



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA Y

TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

**RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE PROGESTERONA EL DÍA DE LA
ADMINISTRACIÓN DE LA GONADOTROPINA CORIÓICA HUMANA Y EL
ÉXITO EN EL PROTOCOLO DE FECUNDACIÓN *IN VITRO***



**RELATION BETWEEN PROGESTERONE LEVELS IN THE DAY OF HUMAN
CHORIONIC GONADOTROPIN ADMINISTRATION AND SUCCESS IN THE
IN VITRO FERTILIZATION PROTOCOL**

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER POR:

Sara Sanz Juste

TUTORA:

Victoria Jiménez Moreno

Julio 2016

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer y dedicar este trabajo a Victoria. He tenido mucha suerte de conocer y trabajar con una persona tan profesional y con tanta calidad humana. En definitiva Victoria, no creo que hubiese podido tener mejor tutora que tú. Muchas gracias por tu paciencia, tiempo y esfuerzo, que no han sido pocos.

A mis padres, se que siempre estaréis cuando os necesite y soy consciente del esfuerzo y sacrificio personal que habéis tenido que hacer para que pudiera estudiar lo que me apasionaba. Gracias.

A mis cinco torbellinos, Javier, Shuyana, Inés, Bea y Fátima, que han sido mi pequeña familia en esta aventura y que lo seguirán siendo en las que nos quedan por vivir.

Para terminar, al resto os dejo al final a propósito, vosotros siempre habéis estado, tanto si fueran buenos como malos los momentos y justamente por eso estaréis en mi corazón hasta el final:

- A mi hermana Irene, no sabes lo orgullosa que estoy de ti pequeñaja, ni lo mucho que te quiero, da igual los kilómetros que nos vayan a separar y te va a dar igual los años que pasen o lo mucho que aprendas, siempre vas a ser la "*enana*" que va a poder contar conmigo pase lo que pase.
- Diana, tu eres una de las personas que admiro en este mundo, para mí, una persona exitosa no solo tiene que ser un buen trabajador, si no aún más importante, una buena persona. Tú, eres ambas cosas.
- Marta, mi *bella amie*. En serio, jamás he conocido un corazón tan grande, ni una persona tan tierna como tú.
- Mis dos hermanas de batalla, Mónica y Elsa. Nos apoyamos, discutimos, reímos y nos picamos, al igual que tres hermanas. Además, se que al leer esto os vais a emocionar y eso no me lo pierdo.
- Marcos y Beatriz. En ese primer verano en el que nos conocimos, nunca imaginé que llegaríais a ser tan importantes para mí. Da igual lo muy lejos que nos encontremos, se que para cualquier cosa que necesite solo tengo que marcar vuestros teléfonos. ¡Además, siempre nos quedarán los encuentros exprés en Tudela!.

En definitiva, gracias a todos por vuestro cariño y por vuestra forma de ser. Para mí, no hay un regalo mejor.

ABREVIATURAS

- **ASEBIR:** asociación española para el estudio de la biología reproductiva.
- **AUC:** área debajo de la curva.
- **CEBPβ:** CCAAT/*enhancer-binding protein beta*.
- **COUP - TF II:** factor de transcripción COUP.
- **CI:** intervalo de confianza asintótico al 95 %.
- **D + 2:** día más dos.
- **D + 3:** día más tres.
- **DHEA:** dihidroepiandrosterona.
- **Dkk1:** *dickkopf - related protein 1*.
- **E₂:** estrógeno.
- **EOC:** estimulación ovárica controlada.
- **FAK:** quinasa de adhesión focal.
- **FIV:** fecundación *in vitro*.
- **FOXO 1:** *forkhead box O*.
- **FSH:** hormona folículo estimulante.
- **FSHr:** hormona folículo estimulante recombinante.
- **GnRH:** hormona liberadora de gonadotropina.
- **HB-EGF:** factor de crecimiento ligado a heparina.
- **hCG:** gonadotropina coriónica humana.
- **HoxA-10:** *homebox A-10*.
- **ICSI:** microinyección intracitoplasmática de espermatozoides.
- **IGFBP-1:** proteína transportadora del factor de crecimiento similar a la insulina-1.
- **Ihh:** *indian hedgehog*.

- **IMC:** índice de masa corporal.
- **IUI:** inseminación intrauterina.
- **LDL:** lipoproteínas de baja densidad.
- **LH:** hormona luteinizante.
- **LHr:** hormona luteinizante recombinante.
- **MII:** ovocitos en metafase II.
- **MMPs:** metaloproteinasas de matriz.
- **Muc-1:** mucina 1.
- **NK:** *natural killer*.
- **Nº 2PN2CP:** número de ovocitos fecundados.
- **P₄:** progesterona.
- **PGRMC1:** componente 1 del receptor de membrana para la progesterona.
- **PG:** prostaglandinas.
- **PIBF:** factor bloqueador inducido por progesterona.
- **PRs:** receptores de progesterona.
- **REs:** receptores estrogénicos.
- **ROC:** *receiver operating characteristic*.
- **ROCK:** *rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1*
- **RhoA:** *ras homolog gene family, member A*.
- **SPSS:** paquete estadístico para las ciencias sociales.
- **Th 2:** células *T helper 2*.
- **TRA:** técnicas de reproducción asistida.
- **URA:** unidad de reproducción asistida del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Síntesis de la progesterona. Esteroidogénesis y sistema de las dos células-dos gonadotropinas	3
2. Receptores de la progesterona	6
3. Rol de la progesterona en los diferentes estadios del ciclo ovárico	7
4. Rol de la progesterona en el crecimiento y desarrollo endometrial	9
5. Efectos de la progesterona en el proceso de implantación	12
5.1. Regulación de la progesterona en la receptividad endometrial y la adhesión del trofoblasto.	13
5.2. Regulación de la invasión y migración del trofoblasto.	16
6. Posibles soluciones al aumento supra-fisiológico de la progesterona	17
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
1. Justificación	20
2. Hipótesis y Objetivos	21
1. Hipótesis	21
2. Objetivos	21

III. MATERIAL Y MÉTODOS	22
1. Diseño del estudio	23
2. Población de estudio	24
2.1. Estudio de la población general según niveles de progesterona	24
2.2. Estudio de la población general según el ratio progesterona/estradiol	24
2.3. Estudio de la población general según el ratio progesterona/ovocitos en metafase II	25
3. Proceso de fertilización in vitro	25
3.1. Protocolos de estimulación ovárica controlada	25
3.2. Obtención de ovocitos. Punción ovárica	28
3.3. Obtención y preparación de las muestras seminales	28
3.4. Fecundación, cultivo de embriones y clasificación embrionaria.	29
3.5. Transferencia embrionaria y valoración de la gestación.	30
4. Medición de los niveles de progesterona y estradiol en sangre	31
4.1. Ensayo del estradiol	31
4.2. Ensayo de la progesterona	32
5. Análisis estadístico	32
6. Definición de variables	33
IV. RESULTADOS	36
1. Estudio de la población general según niveles de progesterona	38
2. Estudio de la población general según el ratio progesterona/estradiol.	42
3. Estudio de la población general según el ratio progesterona/ovocitos en metafase II	46
V. DISCUSIÓN	51
VI. CONCLUSIÓN	57
VII. BIBLIOGRAFÍA	59

TABLA DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

- Figura 1.** Sistema de dos células - dos gonadotropinas. 5
- Figura 2.** En esta imagen se muestra el control hormonal del ciclo ovárico y las diferentes etapas del desarrollo folicular (Benjamin Cummings, 2007). 8
- Figura 3.** Ciclo ovárico y ciclo uterino junto a los niveles hormonales y de temperatura (Benjamin Cummings, 2007). En el caso del ciclo uterino, tanto el volumen como su actividad secretora aumentan gradualmente debido a la gran cantidad de P4 producida por el cuerpo lúteo (T.W. Sadler, 2012). 10
- Figura 4.** Efectos de la P4 en la estructura endometrial y en el proceso de unión del embrión. La P4 bloquea el efecto proliferativo del E2 en las células del epitelio uterino y facilita la receptividad uterina al embrión. También modula la proliferación de las células estromales, el crecimiento decidual, la expresión de moléculas de adhesión y modula el sistema inmune materno para permitir la implantación del embrión (las moléculas inducidas por la P4 se encuentran resaltadas en negrita) (Halasz and Szekeres-Bartho, 2013). 15

Figura 5. Control de la P4 sobre la migración del trofoblasto. La P4 modula la migración de las células del trofoblasto mediante las acciones genómicas de IGFBP-1 y Dkk-1 y no genómicas Ras homolog gene family, member A (RhoA)/ rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1 (ROCK). (Las moléculas inducidas directamente por la P4 se encuentran en negrita) (Halasz and Szekeres-Bartho, 2013). 16

Figura 6. Esquema de los dos protocolos de EOC. En la imagen A se observa un protocolo de agonistas y en la B el protocolo de antagonistas (Barri, 2005). 27

Figura 7. Tabla de la clasificación embrionaria de ASEBIR (Arroyo, G et al., 2015). Aquellos embriones clasificados con la categoría A, son embriones de óptima calidad y con máxima capacidad de implantación y los de categoría B, embriones de buena calidad y con elevada capacidad de implantación. El conjunto de estos dos tipos de embriones son los que se han clasificado como de "buena calidad" en este trabajo. Mientras que los embriones de categoría C son embriones con una calidad regular y con una probabilidad de implantación media y los embriones de categoría D, de mala calidad y con una probabilidad de implantación baja, Su conjunto lo hemos considerado como de "mala calidad". Aquel conjunto que se ha considerado de "calidad mixta" es debido a que entre ellos, al menos uno de los embriones era de buena calidad, pero no todos. 35

Figura 8. La curva de ROC para la P4 es de color azul, mientras que la línea verde es una línea auxiliar para facilitar el análisis de dichas curvas. 41

TABLAS

- Tabla 1.** Datos generales del total de la población de este estudio. 37
- Tabla 2.** Comparación de la media de edades, número de ovocitos, número de ovocitos en metafase II, número de ovocitos fecundados y número de sacos entre el grupo de pacientes que tuvo unos niveles de $P_4 < 1,5$ ng/ml y el grupo que tuvo una $P_4 \geq 1,5$ ng/ml. En esta tabla se puede observar la media \pm la desviación típica de cada una de las variables y el T-student no significativo = NS. 38
- Tabla 3.** En esta tabla se muestra el % de embriones transferidos en base a su calidad. Los embriones fueron clasificados en uno u otro rango de calidad a partir de los rasgos morfológicos que se analizaron en D + 2 y D + 3. El chi-cuadrado cuando no es significativo se clasifica como NS. 39
- Tabla 4.** Total de casos de fecundación, transferencia e implantación junto a sus tasas y su chi-cuadrado, donde NS = no significativo. 40
- Tabla 5.** Tasas de embarazos y abortos junto al resultado del chi-cuadrado, donde NS = no significativo. 40
- Tabla 6.** Comparación de la media de edades, número de ovocitos, número de ovocitos en metafase II, número de ovocitos fecundados y número de sacos entre el grupo de pacientes que tuvo unos niveles de $P_4/E_2 < 1$ ng/ml y el grupo que tuvo una $P_4/E_2 \geq 1$ ng/ml. En esta tabla, se puede observar la media \pm la desviación típica de cada una de las variables y el resultado del T- student donde NS = no significativo y $p < 0,05$ = valor significativo. 43

