

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA**



**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**DAÑO AL ADN CAUSADO POR ESTIMULACIÓN OVÁRICA CONTROLADA EN  
CÉLULAS DE LA GRANULOSA COMO MARCADOR DE LA CALIDAD DE  
OVOCITOS HUMANOS**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO EN MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA  
REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**PRESENTA**

**Lic. en B. E. Alcalá Sánchez Ximena Arencis**

**DIRECTOR:**

Dr. Edmundo Bonilla González

**CO-DIRECTOR**

M. en C. Pedro Cuapio Padilla

**ASESOR**

Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo

Ciudad de México, marzo 2021

---



## MIEMBROS DEL COMITÉ DE TUTORES

### DIRECTOR

**Dr. Edmundo Bonilla González**

Profesor Titular "C"

Laboratorio de Biología Molecular de la Gametogénesis

Departamento Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa

[mundo@xanum.uam.mx](mailto:mundo@xanum.uam.mx)

### CO-DIRECTOR



**M. en C. Pedro Cuapio Padilla**

Responsable de Laboratorio de Andrología

Laboratorio de Andrología y Fecundación *in vitro*

HISPAREP, Clínica de Reproducción Asistida, Hospital Español, CDMX.

[cuapiopp@yahoo.com.mx](mailto:cuapiopp@yahoo.com.mx)

### ASESOR



**Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo**

Profesor Titular Asociado "C"

Laboratorio de Biología Molecular de la Gametogénesis

Departamento Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa

[ivan.bahhena@gmail.com](mailto:ivan.bahhena@gmail.com)

---

## JURADO

### **Dra. Adriana Morales Otal**

Profesor Titular “C”

Laboratorio de Neurohistología y Conducta Sexual

Departamento de Biología de la Reproducción. División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa

[otal@xanum.uam.mx](mailto:otal@xanum.uam.mx)

### **Dr. José Miguel Betancourt Rule**

Profesor Titular “C”

Laboratorio de Biología Celular

Departamento Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa

[bet@xanum.uam.mx](mailto:bet@xanum.uam.mx)

### **Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo**

Profesor Asociado “C”

Laboratorio de Biología Molecular de la Gametogénesis. Departamento Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

[ivan.bahena@gmail.com](mailto:ivan.bahena@gmail.com)

### **Dr. Eduardo Casas**

Profesor Asociado “C”

Laboratorio de Biología Celular. Departamento Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

[dino@xanum.uam.mx](mailto:dino@xanum.uam.mx)

---

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa así como al CONACyT.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Expresión Génica de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y en el laboratorio de Andrología y Fecundación *in vitro* de HISPAREP, Clínica de Reproducción del Hospital Español.

El programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I) está incorporada en el Programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONACyT (PNPC) registro 003797

Este trabajo fue financiado por los proyectos: CONACYT CB-2012-01-180043 y Fertilización en Mamíferos de la UAM.

La alumna Ximena Arencis Alcalá Sánchez contó con el apoyo de la beca que otorga el CONACyT con el número de registro: 798269

Se contó con el apoyo de la Clínica de Reproducción Asistida del Hospital Español HISPAREP, CDMX para la fase experimental

---

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “**DAÑO AL ADN CAUSADO POR ESTIMULACIÓN OVÁRICA CONTROLADA EN CÉLULAS DE LA GRANULOSA COMO MARCADOR DE LA CALIDAD DE OVOCITOS HUMANOS**” que presento Ximena Arencis Alcalá Sánchez el día 18 de marzo del 2021.

**Presidente**

**Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo** \_\_\_\_\_

Laboratorio de Biología Molecular de la Gametogénesis. Departamento Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud.  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

**Secretario**

**Dr. José Miguel Betancourt Rule** \_\_\_\_\_

Laboratorio de Biología Celular  
Departamento Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud.  
Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa

**Vocal**

**Dra. Adriana Morales Otal** \_\_\_\_\_

Laboratorio de Neurohistología y Conducta Sexual  
Departamento de Biología de la Reproducción. División de Ciencias Biológicas y de la Salud.  
Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa

**Vocal**

**Dr. Eduardo Casas** \_\_\_\_\_

Laboratorio de Biología Celular. Departamento Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud.  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

---

## AGRADECIMIENTOS

Dr. Edmundo Bonilla González, por permitirme continuar en el laboratorio para realizar la maestría y por siempre ser el mejor director de Tesis.

M. en C. Pedro Cuapio Padilla, por haber confiado en mí y haberme dado un proyecto tan especial al poder trabajar en células humanas, lo que tanto había deseado. Gracias por recibirme en la Clínica de Reproducción.

Dr. Iván Bahena, por su apoyo y comentarios durante todo este tiempo.

Biól. Ricardo Rodríguez responsable del laboratorio de *In Vitro* por recibirme en su laboratorio y por los conocimientos y consejos que me compartió.

Dra. Adriana Morales Ota, por siempre estar presente en los momentos importantes y por darme esa bonita confianza y amistad. La quiero mucho.

Maestro Mario Teteltitla, por compartirme sus conocimientos técnicos, su apoyo y amistad en todo momento.

Maestro Alejandro Domínguez por siempre estar disponible, por toda su ayuda y la gran amistad que tenemos.

A los Doctores Miguel Betancourt Rule y Eduardo Casas por haber aceptado la invitación para ser parte del miembro de jurados.

A todas las pacientes, que sin ellas no hubiera sido posible realizar este trabajo.

---

*A mis amados padres Laura y Ramón por su interminable apoyo.*

*Gracias Dios.*

---

## ÍNDICE GENERAL

1. ABREVIATURAS.....	8
2. RESUMEN .....	9
3. ABSTRACT .....	10
4. MARCOTEÓRICO.....	11
1. La infertilidad.....	11
2. El ovario.....	11
3. El ovocito.....	11
4. Células de la granulosa (Cooperatividad metabólica entre ovocito y célula de la granulosa granulosa.....	12
5. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario.....	13
6. La ovulación.....	14
7. Fertilización.....	16
8. Estimulación Ovárica Controlada.....	16
9. Fármacos Empleados en Estimulación Ovárica Controlada.....	19
10. Reproducción asistida.....	20
11. Daño al ADN por estimulación ovárica controlada.....	21
12. Ensayo Cometa.....	22
ANTECEDENTES.....	24
JUSTIFICACIÓN.....	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVOS.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
1. Aspiración de los ovocitos .....	31
2. Decumulación de las células de la granulosa .....	32
3. Estimulación Ovárica Controlada.....	32
4. Ensayo Cometa.....	32
RESULTADOS.....	35
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIÓN.....	45
BIBLIOGRAFÍA.....	46

---

## ABREVIATURAS

- ADN.** Ácido Desoxirribonucleico
- CC.** Células del Cumulus
- CG.** Células de la Granulosa
- COS.** Estimulación Ovárica Controlada
- COC.** Complejo Ovocito- Células del Cumulus
- DFM.** Desarrollo Folicular Múltiple
- FIV.** Fertilización In Vitro
- FSH.** Hormona Folículo Estimulante
- FSHr.** Hormona Folículo Estimulante recombinante
- GDF9.** Factor de crecimiento y diferenciación 9
- GnRH.** Hormona Liberadora de Gonadotropinas
- GnRH-ant.** Antagonista de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas
- hCG.** Hormona Gonadotropina Coriónica
- hMG.** Hormona gonadotropina menopáusica humana
- HTF.** Fluido Tubárico Humano
- IA.** Inseminación Artificial
- ICSI.** Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides
- LH.** Hormona Luteinizante
- OMS.** Organización Mundial de la Salud
- PON.** paraoxonasas
- TRA.** Técnicas de Reproducción Asistida
- ZP.** Zona Pelúcida

---

## RESUMEN

La estimulación ovárica controlada tiene como base el reclutamiento de varios folículos al inicio de cada ciclo menstrual, mediante la administración de agonistas de la hormona liberadora de Gonadotropinas (GnRH), hormona folículo estimulante recombinante (FSHr), hormona gonadotropina menopáusica humana (hMG) y hormona gonadotropina coriónica humana (hCG). En el transcurso de un ciclo ovárico natural entre los días 3 a 5 de su inicio se produce la dominancia folicular mediante la cual, a partir del grupo de folículos reclutados, generalmente solamente uno será destinado a completar su maduración y ovular. Hasta el momento no existe un protocolo que indique las dosis óptimas de la estimulación ovárica controlada. La dosis se calcula de acuerdo con las variables específicas de la paciente como la edad, concentraciones basales de hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) y estradiol (E2); así como la respuesta previa al tratamiento. En el presente estudio se evaluaron diferentes tipos de esquemas de estimulación ovárica en las pacientes de la Clínica de Reproducción Asistida HISPAREP, para determinar cuáles fármacos tienen menor impacto sobre el daño en el ADN en células de la granulosa mediante el ensayo cometa, como un marcador de calidad de los ovocitos. Los resultados muestran que el antagonista de GnRH se asocia con escaso daño al ADN en las células del cumulus de las pacientes sometidas a fertilización in vitro (FIV), así como con un desarrollo embrionario completo con recién nacidos vivos. Por otro lado, La FSHr mostró mayor eficiencia que en cuanto al daño al ADN producido en células cumulus y los resultados del desarrollo embrionario. Finalmente, los resultados muestran una correlación entre el daño al ADN en células del cumulus humano evaluado por el ensayo cometa y el resultado del desarrollo embrionario, lo que permite plantear la posibilidad del uso de este ensayo como un marcador de la calidad de los ovocitos de las mujeres que llevan a cabo FIV.

---

## ABSTRACT

Controlled ovarian stimulation is based on the recruitment of several follicles at the beginning of each menstrual cycle, through the administration of agonists of Gonadotropin-releasing hormone (GnRH), recombinant follicle-stimulating hormone (FSHr), human menopausal gonadotropin hormone (hMG) and human chorionic gonadotropin hormone (hCG). In the course of a natural ovarian cycle, follicular dominance occurs between days 3 to 5. As a result, generally only one will be destined to complete its maturation and ovulate. So far, there is no protocol indicating the optimal doses of controlled ovarian stimulation. The dose is calculated according to the specific variables of the patient such as age, basal concentrations of follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and estradiol (P4); as well as the previous response to the pharmacological treatment. In the present study, different types of ovarian stimulation protocols were evaluated in patients of the HISPAREP Assisted Reproduction Clinic, to determine which drugs have the least impact on DNA damage in granulosa cells using the comet assay, as a marker of oocyte quality. Results show that the GnRH antagonist is associated with low DNA damage in the cumulus cells of patients undergoing in vitro fertilization (IVF), as well as complete embryonic development that resulted in live newborns. On the other hand, the FSHr showed greater efficiency than regarding the damage to DNA produced in cumulus cells and the results of embryonic development. Finally, the results show a correlation between DNA damage in human cumulus cells evaluated by the comet assay and the result of embryonic development, which allows us to consider the possibility of using this assay as a marker of oocyte quality in women who carry out IVF.

---

## MARCO TEÓRICO

### 1. La Infertilidad

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la infertilidad se define como la imposibilidad de lograr un embarazo después de mantener relaciones sexuales sin protección por 12 meses; es un problema clínico común que afecta alrededor del 13% al 15% de las parejas en el mundo (Zegers-Hochschild et al., 2009).

