



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACION.

**THE AMERICAN BRITISH COWDRAY
MEDICAL CENTER, I.A.P.**
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA.

**“IMPACTO DE DIFERENTES MARCADORES
INTRAFOLICULARES EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO
CON LA APLICACIÓN DE DOS PROTOCOLOS DE INDUCCIÓN
OVULATORIA EN FERTILIZACIÓN IN VITRO”.**

TESIS DE POSTGRADO
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:

GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

P R E S E N T A:

DRA. CYNTHIA DICKTER SARFATI.

ASESOR DE TESIS:
**DR. JUÁN GERARDO BARROSO VILLA.
DR. CARLOS VALDESPIN FIERRO.**

PROFESOR TITULAR:
DR. RODRIGO AYALA YAÑEZ.

.CD.MX., AGOSTO 2017.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DR. J. GERARDO BARROSO VILLA
ASESOR DE TESIS
GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
CENTRO MÉDICO ABC

DR. CARLOS VALDESPIN FIERRO
ASESOR DE TESIS
GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
CENTRO MÉDICO ABC

DR. FÉLIX MUÑUZURI ÍÑIGUEZ
JEFE DE SERVICIO DEL DEPARTAMENTO DE
GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
CENTRO MÉDICO ABC

DR. RODRIGO AYALA YAÑEZ
PROFESOR TITULAR DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
CENTRO MÉDICO ABC
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE MEDICINA UNAM

DR. AQUILES R. AYALA RUÍZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN MÉDICA
CENTRO MÉDICO ABC
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE MEDICINA UNAM

ÍNDICE

1. Agradecimientos.....	5
2. Introducción.....	7
3. Marco teórico	9
a. Reproducción asistida.....	9
b. La complejidad de la individualización de la terapia FIV.....	10
c. Predictores de la respuesta ovárica.....	11
d. Factores de contraregulación homeostática a nivel folicular.....	14
o VEGF.....	15
o NO.....	16
o Leptina.....	17
o Metaloproteinasas.....	18
e. Estimulación ovárica.....	19
f. Principales medicamentos en los protocolos de estimulación ovárica controlada.....	20
g. Nuevos esquemas.....	26
4. Planteamiento del problema.....	29
5. Justificación.....	30
6. Objetivos.....	31
a. Objetivos específicos.....	31
7. Hipótesis alterna.....	31
a. Hipótesis nula.....	31
8. Metodología.....	32
a. Lugar y duración.....	32
b. Universo.....	32
c. Criterios de selección.....	32
d. Material y métodos.....	33
e. Diseño del estudio.....	36
f. Variables del estudio.....	37
g. Cronograma de actividades.....	37

9. Análisis estadístico.....	38
10. Resultados.....	39
11. Discusión y análisis de resultados.....	48
12. Conclusiones.....	52
13. Anexos.....	53
a. Anexo 1.....	53
14. Referencias.....	55

AGRADECIMIENTOS

Intentare expresar en palabras la emoción y la alegría que siento al culminar esta meta, es mucha la gratitud que siento por todos los que han sido parte de ella.

Primero que nada, a la vida, por lo afortunada que soy de haber encontrado una pasión tan grande.

Le dedico esta tesis a mi esposo Isaac, mi compañero y mejor aliado, eres la pieza mas importante de este rompecabezas, gracias por tu apoyo, por tu invaluable paciencia, por tu perfecto amor y por demostrarme que como pareja podemos contra todo, te amo mas que a nada en este mundo, tenerte junto a mi durante este camino ha sido la mejor parte. Flaco; este triunfo no es mío, es NUESTRO.

A mi hermano que donde quiera que se encuentre, se que esta sonriéndome con orgullo, a ti David por iluminar mi camino y hacerme sentir que nunca estoy sola, por enseñarme que la vida es inesperada y solo nos queda vivirla intensamente.

A mi mama, mi cómplice y mejor amiga. Ma: sin ti esto no hubiera sido posible, por estar para mi, por ser mi porrista numero uno, por tener el consejo perfecto, el abrazo mas caluroso y por siempre creer en mi, estaré eternamente agradecida.

A mis hermanos (Michelle y Víctor) y a mis sobrinas (Ella y Marion) por ser mi soporte, por su amor y autenticidad, por enseñarme que la vida es como cada uno la quiera vivir.

Ale y Beto: su ejemplo y cariño han sido fundamentales para mi.

Un especial agradecimiento al Dr. Barroso, maestro de la residencia y de la vida, por permitirme ser parte de un proyecto tan especial, al Dr. Carlos Valdespin por tu paciencia y ayuda en la realización de esta tesis, al Dr. Flores por su profesionalismo, a Lucy

Gracias por su entrega absoluta y todo el equipo de Nacsere por su apoyo incondicional.
A Aláin Sánchez por su ingenio.

A mi hospital, el ABC, que ha sido testigo de mi vida desde el día de mi nacimiento, del cual me siento orgullosa de pertenecer. Gracias a mis jefes de enseñanza (Dr. Ayala y Dr. Alfaro) gracias a todos los doctores que me formaron, que con paciencia y cariño me enseñaron y me vieron crecer. A mis compañeras que se convirtieron en mis hermanas (Janisse y Paty).

Al resto de mi familia y amigos por la comprensión y las trivialidades que hacen que todo esto valga la pena.

Mi agradecimiento es para todos aquellos que se cruzaron por mi vida estos años, a los que me apoyaron, los que me hicieron mas fuerte, a los que creyeron en mi, los que me hicieron madurar, los que me vieron caer y volverme a levantar.

De todo corazón GRACIAS.

INTRODUCCIÓN

Tras un periodo de casi 40 años del primer éxito reproductivo con fertilización in vitro, determinado por el nacimiento de Elizabeth Carr en 1981¹, solo una pequeña parte de la población mundial ha sido beneficiada. Actualmente existen 80 millones de personas con problemas de infertilidad. De los cuales, el 5% se encuentran en el continente europeo y el 1% en Estados Unidos. Estos datos se traducen en una producción mundial de 1.5 millones de ciclos de técnicas de reproducción asistida. Sin embargo, únicamente 350000 resultan en un nacimiento de un recién nacido vivo en casa².

En México, 1.5 millones de mexicanos requieren el uso de técnicas de reproducción asistida de alta complejidad. De acuerdo con cifras del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), el 15% de la población mexicana en edad reproductiva padecen o padecerán algún problema de infertilidad³ y el Consejo Nacional de Población (CONAPO) calcula que el 17% de las mujeres en edad reproductiva en nuestro país padecen de infertilidad⁴. A pesar de ello, menos del 50% acude a un especialista.

Alrededor de un 40% de los motivos de infertilidad, en una pareja están vinculados al hombre, del 20-33% a la mujer, y alrededor del 33% de las parejas se debe a factores inexplicables o derivados de ambas partes⁵. La Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2010, reconoce el tema de la infertilidad como una enfermedad del sistema reproductor, caracterizada por la imposibilidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más, teniendo relaciones sexuales habituales sin protección⁶. El consenso general de los expertos sobre infertilidad, especifica que, en mujeres mayores de 35 años de edad, el abordaje inicial debe realizarse a los 6 meses, debido a la disminución significativa en la reserva ovárica.

Los factores más comunes identificados son: endometriosis, adherencias pélvicas, obstrucción de las trompas, otras anomalías de las trompas e hiperprolactinemia. Otros informes describen los trastornos ovulatorios como responsables de más de la mitad de las causas de infertilidad femenina⁷.

Los tipos de infertilidad se clasifican en: infertilidad primara cuando nunca se ha logrado un embarazo y secundaria cuando existe embarazo previo⁸.

Al día de hoy, la pareja infértil cuenta con más posibilidades de lograr un embarazo que en años previos, la tecnología y la ciencia han avanzado notablemente en pro de la vida, por ejemplo, en el 2016 presenciamos el nacimiento del primer bebé con DNA de tres padres obtenido mediante la técnica de transferencia del huso meiótico^{9,10}. Los conocimientos actuales logran que personas que les era imposible lograr un embarazo, hoy sean padres de más de un niño. Sin embargo, lamentablemente los recursos destinados a la investigación se han distribuido de una manera poco equitativa e igualitaria, colocando a un gran porcentaje de parejas infértiles en una situación de vulnerabilidad.

En realidad, la especie humana es deficiente en el ámbito reproductivo. Durante el transcurso de la vida de una mujer, su mayor porcentaje de embarazo es tan solo del 25% a los 20 años. En cambio, para una mujer de 35 años, sus probabilidades disminuirán drásticamente a un 8%, mientras que, a partir de los 38 años, solo tendrán un 3% de conseguirlo. El hombre se comporta de una manera similar a partir de los 20 años, la funcionalidad y rendimiento del espermatozoides, incluyendo su motilidad decrecerá un 0.7% cada año². Definitivamente, después de los 35 años el porcentaje de que una pareja conciba un embarazo espontáneo es extremadamente bajo, aumentando la probabilidad de alteraciones cromosómicas y el riesgo de una pérdida temprana del embarazo, sin embargo, es fundamental reconocer el derecho reproductivo y la libertad personal, ofreciendo el mejor tratamiento con un alcance universal y no discriminatorio.

En el mundo globalizado en el que vivimos, existen cambios sociales, principalmente en las conductas culturales y estilo de vida, los cuales generan una disminución en el porcentaje de mujeres que desean embarazarse en la edad más fértil de su vida reproductiva (22-35 años). Las nuevas generaciones, tanto hombres como mujeres; buscan crecer y trascender profesionalmente, quieren viajar y romper barreras, conocerse mejor y construir los mejores cimientos para formar una familia. Sin embargo,

el ser humano no ha logrado independizarse totalmente del reloj biológico. Además, se han añadido cambios epigenéticos los cuales en un gran porcentaje atacan fuertemente en el ambiente y el desarrollo de las células gonadales. El consumo de alimentos tóxicos, de hormonas prefabricadas, la ingesta de medicamentos sin prescripción, drogas y tabaquismo, entre otras cosas, han aumentado notablemente la cantidad de parejas infértiles.

MARCO TEÓRICO

REPRODUCCIÓN ASISTIDA

La reproducción asistida se define como el uso de tecnología que incluye la manipulación de gametos y/o embriones para tener un objetivo reproductivo. Existen más de 5 millones de niños nacidos por ciclos desde 1978, y cada año incrementa la cifra de uso de técnicas de reproducción asistida¹⁶.

Se puede dividir en reproducción asistida de: baja, moderada y alta complejidad.

- Baja complejidad: inseminación intrauterina.
- Moderada complejidad: fertilización in vitro (FIV) y transferencia de embriones (FIV, TE), transferencia intratubárica de gametos (GIFT), de cigotos en estadio pronucleos (PROST), de cigotos (ZIFT), de embriones (TET), madres subrogadas.
- Alta complejidad: micromanipulación de gametos, inyección de intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y el uso de la aplicación de columnas de anexina (MACS), micromanipulación de la zona pelúcida, para su fragmentación o adelgazamiento, remoción con micromanipulación de fragmentos entre blastómeras, cultivo prolongado hasta etapa de blastocisto y diagnóstico genético preimplantación.

LA COMPLEJIDAD DE LA INDIVIDUALIZACIÓN DE LA TERAPIA FIV

Aunque la personalización del tratamiento de FIV puede conducir a una mejora en el cumplimiento del paciente y una mejor práctica clínica, está lejos de ser fácil. La dificultad se deriva del gran número de fármacos y opciones disponibles para la estimulación Ovárica Controlada (COS), como los análogos de la Hormona liberadora de Gonadotropina (GnRH), las preparaciones de gonadotrofinas y otras terapias adyuvantes.

Los médicos suelen elegir terapias según criterios anamnésicos y/o clínicos, siendo el más importante el resultado de ciclos previos de FIV. La selección de un protocolo clínico parece mucho más fácil en mujeres que han sido sometidas a intentos previos de FIV. Si un ciclo anterior tuvo un buen desempeño, es probable que el médico se ajuste al protocolo. Por el contrario, si un ciclo anterior tuvo un resultado indeseable, es probable que el protocolo se modifique. Si no se ha realizado ningún ciclo previo, es probable que la elección sea empírica y basada en la preferencia del médico o del centro reproductivo. Los criterios clínicos utilizados por la mayoría de los médicos para seleccionar un protocolo suelen incluir la edad de la mujer, el Índice de Masa Corporal (IMC), las características del ciclo menstrual, características sugestivas de Síndrome de Ovario Poliquístico (PCOS), como el hiperandrogenismo. Un factor clave que determina el resultado de COS y el resultado posterior de la FIV es la selección de la dosis inicial de gonadotropina. La necesidad de individualizar la dosis de gonadotropinas se deriva de la gran variabilidad de la reserva ovárica^{11,12,13,14,15} y consecuentemente, una dosis estándar de gonadotropina puede no ser adecuada para todas las mujeres. La individualización correcta de la dosis inicial de gonadotropina es una decisión clínica extremadamente importante. Por ejemplo, en una mujer con una reserva ovárica normal o elevada, la elección de una dosis de gonadotropina excesivamente baja podría conducir a un desarrollo folicular de tres a cinco ovocitos, perjudicando el ciclo de FIV. Por otro lado, la elección de una dosis excesiva podría provocar una respuesta ovárica excesiva con riesgo posterior de SHO. En los últimos años, la predicción de los extremos de la respuesta ovárica y el ajuste de la dosis consecuente ha sido objeto de interés por parte de los expertos de FIV^{16,17,18,19,20,21}. La obtención de información detallada sobre el potencial

ovárico de una paciente debe considerarse vital antes de comenzar la estimulación. Recientemente, algunos autores han sugerido que la prescripción de medicamentos estándar es inaceptable tanto desde el punto de vista ético y legal, ya que podría tener resultados negativos para la mujer^{21,22}.