- Tabla 7.** En esta tabla se muestra el % de embriones de diferente calidad transferidos en ambos grupos. Los embriones fueron clasificados en uno u otro rango de calidad a partir de los rasgos morfológicos que se analizaron en D + 2 y D + 3. En el resultado del chi-cuadrado, NS = no significativo. 44
- Tabla 8.** Número total de casos y tasas de fecundación, transferencia e implantación. En el chi-cuadrado, NS = no significativo y $p < 0,05$ = valor significativo. 45
- Tabla 9.** Comparación de las tasa de embarazo y aborto donde el resultado del chi-cuadrado NS = no significativo. 45
- Tabla 10.** Comparación de la media de edades, número de ovocitos, número de ovocitos en metafase II, número de ovocitos fecundados y del número de sacos entre el grupo de pacientes que tuvo unos ratios de $P_4/MII < 0,32$ ng/ml y el grupo que tuvo una $P_4/MII \geq 0,32$ ng/ml. En esta tabla se puede observar la media \pm la desviación típica de cada una de las variables, y el resultado del T-student, donde NS = no significativo y $p < 0,05$ = valor significativo. 47

Tabla 11. En esta tabla se muestra el % de embriones de diferente calidad transferidos de ambos grupos. Los embriones fueron clasificados en uno u otro rango de calidad a partir de los rasgos morfológicos que se analizaron en D + 2 y D + 3. En el resultado del chi-cuadrado, NS= no significativo. 48

Tabla 12. Tasas de fecundación, transferencia e implantación junto a su chi-cuadrado, donde NS = no significativo y $p < 0,05$ = valor significativo. 49

Tabla 13. Tasas de embarazos y abortos junto con el chi-cuadrado, donde NS = no significativo y $p < 0,05$ = valor significativo. 50

RESUMEN

Motivación de la investigación: el efecto de los niveles supra-fisiológicos de la progesterona en el día de la administración de la gonadotropina coriónica humana es una cuestión de continuo debate. Por esta razón, el principal objetivo de este trabajo es estudiar si en la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, los niveles de progesterona, el día de la administración de la gonadotropina coriónica humana, se encuentran relacionados con el éxito de las técnicas de fecundación *in vitro*.

Material y métodos: en esta unidad, se ha realizado un estudio retrospectivo de 273 pacientes sometidas a estimulación ovárica controlada, a las cuales se les realizó fecundación *in vitro* o microinyección intracitoplasmática de espermatozoides y se las transfirió en día más 2 o más 3 entre 1 a 3 embriones. En este trabajo, se estudiaron los puntos de corte de 1,5 ng/ml para la progesterona, 1 ng/ml para la relación progesterona/estradiol y 0,32 ng/ml para la relación progesterona/ovocitos metafase II.

Resultados más importantes: el resultado más relevante de este trabajo es la diferencia significativa que se obtuvo en las tasas de embarazo para la relación progesterona/ovocitos metafase II.

Conclusión: Los niveles de progesterona, por sí solos, no afectan al éxito de las técnicas de fecundación *in vitro* del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Además, al estudiar la progesterona junto con otros parámetros, la relación progesterona/ovocitos metafase II parece ser el mejor indicador para predecir los efectos de la progesterona en las técnicas de fecundación *in vitro* de este hospital. No obstante, sería recomendable volver a valorar la situación cuando se tenga una población de estudio mayor y teniendo en cuenta la respuesta de las pacientes a la estimulación ovárica controlada.

Palabras clave: calidad ovocitaria, endometrio, gonadotropina coriónica humana, progesterona.

ABSTRACT

Motivation research: the effect of progesterone supra-physiological levels, on the human chorionic gonadotropin administration day in the in vitro fertilization cycles, is a matter of ongoing debate. For this reason, the aim of this work is to study if in the Assisted Reproduction Unit of the University Hospital of Marques de Valdecilla, the levels of progesterone, on the day of human chorionic gonadotropin administration, are related to the success of in vitro fertilization techniques.

Material and methods: This unit has realized a retrospective study of 273 patients undergoing controlled ovarian stimulation, who were subjected to in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer on day 2 or 3. In this paper, the cutoffs were 1.5 ng/ml for progesterone, 1 ng/ml for progesterone/estradiol ratio and 0.32 ng/ml for the progesterone/metaphase II oocytes ratio.

Key results: The most relevant result of this work is the significant difference in pregnancy rate to the progesterone/ metaphase II oocytes ratio.

Conclusion: Progesterone levels, by themselves, do not affect the success of in vitro fertilization techniques in the University Hospital of Marques de Valdecilla. In addition, studying the relationship with other parameters, progesterone/metaphase II oocytes ratio seems to be the best indicator for predicting the effects of progesterone in the techniques of in vitro fertilization of this hospital. However, it would be advisable to reassess the situation with a larger study population and taking into account the response of patients to controlled ovarian stimulation.

Keywords: egg quality, endometrium, human chorionic gonadotropin, progesterone.

I. INTRODUCCIÓN

Se estima, que aproximadamente el 17 % de parejas en los países desarrollados necesitan consejo médico para tratar problemas de infertilidad (Cahill and Wardle, 2002), siendo cada vez mayor el número de embarazos obtenidos mediante la aplicación de técnicas de reproducción asistida (TRA). Estas tecnologías incluyen la inseminación intrauterina (IUI), la fecundación *in vitro* (FIV) y la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

Cuando se detecta un problema de esterilidad, el camino a seguir es realizar un estudio a ambos miembros de la pareja y con sus resultados, decidir cuál es la mejor técnica a escoger. En los casos más severos, se utilizan las técnicas de fecundación *in vitro* (FIV e ICSI), donde uno de los puntos claves es la estimulación ovárica controlada (EOC). Los objetivos de esta estimulación son obtener un número óptimo de ovocitos con los que trabajar, unos niveles hormonales lo más fisiológicos posibles (Perez P et al., 2010) y un desarrollo endometrial adecuado para que tenga lugar la implantación. Sin embargo, a pesar de los avances que han acontecido en los últimos años, tanto para los protocolos de estimulación como para los fármacos utilizados en EOC, en muchos casos, los niveles hormonales son mayores a los que se encontrarían en un ciclo natural, empeorando en algunas ocasiones tanto la calidad embrionaria como la endometrial, dos factores que se encuentran estrechamente relacionados con el éxito en protocolos de fecundación *in vitro* (Khairy et al., 2008; Pandian et al., 2013; Thomas et al., 2010).

Una de las hormonas cuyos niveles se incrementan en algunas pacientes por encima de los niveles fisiológicos, es la progesterona (P_4). Aproximadamente entre un 20 - 40 % de las pacientes presentan niveles elevados de esta hormona el día de la administración de la gonadotropina coriónica humana (hCG) (Ubaldi et al., 1996), lo cual parece afectar negativamente tanto a la calidad de los ovocitos (Huang et al., 2016), como a la receptividad endometrial.

En estos casos, el endometrio iniciará una transformación hacia la fase secretora de manera prematura, con lo cual su ventana de implantación se encontrará desplazada en el tiempo y terminará por cerrarse antes de que los embriones se encuentren en el estadio evolutivo adecuado para poder ser

transferidos (Cai et al., 2014). En este estado de asincronía entre la maduración ovocitaria y endometrial, el diálogo entre el embrión y el endometrio materno no se puede realizar correctamente y como resultado, se conseguirá una menor tasa de embarazo al aplicar estas técnicas (Papanikolaou et al., 2009). No obstante, hay que tener en cuenta que dicho efecto se observa tan solo cuando se transfieren embriones en fresco (Van Vaerenbergh et al., 2011), por lo consiguiente, no existe tal problema en ciclos de congelado - descongelado, ni en ciclos de donación, en los cuales los embriones originados se transfieren a un endometrio que no ha sido expuesto a concentraciones de P_4 superiores a sus niveles fisiológicos (Venetis et al., 2015).

Para entender mejor el efecto que la P_4 ejerce sobre el éxito en las técnicas de fecundación *in vitro* cuando se encuentra en altas concentraciones el día de la administración de hCG, es necesario entender antes su papel tanto en ciclos naturales como en los ciclos en que se ha utilizado una EOC.

1. Síntesis de la progesterona. Esteroidogénesis y sistema de las dos células-dos gonadotropinas

La P_4 es una hormona esteroidea que colabora junto con otras hormonas en la regulación del ciclo ovárico y endometrial, en estos ciclos participará principalmente en la maduración ovocitaria, en la preparación del endometrio para la implantación y en el mantenimiento del embarazo.

En las mujeres, la síntesis de P_4 tiene lugar en la corteza suprarrenal, las glándulas adrenales, el hígado, los folículos y la placenta, siendo estas dos últimas las más importantes (SEGO Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, 2003). Este trabajo se centrará en la síntesis de P_4 por parte de los folículos.

La ruta biosintética de las hormonas esteroideas es la misma, independientemente del órgano que las genere. Sin embargo, el tipo y cantidad de hormona que se sintetice depende de la expresión de enzimas específicas de cada órgano. La P_4 , posee 21 átomos de carbono y una estructura básica de pregnano y al igual que todas las hormonas esteroideas, se origina a partir del colesterol. El colesterol se encuentra en forma de lipoproteína de baja densidad (LDL) (Brown

and Goldstein, 1976) y para que se lleve a cabo la esteroidogénesis, tendrá que unirse a receptores de membrana y ser introducido al interior celular dentro de vesículas fusionadas con lisosomas. En este momento, los lisosomas liberarán sus hidrolasas hacia el contenido vesicular, consiguiendo así la forma libre del colesterol, tras lo cual viajará hacia las mitocondrias celulares donde se formará la pregnenolona. A partir de este momento, la síntesis de moléculas mediante el citocromo P 450 puede seguir dos caminos distintos:

- *Vía de los 3 β -hidroxiesteroides.*

En esta vía, se sintetiza 17α -hidroxipregnenolona, dihidroepiandrosterona (DHEA) y androstendiol. Esta es la principal vía metabólica en los folículos que todavía no se han luteinizado.

- *Vía de las cetonas.*

Esta es la ruta donde se sintetizará la P_4 y además, también se formará la 17α -hidroxiprogesterona y la androstendiona. A diferencia de la anterior ruta, esta vía es característica de las células de la granulosa en los folículos luteínicos.

La mayoría de la P_4 que se sintetiza en los ovarios se vierte en la sangre para llevar a cabo sus funciones biológicas, su vida media es bastante baja, tan solo de unos cinco minutos y además, para que se sintetice la P_4 , es imprescindible que tenga lugar la teoría de las "dos células - dos gonadotropinas". En esta teoría, el desarrollo de los folículos ováricos depende del efecto secuencial de dos gonadotropinas, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) (*figura 1*).