### 2. El Ovario

El ovario humano es un órgano cuyas funciones principales consisten en liberar durante cada ciclo menstrual un ovocito competente para la fertilización y el desarrollo embrionario, además de preparar a los órganos reproductores accesorios para el embarazo y el nacimiento de un bebé sano mediante la producción de hormonas esteroideas (función endocrina) (Adashi y Leung, 2007). En el ovario humano adulto, existe comunicación parácrina entre el ovocito y las células de la granulosa durante todo el crecimiento y desarrollo del ovocito, así como del folículo ovárico. Los ovocitos de folículos primordiales cultivados *in vitro* dejan de crecer en ausencia de células de la granulosa. Las células del cumulus (CC) tienen un papel importante en la regulación de la maduración del ovocito así mismo el ovocito es también un modulador importante de la función de las CC (Zhang et al., 2005).

### 3. El ovocito

El ovocito es la única célula altamente especializada responsable de crear, activar y controlar el genoma embrionario, así como apoyar a los procesos básicos, tales como la homeostasis celular, el metabolismo y la progresión del ciclo celular en el embrión temprano. La calidad de los ovocitos también está relacionada con la supervivencia embrionaria temprana, establecimiento y mantenimiento del embarazo (Ruvolo et al., 2013a). El ovocito no es un receptor pasivo, sino un regulador clave de su propio desarrollo. A través de la señalización parácrina, utilizando factores como el factor de crecimiento y diferenciación 9

---

(GDF9) y las uniones comunicantes, los ovocitos son capaces de influir en torno a las células del cumulus y regular su microentorno (Gilchrist et al., 2008) Esta comunicación bidireccional entre los ovocitos y sus células del cumulus parece ser vital para su crecimiento, desarrollo y supervivencia. Se ha demostrado que los ovocitos regulan el desarrollo folicular (Eppig et al., 2002), secretan mitógenos desencadenantes de la proliferación de CG (Li et al., 2000) y disminuyen el índice apoptótico de células del cumulus (Hussein, 2005).

#### **4. Las Células de la Granulosa (Cooperación Metabólica entre Ovocitos y Células de la Granulosa)**

Las CG son células somáticas íntimamente asociadas con el desarrollo del ovocito en el folículo ovárico. Las células foliculares se encuentran formando una sola capa aplanada alrededor del ovocito en el folículo primordial. Durante el desarrollo del folículo (foliculogénesis) éstas proliferan y dan lugar a las llamadas CG (Brůcková et al., 2008) las cuales están en contacto físico con el desarrollo del ovocito por medio de las uniones comunicantes de hendidura (Andersen y Ezcurra, 2014). También están presentes las CG murales, las cuales están situadas en la teca interna y son esenciales para la producción de estrógenos y para la ruptura del folículo (Andersen y Ezcurra, 2014). La maduración y crecimiento adecuado del ovocito depende del soporte de las CG de los folículos ováricos (Sharpe-Timms et al., 2000). Después de la formación del folículo antral se forma una capa estratificada de CG. En el folículo maduro, éstas rodean al ovocito en forma de corona radiada, que forma parte del *cumulus-oophorus*. Las células de granulosa-luteínicas humanas hoy en día son usualmente cultivadas durante la FIV a partir de los folículos ovulatorios pre-estimulados por hormonas femeninas ( Brůcková et al., 2008). Finalmente, en los folículos de Graaf, las CG murales se alinean en la pared folicular, y un conjunto de células somáticas altamente especializadas conocidas como células del cumulus que rodean el ovocito, formando el complejo cumulus-ovocito (COC). Estas capas de CG y de células del cúmulo median señales endocrinas externas al ovocito, lo que permite el crecimiento y la maduración de ovocitos. Antes de la oleada ovulatoria de la LH,

---

las células del cumulus se conectan al ovocito por uniones comunicantes de hendidura que facilitan la comunicación intercelular (Albertini et al., 2001). A través de estas uniones, las células del cúmulo son capaces de transportar los aminoácidos, metabolitos y moléculas de señalización que son esenciales para el crecimiento y el desarrollo de los ovocitos y la reanudación de la meiosis (Gilchrist, 2006).

## **5. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario**

El eje hipotálamo-hipófisis-ovario trabaja en conjunto para permitir la fertilización por medio de la producción cíclica de hormonas gonadotrópicas y esteroides. Este ciclo está estrictamente regulado para seleccionar un folículo dominante para la ovulación, mientras que prepara el endometrio para la implantación. El ovario juega un papel fundamental en la producción de hormonas esteroides necesarias para el desarrollo folicular y la maduración de los ovocitos. Esta regulación puede verse afectada negativamente cuando ocurren patologías dentro de cualquier unión del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Mikhael et al., 2019). El ciclo ovulatorio está regulado por mecanismos de retroalimentación positiva y negativa. Las hormonas sexuales esteroides producidas por el ovario regulan el patrón de secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas, hormona estimulante del folículo y hormona luteinizante, que a su vez modifican la liberación de hormonas ováricas. Al comienzo de cada ciclo, un aumento en los niveles de FSH provoca el reclutamiento y el desarrollo folicular, con la consiguiente elevación de los niveles de estradiol (Miro y Aspinall, 2005). El aumento de los niveles de estradiol secretado por los folículos en maduración produce una proliferación endometrial, un cambio en el tamaño del orificio cervical y un aumento en la cantidad de moco cervical. Después del reclutamiento folicular, durante la fase folicular del ciclo, el estradiol junto con la inhibina ejerce un mecanismo de retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario que provoca una disminución en los niveles de FSH. Posteriormente, cuando un folículo se convierte en el folículo dominante, produce niveles cada vez más altos de estradiol, lo que resulta en una estimulación de neuronas kisspeptinérgicas en

---

el núcleo periventricular anteroventral del hipotálamo, cambiando así el mecanismo de retroalimentación negativa a positivo. La kisspeptina induce la secreción de GnRH y el siguiente pico preovulatorio de LH, que inicia la luteinización folicular que conduce a la formación del cuerpo lúteo. Después del inicio del pico de gonadotropinas a mitad del ciclo, se produce un aumento preovulatorio de la progesterona. Este aumento temprano de progesterona producido en el folículo preovulatorio es crítico para la ovulación y el desarrollo de un cuerpo lúteo funcional. La LH y la progesterona desencadenan la degradación de la pared folicular por proteasas, prostaglandinas y otros compuestos, lo que produce la liberación del ovocito que normalmente sobrevive de 12 a 24 horas. Después de la ovulación, la LH contribuye al desarrollo del cuerpo lúteo que continúa produciendo progesterona y estrógeno durante la fase lútea. La progesterona modifica el revestimiento endometrial de tipo proliferativo a secretor y cambia el moco cervical de estrogénico a progestacional. Aproximadamente 8 días después, en ausencia de fertilización, el cuerpo lúteo comienza a retroceder y dura aproximadamente de 11 a 17 días, con una vida útil promedio de 14 días. Como consecuencia, las concentraciones de estrógeno y progesterona vuelven a los niveles observados en la fase folicular temprana aproximadamente dos semanas después de la formación inicial del cuerpo lúteo. Esto elimina la supresión ejercida sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario y provoca el inicio de un nuevo ciclo dentro del eje (Holesh et al., 2021).

## **6. Ovulación**

Para que los folículos progresen desde el estado preantral, las células de la granulosa y las de la teca desarrollan receptores para las gonadotropinas FSH y LH, respectivamente. La teca produce andrógenos (testosterona y androstenediona) bajo la influencia de la LH, que se difunden a través de la membrana propia hasta la granulosa, donde los andrógenos se transforman en estrógenos. En esta fase del desarrollo la granulosa no puede producir andrógenos, y la teca tiene una capacidad limitada para la producción de estrógenos. Sin embargo, en un estadio tardío de la fase ovárica folicular, los

---

receptores de LH se desarrollan también en la granulosa (gracias al estímulo de los estrógenos y de la FSH), lo que permite el pico preovulatorio que ocasiona la ovulación (Holesh et al., 2021).

Al final de la fase de crecimiento el folículo maduro reacciona a la liberación de gonadotropinas para completar la maduración citoplásmica y nuclear del ovocito. Las células del cumulus secretan una gran cantidad de ácido hialurónico que se acumula en los espacios intercelulares y provoca la disociación de las CC seguido de su ruptura y así el ovocito, rodeado de una porción de las células de la granulosa (CG) y de la corona radiada, es liberado con el líquido folicular. La formación del ovocito preovulatorio conduce a un proceso de proteólisis enzimática que debilita la pared del folículo y permite la expulsión suave del contenido folicular. La producción del activador del plasminógeno activa la producción de colagenasa que disocia las fibras de la teca, al mismo tiempo que la producción de prostaglandinas induce una serie de contracciones rítmicas de los mioblastos de las paredes foliculares y del estroma cortical que produce, en el último término, la expulsión del contenido folicular (Holesh et al., 2021).

El ovocito completa su maduración citoplásmica y nuclear bajo el influjo de la LH. Los gránulos corticales del ovocito migran hacia la periferia y se adhieren a la membrana plasmática. La meiosis se reactiva, se expulsa el primer cuerpo polar y los cromosomas se alinean en metafase II en espera del complemento cromosómico espermático, en caso de fertilización futura. El cuerpo lúteo después de la expulsión del ovocito del folículo se transforma en cuerpo amarillo que es el responsable de la producción hormonal que transformará el endometrio, previamente proliferado por los estrógenos, para hacerlo receptivo del embrión. Los vasos sanguíneos invaden completamente las células de la granulosa y se abren en la cavidad folicular llenándola rápidamente con un coágulo central que modificará su aspecto durante la fase lútea. Las células de la granulosa adquieren inclusiones lipídicas citoplásmicas necesarias para la producción de esteroides sexuales y se transforman en células luteicas grandes responsables de la producción de esteroides, especialmente de progesterona que se encarga de

---

preparar el endometrio para la implantación uterina del óvulo fertilizado y el mantenimiento del embarazo (Butnev AY, 2014).

## **7. Fertilización**

La fertilización es un paso esencial en la reproducción sexual y consiste en una serie de eventos cuidadosamente orquestados que culminan con la generación de un cigoto genéticamente único. Tras la eyaculación en el tracto genital femenino, millones de espermatozoides ascienden al útero. Sin embargo, solo unas pocas pasan a través de las uniones uterotubáricas para migrar hacia el ámpula del oviducto. Durante este tránsito, los espermatozoides adquieren la capacidad de fecundar los óvulos mediante un proceso definido como capacitación que consiste en una serie de cambios fisiológicos y moleculares que adquieren los espermatozoides en el tracto reproductivo femenino. Estos cambios pertenecen al patrón de motilidad de los espermatozoides y a su capacidad para experimentar exocitosis acrosómica (la fusión de la membrana plasmática del esperma con la membrana acrosómica externa), que es esencial para la fertilización (Georgadaki et al., 2016). Muy pocos espermatozoides alcanzan el ámpula tubárica y entran en contacto con el ovocito. La unión del espermatozoide con el óvulo se basa en la organización molecular de la superficie celular de cada gameto, sobre las cuales existen moléculas de reconocimiento y adhesión. La interacción del espermatozoide con el ovocito durante la fertilización ocurre en tres niveles: i) el *cumulus oophorus*., ii) la zona pelúcida, que induce la exocitosis del contenido del acrosoma y, iii) la membrana plasmática del ovocito que concluye fusionándose con la membrana del espermatozoide (Georgadaki et al., 2016).