La individualización correcta de los protocolos de tratamiento en la FIV debe basarse en la predicción correcta de la respuesta ovárica, especialmente los extremos. El objetivo es elegir el mejor protocolo de tratamiento de acuerdo con diversos factores pronósticos. La predicción de una respuesta pobre o hiper, también permite a los médicos dar a las mujeres información más exacta sobre los resultados esperados. Las pacientes pueden recibir información más precisa sobre la duración del tratamiento, las probabilidades de cancelación del ciclo, el OHSS, la carga del tratamiento y el éxito reducido.

PREDICTORES DE LA RESPUESTA OVÁRICA

Si la personalización se basa en la predicción exacta de la respuesta ovárica, entonces la predicción de la respuesta ovárica debe basarse en los marcadores más sensibles de la reserva ovárica.

El correcto funcionamiento del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal es indispensable en el proceso de maduración de los ovocitos y en la adecuada espermatogénesis. Esto se traduce en la producción de gametos sexuales con características adecuadas para la generación de un embrión sano.

En el ovario, las células de la granulosa expresan receptores para la hormona folículo estimulante (FSH). Conforme aumenta el número de células de la granulosa aparecen uniones entre ellas, facilitando el intercambio de nutrientes y moléculas reguladoras; naturalmente el folículo dominante produce un aumento paralelo de estrógenos, desencadenando una retroalimentación negativa sobre la liberación de FSH por la hipófisis, generando una atresia en los demás folículos. Posteriormente aparecen receptores para la hormona luteinizante (LH) e inicia la producción de progesterona, el

estímulo para generar el pico de LH se desencadena cuando los niveles de estradiol en sangre alcanzan 200 pg/ml durante 48 horas²³.

Sin embargo, el envejecimiento tiene un impacto significativo en la correcta generación y desarrollo de los gametos sexuales. El objetivo de las TRA es documentar la presencia de ovulación; así mismo, generar el crecimiento de uno o más folículos por estímulo exógeno a nivel central o periférico, de acuerdo con la complejidad de la técnica.

La reserva ovárica es la protagonista del éxito de un embarazo, la cual está determinada por diversos factores que nos ayudan a pronosticar el desenlace individualizado de cada paciente.

Se ha observado que en mujeres sometidas a ciclos de FIV, existe un aumento estadísticamente significativo en la tasa de embarazo en mujeres con una edad inferior a 30 años, en comparación con mujeres mayores de 37 años (26 y 9%, respectivamente); así como una disminución en la incidencia de aborto en las pacientes menores de 30 años de edad, en comparación con mujeres mayores de 40 años (50 y 22%, respectivamente)²³.

La concentración basal de FSH determina en gran medida las tasas de cancelación del ciclo de estimulación ovárica y de embarazo, el rango ideal es menor a 15 mUI/ml, tiene una relación inversamente proporcional con la tasa de embarazo. Se ha relacionado que concentraciones séricas basales de estradiol en el tercer día del ciclo menstrual igual o menor a 80 pg/ml favorecen la tasa de embarazo, aunque no se ha podido determinar cuál sería el mejor valor pronóstico²³.

Autores como Barroso y colaboradores desde el 2001, demostraron la relación negativa de altas concentraciones basales de FSH y bajas de LH en suero, relacionadas con las deficiencias en el desarrollo folicular y la calidad del ovocito, colocando esta relación FSH:LH como biomarcador temprano de la respuesta ovárica deficiente²⁵.

En la bibliografía publicada desde la década 1990 se otorga una importancia cada vez mayor al papel desempeñado por las inhibinas como factor pronóstico de la reserva

ovárica en mujeres sometidas a FIV. Las inhibinas son glucoproteínas producidas por las células de la teca y de la granulosa, por las células de Sertoli y, en cantidades pequeñas, por diversos tejidos extragonadales (médula ósea, cerebro, hipófisis, hígado y glándula suprarrenal). Son hormonas importantes para el control del mecanismo de retroalimentación negativa en la secreción de las gonadotropinas hipofisarias. Hay, al menos, dos formas moleculares activas en la circulación sanguínea: la inhibina A y la inhibina B. A medida que aumenta la edad materna, disminuye el número de folículos antrales y, en consecuencia, se reduce la concentración de la inhibina B, lo cual determina un aumento de las concentraciones de FSH. Existe una correspondencia entre el número de ovocitos capturados en MII y los niveles séricos de inhibina B, diversos estudios demostraron que concentraciones mayores a 45 mg/ml favorece a la maduración ovular²³.

Desde el descubrimiento de la hormona antimülleriana (AMH) en el año 1940, se ha considerado como factor determinante relacionado con el reclutamiento folicular y el envejecimiento del ovario, debido a su producción directa por las células de la granulosa de los folículos preantrales y antrales menores a 4 mm. En un meta-análisis se comparó el volumen ovárico, la concentración de FSH, E2 y de inhibina B, la AMH y la edad, demostraron que el mejor marcador de la respuesta ovárica es la AMH, reportando como valor mínimo 0.99 ng/ml²⁴.

Por último, la evaluación del volumen y el número de los folículos antrales mediante ultrasonido pélvico transvaginal, desde la década de 1990 se convirtió en una herramienta importante para el estudio de la reserva ovárica. Barroso y colaboradores, demostraron una tendencia significativa en la determinación basal de FSH, con un incremento significativo en pacientes con ovarios menores de 3 cm³. Además de una mayor tasa de cancelación (36%). En pacientes con ovarios mayores a 3 cm³, se observó mayor número de óvulos en MII y mejor tasa de fertilización y embarazo²⁶.

Barroso y colaboradores, realizaron el primer estudio en México. En el cual, se evidenció una correlación negativa entre el número de óvulos en MII al final de la estimulación vs índice de resistencia perifolicular²⁷.

FACTORES DE CONTRAREGULACIÓN HOMEOSTÁTICA A NIVEL FOLICULAR

La composición del líquido folicular es un posible predictor del potencial de desarrollo de los ovocitos y embriones. Refleja el metabolismo de todo el folículo, contiene moléculas reguladoras que son cruciales para la maduración exitosa de los ovocitos, y es un subproducto de la recuperación del ovocito. Estudios previos han revelado que la concentración de hormonas, factores de crecimiento y especies reactivas de oxígeno en el líquido folicular humano, se han logrado correlacionar con la tasa de fertilización, el potencial de desarrollo de los ovocitos y el resultado del embarazo²⁹.

Debido a la íntima proximidad del líquido folicular con el ovocito maduro, este fluido biológico proporciona una ventana única en los procesos que ocurren durante la maduración folicular. Los componentes específicos dentro del líquido folicular nos ayudan a comprender mejor la señalización intrafolicular, así como revelar biomarcadores potenciales de la salud de los ovocitos para las mujeres sometidas a tratamiento de reproducción asistida²⁸.

En general, el análisis composicional del líquido folicular podría ser una herramienta útil para evaluar el resultado de la FIV²⁹ al determinar de manera directa la calidad ovocitaria por consecuencia de los procesos metabólicos y de sincronización cromosómica.

Autores como Barroso G. y colaboradores, se han dedicado a esclarecer la etiología de las diferentes patologías que afectan en el desarrollo ovocitario y la tasa de fertilización, principalmente en técnicas de reproducción asistida de moderada y alta complejidad, existe evidencia que la mayoría de estas anomalías, pueden ser el resultado de alteraciones en las condiciones intrafoliculares durante la maduración ovular generada por los medicamentos usados en los ciclos de estimulación ovárica controlada. Se han realizado diversos estudios médicos controlados de forma prospectiva, con los principales fármacos utilizados en los ciclos de estimulación ovárica controlada, con el objetivo de desenmascarar los cambios en el ambioma y las concentraciones de los diferentes

componentes del líquido folicular, así como la capacidad de desarrollo del ovocito-embrión.

Su importancia radica en que más del 77% de las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad fallan. Esto se debe a que cada embrión tiene un potencial único y solo una proporción relativamente pequeña de embriones es competente para implantarse después de un ciclo FIV, todas estas anomalías pueden ser resultado de las condiciones intrafoliculares durante la maduración ovular, ya sea de forma natural o durante los ciclos de estimulación controlada²⁹.

Se realizó una búsqueda sistemática de PubMed en todos los artículos publicados hasta Junio 2017, relacionados con los principales bio-marcadores intrafoliculares y sus acciones sobre la reproducción, infertilidad, FIV y estimulación ovárica. Se revisó la literatura disponible para proporcionar una visión general de los conocimientos actuales sobre las funciones fisiológicas y su participación en la función reproductiva femenina y su posible interés como marcador pronóstico en los ciclos de FIV.

- **VEGF**

La angiogénesis es un proceso clave en muchos aspectos de la reproducción humana a partir del desarrollo del sistema reproductivo, juega un papel central en la formación de gónadas sanas, la progresión folicular y la ovulación, el desarrollo del cuerpo lúteo, la proliferación endometrial, la implantación de ovocitos, la placentación, la organogénesis y el desarrollo.

Existen pruebas de que la angiogénesis de las células de la teca tiene un papel primordial en el desarrollo folicular. El aumento de la vascularidad en los folículos da como resultado una mayor superficie vascular para el intercambio de nutrientes transcilarios, gonadotropinas, factores de crecimiento y otros factores asociados. El establecimiento de una red vascular alrededor de los folículos en desarrollo puede ser el proceso de selección del folículo dominante. Un insuficiente suministro de sangre podría actuar como el gatillo que conduce a la atresia folicular³⁰.

La producción alternativa de factores angiogénicos por las células foliculares puede estimular el desarrollo vascular en el folículo dominante. La regulación de la angiogénesis parece depender de la interacción entre muchos factores de crecimiento que pueden actuar en diferentes momentos, algunos de ellos estimulando el crecimiento, mientras que otros median la reorganización de las células endoteliales en una estructura vascular más compleja³⁰.

En el ovario, el VEGF se expresa en las células de la granulosa y de la teca. El VEGF es secretado en el ovario humano premenopáusico de una manera cíclica y regulado por la secreción de gonadotropina durante el ciclo menstrual³². De hecho, el VEGF juega un papel importante en la angiogénesis, la vascularización folicular, la selección folicular dominante, el desarrollo del cuerpo lúteo y la oxigenación intrafolicular^{32,33}. Sin embargo, se ha descrito que durante el proceso de selección folicular, VEGF y el receptor de VEGFR2 incrementan su expresión para favorecer el aporte de nutrientes al folículo. En la ovulación VEGF, VEGFR1 y VEGFR2 reducen su expresión para evitar una hemorragia, y se incrementa inmediatamente después para promover la formación de vasos sanguíneos y el desarrollo del cuerpo lúteo. Posteriormente durante la regresión del cuerpo lúteo los niveles de VEGF y VEGFR2 disminuyen³⁴. Por el contrario, hay resultados negativos sobre la relación entre los niveles de VEGF y la FIV³².

La expresión excesiva de VEGF en áreas donde se necesita angiogénesis parece ser perjudicial³². La liberación excesiva de VEGF por el ovario se ha relacionado con un número incrementado de células de la granulosa activamente secretoras y al aumento de la capacidad secretora de cada célula³³.

- **NO**

El óxido nítrico es un radical libre presente en el microambiente de los ovocitos, el cual desempeña un papel vital en prácticamente todos los pasos del desarrollo de ovocitos, incluyendo maduración meiótica, fertilización, división embrionaria e implantación. Además de retrasar el envejecimiento de ovocitos y mantener la integridad del huso

mitótico. Por lo tanto, la disminución de la biodisponibilidad de NO en determinadas condiciones patológicas podría dar lugar a anomalías en la viabilidad de los ovocitos y en la capacidad de desarrollo. Uno de los principales mecanismos que afectan la biodisponibilidad del NO podría ser su consumo por superóxido, con la consiguiente formación de peroxinitrito altamente reactivo³⁵.

Los niveles de NO están correlacionados inversamente con el potencial de fertilización del ovocito y el desarrollo normal del embrión. Además, la presencia de NO en pacientes con endometriosis e infertilidad tubárica es asociada con la mala calidad ovocitaria y embrionaria³⁵. El NO juega un papel importante en la regulación del desarrollo embrionario. Se ha demostrado previamente que la inhibición de la producción de NO, a su vez, inhibe el desarrollo de embriones de dos células en la etapa de cuatro células. Sin embargo, el exceso de NO también detiene el desarrollo del embrión, posiblemente a través de la producción de radicales libres³⁶.

- **LEPTINA**

En los seres humanos, algunas situaciones clínicas demuestran la interacción entre la leptina y el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. En primer lugar, las mutaciones en el gen de leptina humana y sus receptores son responsables del hipogonadismo hipogonadotrópico. En 1974, Frisch y McArthur demostraron que se necesitaba una cantidad mínima de grasa para el inicio de la pubertad y el mantenimiento de los ciclos menstruales de las mujeres. La leptina está regulada a través de diversos neurotransmisores, como son alfa-MSH, AgRP y neuropéptido, y la leptina se sintetiza en las neuronas localizadas en el núcleo arqueado, proyectándose hacia las neuronas de GnRH^{37,38}.

Recientemente se ha evidenciado la activación de la familia kisspeptins³⁹ ejerciendo un control en los efectos de retroalimentación del estradiol sobre la liberación de GnRH, además de estimular al mRNA con el objetivo de generar un aumento de la expresión del gen Kiss1 en el núcleo periventricular anteroventral (AVPV), el cual es necesario para la generación de los picos ovulatorios de LH⁴⁰. Sin embargo, las kisspeptins coexpresan otros dos neurotransmisores la neuroquinina B y la dinorfina; la neuroquinina B se

describe como un activador de la red KNDy, resultando la liberación de GnRH⁴¹ mientras que la dinorfina inhibe las neuronas KNDy, después de la estimulación por neuroquinina B. Diversos estudios demuestran que altas concentraciones de leptina actúan negativamente en el eje gonadotrópico, bloqueando la vía de la kisspeptins. Esta observación puede explicar el efecto negativo sobre el sistema reproductor femenino; actuando directamente en los ovarios como indirectamente en el sistema nervioso central⁴³.