En un primer momento, las células de la granulosa no tendrán receptores para la LH o bien no poseerán la sensibilidad necesaria para dicha hormona, pero lo que sí que poseerán en este momento serán receptores para la FSH, en cambio, las células de la teca, tan solo disfrutarán de los receptores para la LH. Por este motivo, el sistema de dos células comenzará sintetizando andrógenos por parte las células

tecales, los cuales a través del torrente sanguíneo, se dirigirán hacia las células de la granulosa, que junto con los elevados niveles de FSH que existen en ese momento, activarán la función aromatasas de las células de la granulosa, convirtiendo los andrógenos en estradiol (E₂). Por otra parte, al unirse la FSH a su receptor, también se propiciará que, por un lado, se sinteticen receptores de LH en las células de la granulosa y por otro lado, que aumente la división celular y la síntesis de más FSH (Nielsen et al., 2011). En el momento en el que ambos receptores se encuentran activos en las células de la granulosa, tanto la LH como la FSH ejercerán efectos importantes en el folículo, como es el mantenimiento del crecimiento folicular, la luteinización y la ovulación del ovocito. Por último, en el momento en el que el folículo dominante alcance la fase lútea, los niveles de FSH bajarán y los niveles de LH serán los que predominen favoreciendo de esta manera la síntesis de P₄ sobre la de E₂ (Andersen and Ezcurra, 2014; Fleming and Jenkins, 2010; Hugues et al., 2011)

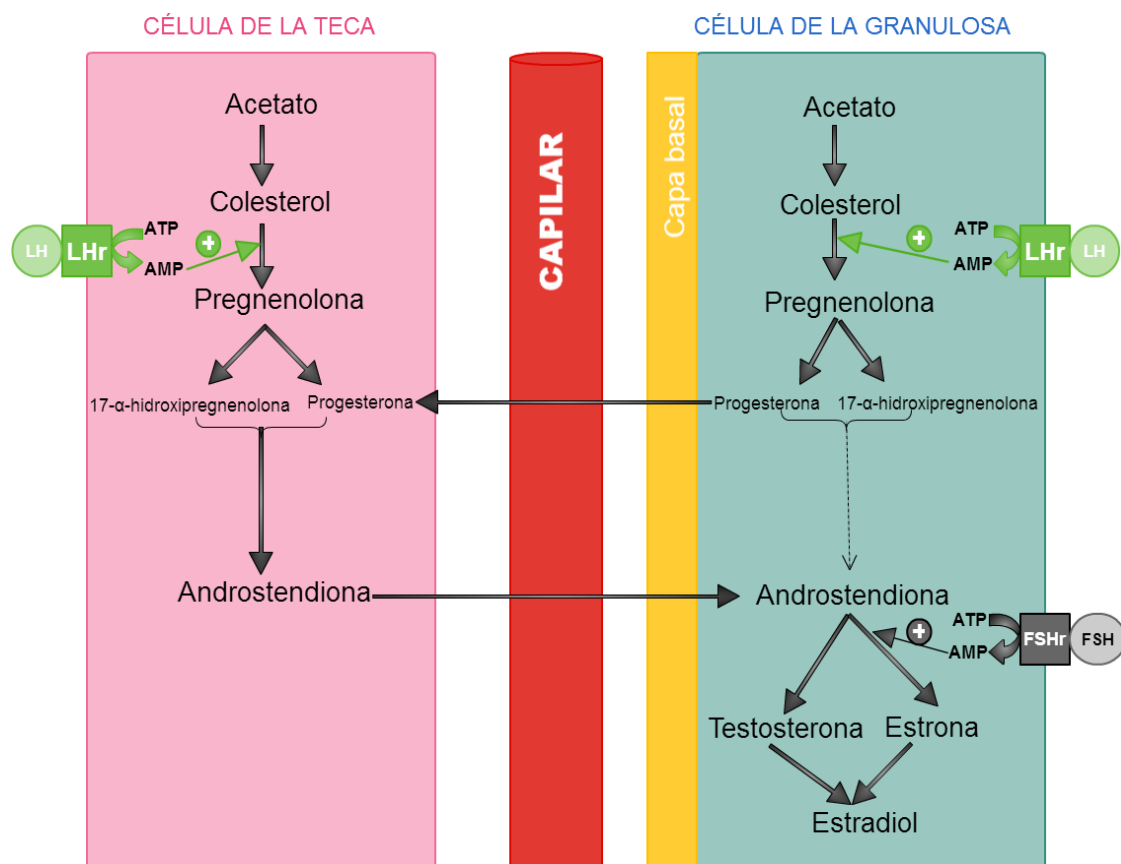


Figura 1. Sistema de dos células - dos gonadotropinas.

2. *Receptores de la progesterona*

En el tracto reproductivo de la mujer, la P₄ puede ejercer efectos tanto genómicos, a través de receptores intracelulares, como no genómicos, a través de receptores de membrana, produciendo de esta manera respuestas tanto tisulares como específicas de un solo tipo celular (Gellersen et al., 2009).

En el caso de los receptores genómicos, la P₄ al ser una molécula lipofílica puede atravesar las membranas por difusión e interactuar a nivel nuclear mediante la unión a sus receptores (PRs). Estos receptores son PR - A y PR - B (Li and O'Malley, 2003) y sus isoformas PR - C, PR - M, PR - S y PR - T (Lonard et al., 2007). Los PRs nucleares, una vez unida la P₄, formarán un dímero y viajarán al núcleo para activar la transcripción ribosomal, este proceso necesitará minutos, e incluso horas, sin embargo, estos receptores serán los principales reguladores de la actividad de la P₄ en la reproducción de la mujer (Graham and Clarke, 1997).

Los RPs de membrana, en cambio, serán los responsables de las respuestas no genómicas y rápidas y se encontrarán constituidos por la familia mPR (mPR α , mPR β , mPR γ , mPR δ y mPR ϵ) y el componente 1 del receptor de membrana para la progesterona (PGRMC1). El modo de actuación de los RPs de membrana es aún desconocido, lo que se sabe hasta el momento, es que la familia de receptores de mPR utilizará cascadas en las que intervendrán las proteínas G y las kinasas, y que de esta manera disminuirán los niveles de AMPc. Por otra parte, también se ha descubierto que el receptor PGRMC1 deberá de unirse a *plasminogen activator inhibitor 1 RNA-bindingprotein* (PAIR-BP1) para llevar a cabo sus acciones (Levin, 2011).

3. Rol de la progesterona en los diferentes estadios del ciclo ovárico

El ciclo ovárico consta de tres fases, *la fase folicular, la fase ovulatoria y la fase lútea* (Ralph et al., 2016) (*figura 2*) entre las cuales los niveles de P₄ van a variar dependiendo de la fase del ciclo en la que se encuentren.

Durante la fase folicular o estrogénica, la FSH es la hormona dominante, es por este motivo, por el que los niveles de E₂ se encuentran más elevados que los niveles de P₄, que en este momento serán menores de 1 ng/ml. Sin embargo, al final de la fase folicular, la LH terminará siendo la hormona dominante y al alcanzar sus máximos niveles se producirá la maduración final del folículo y la ovulación (fase ovulatoria). Los altos niveles de LH también serán los responsables del aumento de la P₄ en la fase lútea o progestacional, cuyos niveles alcanzarán hasta 10 a 35 ng/ml lo cual es muy importante, ya que se ha observado que la concepción es menor en aquellas mujeres que presentan una fase lútea defectiva en P₄ en comparación con aquellas mujeres que presentan niveles normales de esta hormona.

La elevación de los niveles de P₄ durante las fases ovulatoria y lútea está relacionada con el papel que ejerce la P₄ durante la maduración final del ovocito. En este momento, la P₄ actuará directamente sobre las células de la granulosa y promoverán el crecimiento folicular y la inhibición de los genes pro-apoptóticos mediante la interacción con su receptor de membrana PGRMC1 (Peluso, 2013). No obstante, niveles supra-fisiológicos de P₄ serán negativos en la maduración ovocitaria y por tanto, sobre la calidad ovocitaria, llegando incluso a relacionarse con pérdidas embrionarias (Cai et al., 2014).

El mecanismo por el cual la P₄ puede afectar a la calidad ovocitaria es debido a que, en un ciclo normal, la secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) se encuentra regulada por los niveles de P₄ en sangre, entre otras hormonas. Por lo que de este modo, también regula la frecuencia de los pulsos de LH, que a su vez, son los responsables de reanudar la meiosis y maduración ovocitaria en el folículo dominante (Coticchio et al., 2015; Lonergan, 2011) y cuyo pico estimulará el crecimiento continuo del folículo dominante hasta que al final, el ovocito ovule. Sin embargo, si los niveles de P₄ en este momento se encuentran más

altos de lo normal, los niveles necesarios para que ocurra el pico de LH tardarán en alcanzarse, ralentizando así el proceso de maduración final, ovulación y propiciado así que los ovocitos se atresien (Lonergan, 2011).

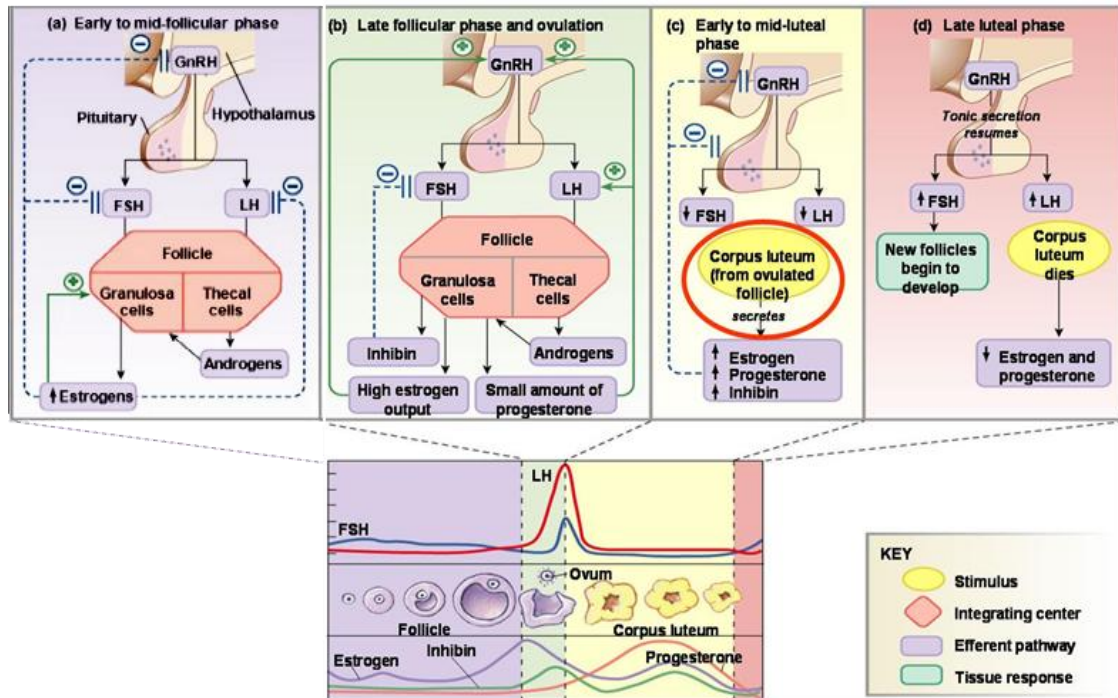


Figura 2. En esta imagen se muestra el control hormonal del ciclo ovárico y las diferentes etapas del desarrollo folicular (Benjamin Cummings, 2007).