## **8. Estimulación Ovárica Controlada (COS)**

La estimulación ovárica controlada es la inducción de la maduración folicular para la fertilización *in vitro* (FIV), y ésta se logra mediante la administración de gonadotropinas en dosis altas con la intención de recuperar tantos ovocitos como sea posible (Wu et al., 2020). Es el componente clave de las tecnologías de reproducción asistida (ART) que cambiaron la práctica clínica de los ciclos monofoliculares naturales a los ciclos de tratamiento de FIV donde

---

ocurre la estimulación de múltiples folículos y, en consecuencia, un mayor número de ovocitos recuperados, lo cual mejoró las tasas de embarazo en las mujeres que se sometieron a FIV/ICSI, no solo al aumentar el número de embriones disponibles, sino también al permitir el cultivo de embriones y permitir la selección del embrión de mejor calidad para su transferencia (Drakopoulos et al., 2016).

La estimulación ovárica controlada ha pasado por fases. El primer nacimiento por fertilización in vitro, en 1978, se logró en un ciclo natural. Las bajas tasas de embarazo ocasionaron que en 1982 se empezara a practicar la estimulación ovárica controlada, al inicio con mínima estimulación con citrato de clomifeno, complementado con hMG y hCG. Un problema frecuente en este tipo de esquemas es que provocaba picos prematuros de LH, que cancelaban los ciclos en 20 a 30% de los casos. En la década de 1990, la generación de análogos de GnRH, en un principio agonistas, disminuyó la luteinización prematura al 2%, pero la supresión hipofisaria era tan acentuada en los ciclos largos, que se empezaron a requerir dosis más altas de gonadotropinas, lo cual fomentó complicaciones como el síndrome de hiperestimulación ovárica y los embarazos múltiples (Pérez E, 2010).

La eficacia de las TRA depende de un buen protocolo de hiperestimulación ovárica controlada y un adecuado reclutamiento de ovocitos. La respuesta de muchas pacientes a los protocolos de estimulación ovárica utilizados cada vez no siempre es la esperada. La falta de respuesta adecuada a los protocolos y de reclutar folículos adecuados se denomina respuesta deficiente y da como resultado una disminución de la producción de ovocitos, la cancelación del ciclo y, en general, una disminución de las tasas de embarazo. La mala respuesta a la inducción de la COS es un caso de un resultado esperado deficiente. La incidencia de respondedores deficientes varía en la literatura entre el 9 y el 24% (Loutradis et al., 2007). La reserva ovárica reducida representa el factor etiológico más frecuente. Aunque está altamente correlacionado con la edad materna, también es común en mujeres más jóvenes y puede estar asociado con endometriosis avanzada o cirugía ovárica previa. Estudios recientes han demostrado que la mala

---

respuesta ovárica es un primer signo de envejecimiento ovárico (insuficiencia ovárica precoz o menopausia precoz). Los ovocitos obtenidos en la extracción de óvulos a menudo son subóptimos (Jenkins et al., 1991). Las altas cifras de implantación y embarazo, comparadas con los ciclos naturales, pueden ser atribuidas al uso de COS. Actualmente, tres objetivos son perseguidos cuando se usan las técnicas de COS en ART: el primero, inducción de la ovulación, seguido de supresión de la actividad hipofisiaria y finalmente la estimulación del crecimiento de múltiples folículos (Hoseini et al., 2014).

En la concepción natural *in vivo* los eventos fisiológicos, sobre todo hormonales, que ocurren en el folículo cercano a la maduración ovocitaria y al mismo proceso ovulatorio, así como el fenómeno de desarrollo endometrial y sus mecanismos de maduración y receptividad, se producen coordinadamente a través de una sincronización orgánica intrínseca que funciona a la perfección. Este tipo de sincronización, por supuesto, no va a ocurrir en la paciente receptora, de tal manera que se torna crítico y sumamente importante el estricto manejo y control del procedimiento que deba realizarse. El principio de la sincronización es el de transferir embriones a la receptora, justo en el tiempo en que el desarrollo embrionario y endometrial, permitan una subsecuente implantación normal (Melnick et al., 2018).

De lo anterior se deduce que todos los procedimientos de transferencia embrionaria deben, en lo posible, imitar los fenómenos naturales del ciclo, intentando duplicar en la receptora la secuencia de eventos sobre todo a nivel endometrial, que suceden espontáneamente *in vivo*. En vista de que no se han descrito los parámetros definidos de receptividad endometrial normal, en términos de crecimiento y diferenciación, los niveles adecuados en suero de los esteroides circulantes y la histología endometrial en días específicos del ciclo menstrual previo, probablemente proporcionen información de equivalencia al desarrollo de una receptividad endometrial normal (Paulson et al., 1990).

## **9. Fármacos Empleados en Estimulación Ovárica Controlada**

---

1. INDUCTORES/ESTIMULADORES DE LA OVULACIÓN: Se emplean para proporcionar un número mayor de ovocitos por ciclo.

*Hormona folículo estimulante recombinante (FSHr)*

Está indicado para la estimulación del desarrollo folicular en mujeres con deficiencia severa de LH y FSH y además en pacientes con insuficiencia ovárica. Es usada en pacientes que se someten a técnicas de reproducción asistida (TRA) como la FIV, ICSI (Jiménez García, 2016). Su función es la de fomentar el crecimiento y el desarrollo de los folículos ováricos. Los principales fármacos de FSHr empleados son Gonal-F, Puregon, Corneumon y Pergoveris.

*Gonadotropina menopáusica humana (hMG)*

Se obtiene a partir de la orina de mujeres postmenopáusicas y es una combinación que contiene cantidades equivalentes de FSH y LH (75UI). Los primeros preparados presentaban un alto grado de impureza, pero actualmente existen preparados de hMG ultrapurificados, que pueden administrarse por vía subcutánea, por lo que el tratamiento es mejor tolerado. Mecanismo de acción: Su componente FSH induce un mayor reclutamiento folicular y estimula el crecimiento y su componente LH facilita la maduración folicular (Jiménez García, 2016). Los principales fármacos de este tipo son Pregnyl, Lucrin, Ovidrel y Choregon.

*Gonadotropina coriónica humana (hCG)*

Se administra para desencadenar la maduración folicular final y la luteinización tras la estimulación del desarrollo folicular. Los principales fármacos de hCG utilizados son Pregnyl, Lucrin y Ovidrel (Jiménez García, 2016).

2- SUPRESORES HIPOFISARIOS: Su función es inhibir la función hipofisaria: evitar aparición de un pico de LH endógena que desencadene una ovulación espontánea.

*Agonistas de GnRH*

---

La GnRH es la hormona liberadora de gonadotropinas, la cual es secretada por el hipotálamo para regular el ciclo menstrual de la mujer que ejerce su efecto sobre la hipófisis para inducir la secreción de las gonadotropinas FSH y LH. Con esto se consigue activar el ciclo menstrual de la mujer y que los folículos ováricos empiecen a desarrollarse para expulsar un óvulo maduro. Los agonistas de GnRH son hormonas con una constitución similar a la GnRH endógena y que actúan mediante un sistema de desensibilización. Ejercen su acción mediante la unión a los receptores de GnRH presentes en la superficie de la hipófisis anterior; los análogos de GnRH administrado inicialmente activan mediante la unión con su receptor la liberación de gonadotropinas (efecto “flare-up”), pero al ser estos administrados de forma continua, terminan por copar los receptores disponibles, saturándolos y dejándolos ocupados, lo que provoca una reducción en los niveles de FSH y LH, y una caída secundaria de la secreción de las hormonas ováricas, principalmente de E2. Esto permite un control preciso de la estimulación ovárica mediante la administración exógena de una preparación de FSH, e impide la aparición inoportuna de un pico de LH endógena y la ovulación espontánea subsiguiente, antes de que pueda hacerse la captación ovocitaria. Entre los agonistas de GnRH más utilizados se encuentran Triptorelina, Nafarelina y Leuprorelina (Jiménez García, 2016).

#### *Antagonistas de GnRH*

Mecanismo de acción: Actúan por competición directa con la GnRH endógena bloqueando su receptor hipofisario, lo que provoca una supresión inmediata de la secreción de las gonadotropinas, sin efecto “flare-up”. En este grupo de fármacos encontramos a Orgalutran (Ganirelix) y a Cetrotide (Cetrorelix), los cuales son decapeptidos sintéticos (Jiménez García, 2016).

### **10. Reproducción asistida**

El diagnóstico y tratamiento moderno de los problemas de infertilidad de la pareja se basa en el entendimiento de los eventos fisiológicos que regulan el proceso reproductivo en la especie humana. Las estrategias terapéuticas como la inducción de la ovulación y la COS, tienen como base el reclutamiento de varios

---

folículos al inicio de cada ciclo menstrual, por lo que es indispensable conocer las características morfológicas y los eventos endocrinos que regulan la producción de gametos (Adashi y Rosenwaks, 1996).

En la práctica clínica las gonadotropinas son tradicionalmente utilizadas para inducir la maduración del folículo con la finalidad de obtener un gran número de ellos para un tratamiento exitoso y maximizar la calidad del embrión (Okun et al., 2014). Hasta la fecha no existe un protocolo que indique la dosis óptima de inicio en la COS (Macklon et al., 2006). La dosis óptima de inicio se calcula de acuerdo con las variables específicas de la paciente como la edad, concentraciones basales de FSH y respuesta previa al tratamiento. Las pacientes, comúnmente, difieren en su respuesta a la estimulación y, por lo tanto, es difícil establecer las dosis y protocolos efectivos (Howles et al., 2006).

En humanos, es difícil distinguir entre los efectos de las TRA y los factores parentales relacionados con la infertilidad. Otro problema, es lo relativo con los resultados de las manipulaciones al ovocito por la estimulación ovárica con bajas o altas concentraciones hormonales (el Hajj y Haaf, 2013).

### **11. Daño al ADN por la estimulación ovárica controlada**

Aunque la COS ha favorecido la obtención de un elevado número de ovocitos, lo cual ha llevado a un incremento en las tasas de FIV, su uso puede originar complicaciones clínicas, tales como el síndrome de hiperestimulación ovárica y reducción en la viabilidad embrionaria (Pérez-Ruiz et al., 2011). Estudios en ratón han demostrado que la COS causa un aumento en las especies reactivas de oxígeno, inhiben la replicación del ADN mitocondrial, causan alteraciones en el citoesqueleto y afectan negativamente la función mitocondrial de ovocitos (Ge et al., 2012), en tanto que estudios en mujeres muestran que agonistas de la GnRH son capaces de causar apoptosis en células de la granulosa (Park et al., 2011) y que la COS causa una inhibición significativa de algunas enzimas antioxidantes de la familia de las paraoxonasas (PON) en el fluido folicular, reduciendo así la protección del fluido folicular contra radicales libres (Pérez-Ruiz et al., 2011). El estrés oxidativo generado en las células del cumulus y en el ovocito sería el

---

responsable del daño al ADN en las células cumulus de mujeres que participaron en programas de FIV/ICSI (Lavorato et al., 2012; Ruvolo et al., 2019). Si el daño al ADN ocurre en el ovocito, no se llevará a cabo la activación de las proteínas reparadoras y subsecuentemente habrá daño en el genoma (Ma et al., 2013). Los mencionados efectos secundarios de la COS podrían explicar la baja eficiencia de la FIV y la reducción en la viabilidad embrionaria asociada con estos procedimientos clínicos.

## **12. Ensayo cometa**

En los últimos 30 años, el ensayo cometa ha demostrado su utilidad y versatilidad en biomonitoreo humano, en ecogenotoxicología, pruebas de genotoxicidad e investigación básica sobre los mecanismos de reparación y daño del ADN (Collins, 2015). El ensayo cometa, o electroforesis en gel de células individuales, se desarrolló a partir de estudios de la estructura del núcleo llevados a cabo en la década de 1970 (Cook et al., 1976).