Karlson y colaboradores, en 1997, demostraron que el receptor de leptina se expresa en el ovario humano, que la leptina está presente en el líquido folicular y que la leptina podría inducir una respuesta biológica en las células ováricas. La leptina no solo participa en el control de la secreción de gonadotropinas a través de sus acciones hipotalámicas/hipofisarias, sino que la leptina circundante o producida localmente también puede proporcionar una modulación directa de la función ovárica. Se ha encontrado en el líquido folicular, con concentraciones correspondientes a las reportadas en suero y desempeña un papel importante en el desarrollo folicular. Por otra parte, la leptina se ha identificado en células de la granulosa, teca y las células intersticiales del ovario humano⁴⁰.

Barroso G. y colaboradores, propusieron que el aumento en los niveles de leptina se podría considerar como otro biomarcador pronóstico, por su relación con eventos hipóxicos foliculares, los cuales pueden generar ovocitos de mala calidad y disminución en la tasa de fertilización.

- **METALOPROTEINASAS**

Las metaloproteinasas intervienen en diversos procesos fisiológicos y patológicos del organismo. Regulan, las vías de señalización que controlan el crecimiento celular, la inflamación y la angiogénesis. Participan en el procesamiento de moléculas bioactivas como citoquinas y factores de crecimiento⁴³. Tanto la MMP-2 como la MMP-9 juegan un papel en la regulación de la angiogénesis durante la cicatrización de heridas mediante la

activación de citoquinas proangiogénicas, incluyendo TNF- α y VEGF, generando péptidos antiangiogénicos⁴⁴. La actividad de las MMP en el espacio extracelular está regulada tanto por los inhibidores de metaloproteinasas de origen sérico como por los derivados de tejidos. Las MMP y sus inhibidores endógenos se denominan sistema MMP. Los inhibidores tisulares de las MMPs (TIMPs) son abundantes en los tejidos reproductores, regulados hormonalmente, e involucrados en numerosos procesos ováricos.

La fragmentación y disociación de la matriz del tejido conectivo, y de las fibras de colágena en la túnica albugínea y la teca externa previas a la ruptura folicular, se han correlacionado con un aumento en la actividad de las metaloproteasas presentes en los tejidos y en el líquido folicular. Existen metaloproteinasas con actividad de desintegrina que son capaces de bloquear la activación de la angiogenia inducida por el VEGF⁴⁴.

Durante el proceso ovulatorio, las MMPs intervienen en el remodelado y la disolución de la membrana basal de la célula de la granulosa y la fragmentación de la matriz extracelular de la pared folicular, permitiendo que el ovocito sea liberado⁴⁴.

ESTIMULACIÓN OVÁRICA

En un ciclo ovárico natural, el reclutamiento folicular es de un ovocito, sin embargo, algunas mujeres sufren de ciclos anovulatorios por diferentes causas. El objetivo de las técnicas de reproducción es documentar la presencia de ovulación, así mismo generar el crecimiento de uno o más folículos, de acuerdo a la complejidad de la técnica. En las técnicas de baja complejidad el fin es obtener 2-3 óvulos, en técnicas de alta complejidad se buscan 6-10 óvulos además de la madurez y la calidad de los mismos. Se procura obtener un reclutamiento folicular sincrónico y un endometrio receptivo. El fin es evaluar la mejor respuesta ovárica, individualizar los tratamientos, evitar el síndrome de hiperestimulación ovárica, y embarazos múltiples.

Los avances tecnológicos en esta área van en crecimiento, se tiene un mejor entendimiento de los mecanismos de la ovulación, el ciclo endometrial, y del desarrollo

embrionario. La transferencia de múltiples embriones en al mismo tiempo aumentó la posibilidad de que al menos uno se implante y se logre un nacimiento vivo⁴⁵. La consecuencia natural de esta práctica fue un aumento en las gestaciones múltiples.

Existen diversos protocolos, principalmente se dividen en baja y alta complejidad. En los tratamientos de baja complejidad se requiere protocolos de estimulación suave o mínima, que lleven a la obtención de no más de cuatro ovocitos, mientras que en los de alta complejidad se requiere de más óvulos, por lo que los tratamientos suelen ser algo más agresivos. En la mayoría se utilizan protocolos que incluyen inyecciones diarias de hormona folículo-estimulante exógena (FSH), ya que se ha demostrado mayor reclutamiento de ovocitos, así como mayores tasas de nacidos vivos por ciclo de FIV⁴⁵, en la actualidad existen un mundo de opciones con la finalidad de personalizar los ciclos de estimulación.

Tanto las preparaciones estándar como las de acción prolongada de FSH, provocan un aumento de los niveles séricos de FSH logrando la estimulación multifolicular en los ovarios. Sin embargo, los efectos no estrógenicos de los ciclos de estimulación ovárica controlada no sólo disminuye la receptividad endometrial por medio de vías de señalización genética-inmunológica, por medio de la metilación de los genes que propician la ventana de implantación, sino que también puede interferir con el desarrollo embrionario y placentario, lo cuál se ve claramente afectado en el resultado.

PRINCIPALES MEDICAMENTOS EN LOS PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN OVARICA CONTROLADA

- **Citrato de clomifeno**

Es el medicamento de primera línea en estimulaciones de baja complejidad, en pacientes con adecuada funcionalidad en el eje hipotalámico-pituitario-ovárico, es un receptor modulador selectivo de estrógenos (SERM). Funciona como una sustancia antiestrogénica, la cual impide la comunicación normal entre los ovarios y el eje hipotálamo- hipófisis. Genera una regulación negativa, por el bloqueo en el receptor de

estrógeno a nivel hipofisario, aumentando la secreción de FSH/LH alcance el pico. En los casos de pacientes con oligomenorrea (anovulatorios), este mecanismo consigue el crecimiento y desarrollo de un folículo dominante en 70% de las pacientes, con la consecuente ovulación⁴⁶. Los efectos secundarios son la falta de estrógeno a otros niveles como: engrosamiento endometrial y moco cervical, lo que lleva a una menor tasa de embarazo aunque exista una ovulación adecuada.

Se inicia habitualmente el día 3, 4 o 5 del ciclo a una dosis de 50 mg diarios durante cinco días. Si la ovulación no ocurre en el primer ciclo de tratamiento, la dosis se incrementa 50 mg a una dosis máxima diaria de 150 mg hasta que se alcanza la ovulación.

- **Inhibidores de la aromatasa**

Los inhibidores de la aromatasa actúan por supresión en la producción de estrógeno, ya que bloquean la conversión de andrógenos a estrógenos mediante una inhibición en la acción de la aromatasa. Al existir la falta de estrógenos, aumentan los andrógenos intrafolículos y a su vez, la expresión de receptores para FSH; esta retroalimentación favorece la producción de gonadotropinas, pero sin tener los efectos adversos antiestrogénicos del citrato de clomifeno⁴⁷.

Un estudio aleatorizado y un metaanálisis de nueve estudios clínicos en mujeres con SOP sugieren que la terapia con letrozol aumenta las tasas de nacidos vivos y ovulación en comparación con la terapia con clomifeno. El efecto es aun mayor en mujeres obesas con SOP (IMC > 30 kg / m²)⁴⁸. Sin embargo, los efectos no estrogénicos aun no se han descrito totalmente, autores como Barroso G. y colaboradores, describen por primera vez los efectos en la co-metilación del DNA, principalmente en las vías de señalización de GnRH, maduración ovocitaria dependiente de progesterona y respuesta inflamatoria a nivel endometrial que reduce la ventana de implantación.

- **Gonadotropinas**

Existen diferentes tipos, las más utilizadas son las gonadotropinas menopáusicas humanas (hMG) y las gonadotropinas recombinantes (r-FSH y r-LH).

Las gonadotropinas son utilizadas con mayor frecuencia en reproducción asistida de alta complejidad, dado que la respuesta ovárica permite un desarrollo folicular múltiple, se debe de tener cuidado con el síndrome de hiperestimulación ovárica.

Actualmente no se ha definido cuales inducen mejor respuesta, pero se sabe que en casos de gonadotropinas recombinantes, los lotes del producto siempre serán idénticos, mientras que en los casos de gonadotropinas menopáusicas purificadas pueden variar.

En un meta-análisis de 14 estudios en 1726 mujeres, no se encontraron diferencias en las tasas de embarazo⁴⁹.

- **Hormona folículo estimulante (FSH)**

La FSH es la hormona responsable del proceso de reclutamiento folicular y del desarrollo del folículo dominante. El uso de FSH exógena sirve para lograr una hiperestimulación ovárica controlada.

- **Análogos de la GnRH**

Los análogos de GnRH se utilizan para evitar el pico de LH y por consecuente la ovulación. Además de lograr sincronía en el ciclo y evitar la luteinización prematura. Según diversos estudios, se ha visto que la luteinización prematura se produce en 5 a 35% de los ciclos con agonistas y en 5 a 20% de los ciclos con antagonistas⁵⁰.

- **Agonistas de GnRh**

Los agonistas de GnRH, son hormonas con composición similar a la hormona endógena, que al unirse a receptores de GnRH, al principio liberan hormona endógena (efecto flare-

up), hasta que satura todos los receptores por lo que la hormona se deja de secretar y la liberación de gonadotropinas hipofisarias (FSH y LH) queda inhibida.

Por el efecto flare-up, este debe iniciarse 1-2 semanas antes que termine el ciclo menstrual y se continua en el nuevo ciclo para evitar la estimulación ovárica fisiológica y simultáneamente administrar FSH y LH exógenas para lograr la estimulación de más de 1 folículo en ese ciclo.

Es importante notar que la dosis inicial se reduce a la mitad una vez se inicia el estímulo con las gonadotropinas. En el caso de protocolos cortos y ultracortos, el agonista se inicia el primer o segundo día del ciclo menstrual y las gonadotropinas al día siguiente; si el esquema es corto, luego de tres días se baja la dosis a la mitad y se continúa hasta el final de la estimulación; si es ultracorto, solo se emplea por tres días.

- **Antagonistas de GnRH**

Los antagonistas de GnRH son hormonas que bloquean directamente los receptores de GnRH, bloqueando la producción de FSH y LH. Su acción es inmediata y su vida media corta, por lo que no generan efecto flare-up.

A diferencia de los agonistas, los antagonistas evitan el pico prematuro de LH, además de ser un medicamento más amigable puesto que se emplea menos días que el antagonista⁵¹.

- **hGC**

Una vez que se tienen ovocitos maduros (metafase II), es necesario producir un pico de LH para lograr capturarlos. Actualmente se intenta reproducir este evento, mediante la administración de hormona gonadotropina coriónica (hCG), ya que esta tiene una constitución muy similar a la LH y alcanza a actuar sobre los mismos receptores, produciendo el mismo efecto. Se encuentra en preparaciones urinarias y recombinantes.

Esta hormona se emplea una vez que se observa por ultrasonido transvaginal, al menos 3 folículos de 18-20 mm de diámetro, y se corrobora con la medición de estradiol en sangre la cual debe de calcularse, > 200 pg/ml por cada folículo > 17 mm. La hCG actúa en

promedio a las 37 o 39 horas luego de haber sido administrada, por lo que la aspiración folicular debe realizarse entre 35 y 36 horas luego de su aplicación.

ESQUEMAS CON AGONISTAS DE GNRH

- **Esquema largo**

En este esquema se inician los medicamentos en el ciclo menstrual anterior al ciclo de FIV, ya sea con un agonista o un antagonista de GnRH o anticonceptivos orales.

Consiste en la administración diaria subcutánea del agonista en el día 21 del ciclo o 7 días antes de la próxima menstruación, para disminuir la dosis a la mitad a partir del tercer día del ciclo, posteriormente se agrega FSH recombinante (rFSH) o HMG (menotropinas) en un régimen decreciente, simultáneamente existe un seguimiento folicular por ultrasonido transvaginal y determinaciones de estradiol en suero. Al lograr 3 o más folículos ≥ 18 mm, se administra HCG y se programa la captura alrededor de 36-37 horas después.

Las ventajas son: la sincronización de la cohorte folicular que reduce el crecimiento folicular asincrónico durante la estimulación, esto mejora el número de óvulos maduros obtenidos.