4. Rol de la progesterona en el crecimiento y desarrollo endometrial.

Durante el ciclo ovárico, dependiendo de los niveles de E_2 y P_4 , el endometrio experimentará cambios tanto en su morfología como en su maduración funcional. Los niveles dominantes de una u otra hormona conducirán al endometrio por una serie de fases, la *fase proliferativa* será la primera de ellas, seguida de una *fase secretora o progestacional* y por último, una *fase menstrual* (figura 3) (T.W. Sadler, 2012).

La fase proliferativa, comprenderá entre los días 3 - 5 hasta 13 - 14 del ciclo y será el E_2 quien inducirá tanto el crecimiento como la proliferación celular del endometrio. Durante esta etapa, las luces glandulares se dilatarán y también aumentará su número. Por otra parte, se producirá nueva vascularización y espiralización de las arteriolas en la parte profunda del endometrio y además, aumentará el número de receptores estrogénicos (REs) y progestagénicos, lo cual se acompañará con cambios en el metabolismo lipídico, glicídico, de aminoácidos y de síntesis proteica (Filant and Spencer, 2014). Estos cambios suelen ser más acentuados en los dos tercios superiores de la cavidad uterina, ya que es el lugar más habitual para que se produzca la implantación.

Tras la ovulación, la concentración de REs caerá abruptamente, debido a la acción de la P_4 y en cambio, los PRs se distribuirán en gran número por las células epiteliales del endometrio (Lessey et al., 1988), lo que propiciará el cambio del endometrio de un estado proliferativo a un estado secretor. A partir de la fase secretoria, la P_4 habrá superado a los niveles de E_2 y por tanto, tomará el relevo modificando el endometrio mediante dos procesos muy importantes, la diferenciación y la madurez celular, los cuales serán determinantes para que se produzca una correcta implantación y desarrollo embrionario.

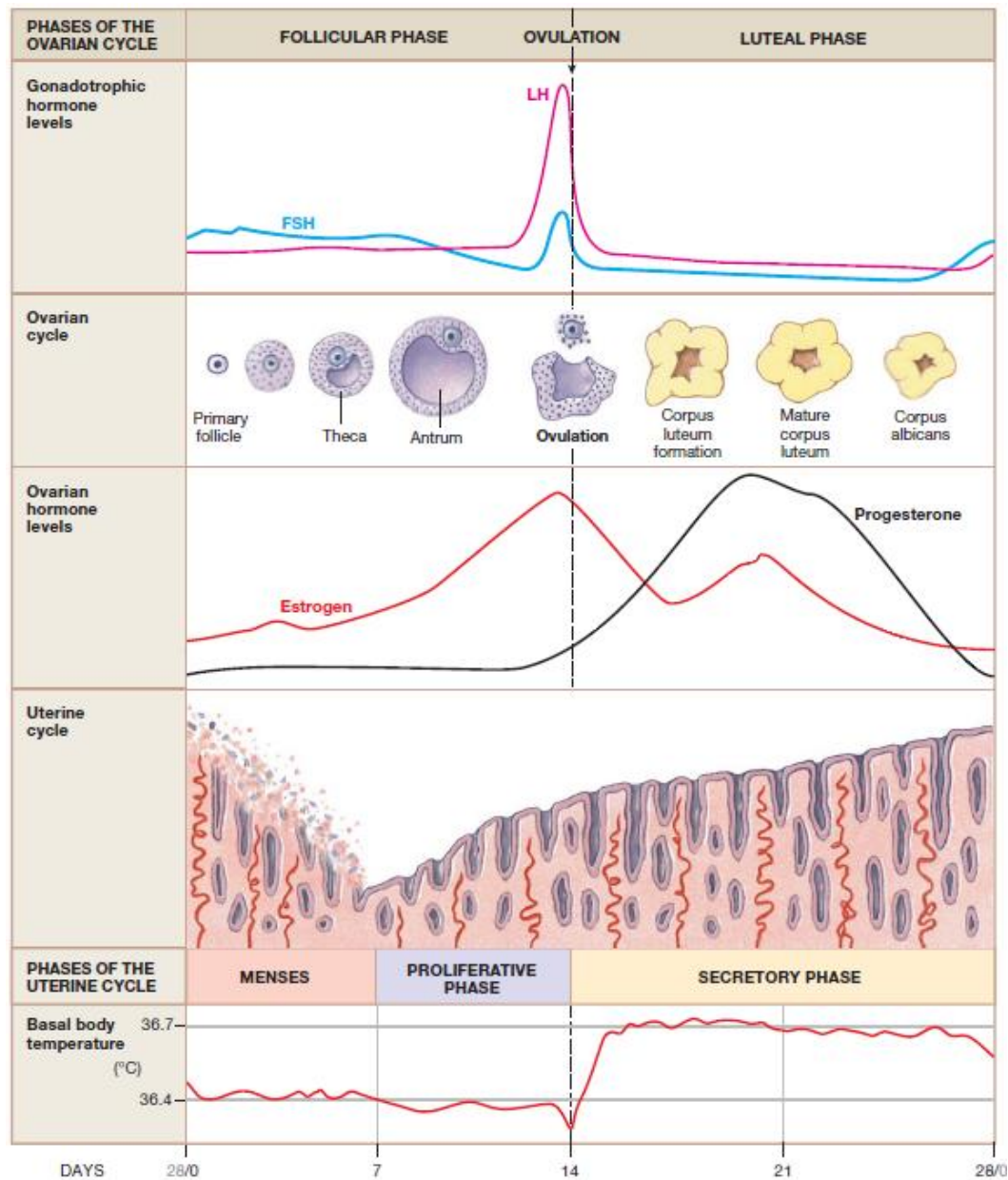


Figura 3. Ciclo ovárico y ciclo uterino junto a los niveles hormonales y de temperatura (Benjamin Cummings, 2007). En el caso del ciclo uterino, tanto el volumen como su actividad secretora aumentan gradualmente debido a la gran cantidad de P₄ producida por el cuerpo lúteo (T.W. Sadler, 2012).

La fase secretora temprana abarca normalmente desde el día catorce al veintiuno del ciclo. En este periodo, la acción del E₂ sobre el endometrio será cada vez menor debido fundamentalmente a que el folículo ovulatorio se convertirá en cuerpo lúteo, el cual producirá mayores niveles de P₄ que de E₂. Además, debido a

la unión de la P₄ con sus receptores, se emitirán señales que inhibirán los efectos del E₂ (SEGO Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, 2003). Estos cambios hormonales, propiciarán que al principio de esta fase disminuya la proliferación epitelial debido a la P₄ y que aumente el volumen endometrial ya que las glándulas que se encuentran en el endometrio aumentarán de tamaño y adquirirán una conformación tortuosa mientras acumulan secreciones ricas en nutrientes (principalmente aminoácidos, glucógeno y glicoproteínas) (Keith L. Moore et al., 2013). Además, en este momento, las arterias espirales poseerán un mayor flujo sanguíneo y seguirán creciendo hacia la superficie de la mucosa endometrial enrollándose cada vez más y formando grandes lagunas mediante su anastomosis. Por último, el componente estromal se edematizará progresivamente, especialmente en los últimos días de esta fase y las vacuolas de las células epiteliales se cargarán de glucógeno mientras avanzan desde la base hacia la luz celular.

La fase secretoria tardía abarca desde el día 21 hasta el 28 del ciclo, durante este periodo de tiempo, el endometrio sufrirá una serie de cambios que le prepararán para la implantación hasta terminar con un proceso de pre-decidualización, en el cual la P₄ tendrá una gran importancia. Por un lado, aumentará el edema estromal hasta extenderse por todo el endometrio, y serán las células de este estroma las que se transformen en células deciduales y produzcan un gran número de hormonas (relaxina, prolactina, renina) y factores de crecimiento (factor de crecimiento insulino dependiente y sus proteínas ligadoras) necesarios en caso de producirse la concepción (Keith L. Moore et al., 2013). Mientras que por el otro lado, se producirá una dilatación glandular cada vez mayor que ayudará a aumentar el espesor endometrial al máximo.

Al final de esta etapa, se puede diferenciar perfectamente tres zonas:

- El *estrato basal*, no modificado y que tan solo representa entre 1/3 y 1/4 del espesor de la mucosa.
- Un *estrato esponjoso* que está formado por el edema estromal, y múltiples vasos espiralados además de glándulas tortuosas. Representa aproximadamente la mitad del volumen.
- Un *estrato compacto*, en ella los trayectos glandulares se encuentran comprimidos, adquiriendo una conformación festoneada.

5. Efectos de la progesterona en el proceso de implantación

El proceso de implantación es uno de los puntos clave para que tenga lugar el embarazo y depende tanto de la calidad embrionaria, como del estado endometrial. En el caso del endometrio, una vez que ha ocurrido la ovulación, tendrá lugar un periodo corto de tiempo donde será receptivo al embrión, este periodo de tiempo se denomina ventana de implantación (Salamonsen et al., 2009). Una vez que el blastocisto consigue llegar a la parte posterior de la cavidad uterina, realizará el *hatching*, se orientará hacia la mucosa endometrial, se posicionará dirigiendo su masa celular interna hacia la zona del endometrio y terminará por invadirlo, iniciando así el embarazo (Chen et al., 2013). Para que este proceso ocurra, la P₄ deberá de llevar a cabo una actividad inmunosupresora, al igual que aumentar la vascularización, la secreción de moléculas de adhesión y en definitiva, una reforma completa del endometrio con el fin de que el embrión pueda unirse a él (Taraborrelli, 2015).

5.1. Regulación de la progesterona en la receptividad endometrial y la adhesión del trofoblasto.

Durante la ventana de implantación, la P₄ ejercerá diversas acciones encaminadas a aumentar la receptividad endometrial y a favorecer la adhesión del trofoblasto. Algunas de las más importantes son la inhibición de la proliferación epitelial, la mayor proliferación estromal junto con su decidualización, facilitar la adhesión del blastocisto y por último, crear un ambiente materno inmunotolerante (*figura 4*).

Bloquear la proliferación epitelial.

La supresión de la proliferación celular es debida a la disminución de los efectos del E₂, efecto propiciado por la P₄. La P₄ conseguirá este resultado gracias a una serie de moléculas cuya transcripción aumenta conforme los niveles de P₄ se elevan, como es el caso de *Hand 2* que actúa como antimitogénico (Li et al., 2011) o *Indianhedgehog* (Ihh) que disminuye la acción de los ER (Kurihara et al., 2007; Takamoto et al., 2002).

Estimula la proliferación de células estromales y su decidualización.

Al igual que en el caso anterior, la P₄ realiza esta labor controlando la transcripción de diferentes moléculas. Al contrario que ocurre en otros tipos celulares, durante este proceso se producirá una proliferación de las células estromales debido a una serie de moléculas que activará la P₄, como es el caso de la proteína *CCAAT/enhancer-bindingprotein beta* (CEBP β). Además, estas células también se diferenciarán en células deciduales, lo cual ocurre gracias a la acción del factor de transcripción COUP-TF II (COUP 2) (Lee et al., 2007), la anfiregulina, el factor de crecimiento ligado a heparina (HB-EGF) y *forkhead box O1* (FOXO1). Este último factor, también se encargará de disminuir la transcripción de genes que regulan el ciclo celular con lo cual inhibirá el crecimiento de las células epiteliales en el endometrio (Takano et al., 2007).