Si las células y las membranas nucleares se disuelven con detergente, y las histonas se extraen del ADN con una alta concentración de NaCl, el ADN y la matriz permanecen como una estructura nuclear, el nucleoide, y el ADN retiene el superenrollamiento que tenía cuando se encontraba en los nucleosomas. Si el superenrollamiento se relaja mediante una ruptura de cadena simple o doble, el asa del ADN puede moverse libremente hacia un "halo" alrededor del núcleo. En el ensayo del cometa, los nucleoides se incrustan en agarosa y se someten a un campo eléctrico; el ADN dañado es atraído por el ánodo, formando una "cola de cometa" (Shaposhnikov et al., 2008). La intensidad relativa de la cola (generalmente medida mediante microscopía de fluorescencia) aumenta con la dosis de radiación ionizante o agente químico dañino, a medida que aumenta la frecuencia de las rupturas. Mientras el ensayo cometa se concentra en el análisis detallado de eventos en células individuales, muchos usuarios del ensayo tienen la dificultad de una rápida descripción del daño al ADN en una gran cantidad de muestras. Para esto, se requiere del procesamiento de muestras con alto rendimiento y rápido. Esto se logra con un análisis automatizado (Ge et al., 2015).

---

Si se utiliza el ensayo de cometa estándar o una variante de alto rendimiento, existen elementos prácticos comunes que deben controlarse cuidadosamente, como la concentración de agarosa, el tiempo de desenrollado alcalino y las condiciones de electroforesis (Enciso et al., 2015). Se ha investigado el efecto de variar el período de lisis, un paso que normalmente se considera como no crítico, siempre que se aplique un período mínimo de 1 hora. Cuando se recogen muchas muestras a la vez, y el procesamiento inmediato es imposible, las células se pueden crioconservar y analizar en una fecha posterior (Del Bo' et al., 2015).

**Los diferentes enfoques para el análisis de los cometas incluyen los siguientes:**

- Medir la longitud de la cola del cometa en una fotomicrografía o utilizar una retícula, un método laborioso que proporciona información limitada, ya que la longitud de la cola aumenta solo en los niveles más bajos de daño y pronto llega a ser máxima, reduciendo así el rango útil del ensayo. Clasifica los cometas mediante inspección visual, generalmente en cinco categorías: 0 que representa células sin daños (cometas con colas nulas o apenas detectables) y 1-4 que representa intensidades de cola relativas crecientes. Sumar los puntajes (0-4) de 100 cometas da una puntuación general de entre 0 y 400 unidades arbitrarias.
- Análisis de imágenes, con una cámara de dispositivo de carga conectada a una computadora con el software apropiado, disponible comercialmente o de Internet. Las imágenes del cometa son seleccionadas por el operador.
- Sistemas automatizados, que buscan los cometas y llevan a cabo el análisis con una mínima intervención humana.
- Cualquiera que sea el método elegido, la puntuación lleva tiempo y se convierte en el factor limitante cuando se deben analizar grandes cantidades de muestras. Los sistemas automatizados hasta ahora disponibles todavía se basan en el análisis de cometas individuales. (Collins et al., 2008)

---

## ANTECEDENTES

Desde el nacimiento del primer niño mediante FIV en 1978 han habido muchos cambios en la metodología utilizada permitiendo hoy en día el desarrollo hasta el estadio de blastocisto de forma confiable y segura (Torelló Ybáñez, 2011). Muchos investigadores están trabajando para identificar marcadores para seleccionar el mejor de los ovocitos para producir embriones con mayor potencial de implantación (Ruvolo et al., 2013b).

En un experimento de Lavorato et al. (2012) se comparó el nivel de fragmentación del ADN evaluado por el ensayo TUNEL (Terminal Transferase-Mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling) en las células de la granulosa expuestas a un agonista o antagonista de GnRH en ciclos de ICSI complementados con LH recombinante (LHr), encontrándose que tanto el agonista como el antagonista de GnRH causaron fragmentación del ADN en células de la granulosa en mujeres sometidas a procedimientos de FIV/ICSI (Figura 1), mostrando evidencia de los efectos secundarios que tiene la COS en estos procedimientos. El daño causado en las células del cumulus, al estar en estrecha comunicación con el ovocito y servirle de soporte nutricional, podría afectar la calidad del ovocito, por lo que resulta muy interesante determinar si la fragmentación del ADN en las células del cumulus puede ser utilizada como un marcador molecular de la calidad de los ovocitos.

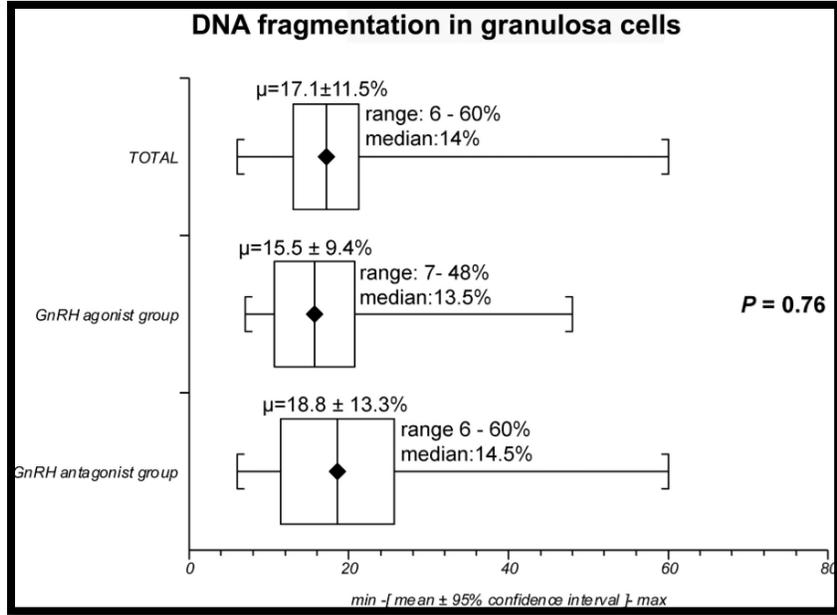


Figura 1. En la gráfica se observa el nivel promedio de fragmentación del ADN fue de  $15.5 \pm 9.4\%$  para la GnRH-a y  $18.8 \pm 13.3\%$  para el grupo GnRH-ant. El porcentaje de fragmentación positiva del ADN en las células de la granulosa no difirió significativamente ( $P=0,76$ ) entre el grupo GnRH-a y el grupo GnRH-ant. Tomado de (Lavorato et al., 2012).

---

## JUSTIFICACIÓN

Los métodos tradicionales de la selección de ovocitos se basan en evaluaciones subjetivas morfológicas. Las células de la granulosa son abundantes y generalmente se descartan en el momento de la FIV, por lo que son un sustrato ideal para estudiar ya que las propiedades funcionales de estas células son un reflejo de la calidad del ovocito (Kordus and LaVoie, 2017)

La búsqueda de marcadores en las células de la granulosa relacionados con la calidad del ovocito, específicamente daño al ADN, permitiría seleccionar ovocitos de mejor calidad para las diferentes TRA con la finalidad de incrementar la probabilidad de fecundación y desarrollo embrionario.

---

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿El daño al ADN causado por la estimulación ovárica controlada está relacionado con la calidad del ovocito para su uso en las técnicas de reproducción asistida?

---

## **HIPÓTESIS**

El daño al ADN provocado por estimulación ovárica puede causar bajas tasas de fertilización o desarrollo embrionario. Identificar marcadores de la calidad del ADN en las células de la granulosa podría ayudar a identificar los ovocitos humanos de mayor calidad y por lo tanto obtener mejores resultados durante la FIV.

---

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Determinar si el daño al ADN en células de la granulosa se relaciona con la calidad de los ovocitos humanos obtenidos por medio de estimulación ovárica controlada.

### Objetivos Particulares

1. Obtención de las células de la granulosa de pacientes sometidas a estimulación ovárica controlada.
2. Análisis del daño al ADN en las células de la granulosa por medio del ensayo cometa, utilizando el software OpenComet.
3. Analizar el desarrollo embrionario de los ovocitos que corresponden a las células de la granulosa analizadas para determinar si existe una correlación entre el daño al ADN de éstas con la calidad de los ovocitos obtenidos por medio de una estimulación ovárica controlada.

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Estimulación ovárica controlada

Todas las pacientes comenzaron la estimulación ovárica con una dosis inicial flexible de FSHr (Gonal-F) que varía de 150 a 225 UI en el tercer día del ciclo menstrual durante 3 días consecutivos. La dosis inicial se determina por la edad del paciente, la reserva ovárica, el índice de masa corporal y la respuesta previa a COS. La dosificación de FSHr se ajustó luego de acuerdo con el crecimiento folicular, el cual se controló mediante ultrasonidos transvaginales en serie. Después de que al menos un folículo había alcanzado 14 mm de diámetro, las pacientes también comenzaron las inyecciones subcutáneas de Cetrorelix (cetrotide, agonista de GnRH) a una dosis de 0.25 mg por día junto con la FSHr. Cuando al menos dos folículos principales alcanzaron 18 mm de diámetro, la maduración final de los ovocitos se desencadenó con 250 µg de hCG recombinante (Ovidrel) que fue equivalente aproximadamente a 6,500 UI de hCG de acuerdo con los datos del fabricante, o por 250 µg de hCG recombinante más 0.2 mg de triptorelin (Decapeptil, agonista de GnRH) (Lin et al., 2013).



Figura 2. Se muestra la ecografía después de una estimulación. Al centro de la imagen se observan varias figuras negras que se corresponden con los folículos mayores a 14 mm de diámetro.

Imagen proporcionada por el M. en C. Pedro Cuapio Padilla. Clínica HISPAREP

## 1. Aspiración de los ovocitos o punción folicular

La aspiración folicular para la recuperación ovocitaria se llevó a cabo de 34 a 36 horas después de la administración de hCG. El procedimiento se efectuó en el quirófano de la clínica HISPAREP con la paciente en posición de litotomía dorsal, la asepsia y antisepsia del canal vaginal se realizó con solución salina, se aplicó anestesia general corta y superficial. Mediante la punción transvaginal bajo guía ecográfica utilizando una aguja de aspiración descartable de 16g–17g y de 300 mm de largo fueron aspirados los folículos ováricos. La aguja de aspiración se lavó con medio de cultivo Gamete 100-HEPES antes del procedimiento.

Se aplicó una presión negativa de 100-120 mmHg mediante un sistema o bomba de aspiración. La succión se inició en el momento que la aguja punccionó al folículo y se mantuvo hasta que éste colapsó totalmente, como se pudo apreciar en el monitor del ecógrafo. El líquido aspirado se colectó en un tubo de ensayo de 15 ml de ensayo con medio HTF.

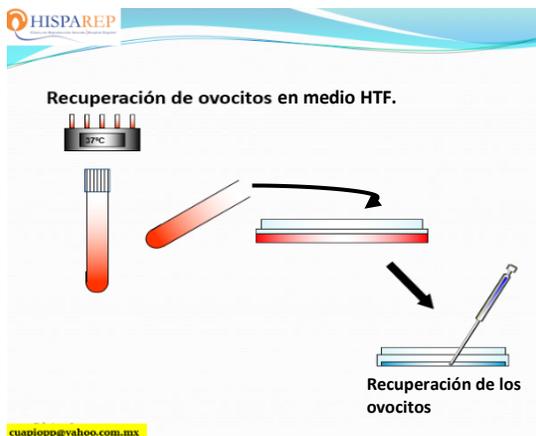


Figura 3. Los ovocitos aspirados se colocan en una placa a 37°C para ser llevados a una caja Petri y recuperar los ovocitos que se hayan obtenido durante la aspiración.