En un metaanálisis de 37 ensayos se encontró que los protocolos largos, tienen más éxito que los cortos cuando se utiliza agonista de GnRH como supresor hipotalámico, reportando una tasa de embarazo OR 1,50, IC del 95% 1,16-1,93.⁵²

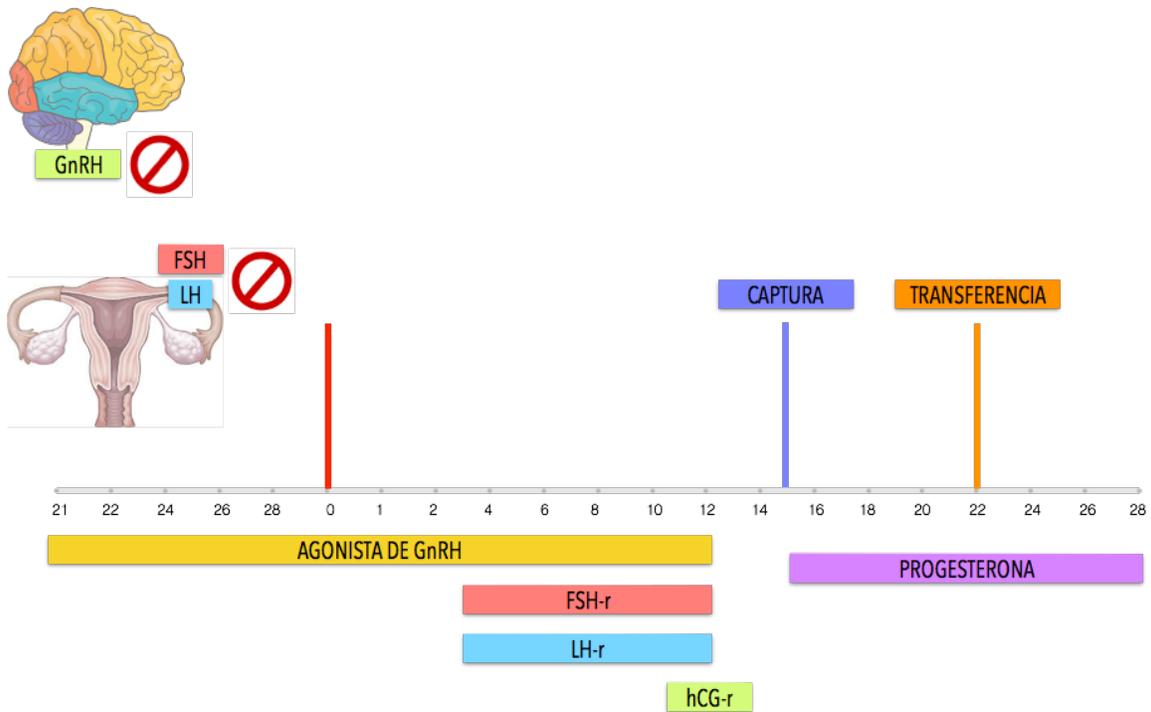


Figura 1. Ejemplo de estimulación ovárica, protocolo largo.

- **Esquema corto**

En este esquema los medicamentos se inician en el momento del ciclo menstrual natural. La estimulación se logra con gonadotropinas menopáusicas humanas (hMG) y/o FSH recombinante, la ovulación espontánea se bloquea con un agonista de GnRH o con un antagonista de GnRH. Los antagonistas de GnRH se prefieren sobre los agonistas de GnRH para el protocolo corto por que no existe el efecto de flare-up.

Las ventajas son: es mas utilizado en pacientes con disminución de la reserva ovárica. Se aprovecha el efecto estimulador inicial del agonista el cual se aplica a partir del segundo día de la menstruación y al tercer día se agrega la FSH recombinante o la HMG, posteriormente se continua igual que el esquema largo.

Las desventajas son: menor tasas de embarazo, posible rescate del cuerpo luteo anterior, no tan buena sincronización de la cohorte folicular y menor flexibilidad en los ciclos.

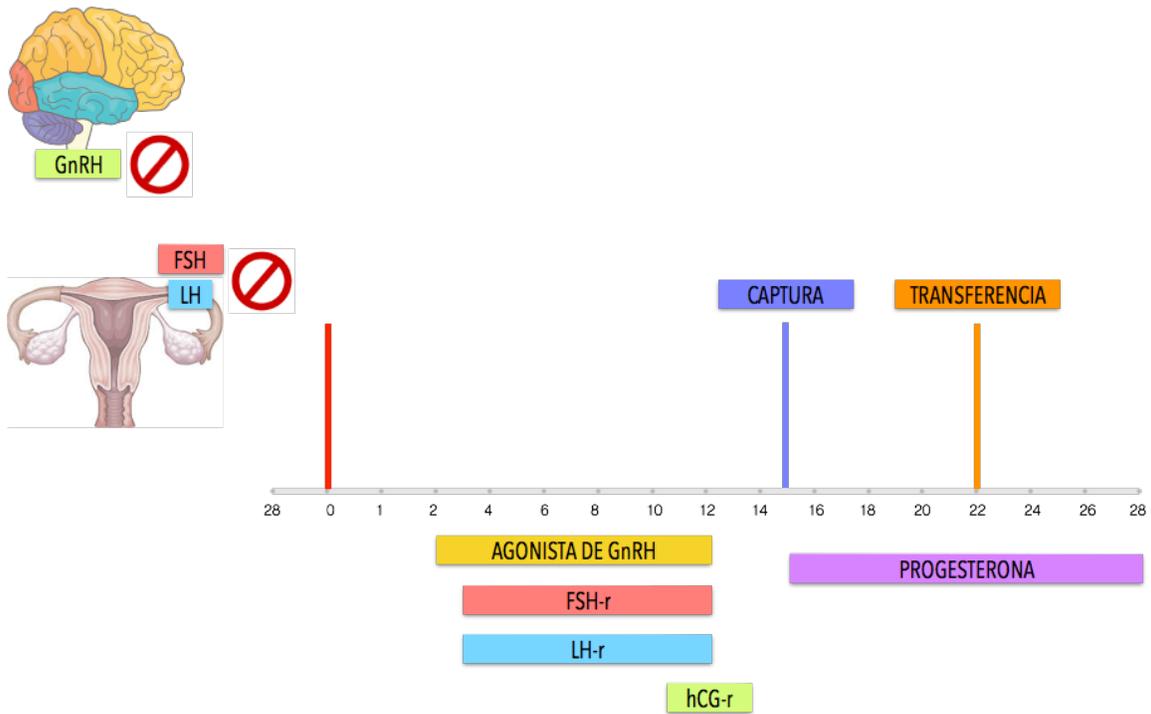


Figura 2. Ejemplo de estimulación ovárica, protocolo corto.

NUEVOS ESQUEMAS

- **Corifolitropina Alfa:**

Es una hormona foliculo estimulante con una duración de acción mayor que permite mantener el crecimiento folicular múltiple durante una semana entera con una única inyección subcutánea. De esta forma, la dosis recomendada puede sustituir las siete primeras inyecciones de cualquier preparación de FSH recombinante diaria en un ciclo de tratamiento de Estimulación Ovárica Controlada.

La calidad de los ovocitos y embriones obtenidos con corifolitropina alfa son equiparables con los obtenidos en tratamientos con FSHr. Puede mejorar el cumplimiento terapéutico, por la disminución de los errores de administración, ya que podría disminuir el numero de inyecciones administradas a la paciente en un 70% en comparación a la

FSHr. Se simplifican los esquemas, el tratamiento se vuelve más fácil y adaptable, y se evitan los olvidos de aplicación.

El mecanismo de acción de la corifolitropina alfa se ha diseñado como un estimulante folicular sostenido con el mismo perfil farmacodinámico que FSHr, pero con una duración de la actividad FSH sustancialmente prolongada. Por su capacidad para iniciar y mantener el crecimiento folicular múltiple durante una semana entera, se consiguió una larga duración de la actividad FSH añadiendo el péptido carboxi-terminal de la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana (hCG) a la cadena β de la FSH Humana. Corifolitropina alfa no presenta ninguna actividad LH/hCG intrínseca⁵³.

Barroso G. y colaboradores, realizaron el primer estudio mexicano que comparo el tratamiento con corifolitropina alfa en pacientes con un ciclo previo de FIV-ICSI con un esquema de estimulación ovárica tradicional, concluyeron que este fármaco representa un esquema de estimulación ovárica mas amigable y quizá con menor costo económico para la paciente, sin resultados inferiores a los observados con un esquema de estimulación tradicional, la bibliografía insiste en el riesgo de hiperestimulación ovárica, aunque en estos casos no se presento, también se observaron concentraciones menores de estradiol sérica, las cuales no afectaron de forma negativa el desarrollo endometrial ni el desenlace reproductiva. . Si tomamos en cuenta que se trato de un segundo ciclo de fertilización in vitro, se observe una tasa superior de embarazo⁵⁴. En el 2015 se realizo un meta-análisis, donde se demostró que el uso semanal de FSH de acción prolongada en dosis de 150 a 180 mcg resultó en tasas de nacidos vivos similares en comparación con las inyecciones diarias de FSH⁵⁵.

A partir de la generación de un embrión completamente sano, es indispensable continuar con la preparación del resto del aparato reproductivo, en técnicas de baja complejidad es fundamental crear un medio ambiente favorecedor en el canal vaginal y cervical, que le permita al espermatozoide entrar al útero, sin embargo, esta homeostasis es muy lábil, diversos factores como los microorganismos distintos a la biota habitual, los cuales pueden estar asociados o no a enfermedades de transmisión sexual, induce una contaminación del tejido cervical y/o vaginal, así como, del tracto reproductivo masculino; desencadenando

una respuesta inmune proinflamatoria mediada principalmente por citosinas, quimiocinas y factores inmunológicos (IL-1B, CCL20, IL-6, IL-8 y factor de necrosis tumoral, entre otros). Recordando que en condiciones optimas sólo el 1% de los espermatozoides pasaran al útero, así en condiciones suboptimas las posibilidades de embarazó disminuyen en forma significativa. Como describen la gran mayoría de los especialistas en relaciones humanas, la comunicación es lo más importante, una situación similar sufren los gametos sexuales, es requisito indispensable tener una adecuada comunicación entre ambos gametos, la cual depende en gran medida de la permeabilidad tubárica, existen diferentes patologías que favorecen procesos de inflamación en la tuba uterina, lo que se traduce en la obstrucción parcial o total de la misma, incluyendo microorganismos como *Chlamydia*, los cuales benefician la producción de mediadores inmunológicos, entorpeciendo el correcto funcionamiento de los gametos e incluso la muerte, y lo más importante dificultando el proceso de fertilización.

En técnicas de moderada y alta complejidad, si las condiciones son las adecuadas; se generara un embrión con el 60% de probabilidades de conseguir una correcta implantación y un embarazo exitoso.

Finalmente a pesar de que los otros factores tienen como resultado la generación de un embrión sano, el embarazo no sería posible sin la presencia de un adecuado sitio de implantación, por lo que es fundamental que la cavidad uterina se encuentre en optimas condiciones para recibir al embrión, la presencia de patología uterina de origen congénito o derivada de patologías adquiridas se traduce en fallas en la implantación o abortos de repetición, es importante recordar que la respuesta inmune inflamatoria genera un ambiente tóxico para el embrión y con ello disminución de la ventana de implantación en el endometrio, por tal motivo debemos de restringir el daño que terminan por evitar el objetivo final de la pareja, que siempre será un recién nacido sano en casa.

Los diagnósticos y tratamientos actuales son muchos mas específicos, los conocimientos sobre el genoma, el ambioma y la relación que tienen con las enfermedades causales de infertilidad, de calidad ovocitaria y cromosopatías, han abierto un abismo de posibilidades para lograr tratamientos exitosos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿El uso de nuevas terapias farmacológicas (corifolitropina alfa) en la estimulación ovárica controlada, modifica las condiciones intra-foliculares del óvulo, con repercusión en los procesos de fertilización y desarrollo embrionario en pacientes sometidas a ciclos de fertilización in vitro?

JUSTIFICACIÓN

La demanda de ciclos de fertilización in vitro ha crecido exponencialmente desde su primer caso de éxito. En un inicio, los tratamientos de alta complejidad dependían de la ovulación de un solo folículo dominante lo que mantenía las tasas de éxito en un bajo porcentaje. A partir de la introducción de las gonadotropinas como parte del tratamiento de fertilización in vitro, las tasas de éxito aumentaron, ya que facilitaron la producción de un mayor número de embriones por ciclo a partir de la captura de un mayor número de ovocitos maduros. Derivado de estos resultados, el consumo de estos medicamentos de estimulación ovárica se ha incrementado exponencialmente en los últimos años.

Los esquemas tradicionales de estimulación ovárica para ciclos reproductivos de alta complejidad (FIV/ICSI) son de uso diario, además de ser incómodos y dolorosos para la paciente ya que la vía de administración es subcutánea. Adicionalmente, el costo de dichos medicamentos es excesivo, por lo que el apego al tratamiento suele ser difícil, aumentando el estrés emocional que finalmente repercute en los resultados de éxito. En los últimos años, la tecnología nos ha permitido desarrollar inductores de la ovulación con tecnología recombinante de aplicación única y liberación prolongada que facilitan el uso, seguimiento y apego a los tratamientos de fertilización in vitro.

Queda por definir si el uso de estas terapias farmacológicas modifican las condiciones intra-foliculares del ovocito, con repercusión en los procesos de fertilización, desarrollo embrionario e implantación en métodos de fertilización in vitro.

OBJETIVOS

- Cuantificar los niveles intra-foliculares de: i) factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), ii) óxido nítrico (ON), iii) metaloproteinasas y iv) leptinas, para evaluar su relación con los procesos de fertilización en pacientes sometidas a fertilización in vitro con corifolitropina alfa y gonadotropinas recombinantes (FSH recombinante).

OBJETIVO ESPECIFICOS

- Comparar las concentraciones foliculares de óxido nítrico, metaloproteinasas, VEGF, y leptinas en pacientes sometidas a un protocolo convencional de estimulación ovárica controlada para técnicas de alta complejidad vs pacientes sometidas a un protocolo alternativo de estimulación ovárica con FSHr de depósito.
- Comparar la madurez ovocitaria (metafase II) de cada uno de los esquemas de estimulación y su relación con los niveles intra-foliculares de los diferentes marcadores.
- Comparar la tasa de fertilización de cada uno de los esquemas de estimulación y su relación con los niveles intra-foliculares de los diferentes marcadores.

HIPÓTESIS ALTERNA

- El esquema de inducción de ovulación con corifolitropina alfa en comparación con el esquema tradicional, modifica los factores intra-foliculares de diferentes marcadores, impactando sobre la madurez ovocitaria y los procesos de fertilización.