Controlar la adhesión del blastocisto

La P₄ controlará el proceso de adhesión mediante la activación de *Homebox A 10* (HoxA-10), que a su vez activará una serie de moléculas que controlarán la adhesión del blastocisto.

En un primer momento, HoxA-10 activa la transcripción de la mucina 1 (Muc-1), la cual se dispone sobre el epitelio endometrial actuando como una barrera y evitando así la unión del trofoblasto al endometrio durante los tres primeros días de su entrada en el útero (Margarit et al., 2010). No obstante, HoxA-10 también favorecerá la adhesión del blastocisto al activar la transcripción de otras moléculas como es el caso de las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_4\beta_1$ (Matsumoto et al. 2002), los pinópodos (Nikas and Makrigiannakis, 2003), la fibronectina (Staun-Ram and Shalev, 2005), prostaglandinas (PG), que además, serán las encargadas de que se produzca la decidualización celular y los receptores para la PGE₂, los cuales se nombran en la figura 4 como Ep₃ y EP₄ (Wang et al., 2010).

Inmunotolerancia

Durante el proceso de adhesión e invasión, la P₄ también influirá en el sistema inmune, ya que de manera indirecta inhibirá la actividad de las células *natural killer* (NK) y aumentará la producción de las células *T helper-2* (Th2) por parte de los linfocitos maternos (Par et al., 2003). Además, también aumentará la secreción de las citoquinas por la acción de la P₄, lo cual facilitará el proceso de implantación (Hess et al., 2007).

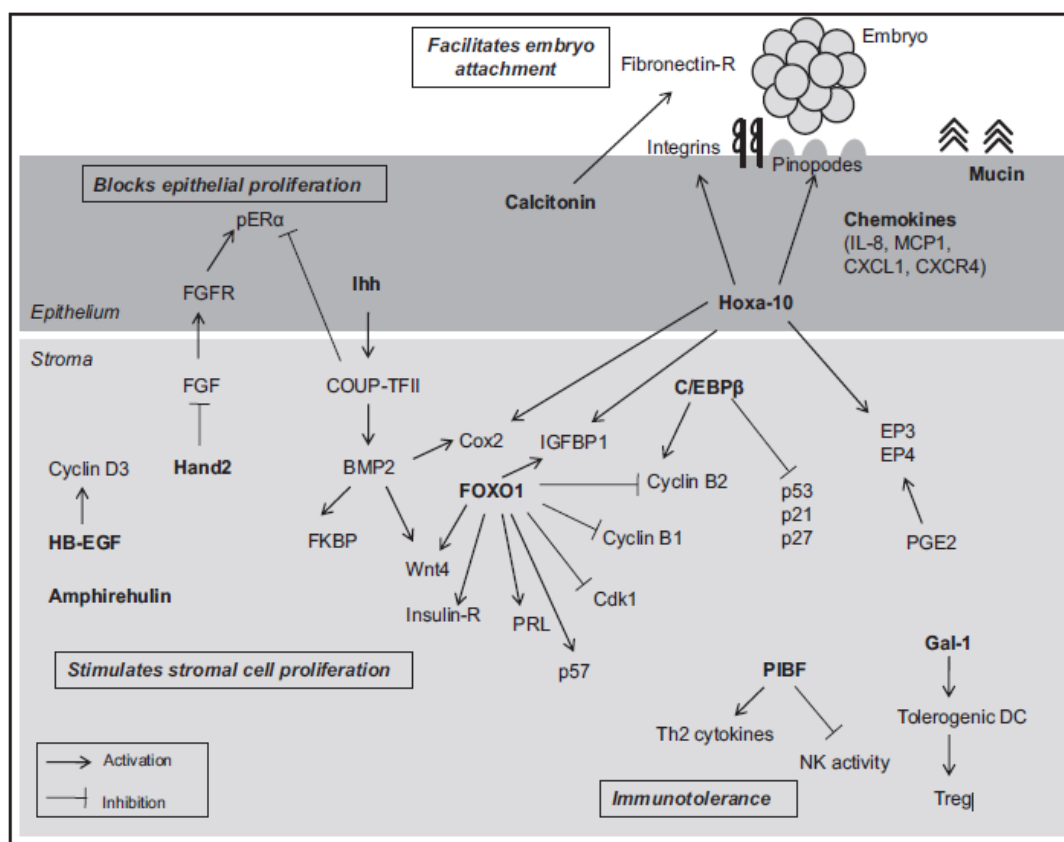


Figura 4. Efectos de la P₄ en la estructura endometrial y en el proceso de unión del embrión. La P₄ bloquea el efecto proliferativo del E₂ en las células del epitelio uterino y facilita la receptividad uterina al embrión. También modula la proliferación de las células estromales, el crecimiento decidual, la expresión de moléculas de adhesión y modula el sistema inmune materno para permitir la implantación del embrión (las moléculas inducidas por la P₄ se encuentran resaltadas en negrita) (Halasz and Szekeres-Bartho, 2013).

5.2. Regulación de la invasión y migración del trofoblasto.

La invasión del trofoblasto se encuentra dirigida por enzimas proteolíticas, como es el caso de las metaloproteinasas de matriz (MMPs), por este motivo, con el fin de controlar la invasión del trofoblasto, la P₄ inhibirá la actividad de estas MMPs de manera tanto directa como indirecta mediante moduladores locales (e.g. las citoquinas o la leptina) (Yao et al., 2003).

Por otro lado, después de digerir la matriz extracelular, las células del trofoblasto migrarán por todo el espacio que se ha formado hasta llegar lo más cerca posible del miometrio. En este proceso, la P₄ actuará sobre la quinasa de adhesión focal (FAK), la cual intervendrá sobre el citoesqueleto, de esta manera regulará el ciclo celular, adhesiones, polarización y migración del trofoblasto (Knöfler, 2010; Spencer et al., 2004). Además, la P₄ también actuará sobre la acción de *insulin-like growth factor binding protein 1* (IGFBP-1) y *dickkopf-related protein 1* (Dkk1), por lo que la migración del trofoectodermo disminuirá (Pollheimer et al., 2006) (figura 5).

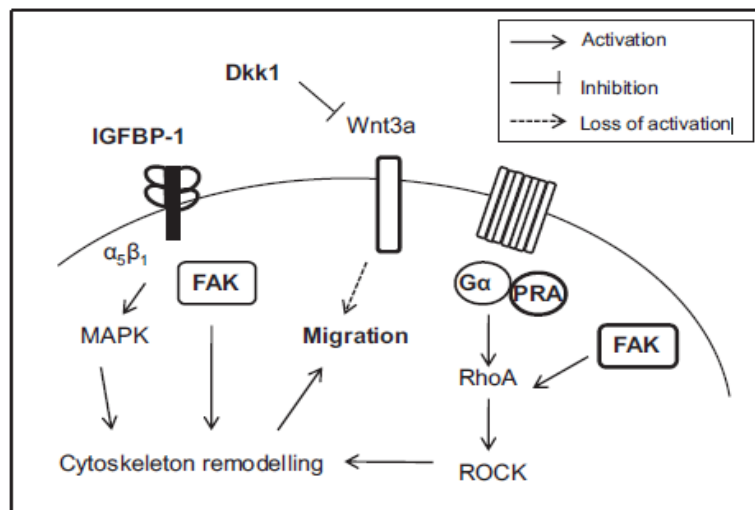


Figura 5. Control de la P₄ sobre la migración del trofoblasto. La P₄ modula la migración de las células del trofoblasto mediante las acciones genómicas de IGFBP-1 y Dkk-1 y no genómicas *Ras homolog gene family, member A* (RhoA)/ *rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1* (ROCK). (Las moléculas inducidas directamente por la P₄ se encuentran en negrita) (Halasz and Szekeres-Bartho, 2013).

6. Posibles soluciones al aumento supra-fisiológico de la progesterona

En base a lo expuesto en apartados anteriores y debido al papel tan importante que juega la P₄ en la calidad ovocitaria y desarrollo endometrial, no es de extrañar que cada vez haya más grupos que consideren que los niveles de P₄, por sí solos o en combinación con otros parámetros, debiesen de ser tenidos en cuenta con el fin último de aumentar las probabilidades de embarazo. En aquellos laboratorios en los que la P₄ es un análisis clínico más, las estrategias que se podrían utilizar para evitar los efectos negativos de los niveles supra-fisiológicos de la P₄ son los siguientes:

- Criopreservar los embriones y transferirlos en otro ciclo (Li et al., 2013). De este modo, los embriones transferidos se encontrarían en un ambiente menos castigado por la medicación administrada y el endometrio sería más receptivo para los embriones transferidos, ya que se encontrarían con unas concentraciones de P₄ normales. En este caso, se debería de tener en cuenta diferentes niveles de P₄ para las diferentes respondedoras (Cicek et al., 2015).
- Administrar hCG en momentos tempranos de la fase folicular, antes de la elevación de la P₄, podría ser beneficioso en algunas de las pacientes que mostraron niveles elevados de P₄ en anteriores EOC, ya que aumentaría el catabolismo de la P₄ hacia andrógenos y por tanto los niveles de P₄ en sangre disminuirían (Bosch et al., 2010; Fleming and Jenkins, 2010).
- Emplear protocolos de estimulación suave (Kolibianakis et al., 2004). De esta manera, menos ovocitos iniciarían su desarrollo y por tanto, habría una menor síntesis de P₄ (Lin et al., 2015).
- Reemplazar la transferencia de embriones por blastocistos, ya que muchos estudios han observado que en sus resultados no existe un efecto negativo

de la P₄ sobre el endometrio a partir del día quinto de transferencia (Bourgain and Devroey, 2003; Papanikolaou et al., 2009).

- Transferir un alto número de embriones en aquellos casos que se encuentren dentro del grupo con el ratio $P_4/E_2 \geq 1$ ng/ml es otra de las posibles soluciones que se han propuesto, de esta manera, se contrarrestaría el efecto negativo de un endometrio en desfase (Yu Ng et al., 2000).
- Utilizar agonistas con un efecto de *flare up* y un adecuado ratio de FSH/LH (Werner et al., 2014).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Justificación

En la actualidad, cada vez más parejas necesitan someterse a protocolos de fecundación *in vitro*. Sin embargo, a pesar de los avances en el campo de la reproducción, las tasas de embarazo en estas técnicas siguen siendo bajas y por lo tanto, se necesita seguir buscando parámetros o marcadores que puedan ayudar a mejorar estos resultados. En los últimos años, uno de los parámetros que se están valorando para tomar decisiones clínicas son los niveles de P_4 el día de la administración de la hCG. Sin embargo, aunque la P_4 juega un importante papel, tanto en el ciclo ovárico como en el endometrial, es importante añadir que a medida que se realizan más estudios se está obteniendo cada vez más resultados contradictorios sobre la idea de que, en el día de la administración de la hCG, los niveles altos de P_4 , al menos por si solos, se encuentren relacionados con menores tasas de embarazo. Es por este motivo, por el que en la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (URA) se ha decidido realizar el siguiente trabajo antes de utilizar este parámetro para tomar decisiones clínicas e intentar de esta manera, mejorar los resultados en las técnicas de fecundación *in vitro*.