Modificada del M. en C. Pedro Cuapio Padilla. Clínica HISPAREP

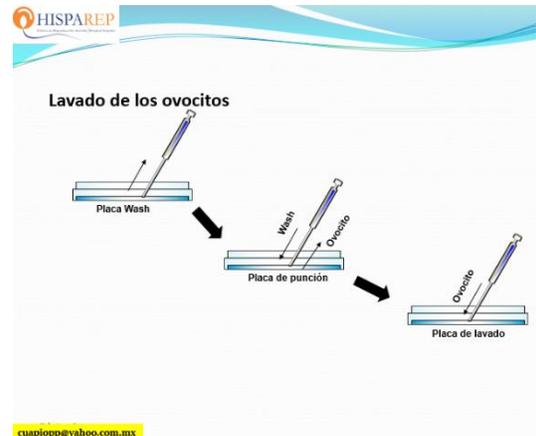


Figura 4. Se muestran los lavados de los ovocitos para que puedan ser llevados a la incubadora.

Proporcionada del M. en C. Pedro Cuapio Padilla. Clínica HISPAREP

---

## **2. Decumulación de las células de la granulosa**

Los tubos con los ovocitos aspirados fueron llevados al laboratorio de Fertilización *in vitro* en donde se realizó la decumulación de los ovocitos y separación de las células de la granulosa bajo el microscopio estereoscópico con agujas finas en medio HTF suplementado con heparina. Posteriormente las células de la granulosa se llevaron a un tubo de 15 ml con medio HTF.

Estos tubos fueron marcados con el número de expediente de cada paciente/donante, los cuales se llevaron a 36°C a la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa en donde se realizó el ensayo cometa.

## **3. Ensayo Cometa**

Se preparó agarosa de bajo punto de fusión al 0.75 % y de punto de fusión normal al 1% (Sigma A9414 y A9539, respectivamente) con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) libre de calcio. Se cubrieron los portaobjetos esmerilados con agarosa de punto de fusión normal y se dejaron solidificar a temperatura ambiente por 24 horas.

Posteriormente a los portaobjetos se añadieron las células de la granulosa de los COCs obtenidos de cada paciente (10 COCs en promedio), resuspendidas en 75 µL de agarosa de bajo punto de fusión y se cubrieron con un cubreobjetos, los portaobjetos se colocaron en una cámara fría (4°C) durante 10 minutos y en oscuridad para solidificar la agarosa. Pasado ese tiempo se retiraron los cubreobjetos y se añadió otra capa de agarosa de bajo punto de fusión (75 µL) y se dejó solidificar nuevamente en la cámara fría por 10 minutos.

Se retiraron los cubreobjetos y los portaobjetos fueron sumergidos en una solución de lisis (2.5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, NaOH y 10 mM de Tris, pH 10, con Tritón X-100 al 1% y 10% de DMSO) durante 1 hora en refrigeración en oscuro. En un cuarto oscuro, los portaobjetos se retiraron de la solución de lisis y se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal por 20 minutos junto con el amortiguador de electroforesis fresco (NaOH 10 N y EDTA 200 mM, pH=10) para que el ADN de las células pase de un estado compacto a uno laxo,

---

posteriormente se realizó la electroforesis a 25 V, 300 mA por 20 minutos. Después del corrimiento se colocaron los portaobjetos en una solución de neutralización (Tris 0,4 M, pH 7,5) durante 10 min, repitiendo el procedimiento dos veces. Realizadas las dos exposiciones a la solución de neutralización, se dejaron de 5 a 10 minutos en alcohol frío al 70% para deshidratar las laminillas. Finalmente se retiraron y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Para evaluar el daño al ADN las muestras se tiñeron con bromuro de etidio, las laminillas se dejaron en una cámara húmeda y oscura por 1 hora hasta el momento de la evaluación. La evaluación se realizó en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss, Axiostar plus) a 400X y se tomaron fotografías de los cometas que posteriormente se analizaron con el software OpenComet.

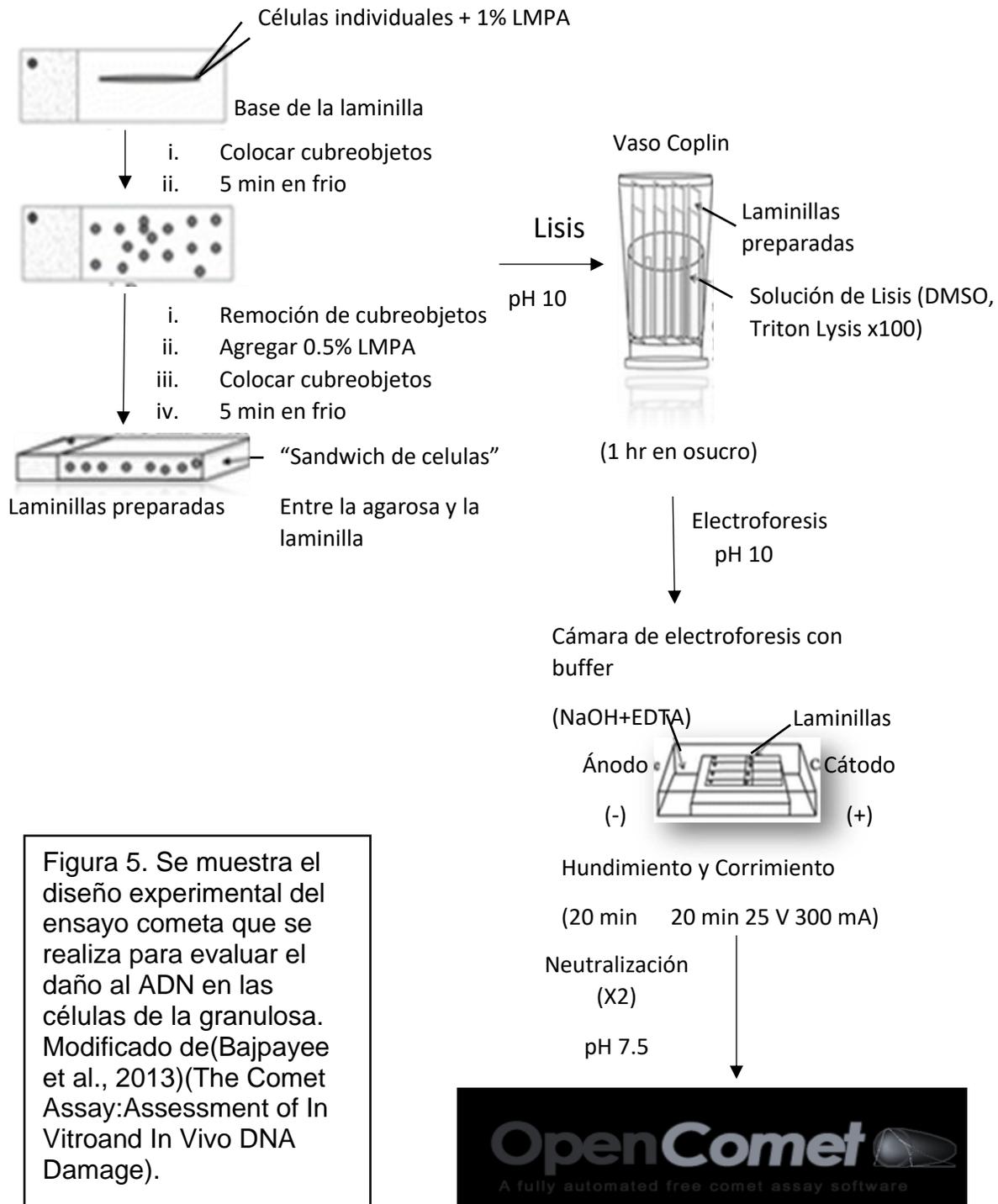


Figura 5. Se muestra el diseño experimental del ensayo cometa que se realiza para evaluar el daño al ADN en las células de la granulosa. Modificado de(Bajpayee et al., 2013)(The Comet Assay:Assessment of In Vitroand In Vivo DNA Damage).

---

## RESULTADOS

Se obtuvieron y transportaron las células de la granulosa humanas obtenidas de 18 pacientes y 2 donantes para realizar el ensayo cometa, las cuales fueron disgregadas y se observan en la Figura 6. Posteriormente se realizó el ensayo cometa con las muestras obtenidas que fueron analizadas con el programa OpenComet, el cual lleva a cabo una selección de los verdaderos cometas y excluye a otras regiones que no se corresponden con éstos (Figura 7).

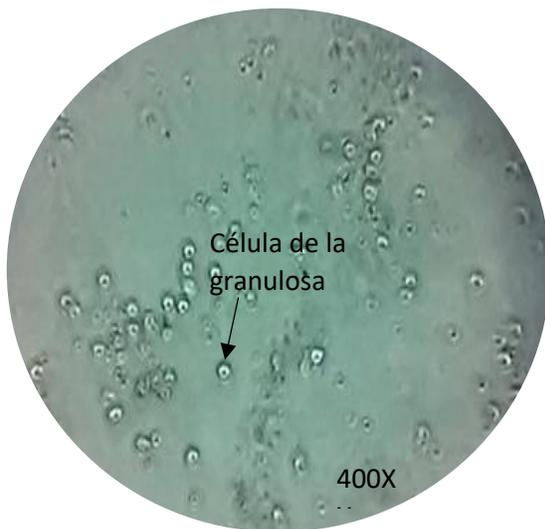


Figura 6. Células de la granulosa humanas.  
Microfotografía de las células de las granulosas humanas.

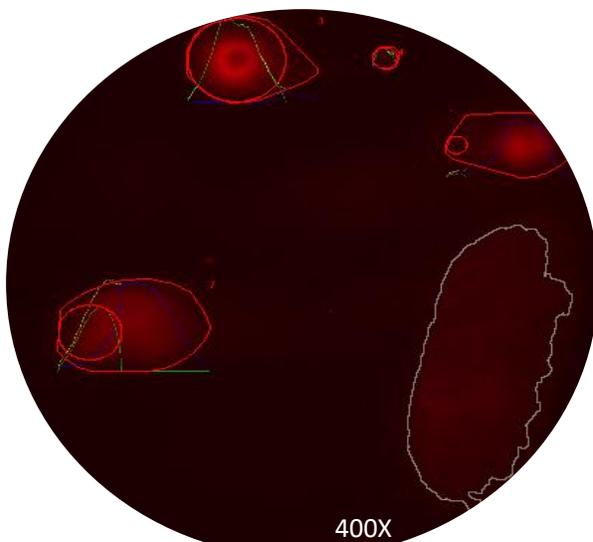


Figura 7. Análisis de los cometas de las células de la granulosa de las pacientes y donantes obtenidas por medio del programa OpenComet. El programa permite la distinción entre los cometas y fluorescencia inespecífica en las preparaciones, las cuales se delimitan con una línea gris. También excluye durante el proceso de la búsqueda de cometas a regiones muy pequeñas, regiones que tocan el borde de la imagen y regiones altamente convexas.

El programa OpenComet analiza los parámetros indicados en el Cuadro 1. Un ejemplo de los datos arrojados por el programa OpenComet después del análisis de cada cometa se observa en el cuadro 2, en tanto que una representación de células de la granulosa con diferente daño al ADN se muestra en la Figura 8.