HIPÓTESIS NULA

- El esquema de inducción de ovulación con corifolitropina alfa en comparación con el esquema tradicional, no modifica los factores intra-foliculares de diferentes marcadores.

METODOLOGÍA

LUGAR Y DURACIÓN

- El estudio se realizó en una clínica privada especializada en técnicas reproductivas de baja y alta complejidad en la Ciudad de México, (Centro de Investigación en Ciencias Reproductivas NASCERE) y fue aprobado por el comité de investigación y ética del Centro Médico ABC (ABC-18-35).
- La planeación, elaboración y análisis de los resultados se llevó a cabo a lo largo de Enero a Julio del 2017.

UNIVERSO

Se incluyeron a 40 pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión y de exclusión, las cuales fueron sometidas a 2 diferentes protocolos de estimulación ovárica para la realización de FIV/ICSI.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de inclusión:

- Pacientes de 25 a 45 años de edad, con indicación para técnicas reproductivas de alta complejidad (FIV/ICSI).

Criterios de exclusión:

- Hipersensibilidad a la sustancia activa o a cualquiera de los excipientes.
- Tumores de ovario, mama, útero, glándula hipofisiaria o hipotálamo.
- Sangrado vaginal anormal o de causa desconocida.
- Quistes ováricos o aumento del tamaño de los ovarios.
- Historia de síndrome de estimulación ovárica.

- Ciclo previo de estimulación ovárica controlada con resultado de más de 30 folículos, con diámetro ≥ 11 mm medido por usg.
- Recuento basal de folículos antrales > 20 .
- Fibromas uterinos incompatibles con el embarazo.
- Malformación de los órganos reproductores incompatibles con el embarazo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las pacientes se asignaron aleatoriamente en dos grupos:

Grupo A: Protocolo a base de corifoliotropina-alfa (Lyrixtim®, MSD), se administró dosis única de 150 μ g de dicho medicamento en el día 3 del ciclo menstrual (considerando el día 1, como el primer día de sangrado menstrual abundante), siempre y cuando, la medición basal de estradiol sérico (E2) fuera ≤ 80 pg/mL y la medición basal de progesterona (P4) sérica fuera ≤ 1.0 ng/mL. Adicionalmente, la aplicación de corifoliotropina-alfa se complementó con la administración diaria de 300 UI de hormona folículo estimulante recombinante (rFSH Gonal F® y Merck) a partir del día 8 del ciclo menstrual hasta el día del disparo. El esquema de estimulación se llevo a cabo bajo protocolo con antagonista utilizando 0.25 mg de Cetrotide® de forma rutinaria a partir del día 7 del ciclo menstrual. Finalmente, cuando se alcanzaron 3 folículos ≥ 17 mm, se utilizó una dosis única de 250 μ g coriogonadropina alfa recombinante (rhCG (Ovidrel® Merck) para desencadenar la ovulación. Treinta y seis horas después de la dosis de rhCG se realizó la captura de ovocitos, utilizando la técnica de fertilización ICSI para todos los ovocitos maduros.

Grupo B: Protocolo de estimulación mixta con dosis diaria de 300 UI de hormona folículo estimulante recombinante rFSH (Gonal F® Merck), más 150 UI de menotropinas uhMG (Merapur®; Ferring), a partir del día 3 del ciclo menstrual (considerando el día 1, como el primer día de sangrado menstrual abundante) hasta el día de disparo. El esquema de estimulación se llevo a cabo bajo protocolo con antagonista utilizando 0.25 mg de

Cetrotide® de forma rutinaria a partir del día 7 del ciclo menstrual. Finalmente, cuando se alcanzaron 3 folículos ≥ 17 mm, se utilizó una dosis única de 250 μg coriogonadropina alfa recombinante (rhCG (Ovidrel® Merck) para desencadenar la ovulación..

La reserva ovárica se evaluó rutinariamente por el número de folículos preantrales (recuento folicular antral) en el día 3 del ciclo menstrual y al menos 3 folículos antrales fueron observados por ovario en todos los casos. Posteriormente, se realizó control ultrasonografico y hormonal (medición de estradiol y progesterona) durante los días de estimulación ovárica controlada.

Los ovocitos recuperados fueron denudados 2 horas después de la captura ovular y los ovocitos en metafase II (ovocitos maduros) fueron fertilizados mediante la técnica ICSI. Finalmente, la tasa de fertilización se evaluó 18 horas más tarde.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ÁCIDO BICINCONÍNICO.

Las proteínas totales obtenidas de los medios de cultivos se cuantificaron mediante el reactivo Pierce™ BCA Protein Assay Kit, (Thermo Scientific), mediante la construcción de una curva estándar a una absorbancia de 542 nm utilizando el software Gen5 3.0 en el equipo Synergy HT Biotek.

ZIMOGRAFIA MMP-9 Y -2.

La actividad gelatinolítica de los medios condicionados del cultivo se determinó mediante geles geles/sustrato. Alícuotas de 10 μg de proteína de cada uno de los medios fueron sometidos a electroforesis en geles de poli-acrilamida al 8% con dodecil sulfato de sodio (SDS) co-polimerizados con gelatina tipo A de piel porcina (Sigma, St. Louis, MO, USA) al 1% en condiciones no desnaturalizantes,⁵⁶ utilizando un sistema con formato de minigel (Bio-Rad, Richmond, CA). Las zonas de actividad enzimática aparecieron como bandas de lisis claras contra un fondo de sustrato no degradado. En cada experimento se incluyeron marcadores de actividad para MMP-2 y MMP-9 usando el sobrenadante

obtenido de la línea celular de promielocitos U937.⁵⁷ Las bandas obtenidas fueron analizadas por densitometría mediante analizador de imágenes (UVP, Southern, CA, USA) y expresadas como unidades arbitrarias.

CUANTIFICACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (NITRITOS Y NITRATOS).

La concentración de óxido nítrico en los medios condicionados de los co-cultivos, se evaluó de manera indirecta mediante un ensayo comercial de ELISA, utilizando el Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, de (Cayman Chemicals, Mi, USA), con un límite de detección de 2.5 μM . El volumen de muestra utilizado fue de 80 μL en cada uno de los pozos. La curva estándar se construyó con siete estándares y un blanco que se usaron por duplicado: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 μM de nitratos. La placa fue leída a una absorción de 540 nm.

CUANTIFICACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF).

Se cuantificó en los medios de co-cultivo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) humano mediante un ensayo comercial Human VEGF DuoSet ELISA (R&D, Minneapolis, USA), con un rango de sensibilidad de 31.3 - 2,000 pg/mL. El volumen de muestra a utilizado fue de 100 μL por pozo. La curva estándar se construyó con un blanco y siete estándares: 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 pg/mL de VEGF . La lectura de la placa se realizó a 450 nm.

CUANTIFICACIÓN DE LEPTINA

La Leptina fue cuantificada mediante inmunoensayo de ELISA, con el kit Human Leptin DuoSet (R&D, Minneapolis, USA), con un rango de sensibilidad de 31.3 - 2,000 pg/mL. La curva estándar consistió de un blanco y siete estándares: 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 pg/mL de leptina recombinante humana. Se utilizó un volumen de 100 μL para cada una de las muestras. La lectura de la placa se realizó a 450 nm.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Tipo de Investigación.

Experimental

Observacional

Tipos de Diseños.

Experimental Ensayo Clínico

Estudio de Cohorte

Estudio de Casos y Controles

Estudio Transversal

Características del Estudio

Analítico Descriptivo

Prospectivo Prospectivo

Longitudinal Transversal

VARIABLES DEL ESTUDIO.

Independiente:

- Corifolitropina Alfa
- FSH Recombinante de uso diario
- Menotrofina gonadotrofina postmenopausica humana urinaria.

Dependiente:

- ON en líquido folicular
- VEFG en líquido folicular
- Metaloproteinasas 9 en líquido folicular
- Leptina en líquido folicular
- Estradiol en suero
- Madurez ovocitaria
- Tasa de fertilización

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	FECHA
Búsqueda de la Información	Enero 2017
Diseño del proyecto de investigación	Febrero 2017
Evaluación por comités	Marzo 2017
Recolección de muestras	De marzo- junio 2017
Análisis de resultados	Julio 2017
Redacción de artículo para publicación	A partir de Agosto 2017

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Realizamos estadística descriptiva que incluye medidas de tendencia central y de dispersión, las variables categóricas expresadas como medidas de frecuencia absoluta y relativa y las variables lineales como media y desviación estándar (DE) o mediana y rangos intercuartilares (RIQ) según corresponda a la distribución de frecuencias. La normalidad de las variables incluidas fue analizada con la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Las pruebas de hipótesis para evaluar variables lineales son la prueba de t de Student o prueba de U de Mann Whitney para muestras independientes. Las variables categóricas serán analizadas con prueba de Chi cuadrada o prueba exacta de Fisher. El error alfa ajustado menor de 5% ($p < 0.05$) a dos colas será considerado significativo. Se utilizó la paquetería estadística STATA SE versión 11.1.

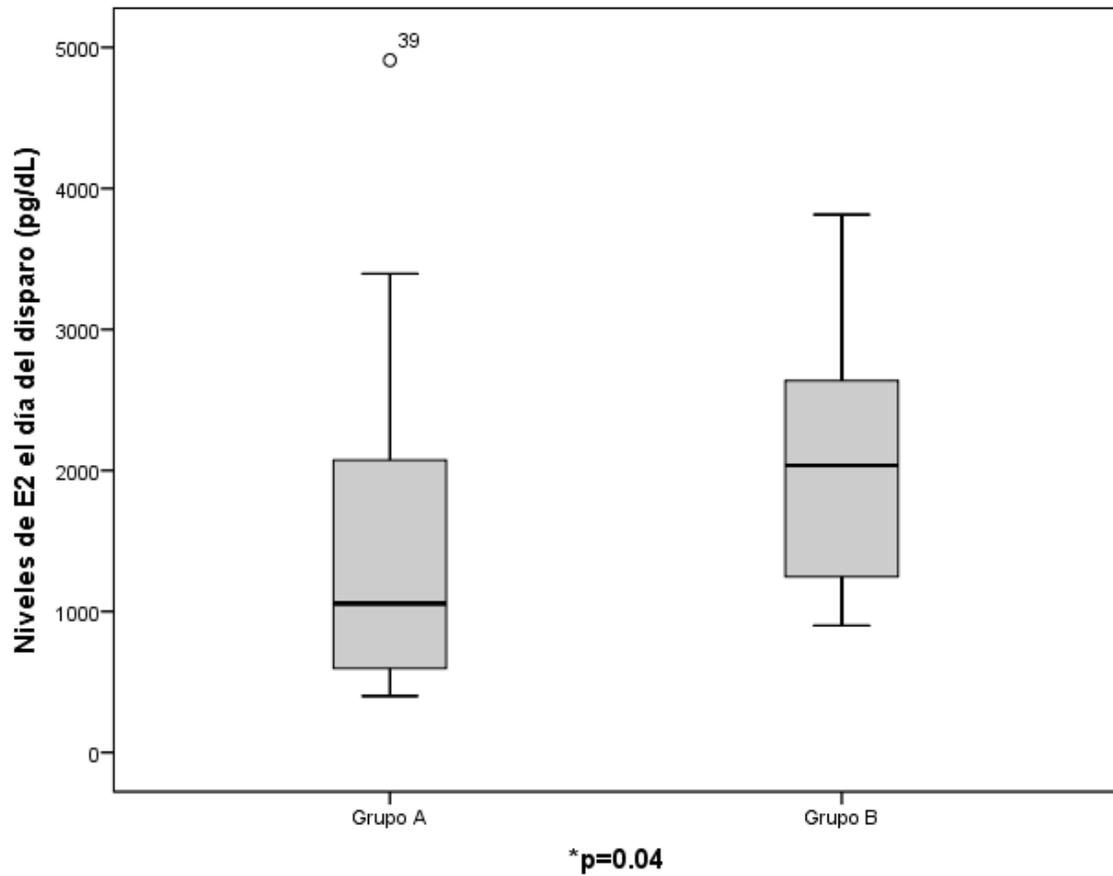
RESULTADOS

Un total de 40 pacientes participaron en el estudio, de las cuales, 20 pacientes fueron consideradas en el grupo A (pacientes estimuladas con corifolitropina-alfa) y 20 en el grupo B (pacientes estimuladas con FSHr/HMG). La edad promedio global fue de 36 años (SD \pm 4.6), y el IMC promedio de 23.2 kg/m²(SD \pm 4.5). No existen diferencias significativas entre ambos grupos por lo que sabemos que la población del estudio es homogénea. En ambos grupos se midió el E2 y la P4 en día 3 del ciclo menstrual. No existieron diferencias significativas en los niveles basales de E2 (34.9 \pm 15.9 vs 33 \pm 16.9) y P4 (1.1 \pm 0.7 vs 0.9 \pm 0.3). Adicionalmente, tampoco se encontraron diferencias significativas en el recuento folicular (10 \pm 5 vs 9.4 \pm 2.5), confirmando una vez más la homogeneidad de los grupos.