2. Hipótesis y Objetivos

1. Hipótesis

Los niveles de progesterona se encuentran relacionados con las tasas de éxito en las técnicas de fecundación *in vitro* de la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

2. Objetivos

Con el fin de demostrar la anterior hipótesis en este trabajo se ha propuesto los siguientes objetivos:

Objetivo principal

Examinar si los niveles de progesterona en sangre, obtenidos el día en el que se lleva a cabo la administración de la gonadotropina coriónica humana, están relacionados con distintos parámetros que influyen sobre el éxito de las técnicas de fecundación *in vitro* de la unidad de reproducción del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

Objetivos secundarios

- Estudiar si la relación progesterona/estradiol, el día en el que se lleva a cabo la administración de la gonadotropina coriónica humana, está vinculada con diferentes parámetros relacionados con el éxito de las técnicas de fecundación *in vitro* del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.
- Analizar si la relación progesterona/ovocitos en metafase II se encuentra asociada con distintos parámetros relacionados con el éxito de las técnicas de fecundación *in vitro* en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio

En este trabajo se ha realizado un estudio retrospectivo, para determinar si existe una relación entre los niveles de P_4 el día de la administración de la hCG y los resultados que se han obtenido de los tratamientos de reproducción asistida. No obstante, los datos examinados en este estudio no fueron utilizados para tomar ninguna decisión clínica.

En el estudio se incluyeron 273 pacientes a las que se les realizó tratamientos de fecundación *in vitro* en la URA. El análisis se realizó entre octubre del 2014 y enero del 2016 y en todos los casos, tanto los niveles de P_4 como de E_2 en sangre fueron medidos el día de la administración de hCG. Además, todas las mujeres que se han incluido en este estudio se encontraban dentro del intervalo de 26 a 40 años, siendo la media de edad 36,18 años \pm 3,20.

Aunque en este análisis se incluyeron las punciones realizadas a 273 pacientes, a 36 de esas mujeres no se las pudo realizar la transferencia en ese mismo ciclo, por lo que en los casos que fue posible, se vitrificaron sus embriones. Los motivos de cancelación fueron debidos a que no tuvieron fecundación (2,56 %), por riesgo a padecer hiperestimulación ovárica (3,66 %), a que no hubo ovocitos o estos fueron inmaduros (3,66 %) o bien por complicaciones post-punción (hemorragia e infecciones) y contaminación externa (3,30 %).

A partir de la población general se hicieron tres estudios diferentes para determinar si los niveles de P_4 por si sola o junto a otros factores, afectaban o no al éxito de las técnicas de fecundación *in vitro*. En un primer estudio, se utilizó solo los niveles de P_4 , mientras que en un segundo y tercer análisis se empleó la relación P_4/E_2 y la relación P_4 /número de ovocitos maduros (MII) respectivamente, puesto que tanto los niveles de E_2 como el número de ovocitos maduros, son dos factores que se encuentran relacionados con los niveles de P_4 (Givens et al., 1994).

2. Población de estudio

2.1. Estudio de la población general según niveles de progesterona

En este estudio, se incluyeron las punciones realizadas a 273 pacientes, a las cuales se dividió en dos grupos según los niveles de P_4 el día de la administración de la hCG y después, se compararon sus resultados.

La división de la población se determinó a partir del límite de P_4 de 1,5 ng/ml siguiendo las sugerencias de estudios previos, los cuales marcaban este como el mejor punto de corte (Bosch et al., 2010; Haouzi et al., 2014; Labarta et al., 2011; Pandian et al., 2013).

- Grupo 1 A: incluye a las mujeres con niveles de $P_4 < 1,5$ ng/ml, (n = 225 punciones).
- Grupo 1 B: incluye a las mujeres con niveles de $P_4 \geq 1,5$ ng/ml (n = 48 punciones).

2.2. Estudio de la población general según el ratio progesterona/estradiol

En este estudio se incluyeron 273 pacientes a las cuales se las clasificó en dos grupos diferentes atendiendo al límite de 1 ng/ml para el ratio P_4/E_2 tal y como sugieren estudios previos (Filicori et al., 2005; Mascarenhas et al., 2015; Ou et al., 2008).

- Grupo 2 A: mujeres con un ratio $P_4/E_2 < 1$ ng/ml (n = 246 punciones).
- Grupo 2 B: mujeres con un ratio $P_4/E_2 \geq 1$ ng/ml (n = 27 punciones).

2.3. Estudio de la población general según el ratio progesterona/ovocitos en metafase II

En este tercer análisis se incluyeron 271 punciones donde se obtuvieron al menos 1 ovocito maduro. Estas pacientes fueron divididas en dos grupos según el límite 0,32 ng/ml para P₄/MII (Aflatoonian et al., 2014).

- Grupo 3 A: mujeres con un ratio P₄/MII < 0,32 ng/ml (n = 221 punciones).
- Grupo 3 B: mujeres con un ratio P₄/MII ≥ 0,32 ng/ml (n = 50 punciones).

3. Proceso de fertilización in vitro

3.1. Protocolos de estimulación ovárica controlada

En todos los casos, con el propósito de conseguir un número adecuado de ovocitos maduros el día de la punción ovárica, se utilizó uno de los dos protocolos de EOC existentes, el protocolo de agonistas o el protocolo de antagonistas (*figura 6*). El protocolo se eligió caso por caso, atendiendo a preferencias clínicas y a las características de cada paciente. La dosis inicial de cada paciente también fue individualizada en cada caso de acuerdo con parámetros tales como edad, niveles basales de FSH, conteo de folículos antrales, índice de masa corporal (IMC) y respuestas previas a la EOC. Además, la dosis se fue ajustando a necesidad, teniendo en cuenta tanto los niveles de E₂ en sangre como la ecografía transvaginal.

Protocolo de agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas

Este protocolo se realizó según las indicaciones descritas en el trabajo de Navarro *et al.* (Navarro, I et al., 2001). En primer lugar, se administró un agonista de la GnRh para inhibir la secreción hipofisaria (*figura 6 A*), en esta unidad se utiliza el acetato de leuprolide (*Procrin*[®], Laboratorios Abbott, Madrid, España) a una dosis de 0,2 mg/día desde la fase lútea del ciclo anterior (día 21). Una vez que se comprobó que se había conseguido inhibir la función de la hipófisis, se administró FSH recombinante (FSHr) (*Gonal-F*[®], Laboratorios Merck-Serono, Madrid, España) durante cinco días a una dosis de 300 UI/día, con el objetivo de conseguir un correcto desarrollo folicular. Esta dosis se ajustó en función de la respuesta individual.

Protocolo de antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina

En aquellos casos que se utilizaron antagonistas para inhibir la secreción hipofisaria, la administración de FSHr (*Gonal-F*[®], Laboratorios Merck-Serono, Madrid, España) o FSHr más LH recombinante (LHr) (*Pergoveris*[®], Laboratorios Merck-Serono, Madrid, España) comenzó el segundo día del ciclo, con una dosis de 300 UI/día (*figura 6 B*) tras lo cual se estudió la respuesta de cada paciente con el fin de ajustar la dosis en lo que fuese necesario. Entre el quinto al séptimo día del ciclo o tras haber observado al menos un folículo de 14 mm de diámetro, se comenzó con la administración del antagonista Cetrotide (*Cetrotide*[®], Laboratorios Merck-Serono, Madrid, España), administrándose una dosis de 0,25 mg/día hasta el final del tratamiento.

Desencadenamiento de la ovulación

La presencia de al menos cuatro folículos de 16 mm y unos niveles adecuados de E₂ para dicho desarrollo folicular indicaron cuándo se tenía una adecuada madurez folicular y por tanto era posible administrar hCG (*Ovitrelle*[®], Laboratorios Merck-Serono, Madrid, España) en una dosis de 10.000 UI.

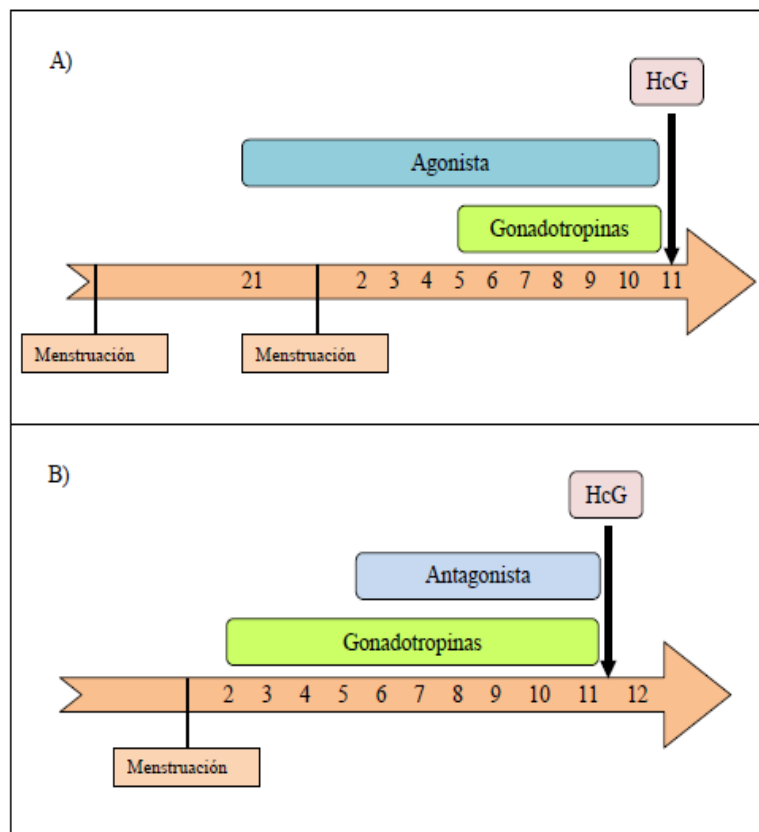


Figura 6. Esquema de los dos protocolos de EOC. En la imagen A se observa un protocolo de agonistas y en la B el protocolo de antagonistas (Barri, 2005).

3.2. Obtención de ovocitos. Punción ovárica

Aproximadamente a las 36 horas de la administración de la hCG se procedió a la punción folicular ecoguiada, la cual se llevó a cabo en un quirófano contiguo al laboratorio mediante un ecógrafo transvaginal. Una vez encontrados los folículos, se realizó la aspiración del líquido de cada uno de ellos, en el cual se encontraba el ovocito y todo ello se depositó en tubos que contenían medio de *flushing* (*Flushing medium*, Origio, Knardrupvej, Dinamarca).

En el laboratorio, los ovocitos que fueron captados y lavados en medio *flushnig* (*Flushing medium*, Origio, Knardrupvej, Dinamarca) a continuación se traspasaron a medio *IVF* (*IVF medium*, Origio, Knardrupvej, Dinamarca), donde se les dejó incubar a 37 °C y 6 % de CO₂ durante 3 horas, tiempo suficiente para que los ovocitos terminaran de madurar.

3.3. Obtención y preparación de las muestras seminales

Las muestras fueron obtenidas mediante eyaculación y se las capacitó con las técnicas de *Swim-up* directo o *Swim-up* inverso, según fuese su calidad tras analizarse la concentración y motilidad en la cámara Mackler.