Parámetros	Descripción
Área del cometa	Número de píxeles en el cometa
Longitud del cometa	Longitud de la región del cometa en píxeles
Contenido de ADN en el cometa	Suma de intensidades de pixel dentro del cometa.
Intensidad promedio del cometa	Contenido del ADN del cometa dividido por el tamaño del cometa.
Área de la cabeza	Número de píxeles dentro de la cabeza.
Diámetro de la cabeza	Longitud de la cabeza en píxeles.
Contenido de ADN en la cabeza	Suma de intensidades de píxeles dentro de la cabeza.
Promedio de intensidad de la cabeza	Contenido de ADN de la cabeza dividido por el tamaño de la cabeza
Porcentaje de ADN en la cabeza	Contenido principal de ADN como porcentaje del contenido de ADN del cometa
Área de la cola	Número de píxeles en la cola.
Longitud de la cola	Longitud de la cola en píxeles.
ADN en la cola	Suma de intensidades de pixel dentro de la cola.
Promedio de la cola	Contenido del ADN de la cola dividido por el tamaño de la cola
Porcentaje de ADN en la cola	Contenido de ADN de la cola como porcentaje del contenido de ADN del cometa
Tail momento	Porcentaje en longitud de cola
Olive momento	Porcentaje de ADN y la distancia entre los centroides ponderados por intensidad de cabeza y cola

Cuadro 1. Parámetros del cometa calculados por OpenComet

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
1	FileName	Num	Flag	CometAre	CometIntensit	CometLengt	CometDN	HeadArea	HeadIntensit	HeadLengt	HeadDNA	HeadDNAPerce
2	IMG_4880.	1	normal	1126	2.722024867	37	3065	974	3.15708419	36	3075	100.3262643
3	IMG_4880.	2	normal	1384	28.45736994	49	39385	256	32.1171875	18	8222	20.87596801
4	IMG_4880.	3	normal	40255	46.45278847	270	1869957	31937	55.2635188	202	1764951	94.38457676
5	IMG_4880.	4	normal	2358	13.81933842	54	32586	1956	14.5511247	50	28462	87.34425827
6	IMG_4880.	5	normal	31828	30.82609652	265	981133	1353	11.5691057	42	15653	1.59540042
7	IMG_4880.	6	normal	8418	15.42575434	106	129854	7160	16.4763966	100	117971	90.84895344
8	IMG_4880.	7	normal	56357	40.56055148	314	2285871	13600	48.6522059	132	661670	28.94607788
9	IMG_4880.	8	normal	26711	36.48556774	212	974566	1118	22.4400716	38	25088	2.574274087
10	IMG_4880.	9	normal	1546	10.70504528	52	16550	112	11.0089286	12	1233	7.450151057
11	Mean		normal	18887	25.05050412	151	703663	6496.222	23.9150693	70	291813.9	48.26065824
12	Median		normal	8418	28.45736994	106	129854	1353	16.4763966	42	25088	28.94607788
13	Stddev		normal	20599.16	14.98946419	112.96128	880186.8	10513.82	17.8780736	62.84903	591834.2	43.63613414
14	Min		normal	1126	2.722024867	37	3065	112	3.15708419	12	1233	1.59540042
15	Max		normal	56357	46.45278847	314	2285871	31937	55.2635188	202	1764951	100.3262643
16	Mean		normal+ou	18887	25.05050412	151	703663	6496.222	23.9150693	70	291813.9	48.26065824
17	Median		normal+ou	8418	28.45736994	106	129854	1353	16.4763966	42	25088	28.94607788
18	Stddev		normal+ou	20599.16	14.98946419	112.96128	880186.8	10513.82	17.8780736	62.84903	591834.2	43.63613414
19	Min		normal+ou	1126	2.722024867	37	3065	112	3.15708419	12	1233	1.59540042
20	Max		normal+ou	56357	46.45278847	314	2285871	31937	55.2635188	202	1764951	100.3262643

M	N	O	P	Q	R	S
TailArea	TailIntensit	TailLength	TailDNA	TailDNAPerce	TailMome	OliveMoment
152	-0.065789	1	-10	-0.326264274	-0.003263	-0.045677
1128	27.62677	31	31163	79.12403199	24.52845	14.2423258
8318	12.62395	68	105006	5.615423242	3.818488	6.28927403
402	10.25871	4	4124	12.65574173	0.50623	2.9108206
30475	31.68105	223	965480	98.40459958	219.4423	130.878117
1258	9.445946	6	11883	9.15104656	0.549063	1.92171978
42757	37.98679	182	1624201	71.05392212	129.3181	68.2117652
25593	37.09913	174	949478	97.42572591	169.5208	75.9920662
1434	10.68131	40	15317	92.54984894	37.01994	21.2864653
12390.78	19.70421	81	411849.1	51.73934176	64.96667	35.7429864
1434	12.62395	40	31163	71.05392212	24.52845	14.2423258
16218.78	13.96376	87.54856	608019.5	43.63613414	84.86505	45.7798419
152	-0.065789	1	-10	-0.326264274	-0.003263	-0.045677
42757	37.98679	223	1624201	98.40459958	219.4423	130.878117
12390.78	19.70421	81	411849.1	51.73934176	64.96667	35.7429864
1434	12.62395	40	31163	71.05392212	24.52845	14.2423258
16218.78	13.96376	87.54856	608019.5	43.63613414	84.86505	45.7798419
152	-0.065789	1	-10	-0.326264274	-0.003263	-0.045677
42757	37.98679	223	1624201	98.40459958	219.4423	130.878117

Cuadro 2. Datos arrojados por el programa OpenComet después del análisis de cada cometa. De las columnas D a la S se indican los diferentes parámetros analizados para cada cometa, los cuales se describen en el cuadro 1. Los renglones 2 al 10 corresponden a diferentes cometas analizados individualmente, en tanto que de las líneas 11 a 20 se anotan los valores media, de mediana y desviación estándar de los datos de cada columna.

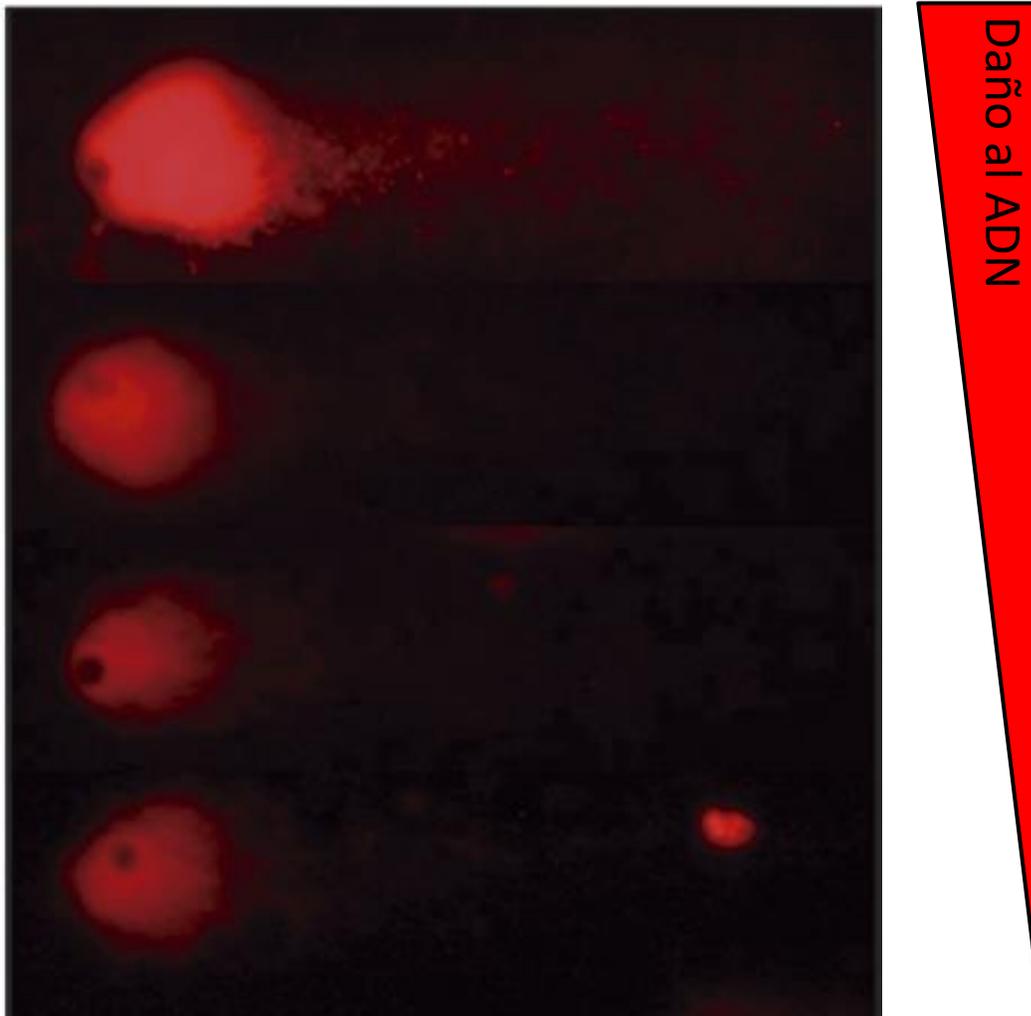


Figura 8. Representación de células de la granulosa con diferente daño al ADN (400X). La fluorescencia y la longitud de la cola de los cometas se incrementa gradualmente de abajo hacia arriba en la imagen.

En el Cuadro 3 se muestran los resultados del tratamiento aplicado a cada paciente, el daño al ADN a las células del cumulus representado por el Olive moment, así como el número de embriones transferidos. El daño al ADN puede evaluarse mediante la longitud de la cola del cometa o mediante la intensidad de la fluorescencia en la cola del cometa. Sin embargo, la mejor evaluación del daño al ADN en los cometas se obtiene con el Olive moment, ya que representa tanto la intensidad de la fluorescencia en la cola (porcentaje de ADN) como la longitud de la cola de los cometas, es por esto que en la mayoría de los estudios donde se

analiza el daño al ADN mediante el ensayo cometa se utiliza el Olive moment. Los pacientes se ordenaron de menor a mayor de acuerdo con el daño al ADN en las CG, medido por el Olive moment. Se observa que el antagonista de GnRH Orgalutran se asocia con un menor daño al ADN en las células del cumulus: En 4 de las 5 mujeres a las que se administró Orgalutran para inhibir la función hipofisiaria, el daño al ADN en las células del cumulus se encontró por abajo del promedio de casi todas las mujeres y pacientes (Olive Moment promedio = 33.69). En estas 5 mujeres, el promedio de Olive Moment fue de 24.68.