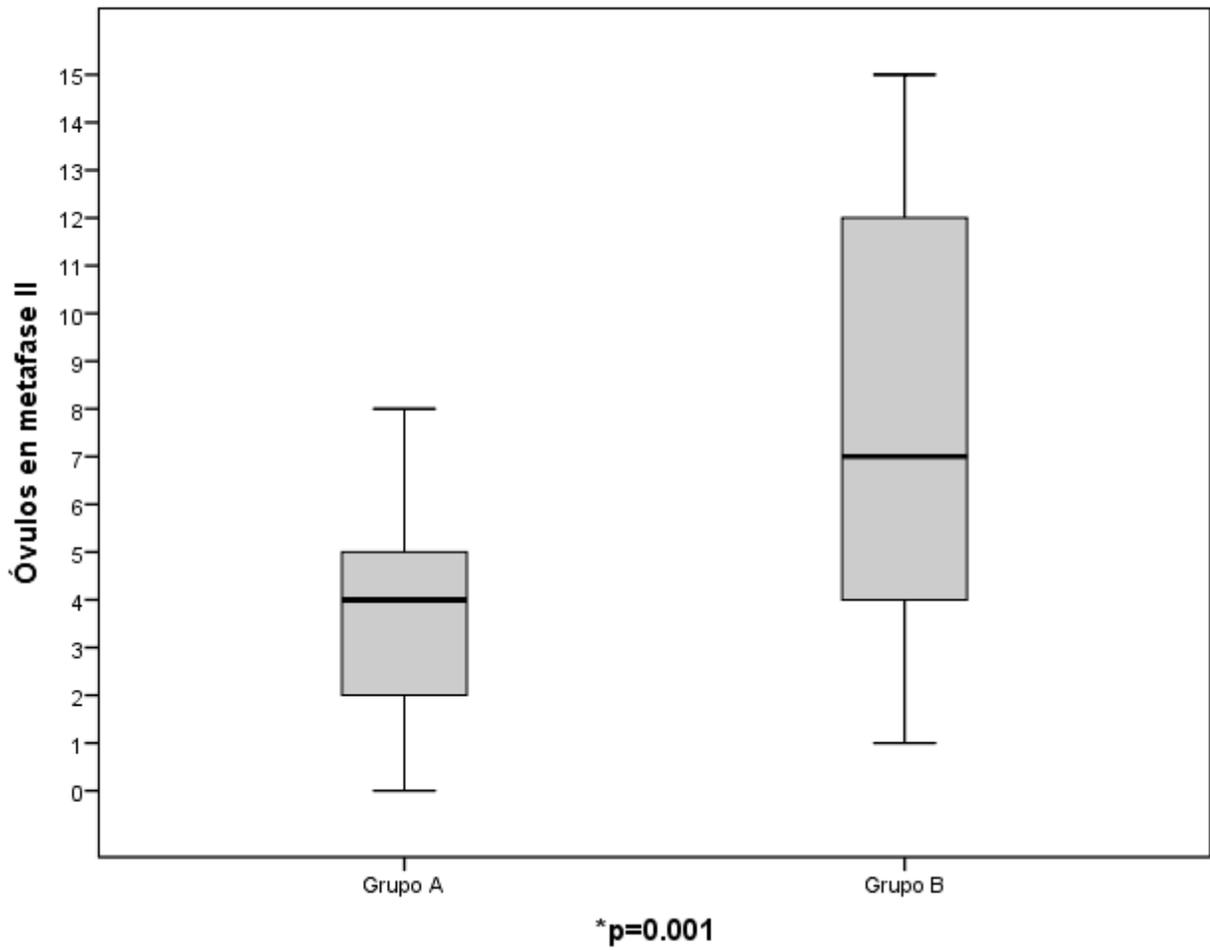
Como se demuestra en las **gráficas 1-4**, se observaron diferencias significativas en los niveles de E2 en suero en el día de disparo (Grupo A: 1716.7 \pm 1571.6 vs Grupo B: 2052.5 \pm 843.4; $p \leq 0.04$). La cantidad de óvulos capturados fue significativamente mayor en el grupo B en comparación con el grupo A (5.7 \pm 3.0 vs 10.6 \pm 6.3; $p \leq 0.05$), al igual que la cantidad de ovocitos maduros (3.45 \pm 2.3 vs 7.8 \pm 4.6; $p \leq 0.05$) y la cantidad de óvulos fertilizados (3 \pm 1.9 vs 6.1 \pm 3.7; $p \leq 0.004$). Sin embargo la tasa de fertilización fue similar en ambos grupos (80.3 \pm 30.2 vs 80.6 \pm 28.03).

El resto de las características demográficas comparativas por grupos se detallan en la **tabla 1**.

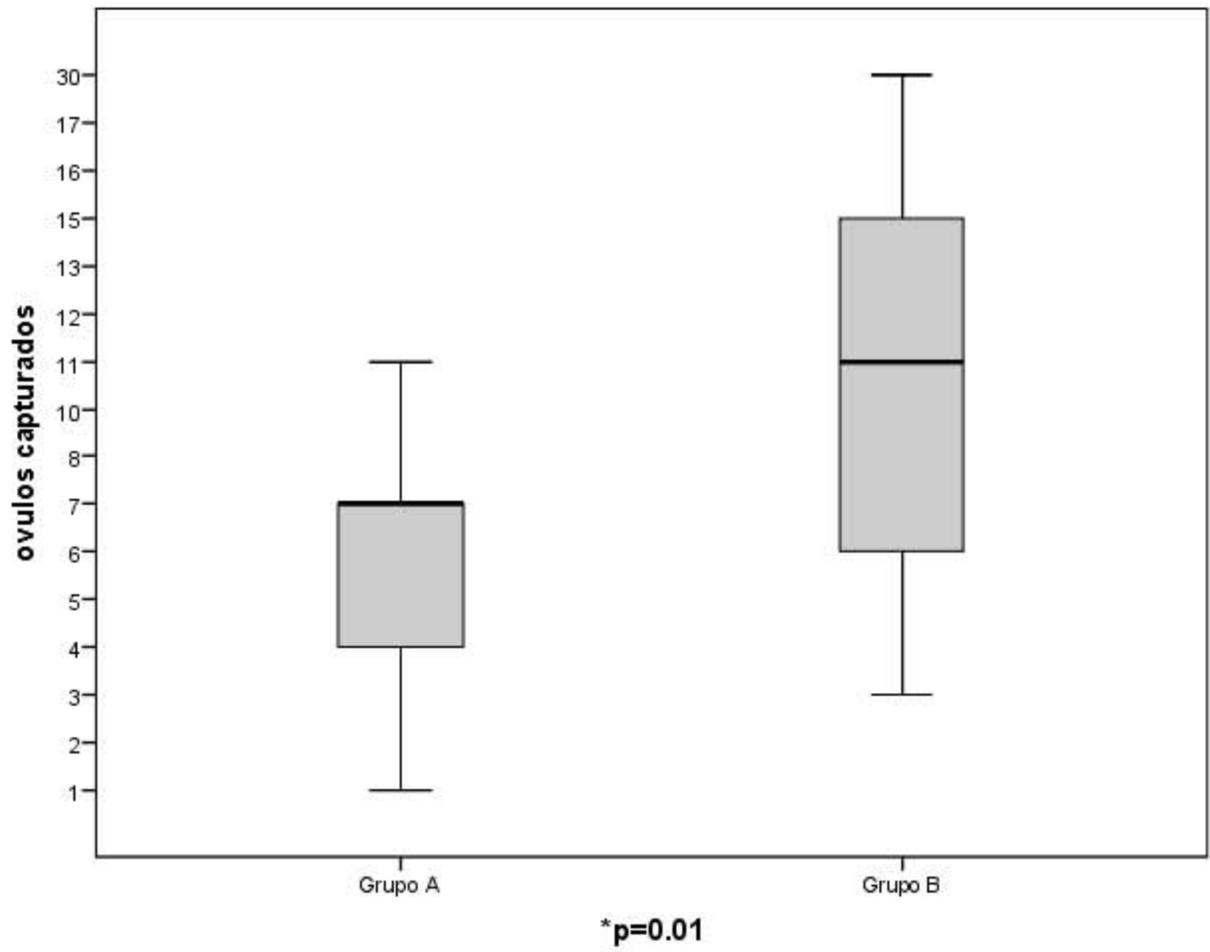
Grafica1. Niveles de E2 del día del disparo comparados por grupos.



Grafica 2. *Numero de óvulos en metafase II comparados por grupos.*



Grafica 3. *Número de óvulos capturados, comparados por grupos.*



Grafica 4. Número de óvulos fertilizados, comparados por grupos.

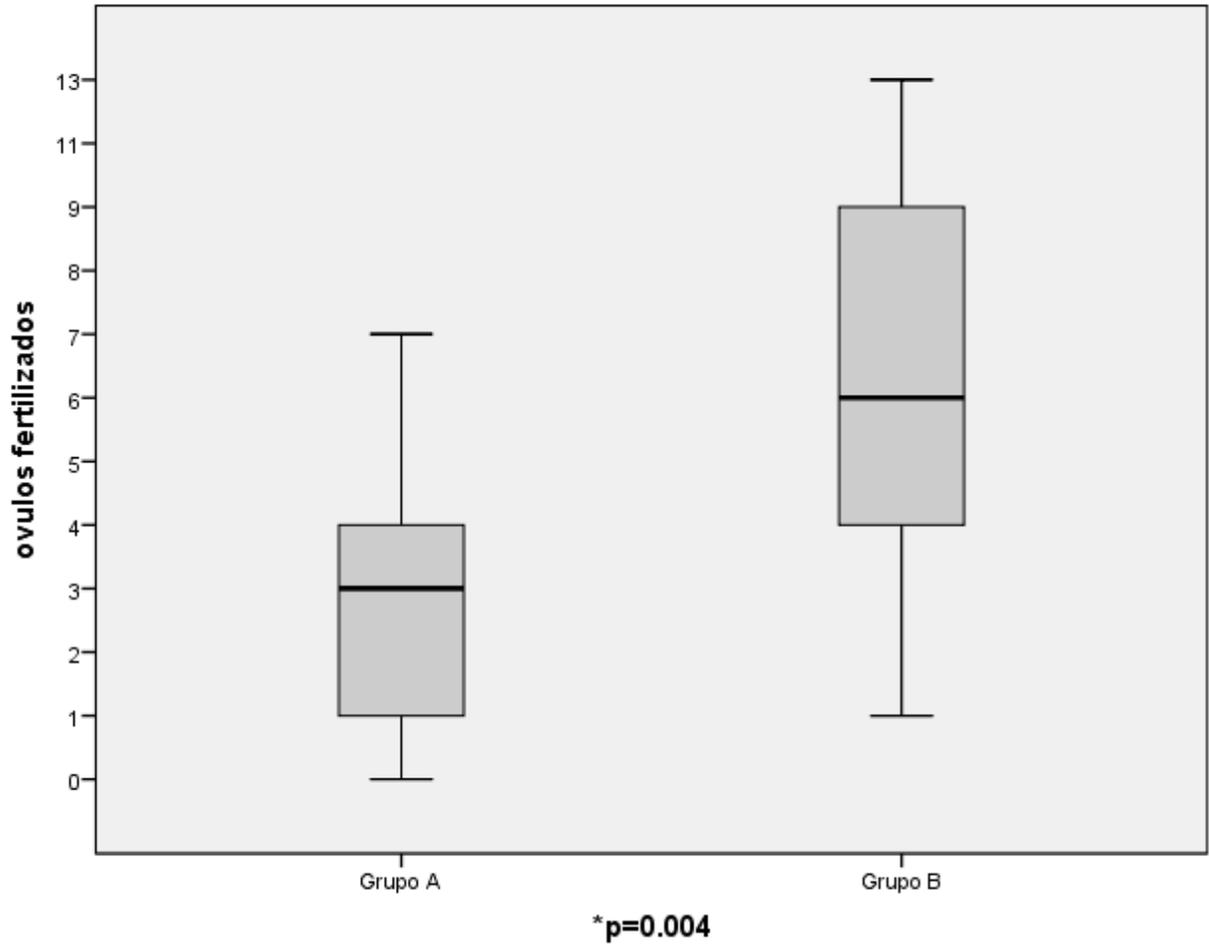


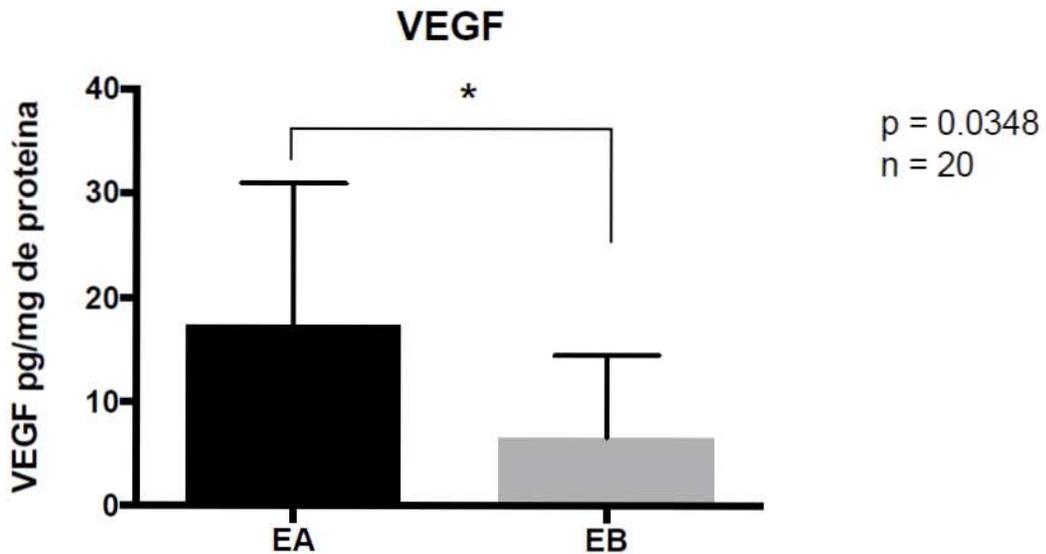
Tabla 1. Datos Demográficos

VARIABLE*	GRUPO A (n=20)	GRUPO B (n=20)	P
EDAD, AÑOS	36.9 (4.4)	35.7 (4.8)	0.62
IMC, Kg/m²	22.6 (3.2)	23.8 (5.8)	0.34
E2 DÍA 3	34.9 (15.9)	33 (16.9)	0.57
P4 DÍA 3	1.1 (0.7)	0.9 (0.3)	0.75
RECuento FOLICULAR	10 (5)	9.4 (2.5)	0.9
DÍA DEL DISPARO	7.5 (0.8)	6.4 (0.6)	0.93
PICO DE E2 EN SUERO, pg/dL	1716.7 (1571.6)	2052.5 (843.4)	0.04
PICO DE P4 EN SUERO, pg/dL	2.4 (1.4)	2 (0.6)	0.81
FOLÍCULOS >18 MM	4 (2.2)	5.2 (2.7)	0.18
OVULOS CAPTURADOS	5.7 (3.0)	10.6 (6.3)	0.01
OVULOS EN MII	3.45(2.3)	7.8 (4.6)	0.001
OVULOS FERTILIZADOS	3 (1.9)	6.1 (3.7)	0.004
TASA DE FERTILIZACIÓN	80.3 (30.2)	80.6 (28.03)	0.61