Swim-up directo

En este procedimiento, las muestras se repartieron en diferentes tubos según su volumen, concentración y motilidad espermática, tras lo cual fueron lavadas con 1 ml de medio de *flushing* (*Flushing medium*, Origio, Knardrupvej, Dinamarca) y centrifugadas a 300 g durante 10 minutos. Al finalizar la centrifugación, se retiró el sobrenadante, y dependiendo de la cantidad del pellet se añadió entre 300 - 500 µl de medio de *flushing* (*Flushing medium*, Origio, Knardrupvej, Dinamarca), después de lo cual se incubaron durante una hora a 37 °C y 6 % de CO₂ y se terminó conservando tan solo los sobrenadantes.

Swim-up inverso

En este caso se añadió 1 ml de medio de *flushing* (*Flushing medium*, Origio, Knardrupvej, Dinamarca) a cada tubo y una determinada proporción de muestra. Una vez realizado este proceso, se incubó a 37 °C y 6 % de CO₂ durante una hora, tras lo cual, se recogió el sobrenadante, se lavó con medio de *flushing* (*Flushing medium*, Origio, Knardrupvej, Dinamarca) y se centrifugó a 300 g durante 10 minutos. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y al pellet se le añadió entre 300 - 500 µl de medio de *flushing* (*Flushing medium*, Origio, Knardrupvej, Dinamarca).

3.4. Fecundación, cultivo de embriones y clasificación embrionaria.

Al cabo de las 3 horas de incubación se escogió qué técnica de fecundación *in vitro* sería la apropiada teniendo en cuenta tanto la calidad y número de los ovocitos obtenidos, como la calidad de la muestra seminal.

Microinyección intracitoplasmática

En aquellos casos en los que se realizó una ICSI, los ovocitos se desnudaron mediante la acción enzimática de la hialuronidasa (*SynVITRO™ Hyalase*, Origio, Knardrupvej, Dinamarca) y con ayuda de pipetas de decumulación. En este caso, solo los ovocitos que se encontraban en estadio de MII fueron elegidos para ser microinyectados e incubados en medio de *cleavage* (*Quinns Advantage™ Cleavage Medium*, Origio, Knardrupvej, Dinamarca).

Fecundación in vitro

En este método, los ovocitos sin decumular se dispusieron en medio *IVF* (*IVF medium*, Origio, Knardrupvej, Dinamarca) junto a una concentración de entre aproximadamente 50.000 - 100.000 espermatozoides móviles/ml.

Valoración de la fecundación

Tras 18 horas post microinyección o inseminación, se comprobó si había tenido lugar la fecundación, para ello se observó la presencia o no de dos pronúcleos y dos corpúsculos polares en el ovocito, considerando que en aquellos casos que existieran se habría producido una fecundación normal dando lugar a un cigoto (Gianaroli et al., 2003). En la FIV, los ovocitos que habían sido fecundados se pasaron a medio de *cleavage* (*Quinns Advantage™ Cleavage Medium*[®], Origio, Knardrupvej, Dinamarca).

Cultivo embrionario y valoración de la calidad embrionaria

Todos los cigotos fueron cultivados en medio de *cleavage* (*Quinns Advantage™ Cleavage Medium*, Origio, Dinamarca) hasta dos días (D + 2) o tres días (D + 3) post-punción, en los cuales se valoró su calidad y ritmo de división en función de caracteres morfológicos. Esta clasificación siguió las directrices de la Asociación Española para el Estudio de la Biología Reproductiva (ASEBIR) (Arroyo, G et al., 2015) y la clasificación de L.Veeck (Veeck L, 1992).

3.5. Transferencia embrionaria y valoración de la gestación.

Transferencia embrionaria

Entre los embriones obtenidos se seleccionaron aquellos que presentaban mejor morfología y ritmo de desarrollo y se recomendó a las parejas que se transfirieran 2 embriones, con el propósito de obtener así las máximas probabilidades de embarazo y evitar el riesgo de un embarazo triple. La transferencia se realizó en D + 2 o D + 3 dependiendo de las cualidades de los embriones, para lo cual fueron traspasados a nuevo medio de *cleavage* (*Quinns Advantage™ Cleavage Medium*, Origio, Knardrupvej, Dinamarca) y cargados en un catéter.

En el quirófano, el catéter se introdujo hasta los dos tercios posteriores del útero, con ayuda de una guía ecográfica transabdominal, y en esta sección fue donde se depositó a los embriones.

Valoración de la gestación

A los doce días después de la transferencia, se determinaron en sangre los niveles de β - hCG y la gestación fue confirmada a las siete semanas de gestación mediante la observación de latido fetal por medio de ecografía vaginal.

4. Medición de los niveles de progesterona y estradiol en sangre

Tanto los niveles de P_4 como de E_2 de las 273 mujeres que se utilizan en este estudio fueron extraídas doce horas antes de la administración de la hCG. Para esta extracción se utilizó un compresor con el que se retuvo la muestra de sangre periférica en la fosa antecubital que previamente había sido desinfectada y se extrajeron 5 ml de sangre en tubos con citrato de sodio como anticoagulante (*Vacurette*[®], GreinerBio-One, Madrid, España). Tras su extracción, las muestras sanguíneas fueron enviadas para que mediante el inmunoensayo enzimático ADVIA Centaur de E_2 y P_4 (*ADVIA Centaur*[®], Siemens, Madrid, España) se obtuvieran los niveles sanguíneos de ambas hormonas.

4.1. Ensayo del estradiol

El ensayo de Advia Centaur (*ADVIA Centaur*[®], Siemens, Madrid, España) para el E_2 es un ensayo competitivo, para el cual se necesitó 80 μ l del suero sanguíneo de cada paciente. La sensibilidad del análisis fue de 11,8 – 3000 pg/ml y los coeficientes de variación intraserie e interserie de 5,6 % y 1,9 % respectivamente.

4.2. Ensayo de la progesterona

El ensayo de P₄ de Advia Centaur (*ADVIA Centaur*[®], Siemens, Madrid, España) también es un inmunoensayo competitivo, para el cual se necesitó 20 µl del suero sanguíneo de cada paciente. La sensibilidad del análisis fue de 0,21 – 60 ng/ml y los coeficientes de variación intraserie e interserie de 3,7 % y 3,9 % respectivamente. En este caso, los niveles de P₄ no fueron utilizados para tomar ningún tipo de decisión clínica.

5. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado mediante el paquete estadístico para las ciencias sociales (*SPSS, versión 20.0 para Windows*, Corporación IBM, Armonk, Nueva York, Estados Unidos) y los datos fueron presentados como media ± desviación estándar o como el número total de casos junto a su porcentaje.

En este análisis se compararon tanto medias como tasas. En el caso de la comparación de las medias, al ser variables cuantitativas, se usó la prueba "t-Student", mientras que en el caso de las tasas, que eran datos categóricos se utilizó el test de chi-cuadrado. En ambos casos, un valor de $p < 0,05$ se consideró como estadísticamente significativo, nombrándose como ($p < 0,05$), mientras que a aquellos valores superiores se les consideró como no significativos (NS).

En este trabajo, en el primer grupo de estudio también se incluye el análisis de la característica operativa del receptor ("Receiver operating characteristic", ROC), con el fin de calcular el mejor punto de corte en los niveles de P₄ de las pacientes de la URA.

6. Definición de variables

1. Edad: media de la edad de las pacientes el día de la punción.
2. N° Ovocitos: número de ovocitos obtenidos por punción.
3. N° Metafases II: número de ovocitos maduros por punción.
4. N° 2PN2CP: número de ovocitos fecundados. Considerando como ovocitos fecundados aquellos que presentaban dos pronúcleos y dos corpúsculos polares a las 18 horas post-fecundación.
5. N° embriones transferidos al útero materno.
6. N° sacos: número de sacos embrionarios con latido fetal.
7. Calidad de los embriones transferidos (*figura 7*):
 - Buena calidad: todos los embriones transferidos a la paciente fueron de grado A y/o B
 - Mala calidad: todos los embriones transferidos a la paciente fueron de grado C y/o D
 - Calidad mixta: al menos uno de los embriones transferidos fue de calidad A y/o B.

8. Tasa de fecundación: $(\text{n}^\circ \text{ de } 2\text{PN}2\text{PC} \times 100) / (\text{n}^\circ \text{ de ovocitos maduros})$.
9. Tasa de transferencia: $(\text{n}^\circ \text{ de transferencias} \times 100) / (\text{n}^\circ \text{ de punciones})$.
10. Tasa de implantación: $(\text{n}^\circ \text{ de sacos embrionarios} \times 100) / (\text{n}^\circ \text{ de embriones transferidos})$.
11. Tasa de embarazos: $(\text{n}^\circ \text{ de embarazos} \times 100) / (\text{n}^\circ \text{ de transferencias})$.
12. Tasa de abortos: $(\text{n}^\circ \text{ de abortos} \times 100) / (\text{n}^\circ \text{ de embarazos})$.

Grado	Día	Nº de células ("→" paso de D+2 a D+3)	% Fragmentos	Simetría celular	Multinucleación	Otros
A	D+2	4	≤10%	estadio-específico	NO	NORMAL
	D+3	7, 8				
B	D+2	5	>10-25%	4→7 células NO estadio-específico en D+3	NO	≤50% células con vacuolas pequeñas, o bien ZP anormal
	D+3	5 → 7 - 10 4 → 9,10				
C	D+2	2, 3, 6	>25-35%	2, 4, 8 células NO estadio-específico	1 cél. bn D+2, o bien 1-2 cél. bn D+3 y el resto como Grado A ⁽¹⁾	≤50% células con vacuolas grandes
	D+3	6, 11, 12 2, 3 → 6 - 9 6 → 8 - 10				
D	D+2	3 (NO estadio-específico), > 6	>35%	3 células No estadio-específico en D+2	Cualquier otro tipo de multinucleación	>50% células con Vacuolas pequeñas, o bien Grave alteración citoplasm. ⁽²⁾
	D+3	3 - 5, 1 más que en D+2				
Embriones excluidos de la clasificación por probabilidad de implantación prácticamente nula: Falta de división en 24h; >50% de fragmentación; Vacuolas grandes en >50% de las células; Combinación de >2 anomalías propias de grado D ⁽³⁾						

(1) "mn"= Multinucleada. "bn"= Binucleada. Excepción a la regla de que cualquier multinucleación conlleva clasificar como grado D.

(2) Por ejemplo: Anillo acitoplasmático muy evidente en D+3. Las vacuolas se valoran aparte.

(3) Excepción a la regla de no penalización por combinación de varias características negativas.

Figura 7. Tabla de la clasificación embrionaria de ASEBIR (Arroyo, G et al., 2015). Aquellos embriones clasificados con la categoría A, son embriones de óptima calidad y con máxima capacidad de implantación y los de categoría B, embriones de buena calidad y con elevada capacidad de implantación. El conjunto de estos dos tipos de embriones son los que se han clasificado como de "buena calidad" en este trabajo. Mientras que los embriones de categoría C son embriones con una calidad regular y con una probabilidad de implantación media y los embriones de categoría D, de mala calidad y con una probabilidad de implantación baja, Su conjunto lo hemos considerado como de "mala calidad". Aquel conjunto que se ha considerado de "calidad mixta" es debido a que entre ellos, al menos uno de los embriones era de buena calidad, pero no todos.