No. Protocolo	Agonista	Unid	Antagonista	Unid.	FSHr	Unid.	HMG	Unid.	hCG	Unid.	Olive Momet	No. Embriones Transferidos	Recién nacido vivo
P18-057	x	x	Cetrotide	1.25	Corneumon	1350	Pergoveris	1500/750	Lucrin	2	13.97	1	Negativo
P18-041	X	x	Orgalutran	1.5	Puregon	1200	Merional	75	Ovidrel	250	17.33	2	Recién nacido vivo
P18-058	x	x	Orgalutran	1	Pergoveris	1650	Merional	1650	Pregnyl	10000	17.90	x	Negativo
P18-056	x	x	Cetrotide	1.5	Pergoveris	1500/750	Merional	8250	Pregnyl	10000	18.03	1	Negativo
P18-049	x	x	Cetrotide	1.25	Gonal F	1500	x	x	Pregnyl	10000	21.73	2	Recién nacido vivo
P18-053	x	x	Cetrotide	1.75	Corneumon	3000	x	x	Pregnyl	1000	24.41	3	Recién nacido vivo
D18-006	x	x	Orgalutran	1.25	Puregon	1200	Merional	150	Ovidrel	250	25.05	2	Negativo
P18-042	Lucrin	2.2	x	x	Gonal F	2225	Merapur	225	Choregon	10000	25.38	1	Aborto
P18-044	x	x	Orgalutran	1.25	Pergoveris	1350	Merional	525	Pregnyl	10000	29.23	2	Embarazo en curso
P18-048	x	x	Cetrotide	1.75	Corneumon	2250	Merional	2250	Pregnyl	10000	29.63	1	Negativo
P18-051	x	x	Cetrotide	0.25	Gonal F	1575	x	x	Pregnyl	10000	33.30	1	Negativo
											33.69		
D18-007	x	x	Orgalutran	1.25	Pergoveris	1500/750	x	x	Lucrin	5000/2	33.87	1	Aborto
P18-039	x	x	Cetrotide	1.25	Corneumon	1950	Merional	1050	Pregnyl	10000	34.24	2	Negativo
P18-047	x	x	Cetrotide	2	Gonal F	2100	Merional	2100	Pregnyl	10000	36.82	2	Negativo
P18-052	x	x	Cetrotide	0.12	Puregon	2375	Merapur	150	x	x	41.93	2	Aborto
P18-004	x	x	Cetrotide	1.75	Gonal F	900	x	x	Pregnyl	10000	42.99	2	Aborto
P18-050	x	x	Cetrotide	1.5	Pergoveris	1650	Merional	1500	Pregnyl	10000	44.17	x	Negativo
P18-043	x	x	Cetrotide	1.75	Gonal F	2700	x	x	Pregnyl	10000	54.16	x	Negativo
P18-045	x	x	Cetrotide	1.25	Puregon	1500	Merional	1050	Lucrin	2	58.49	2	Negativo
					Pergoveris	450/225							
P18-046	x	x	Cetrotide	1.75	Puregon	2200	Merional	1800	Pregnyl	1000	71.28	x	Negativo

Cuadro 3. Tratamiento de estimulación ovárica aplicado a cada paciente (P18) y donante (D18), daño al ADN en células del cumulus representado por el Olive moment de los cometas y resultado de los procedimientos de ICSI, indicado como Recién nacido vivo, Embarazo en curso, Aborto o Negativo (la implantación no ocurrió). En verde se indican los valores de Olive moment de los fármacos asociados con bajo daño al ADN (por debajo de la media de todas las pacientes y donantes, 33.69, indicada con una línea amarilla) y en rojo los de aquellos asociados con alto daño al ADN (por arriba de la media) en las células del cumulus.

---

En relación al antagonista de GnRH Cetrotide, los resultados muestran una gran variabilidad en relación al daño al ADN, con mujeres presentando bajo daño al ADN en las CC (por debajo de la media del Olive moment) o alto daño (por arriba de la media).

Entre las FSHr, Corneumon se asoció con bajo daño al ADN en las células del cumulus de las pacientes, donde 3 de las 4 mujeres tratadas con Corneumon presentaron valores de Olive moment por abajo de la media de todas las pacientes y donantes, obteniéndose un valor promedio de Olive moment de 25.56 en estas 4 mujeres, en tanto que las otras FSHr estudiadas presentaron resultados variables (Puregon y Pergoveris) o se asociaron con alto daño al ADN (Gonal F). En este último caso, el promedio de Olive moment fue de 35.73 (Cuadro 3).

Los resultados también muestran que las dos pacientes que lograron tener un desarrollo embrionario a término, con recién nacidos vivos (P18-041 y P18-049), así como la paciente con embarazo en curso (P18-044) presentaron bajo daño al ADN en las células del cumulus, en tanto que tres de las cuatro pacientes que presentaron aborto, mostraron niveles de daño al ADN por arriba de la media (cuadro 3).

---

## DISCUSIÓN

La estimulación ovárica controlada, un paso esencial de la FIV, se utiliza para lograr un número razonable de ovocitos maduros para la inyección de espermatozoides en la FIV/ICSI.

Los antagonistas de la GnRH inhiben competitivamente con la GnRH endógena, suprimen la producción de gonadotropina hipofisaria y producen una disminución inmediata en los niveles de FSH y LH. La administración de GnRH-antagonista en la fase folicular tardía evita el aumento prematuro de LH y la luteinización prematura. Sin embargo, aunque estos compuestos se han utilizado con éxito en clínicas de FIV existe aún un número limitado de publicaciones sobre el uso de antagonistas de GnRH (Ozelci et al., 2019). En un trabajo reciente se menciona que se pueden realizar estudios para determinar si el ajuste de la dosis de la FSH, en función del marcador elegido de reserva ovárica, conduce a mejores resultados (Anckaert et al., 2019).

En el presente trabajo se analizó el daño al ADN causado por la estimulación ovárica controlada y su correlación con los resultados de la FIV/ICSI. Se utilizaron diferentes inductores de ovulación FSHr, supresores hipofisarios (antagonistas) y responsables de la maduración final hCG en 18 pacientes y 2 donantes sometidas a estimulación ovárica controlada. Encontramos que el antagonista de GnRH Orgalutran se relaciona con un menor daño al ADN (Olive moment). Nuestros resultados están en concordancia con un estudio que muestra que después del tratamiento con antagonista de la GnRH durante la estimulación ovárica para la FIV o ICSI, las incidencias de anomalías en los neonatos son realmente bajas, lo que sugiere que hubo un desarrollo embrionario adecuado (Olivennes et al., 2001). Por su parte, Vlahos et al. (2005) reportaron que el uso del antagonista de GnRH Ganirelix en la COS, no compromete la calidad del embrión, obteniéndose una elevada tasa de embarazo, lo cual apoya los resultados de esta tesis.

Con respecto al tipo de FSHr, en el presente proyecto se estudiaron dos presentaciones de folitropina alfa Gonal F y Corneumon. Los resultados muestran

---

que las mujeres a las que se les administró Gonadotropina alfa (Gonal F) dentro de su protocolo de estimulación ovárica controlada tuvieron un incremento en el daño al ADN. Por otro lado, las mujeres en las que se administró Corneumon presentaron un bajo daño al ADN. Existe un estudio donde se evaluó la eficacia de folitropina alfa (Gonal F) y beta (Follistim) en las tasas de preñez en mujeres que llevaron a cabo FIV. No se encontraron diferencias significativas (Williams et al., 2003). Sin embargo, no hay reportes de la eficiencia de Corneumon en comparación de otras FSHr en la FIV, siendo el presente el primero de este tipo y nuestros resultados, aunque preliminares, muestran una mayor eficacia de Corneumon comparado con Gonadotropina alfa en cuanto al daño al ADN producido en las células del cumulus.

La COS se ha convertido en uno de los pilares del tratamiento de la FIV, junto con el manejo in vitro de gametos y embriones. La contribución relativa al éxito general de la FIV desde la fase de estimulación ovárica es difícil de evaluar. Muchos años de investigación han tenido como objetivo optimizar esta fase específica. Se han abordado los problemas que van desde el uso de productos de FSH urinarios o recombinantes, el uso de dosis altas o bajas de FSH, una dosis alta o baja de hCG, etcétera.

La fácil disponibilidad de las CG brinda la oportunidad de realizar estudios, ya que estas células siempre se descartan antes de los procedimientos de ICSI. Las células cumulo desempeñan un papel muy importante a través de las uniones, que establecen una conexión física entre las células de cumulus y el ovocito. Como consecuencia de esta comunicación cercana, las células del cúmulo pueden reflejar la calidad de los ovocitos, al considerar la fragmentación del ADN de las células del cumulo como un marcador de competencia (Barcena et al., 2015).

La fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN) en células de mamíferos ocurre tanto como un evento programado, por ejemplo, durante la recombinación meiótica, o en respuesta a estímulos exógenos (por ejemplo, luz UV y exposición a las radiaciones ionizantes) y endógenos, como el causado por medicamentos que se realizó en este estudio. Tanto las roturas de ADN de hebra simple como las de doble cadena pueden dañar la célula. La ruptura del ADN de

---

doble hebra, si no se repara, puede provocar un retraso y detención del ciclo celular y apoptosis.

En la relación al daño al DNA causado por COS, se ha demostrado en mujeres sometidas a procedimientos de FIV/ICSI, que tanto el agonista como el antagonista de GnRH causaron fragmentación del ADN en células de la granulosa (Lavorato et al., 2012), mientras que agonistas de la GnRH son capaces de causar apoptosis en células de la granulosa (Park et al., 2011). Estudios en ratón han demostrado que la COS causa un aumento en las especies reactivas de oxígeno, inhiben la replicación del DNA mitocondrial, causan alteraciones en el citosqueleto y afectan negativamente la función mitocondrial de ovocitos (Ge et al., 2012), en tanto que estudios en mujeres muestran que la COS causa una inhibición significativa de algunas enzimas antioxidantes de la familia de las paraoxonasas (PON) en el fluido folicular, reduciendo así la protección del fluido folicular contra radicales libres (Pérez-Ruiz et al., 2011). Los resultados de estos estudios indican que el estrés oxidativo generado en las células del cumulus y en el ovocito sería el responsable del daño al ADN observado en las células cumulus de mujeres que participaron en programas de FIV/ICSI (Lavorato et al., 2012; Ruvolo et al., 2019), así como de la baja eficiencia en estos programas de reproducción asistida.

En el presente estudio se obtuvo información que indica que el daño al ADN causado por la COS se correlaciona con el resultado de la FIV/ICSI, ya que las dos pacientes que lograron tener un desarrollo embrionario a término, con recién nacidos vivos, así como la paciente con embarazo en curso presentaron bajo daño al ADN en las células del cumulus, en tanto que tres de las cuatro pacientes que presentaron aborto, mostraron niveles de daño al ADN altos.

Los resultados de este estudio indican que el daño al ADN evaluado por el ensayo cometa en las células del cúmulo de mujeres que participan en programas de FIV/ICSI podría ser un marcador molecular de la calidad de los ovocitos, que vendría a complementar los criterios morfológicos que se emplean rutinariamente para seleccionar al ovocito con las mejores posibilidades de ser fertilizado y tener

---

un desarrollo embrionario a término, con recién nacidos vivos. Sin embargo, resulta necesaria la realización de más estudios, donde se incluya un mayor número de pacientes, para poder aplicar pruebas estadísticas y así confirmar estos resultados.

---

## CONCLUSIONES

- 1) El antagonista de GnRH (Orgalutran), usado en la estimulación ovárica controlada, se asocia con bajo daño al ADN en las células del cumulus.
- 2) La FSHr (Corneumon) se asocia con menor daño al ADN en las células del cumulus, mientras que Gonal F se asocia con un mayor daño.
- 3) Un bajo daño en el DNA de las células del cumulus tras la estimulación ovárica en las pacientes que participan en los programas de FIV/ICSI se asocia con un mejor resultado, obteniéndose recién nacidos vivos.