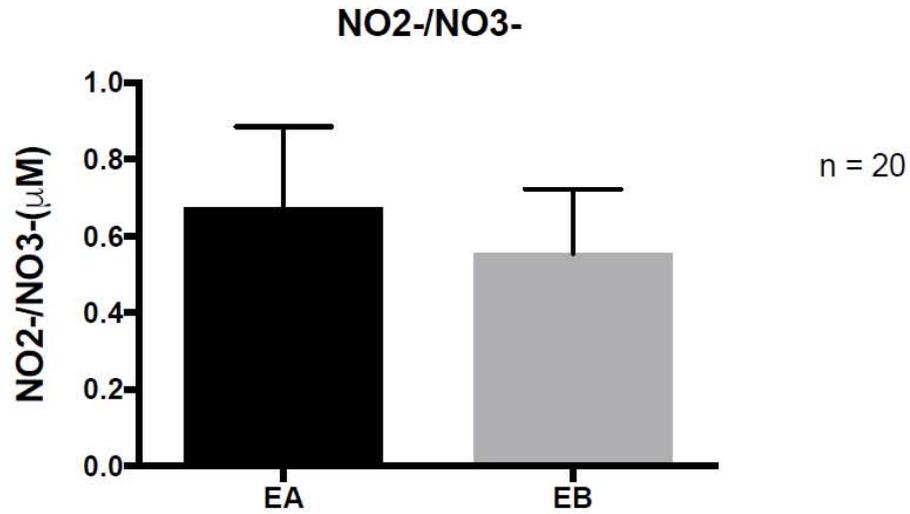
*Se presentan los datos como media y (DE)

Las expresión de biomarcadores en líquido folicular del grupo A fue significativamente mayor en comparación con los niveles del grupo B (**Figura 5-7**), con excepción de los niveles de metaloproteínasa 9 los cuales no arrojaron diferencias significativas (**Tabla 2**).

Grafica 5. *Expresión de VEGF, comparado por grupos.*



Grafica 6. *Expresión de NO₂/NO₃, comparado por grupos.*



Grafica 7. *Expresión de Leptina, comparada por grupos.*

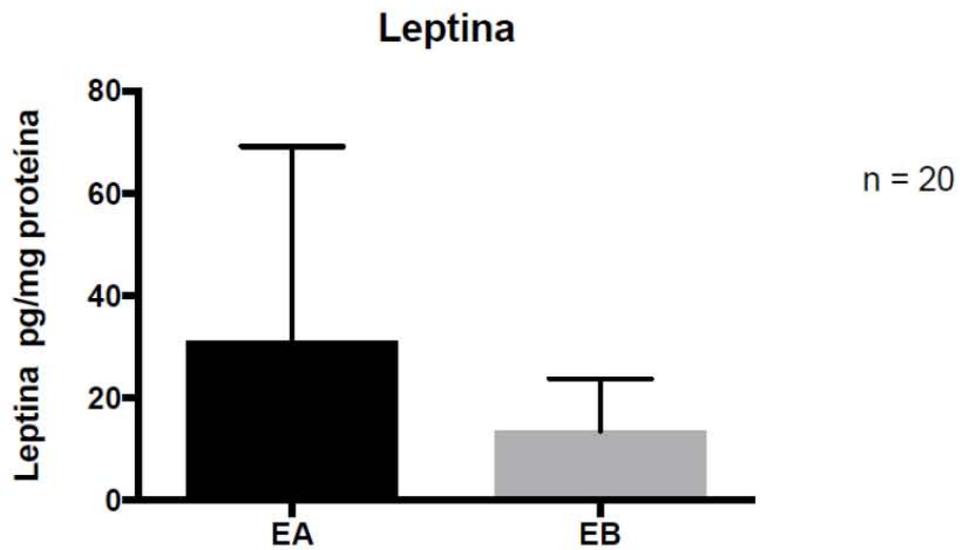


Tabla 2. Expresión de biomarcadores en líquido folicular

VARIABLE*	GRUPO A (n=20)	GRUPO B (n=20)	P
VEGF	17.3 (13.5)	6.6 (7.9)	0.04
ON	0.67 (0.20)	0.5 (0.16)	0.05
LEPTINA	31.11 (38.05)	13.59 (10.14)	0.05
MMP9	983.56 (453.76)	897.18 (362.69)	0.5

DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

El 15% de la población mexicana en edad reproductiva padece o padecerá algún problema de infertilidad,³ por lo tanto la demanda de técnicas de reproducción asistida de alta complejidad cada vez es mayor. El factor pronóstico más importante en el resultado de este tipo de tratamientos es la edad de la mujer ya que se encuentra directamente relacionado con la calidad ovocitaria. A su vez, la calidad ovocitaria esta directamente relacionada con factores inherentes al individuo (reserva ovárica) y factores epigenéticos relacionados con el proceso ovulatorio (alimentación, tabaquismo, estilo de vida).

Existe una relación entre la selección folicular por dominancia y los factores intrafoliculares, la variación de estos tendrá consecuencias directas en las características de madurez, calidad ovocitaria y potencial de fertilización. Se conocen diferentes factores intrafoliculares que interactúan durante el proceso de reclutamiento, diferenciación y selección del folículo dominante, entre ellos destacan el VEGF, NO, leptina y los niveles de metaloproteinasas. Se conoce que dichos factores se modifican durante diferentes esquemas de estimulación ovárica, sin embargo, no se conoce el efecto de la corifolitropina-alfa sobre dichos marcadores⁵⁹. Presentamos el primer estudio comparativo entre diferentes protocolos de estimulación ovárica (corifolitropina-alfa vs FSHr/HMG), cuantificando los niveles intrafoliculares de VEGF, NO, metaloproteína 9 y leptinas, evaluando su relación con la madurez ovocitaria y tasa de fertilización, en pacientes sometidas a fertilización in vitro.

La corifolitropina-alfa, una proteína de fusión obtenida por tecnología de DNA recombinante con actividad prolongada, fue utilizada para estimular a uno de los dos grupos de pacientes. Autores como Barroso y colaboradores, han encontrado que este nuevo medicamento tiene mejor reclutamiento folicular y mejor sincronización folicular en pacientes con baja reserva, generando un aumento en la tasa de fertilización favorecido por el mismo proceso de sincronización. Adicionalmente, se ha reportado que al ser una molécula de acción prolongada, es un medicamento más amigable a la

administración, ya que es de aplicación única en comparación con la aplicación diaria de medicamento con los protocolos convencionales de estimulación.⁵⁴

Nuestro estudio demuestra una diferencia estadísticamente significativa, en los valores de VEGF (p0.04), ON (p0.05) y LEPTINA (p0.05), en donde las concentraciones fueron mayores en el grupo A. La MMP9 también fue mayor en el grupo A, sin llegar a una diferencia estadísticamente significativa (p 0.5).

El VEGF es un potente factor angiogénico producido tanto por las células de la granulosa como por las células de la teca en respuesta a FSH, LH-hCG e hipoxia.

Existe controversia en cuanto a si este es un marcador potencial de fertilización o es marcador de hipoxia folicular.

Encontramos en la literatura que niveles altos de VEGF dentro del líquido folicular han sido relacionados con hipoxia en los folículos, lo que conlleva a baja producción de ovocitos, bajas concentraciones en los picos de estradiol E₂ sérico, bajo número en los índices de concepción después de FIV ó GIFT⁵⁸.

El óxido nítrico, una molécula con efectos reguladores sobre procesos vasculares e inflamatorios, se observa en líquido folicular después de la estimulación con gonadotropinas. La disminución de la biodisponibilidad de NO en determinadas condiciones patológicas podría dar lugar a anomalías en la viabilidad de los ovocitos y en la capacidad de desarrollo.³⁵

Sin embargo los niveles de NO también están correlacionados inversamente con el potencial de fertilización del ovocito y el desarrollo normal del embrión, ya que el exceso de NO detiene el desarrollo del embrión, posiblemente a través de la producción de radicales libres³⁶

La leptina, una proteína implicada en múltiples funciones reguladoras, incluida la angiogénesis, es producida por las células de la granulosa y está presente en los ovocitos y el líquido folicular

Barroso et al. describieron que los niveles de VEGF y NO se correlacionaron negativamente con la calidad del embrión como marcadores de hipoxia folicular, y propusieron los niveles de leptina como otro marcador de eventos hipóxicos foliculares que pueden resultar en mala calidad de ovocitos y desarrollo embrionario.⁵⁹

En el grupo A fue menor; el reclutamiento folicular, la concentración de estradiol en el día del disparo y el número de óvulos capturados, sin embargo la proporción de óvulos maduros (MII) fue superior, además observamos que a pesar de estos factores la tasa de fertilización en ambos grupos fue similar, lo que traduce un mejor desempeño folicular con el uso de Colifolitropina alfa, en la generación de óvulos con una adecuada capacidad fertilizante.

Existe controversia en la literatura a cerca de los biomarcadores intrafoliculares, algunos autores los correlacionan positivamente con el desarrollo folicular, mientras otros los han descrito como marcadores de hipoxia, en este estudio, los marcadores fueron mayores en el grupo A, lo que los vincula positivamente al desarrollo folicular óptimo en FIV. Faltan estudios que expliquen si las cantidades excesivas o escasas de estos marcadores influyen en el desenlace.

Podemos concluir que pacientes con baja reserva fetal podrían tener mejores tasa de fertilización con el uso de colifolitropina alfa en comparación con protocolos estándar. Está descrita mayor tasa de ciclos cancelados en las pacientes tratadas con corifolitropina alfa; las causas de cancelación son el riesgo de hiper-estimulación ovárica⁶⁰. En este estudio no tuvimos ningún caso de hiper-estimulación ovárica.

Además de ser un medicamento de mejor apego por parte de la paciente, por ser de aplicación más amigable.

Nuestros hallazgos sugieren que los procesos relacionados con madurez ovocitaria y proceso de fertilización dependen también de procesos mucho más complejos que no pueden ser explicados únicamente por las modificaciones en el entorno intrafolicular y

posiblemente obedecen a múltiples factores como la edad, niveles hormonales, dosis de medicamentos controladas, y variables no controlables que no fueron incluidas en nuestro estudio.

CONCLUSIONES

La infertilidad es un problema mundial que va en aumento, la necesidad de aplicar TRA de alta complejidad cada vez es mayor.

Por medio de la elaboración de este estudio en el que obtuvimos poblaciones homogéneas tratadas con 2 diferente protocolos, podemos decir que las diferencias encontradas en los resultados de fertilización están directamente relacionadas con los niveles de marcadores intrafoliculares.

Existen diferentes protocolos de estimulación ovárica. Lo importante es individualizar las necesidades de cada paciente para decidir cual es el adecuado.

Podemos proponer la estimulación con colifolitropina alfa en pacientes con baja reserva ovárica como una opción de tratamiento en el que la tasa de fertilización es similar al tratamiento estándar, con la ventaja de ser un medicamento de aplicación única en la cual se encuentra un mayor apego por parte de las pacientes.

ANEXOS

ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO

YO _____

(Nombre del participante o de su representante legal)

declaro libremente que estoy de acuerdo en participar en esta investigación cuyo objetivo, procedimientos, beneficios, y riesgos se especifican en el Apartado A de este documento. Es de mi conocimiento que los investigadores me han ofrecido aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta que, al momento de firmar la presente, no hubiese expresado o que surja durante el desarrollo de la investigación.

Se me ha manifestado que puedo retirar mi consentimiento de participar en cualquier momento sin que ello signifique que la atención médica que se me proporcione, se vea afectada por este hecho. Se me ha informado que el participar en este estudio no repercutirá en el costo de la atención médica que se me deba brindar y que toda la información que se otorgue sobre mi (su) identidad y participación será confidencial, excepto cuando yo lo autorice.

Para los fines que se estime conveniente, firmo la presente junto al investigador que me informó y dos testigos, conservando una copia de a) Consentimiento informado y b) Información proporcionada para obtener mi autorización.

APARTADO A: El objetivo de esta investigación es realizar un estudio comparativo, cuantificando los niveles intra-foliculares de VEGF, ON, metaloproteinasas 2,9 y leptinas y evaluar su relación con el grado de madurez ovular, fertilización y tasa de madures ovocitaria en pacientes sometidas a fertilización in vitro con distintos esquemas de estimulación ovárica (FSH recombinante más corifolitropina alfa o menotropinas urunarias). Los probables beneficios del estudio es evaluar si existe una diferencia entre los diferentes esquemas de estimulación ovárica en relación a : I) marcadores intrafoliculares y II) maduración ovocitaria III) Tasa de fertilización.

La corifolitropina alfa es un medicamento de reciente ingreso a nuestro país el cuál tiene la ventaja de aplicarse en solo una ocasión durante la estimulación ovárica en comparación a la aplicación diaria con otros esquemas de estimulación. Dicho medicamento no ha demostrado ningún riesgo relacionado a su consumo y en cualquier momento puede rehusarse a continuar con el estudio.

Ciudad de México a ____ de _____ de 201_

NOMBRE

FIRMA

PARTICIPANTE

INVESTIGADOR

TESTIGO 1

TESTIGO 2

REFERENCIAS

1. Murat Arslan, M.D.,^{a,b} Silvina Bocca, M.D., Ph.D.,^a Sebastián Mirkin, M.D.,^a Gerardo Barroso, M.D.,^{a,c} Laurel Stadtmayer, M.D., Ph.D.,^a and Sergio Oehninger, M.D., Ph.D. Controlled ovarian hyperstimulation protocols for in vitro fertilization: two decades of experience after the birth of Elizabeth Carr. *American Society for Reproductive Medicine*, 2005;84;3.
2. Alberto Kably Ambe,^{*} Carlos Salazar López Ortiz,^{**} Claudio Serviere Zaragoza,^{***} Gerardo Velázquez Cornejo,^{***} Efraín Pérez Peña,^{***} Roberto Santos Haliscack,^{***} Martha Luna Rojas,^{***} Emilio Valerio,^{***} Héctor Santana,^{***} Fernando Gaviño Gaviño^{****}. Consenso Nacional Mexicano de Reproducción Asistida. *Ginecol Obstet Mex* 2012;80(9):581-624.
3. Instituto Nacional de Estadística y Geografía [Página principal en Internet], acceso lunes 17 de julio de 2017. Disponible en <http://www.inegi.org.mx/>.
4. Consejo Nacional de Población [Página principal en Internet], acceso lunes 17 de julio de 2017. Disponible en <https://www.gob.mx/conapo>.
5. American Society for Reproductive Medicine [Página principal en Internet], acceso lunes 17 de julio de 2017. Disponible en <http://www.asrm.org/>.
6. Organización Mundial de la Salud [Página principal en Internet], acceso lunes 17 de julio de 2017. Disponible en <http://www.who.int/es/>.
7. Weiss RV, Clapauch R. Female infertility of endocrine origin. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014 Mar;58(2):144-52.
8. Watson-Whitmyre, Marcia, Ph.D. Female infertility, Infertilidad genital diseases. *Magill's Medical Guide (Online Edition)*, January, 2017. 5p.
9. Alikani M, et al. *First birth following spindle transfer for mitochondrial replacement therapy: hope and trepidation*. *Reprod BioMed Online*. 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.02.004>
10. Zhang J, et al. *Live birth derived from oocyte spindle transfer to prevent mitochondrial disease*. *Reprod BioMed Online*. 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.01.013>
11. Gougeon A, Lefe`vre B. Evolution of the diameters of the largest healthy and

- atretic follicles during the human menstrual cycle. *J Reprod Fertil* 1983;69:497–502.
12. Gougeon A. Ovarian follicular growth in humans: ovarian ageing and population of growing follicles. *Maturitas* 1998;30:137–142.
 13. Almog B, Shehata F, Shalom-Paz E, Tan SL, Tulandi T. Age-related normogram for antral follicle count: McGill reference guide. *Fertil Steril* 2011;95:663–666.
 14. La Marca A, Spada E, Sighinolfi G, Argento C, Tirelli A, Giulini S, Milani S, Volpe A. Age-specific nomogram for the decline in antral follicle count throughout the reproductive period. *Fertil Steril* 2011a;95:684–688.
 15. Monget P, Bobe J, Gougeon A, Fabre S, Monniaux D, Dalbies-Tran R. The ovarian reserve in mammals: a functional and evolutionary perspective. *Mol Cell Endocrinol* 2012;356:2–12.
 16. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update* 2006;12:685–718.
 17. Nelson SM, Yates RW, Lyall H, Jamieson M, Traynor I, Gaudoin M, Mitchell P, Ambrose P, Fleming R. Anti-Müllerian hormone-based approach to controlled ovarian stimulation for assisted conception. *Hum Reprod* 2009;24:867–875.
 18. La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Arsenio AC, Stabile G, Volpe A. Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update* 2010;16:113–130.
 19. Broer SL, Dölleman M, Opmeer BC, Fauser BC, Mol BW, Broekmans FJ. AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2011;17:46–54.
 20. Devroey P, Polyzos NP, Blockeel C. An OHSS-Free Clinic by segmentation of IVF treatment. *Hum Reprod* 2011;26:2593–2597.
 21. Nelson SM, Yates RW, Lyall H, Jamieson M, Traynor I, Gaudoin M, Mitchell P, Ambrose P, Fleming R. Anti-Müllerian hormone-based approach to controlled ovarian stimulation for assisted conception. *Hum Reprod* 2009;24:867–875.
 22. Nardo LG, Fleming R, Howles CM, Bosch E, Hamamah S, Ubaldi FM, Hugues JN, Balen AH, Nelson SM. Conventional ovarian stimulation no longer exists:

- welcome to the age of individualized ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online* 2011;23:141–148.
23. Dzik, Artur; Fanchin, Renato La reserva ovárica y su influencia en la fertilidad femenina. Inducción a la ovulación. Publicado January 1, 2014. Páginas 26-32. 2014.
 24. La Marca A, Giulini S, Tirelli A, Bertucci E, Marsella T, Xella S, Volpe A. Anti-Muüllerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Hum Reprod* 2007a;22:766–771.
 25. Gerardo Barroso, Sergio Oehninger, Ana Monzón, Paul Kolm, William E. Gibbons and Suheil J. Muasher. High FSH:LH Ratio and Low LH Levels in Basal Cycle Day 3: Impact on Follicular Development and IVF Outcome. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol. 18, No. 9, 2001.
 26. Dr. Alberto Kably Ambe, Dra. Esperanza Carballo Mondragón, Dr. Carlos Quesnel García Benitez, Dr. Gerardo Barroso Villa. Estudio de volumen ovárico como factor predictivo de reserva ovular en respuesta a la estimulación exógena con gonadotropinas y su correlación con el desarrollo óvulo/embrionario en los resultados de FIV/ICSI. *Ginecología y Obstetricia de México*.
 27. Dr Alberto Kably Ambo, Dr José Antonio Pérez Mendizábal, Dra Alejandra Sánchez De León, Dr Samuel Karchmer Krivitzky, Dr Gerardo Barroso Villa. Competitividad óvulo-embionaria determinada a través de la cuantificación de los índices perifoliculares en la microarquitectura vascular por Doppler.
 28. Zamah AM, Hassis ME, Albertolle ME, Williams KE. Proteomic analysis of human follicular fluid from fertile women. *Clin Proteomics*. 2015 Mar 3;12(1):5. doi: 10.1186/s12014-015-9077-6. eCollection 2015.
 29. Suzanne Huey, M.D.,‡ Alfred Abuhamad, M.D.,* Gerardo Barroso, M.D.,‡ Ming-I Hsu, M.D.,‡ Paul Kolm, Ph.D.,† Jacob Mayer,‡ Ph.D., and Sergio Oehninger, M.D. Perifollicular blood flow Doppler indices, but not follicular pO₂, pCO₂, or pH, predict oocyte developmental competence in vitro fertilization. The Jones Institute for Reproductive Medicine, Eastern Virginia Medical School, Norfolk, Virginia. *Fertility and Sterility* Vol. 72, No. 4, October

- 1999.
30. Yasser Ibrahim Orief, Tarek Abd Elzaher Karkor, Hisham Aly Saleh, Abir Shawky, El Hadidy, Nana Badr. Comparative evaluation of vascular endothelial growth factor-A expression in pre-ovulatory follicular fluid in normogonadotrophic and endometriotic patients undergoing assisted reproductive techniques. *Middle East Fertility Society Journal*, volumen 19, Issue 4, December 2014, pages 248-261.
 31. Mary Kudsy, Marwan Alhalabi, Faizeh Al-Quobaili. Follicular fluid Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) could be a predictor for pregnancy outcome in normo-responders and polycystic ovary syndrome women undergoing IVF/ICSI treatment cycles. *Middle East Fertility Society Journal*. Volume 21, Issue 1, March 2016, pages 52-56.
 32. Tal T. McCollum, C., Harris, P., Olin, J., Kleinstreuer, N. Wood, C., Hans, C., Shah, S., Merchant, F., Bondesson, M., Knudsen, T., Padilla, S., Hemmer, M. Immediate and long-term consequences of vascular toxicity during zebrafish development. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* 48: 51-61 (Journal).
 33. Dolors Manau¹, Francisco Fábregues¹, Joana Peñarrubia¹, Montserrat Creus¹, Francisco Carmona¹, Gemma Casals¹, Wladimiro Jiménez² and Juan Balasch^{1,3}. Vascular endothelial growth factor levels in serum and plasma from patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF. *Human Reproduction* Vol. 22, No. 3, pp. 669-675, 2007.
 34. Ana María Rosales Torres, Adrián Guzmán Sánchez. Importancia del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y de sus receptores en el ciclo ováricos. *Rev Mex Cienc Pecu.* Vol. 3, pp 89-111;2011.
 35. Ali Kpatcha Kadanga. Nitric Oxide Synthase (NOS) Genes Expression in Cattle in Vitro Produced Embryos
 36. Chaudhury, Abhay K. Singh a. Markers of oxidative stress in follicular fluid of women with endometriosis and tubal infertility undergoing IVF. *Reproductive Toxicology*. ELSEVIER, 2013.

37. Quennell JH, Mulligan AC, Tups A, Liu X, Phipps SJ, Kemp CJ, Herbison AE, Grattan DR, Anderson GM. Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. *Endocrinology* 2009.
38. Roa J, Herbison AE. Direct regulation of GnRH neuron excitability by arcuate nucleus POMC and NPY neuron neuropeptides in female mice. *Endocrinology* 2012.
39. Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol* 2006.
40. Dhillon WS, Chaudhri OB, Thompson EL, Murphy KG, Patterson M, Ramachandran R, Nijher GK, Amber V, Kokkinos A, Donaldson M et al. Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2007.
41. Louis GW, Greenwald-Yarnell M, Phillips R, Coolen LM, Lehman MN, Myers MGJ. Molecular mapping of the neural pathways linking leptin to the neuroendocrine reproductive axis. *Endocrinology* 2011.
42. Fréour, A. Catteau H. Caillon P. Barrière MG Denis D. Masson T. Leptin and its potential interest in assisted reproduction cycles. *Human Reproduction Update* 2016.
43. Silvia, Coronato. Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *Medicina Buenos Aires* 2012.
44. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L; ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod* 2011.
45. Paulson RJ, Marrs RP. Ovulation stimulation and monitoring for in vitro fertilization. *Curr Probl Obstet Gynecol Infert* 1986.

46. Imani B, Eijkemans MJ, te Velde ER, Habbema JD, Fauser BC. A nomogram to predict the probability of live birth after clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrhoeic infertility. *Fertil Steril*. 2002.
47. Mitwally MF, Casper RF. Use of an aromatase inhibitor for induction of ovulation in patients with inadequate response to clomiphene citrate. *Fertil Steril* 2011.
48. Legro RS, Brzyski RG, Diamond MP, et al. Letrozole versus clomiphene for infertility in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 2014.
49. Weiss NS, Nahuis M, Bayram N, et al. Gonadotrophins for ovulation induction in women with polycystic ovarian syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2015.
50. Bosch E, Valencia I, Escudero E, Crespo J, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Premature luteinization during gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles and its relationship with in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 2003
51. Olivennes F, Cunha-Filho JS, Fanchin R, Bouchard P, Frydman R. The use of GnRH antagonists in ovarian stimulation. *Hum Reprod Update* 2002.
52. Maheshwari A, Gibreel A, Siristatidis CS, Bhattacharya S. Gonadotrophin-releasing hormone agonist protocols for pituitary suppression in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2011.
53. Lorente Gonzales J, Corifolitropina alfa par la estimulación ovárica en reproducción asistida, informe preliminar de la comisión de farmacia, Hospital Reina Sofía Córdoba. 2011.
54. Barroso G, Colín A, Valdespin C, Ávila R, Estrada G, Efecto de la corifolitrofina alfa en pacientes de fertilización in vitro- ICSI con falla previa en un protocolo de FSH/HMG: experiencia preeliminar en México, *Ginecol Obstet Mex*, 2016.

55. Pouwer AW, Farquhar C, Kremer JA. Long-acting FSH versus daily FSH for women undergoing assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015
56. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem.* 1994; 218(2):325-9.
57. Watanabe H, Nakanishi I, Yamashita K, Hayakawa T, Okada Y. Matrix metalloproteinase-9 (92 kDa gelatinase/type IV collagenase) from U937 monoblastoid cells: correlation with cellular invasion. *J Cell Sci.* 1993; 104(4): 991-999.
58. KI Hyung KIM M:D,et al, Follicular flow is a better predictor of the outcome of in vitro fertilization embryo transfer than follicular fluid vascular endothelial growth factor and nitric oxide concentrations, *Fertility and sterility* vol. 82, NO 3, sep 2004
59. Barroso G, et al, Vascular Endothelial growth factor, nitric oxide, and leptin follicular fluid levels correlate negatively with embryo quality in IVF patients, *Fertility and sterility*, vol 71, NO6, Dic 1999
60. Polyzos NP1, Devos M, Humaidan P, Stoop D, Ortega- Hrepich C, Devroey P, Tournaye H. Corifollitropin alfa followed by rFSH in a GnRH antagonist protocol for poor ovarian responder patients: an observational pilot study. *Fer l Steril* 2013