---

## REFERENCIAS

- Adashi, E.Y., and Leung, P.C.K. (2007). *The ovary* (Amsterdam: Elsevier B.V.).
- Adashi, E., Rosenwaks Z. (1996). *Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technolog.* (Lippincott Williams & Wilkins Publishers,).
- Albertini, D.F., Combelles, C.M., Benecchi, E., and Carabatsos, M.J. (2001). Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 121, 647–653.
- Andersen, C.Y., and Ezcurra, D. (2014). Human steroidogenesis: implications for controlled ovarian stimulation with exogenous gonadotropins. *Reproductive Biology and Endocrinology* 12, 128.
- Anckaert, E., Denk, B., He, Y., Torrance, H.L., Broekmans, F., Hund, M. (2019). Evaluation of the Elecsys® anti-Müllerian hormone assay for the prediction of hyper-response to controlled ovarian stimulation with a gonadotrophin-releasing hormone antagonist protocol. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 236, 133-138.
- Barcena, P., López-Fernández, C., García-Ochoa, C., Obradors, A., Vernaeva, V., Gosálvez, J., and Vassena, R. (2015). Detection of DNA damage in cumulus cells using a chromatin dispersion assay. *Syst Biol Reprod Med* 61, 277–285.
- Bosco, L., Chiarelli, R., Roccheri, M.C., Matranga, D., and Ruvolo, G. (2017). Relationship between apoptosis and survival molecules in human cumulus cells as markers of oocyte competence. *Zygote* 25, 583–591.
- Brůčková, L., Soukup, T., Moos, J., Moosová, M., Pavelková, J., Rezábek, K., Vísek, B., and Mokřý, J. (2008). The cultivation of human granulosa cells. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 51, 165–172.
- Butnev AY, B.G. (2014). Macro and Micro Heterogeneity in Pituitary and Urinary Follicle-Stimulating Hormone Glycosylation. *Journal of Glycomics & Lipidomics* 04.
- Collins, A.R. (2015). The comet assay: a heavenly method! *Mutagenesis* 30, 1–4.
- Collins, A.R., Osoz, A.A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., and Stetina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23, 143–151.
- Cook, P.R., Brazell, I.A., and Jost, E. (1976). Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J. Cell. Sci.* 22, 303–324.
- Del Bo', C., Fracassetti, D., Lanti, C., Porrini, M., and Riso, P. (2015). Comparison of DNA damage by the comet assay in fresh versus cryopreserved peripheral blood mononuclear cells obtained following dietary intervention. *Mutagenesis* 30, 29–35.

---

Drakopoulos, P., Blockeel, C., Stoop, D., Camus, M., de Vos, M., Tournaye, H., and Polyzos, N.P. (2016). Conventional ovarian stimulation and single embryo transfer for IVF/ICSI. How many oocytes do we need to maximize cumulative live birth rates after utilization of all fresh and frozen embryos? *Hum. Reprod. dev* 316.

Enciso, J.M., Sánchez, O., López de Cerain, A., and Azqueta, A. (2015). Does the duration of lysis affect the sensitivity of the in vitro alkaline comet assay? *Mutagenesis* 30, 21–28.

Eppig, J.J., Wigglesworth, K., and Pendola, F.L. (2002). The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 2890–2894.

Ge, H., Tollner, T.L., Hu, Z., Da, M., Li, X., Guan, H., Shan, D., Lu, J., Huang, C., and Dong, Q. (2012). Impaired mitochondrial function in murine oocytes is associated with controlled ovarian hyperstimulation and in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev.* 24, 945-52.

Ge, J., Chow, D.N., Fessler, J.L., Weingeist, D.M., Wood, D.K., and Engelward, B.P. (2015). Micropatterned comet assay enables high throughput and sensitive DNA damage quantification. *Mutagenesis* 30, 11–19.

Georgadaki, K., Khoury, N., Spandidos, D.A., and Zoumpourlis, V. (2016). The molecular basis of fertilization (Review). *Int J Mol Med* 38, 979–986.

Gilchrist, R.B. (2006). Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. *Journal of Cell Science* 119, 3811–3821.

Gilchrist, R.B., Lane, M., and Thompson, J.G. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update* 14, 159–177.

el Hajj, N., and Haaf, T. (2013). Epigenetic disturbances in in vitro cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction. *Fertility and Sterility* 99, 632–641.

Holesh, J.E., Bass, A.N., and Lord, M. (2021). Physiology, Ovulation. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.

Hoseini, F.S., Noori Mugahi, S.M.H., Akbari-Asbagh, F., Eftekhari-Yazdi, P., Aflatoonian, B., Aghaee-Bakhtiari, S.H., Aflatoonian, R., and Salsabili, N. (2014). A randomized controlled trial of gonadotropin-releasing hormone agonist versus gonadotropin-releasing hormone antagonist in Iranian infertile couples: oocyte gene expression. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 22.

Howles, C.M., Saunders, H., Alam, V., Engrand, P., and on behalf of the FSH Treatment Guidelines Clinical panel (2006). Predictive factors and a corresponding treatment algorithm for controlled ovarian stimulation in patients treated with

---

recombinant human follicle stimulating hormone (follitropin alfa) during assisted reproduction technology (ART) procedures. An analysis of 1378 patients. *Current Medical Research and Opinion* 22, 907–918.

Hussein, T.S. (2005). Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *Journal of Cell Science* 118, 5257–5268.

Jenkins, J.M., Davies, D.W., Devonport, H., Anthony, F.W., Gadd, S.C., Watson, R.H., and Masson, G.M. (1991). Comparison of “poor” responders with “good” responders using a standard buserelin/human menopausal gonadotrophin regime for in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 6, 918–921.

Jiménez, G. (2017). Reproducción humana y laboratorio clínico. *Ed Cont Lab Clín*; 32: 32 - 43

Kordus, R.J., and LaVoie, H.A. (2017). Granulosa cell biomarkers to predict pregnancy in ART: pieces to solve the puzzle. *Reproduction* 153, R69–R83.

Lavorato, H.L., Oliveira, J.B.A., Petersen, C.G., Vagnini, L., Mauri, A.L., Cavagna, M., Baruffi, R.L.R., and Franco, J.G. (2012). GnRH agonist versus GnRH antagonist in IVF/ICSI cycles with recombinant LH supplementation: DNA fragmentation and apoptosis in granulosa cells. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 165, 61–65.

Li, R., Norman, R.J., Armstrong, D.T., and Gilchrist, R.B. (2000). Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biol. Reprod.* 63, 839–845.

Lin, M.-H., Shao-Ying Wu, F., Kuo-Kuang Lee, R., Li, S.-H., Lin, S.-Y., and Hwu, Y.-M. (2013). Dual trigger with combination of gonadotropin-releasing hormone agonist and human chorionic gonadotropin significantly improves the live-birth rate for normal responders in GnRH-antagonist cycles. *Fertility and Sterility* 100, 1296–1302.

Loutradis, D., Drakakis, P., Vomvolaki, E., and Antsaklis, A. (2007). Different ovarian stimulation protocols for women with diminished ovarian reserve. *J Assist Reprod Genet* 24, 597–611.

Ma, J.-Y., Ou-Yang, Y.-C., Wang, Z.-W., Wang, Z., Jiang, Z.-Z., Luo, S.-M., Hou, Y., Liu, Z., Schatten, H., and Sun, Q.-Y. (2013). The effects of DNA double-strand breaks on mouse oocyte meiotic maturation. *Cell Cycle* 12, 1233–1241.

Macklon, N.S., Stouffer, R.L., Giudice, L.C., and Fauser, B.C.J.M. (2006). The Science behind 25 Years of Ovarian Stimulation for *in Vitro* Fertilization. *Endocrine Reviews* 27, 170–207.

---

Melnick AP, Rosenwaks Z. (2018) Oocyte donation: insights gleaned and future challenges. *Fertil Steril.* 2018;110(6):988-993.

Mikhael, S., Punjala-Patel, A., and Gavrilova-Jordan, L. (2019). Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis Disorders Impacting Female Fertility. *Biomedicines* 7.

Miro, F., and Aspinall, L.J. (2005). The onset of the initial rise in follicle-stimulating hormone during the human menstrual cycle. *Hum Reprod* 20, 96–100.

Okun, N., Sierra, S., Douglas Wilson, R., Audibert, F., Brock, J.-A., Campagnolo, C., Carroll, J., Cartier, L., Chitayat, D., Gagnon, A., et al. (2014). Pregnancy Outcomes After Assisted Human Reproduction. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* 36, 64–83.

Olivennes, F., Mannaerts, B., Struijs, M., Bonduelle, M., and Devroey, P. (2001). Perinatal outcome of pregnancy after GnRH antagonist (ganirelix) treatment during ovarian stimulation for conventional IVF or ICSI: a preliminary report. *Hum. Reprod.* 16, 1588–1591.

Ozelci, R., Dilbaz, S., Dilbaz, B., Cırık, D.A., Yılmaz, S., and Tekin, O.M. (2019). Gonadotropin releasing hormone antagonist use in controlled ovarian stimulation and intrauterine insemination cycles in women with polycystic ovary syndrome. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 58, 234–238.

Park, E.J., Shin, J.W., Seo, Y.S., Kim, D.W., Hong, S.Y., Park, W.I., and Kang, B.M. (2011) Gonadotropin-releasing hormone-agonist induces apoptosis of human granulosa-luteal cells via caspase-8, -9 and -3, and poly-(ADP-ribose)-polymerase cleavage. *Biosci Trends.* 5, 120-128.

Paulson, R.J., Sauer, M.V., and Lobo, R.A. (1990). Embryo implantation after human in vitro fertilization: importance of endometrial receptivity. *Fertil. Steril.* 53, 870–874.

Pérez E, G.A. (2010). Estimulación ovárica controlada. Tiempo de reevaluar. *Revista Mexicana de Medicina de La Reproducción.*

Pérez-Ruiz, I., Meijide, S., Ferrando, M., Larreategui, Z., Ruiz-Larrea, M.B., and Ruiz-Sanz J.I. (2019). Ovarian stimulated cycles reduce protection of follicular fluid against free radicals. *Free Radic Biol Med.* 145, 330-335.

Ruvolo, G., Fattouh, R.R., Bosco, L., Bruccheri, A.M., and Cittadini, E. (2013a). New molecular markers for the evaluation of gamete quality. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 30, 207–212.

Ruvolo, G., Roccheri, M.C., Bruccheri, A.M., Longobardi, S., Cittadini, E., and Bosco, L. (2013b). Lower sperm DNA fragmentation after r-FSH administration in functional hypogonadotropic hypogonadism. *J. Assist. Reprod. Genet.* 30, 497–503.

---

Shaposhnikov, S.A., Salenko, V.B., Brunborg, G., Nygren, J., and Collins, A.R. (2008). Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): loops or fragments? *Electrophoresis* 29, 3005–3012.

Sharpe-Timms, K.L., Ricke, E.A., Piva, M., and Horowitz, G.M. (2000). Differential expression and localization of de-novo synthesized endometriotic haptoglobin in endometrium and endometriotic lesions. *Hum. Reprod.* 15, 2180–2185.

Torelló Ybáñez (2011). Cultivo hasta blastocisto y “Screening” genético preimplantacional: herramientas para aumentar la tasa de implantación embrionaria. *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana* 28.

Vlahos, N.F., Bankowski, B.J., Zacur, H.A., Garcia, J.E., Wallach, E.E., and Zhao, Y. (2005). An oocyte donation protocol using the GnRH antagonist ganirelix acetate, does not compromise embryo quality and is associated with high pregnancy rates. *Arch Gynecol Obstet* 272, 1–6.

Wu, J.L., Keller, P., Kanchwala, M., Xing, C., Babayev, S.N., Carr, B.R., Bukulmez, O., and Word, R.A. (2020). Controlled Ovarian Stimulation Protocols Alter Endometrial Histomorphology and Gene Expression Profiles. *Reprod Sci* 27, 895–904.

Zegers-Hochschild, F., Adamson, G.D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., and Vanderpoel, S. (2009). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009\*. *Fertility and Sterility* 92, 1520–1524.

Zhang, X., Jafari, N., Barnes, R., Confino, E., Milad, M., and Kazer, R. (2005). Studies of gene expression in human cumulus cells indicate pentraxin 3 as a possible marker for oocyte quality. *Fertility and Sterility* 83, 1169–1179.