IV. RESULTADOS

La población de este trabajo incluye 273 punciones realizadas a pacientes con una media de edad de $36,18 \pm 3,20$ años. En todas ellas, se obtuvo una media de $10 \pm 6,93$ ovocitos y una tasa de fecundación de un 57,5 %. Además, la tasa de transferencia fue del 86,9% ya que de las 273 pacientes puncionadas a 36 no se las pudo realizar transferencia y la tasa de implantación fue de un 19,65 %. Por último, se analizó la tasa de embarazos (29,1 %) y la tasa de abortos (10,1 %) (*tabla 1*).

Tabla 1. Datos generales del total de la población de este estudio.

<u>Población General</u>	
Media de edad (años)	$36,18 \pm 3,20$
Nº de punciones	273
Media del nº de ovocitos	$10 \pm 6,93$
Tasa de fecundación	1291 (57,5 %)
Tasa de Transferencias	237 (86,9 %)
Tasa de implantación	88 (19,65 %)
Nº Embarazos	69 (29,1 %)
Nº de Abortos	7 (10,1 %)

1. Estudio de la población general según niveles de progesterona

En este primer estudio se incluyeron a 273 mujeres puncionadas, de las cuales 225 conformaron el grupo 1 A ($P_4 < 1,5$ ng/ml) y 48 el grupo 1 B ($P_4 \geq 1,5$ ng/ml) y se estudió si existía alguna diferencia entre los distintos parámetros de las dos poblaciones. No obstante, tras realizar este análisis, se observó que ninguno de los valores obtenidos era significativo (*tabla 2*).

Tabla 2. Comparación de la media de edades, número de ovocitos, número de ovocitos en metafase II, número de ovocitos fecundados y número de sacos entre el grupo de pacientes que tuvo unos niveles de $P_4 < 1,5$ ng/ml y el grupo que tuvo una $P_4 \geq 1,5$ ng/ml. En esta tabla se puede observar la media \pm la desviación típica de cada una de las variables y el T-student no significativo = NS.

	Grupo del estudio 1		P valor
	Grupo 1 A	Grupo 1 B	
Edad (años)	36,30 \pm 3,10	36,10 \pm 3,67	NS
Nº Ovocitos	10 \pm 7,07	12 \pm 6,01	NS
Nº Metafases II	8 \pm 5,55	9 \pm 5,30	NS
Nº 2PN2CP	5 \pm 3,92	5 \pm 4,44	NS
Nº embriones transferidos	2 \pm 0,37	2 \pm 0,36	NS
Nº Sacos	1 \pm 0,47	1 \pm 0,39	NS

Se sabe que el número total de embriones de buena calidad es uno de los mejores predictores de éxito en ciclos de fecundación *in vitro*, por lo que tras los anteriores resultados, se estudió si entre los dos grupos existía alguna diferencia en este parámetro. En este caso, se ha obtenido un 53 % de embriones de buena calidad en el grupo 1 A y un 63,4 % en el grupo 1 B, mientras que el grupo 1 A alcanzó un 21,3 % de embriones de mala calidad y el grupo 1 B un 14,6 %. En el último caso, se estudiaban los embriones de calidad mixta, el grupo 1 A obtuvo un 25,7 % de embriones mientras que el grupo 1 B consiguió un 22 %. En las tres ocasiones no se observó ninguna diferencia significativa (*tabla 3*).

Tabla 3. En esta tabla se muestra el % de embriones transferidos en base a su calidad. Los embriones fueron clasificados en uno u otro rango de calidad a partir de los rasgos morfológicos que se analizaron en D + 2 y D + 3. El chi-cuadrado cuando no es significativo se clasifica como NS.

	Grupo del estudio 1		P valor
	Grupo 1 A	Grupo 1 B	
Buena calidad	107 (53 %)	26 (63,4 %)	NS
Mala calidad	43 (21,3 %)	6 (14,6 %)	NS
Calidad mixta	52 (25,7 %)	9 (22 %)	NS

Una vez que se observó que no existía ninguna diferencia significativa entre la calidad embrionaria de ambos grupos, se comparó las tasas de fecundación, transferencia e implantación. En este caso, tampoco se obtuvo una diferencia significativa entre las tasas de fecundación del grupo 1 A (60,6 %) y el grupo 1 B (61,6 %), ni entre las tasas de transferencia en las que el grupo 1 A consiguió 89,8 % de transferencias y el grupo 1 B un 85,4 %. Por último, tampoco se encontró diferencias significativas entre las tasas de implantación del grupo 1 A (19,8 %) y del grupo 1 B (18,4 %) (*tabla 4*).

Tabla 4. Total de casos de fecundación, transferencia e implantación junto a sus tasas y su chi-cuadrado, donde NS = no significativo.

	Grupo del estudio 1		P valor
	Grupo 1 A	Grupo 1 B	
Tasa de fecundación	1028 (60,6 %)	263 (61,6 %)	NS
Tasa de Transferencia	202 (89,8 %)	41 (85,4 %)	NS
Tasa de Implantación	74 (19,8 %)	14 (18,4 %)	NS

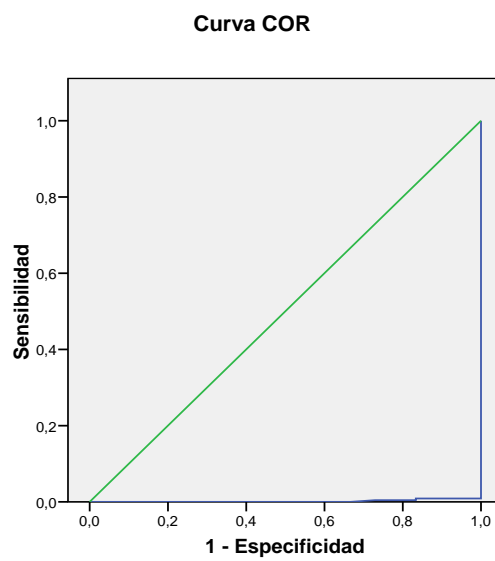
Por último, se estudió la tasa de embarazos en el grupo 1 A (27,7 %), y en el grupo 1 B (30 %) y también la tasa de abortos del grupo 1 A (19,2 %), y del grupo 1 B (0,0 %). En ambos casos tampoco se encontraron diferencias significativas (tabla 5).

Tabla 5. Tasas de embarazos y abortos junto al resultado del chi-cuadrado, donde NS = no significativo.

	Grupo del estudio 1		P valor
	Grupo 1 A	Grupo 1 B	
Tasa de embarazo	56 (27,7 %)	12 (30 %)	NS
Tasa de aborto	7 (19,2 %)	0 (0,0 %)	NS

Curva ROC

Al realizarse una curva ROC, con el fin de averiguar cuál sería el punto de corte real para los niveles de P_4 de esta unidad de reproducción, no se obtuvo una área debajo de la curva (AUC) lo suficientemente grande como para aceptar un valor debido a la escasa cantidad de casos que se tienen hasta el momento. El área obtenida en este análisis fue de 0,002 con un intervalo de confianza asintótico al 95 % (CI) de 0,005, y una hipótesis nula de área verdadera de $p < 0,05$ (figura 8).



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Figura 8. La curva de ROC para la P_4 es de color azul, mientras que la línea verde es una línea auxiliar para facilitar el análisis de dichas curvas.

2. Estudio de la población general según el ratio progesterona/estradiol.

En este estudio, debido a que tanto los niveles de E₂ como de P₄ se encuentran muy relacionados entre sí y son tan importantes para las tasas de éxito en las técnicas de fecundación *in vitro*, se utilizó el ratio P₄/E₂ para diferenciar dos grupos de pacientes dentro de la población general.

La población que se examinó en este último estudio fue de 273 mujeres puncionadas a las cuales se dividió en un grupo 2 A (P₄/E₂ < 1 ng/ml) de 246 mujeres y en un grupo 2 B (P₄/E₂ ≥ 1 ng/ml) que lo conformaron 26 pacientes.

El ratio que se ha evaluado de P₄/E₂ en este estudio ha mostrado diferencias significativas en ambos grupos en el número de ovocitos maduros entre el grupo 2 A (8 ± 5,57) y 2 B (6 ± 4,64) y en el número de ovocitos fecundados por el grupo 2 A (5 ± 4,08), y 2 B (3 ± 2,96). Sin embargo, en el resto de casos no se encontró ninguna diferencia significativa (*tabla 6*).

Tabla 6. Comparación de la media de edades, número de ovocitos, número de ovocitos en metafase II, número de ovocitos fecundados y número de sacos entre el grupo de pacientes que tuvo unos niveles de $P_4/E_2 < 1$ ng/ml y el grupo que tuvo una $P_4/E_2 \geq 1$ ng/ml. En esta tabla, se puede observar la media \pm la desviación típica de cada una de las variables y el resultado del T- student donde NS = no significativo y $p < 0,05$ = valor significativo.

	Grupo de estudio 2		P valor
	Grupo 2 A	Grupo 2 B	
Edad	36,18 \pm 3,24	36,2 \pm 2,88	NS
Nº Ovocitos	11 \pm 6,94	8 \pm 6,35	NS
Nº Metafases II	8 \pm 5,57	6 \pm 4,64	P < 0,05
Nº 2PN2CP	5 \pm 4,08	3 \pm 2,96	P < 0,05
Nº embriones transferidos	2 \pm 0,37	2 \pm 0,38	NS
Nº Sacos	1 \pm 0,47	1 \pm 0,41	NS

Como en el anterior estudio, se examinó si el valor asignado para el ratio P_4/E_2 marcaba alguna diferencia entre las calidades de los dos grupos. Sin embargo, ni para aquellos embriones de buena calidad entre el grupo 2 A (55,4 %) y 2 B (47,3 %), ni entre los embriones de mala calidad (19,6 %) para el grupo 2 A (26,3 %) y para el grupo 2 B, o de calidad mixta para el grupo 2 A (25,0 %) y grupo 2 B (26,3 %), se observó diferencias significativas (*tabla 7*).

Tabla 7. En esta tabla se muestra el % de embriones de diferente calidad transferidos en ambos grupos. Los embriones fueron clasificados en uno u otro rango de calidad a partir de los rasgos morfológicos que se analizaron en D + 2 y D + 3. En el resultado del chi-cuadrado, NS = no significativo.

	Grupo de estudio 2		P valor
	Grupo 2 A	Grupo 2 B	
Buena calidad	124 (55,4 %)	9 (47,3 %)	NS
Mala calidad	44 (19,6 %)	5 (26,3 %)	NS
Calidad mixta	56 (25,0 %)	5 (26,3 %)	NS

Al estudiar las tasas de fecundación entre el grupo 2 A (61,4 %) y 2 B (51,3 %) y las tasas de transferencia, 91,1 % para el grupo 2 A y 70,4 % para el grupo 2 B, se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, no fue así en el análisis de las tasas de implantación, donde se obtuvo un 19,5 % para el grupo 2 A y un 20,0 % para el grupo 2 B (*tabla 8*).

Tabla 8. Número total de casos y tasas de fecundación, transferencia e implantación. En el chi-cuadrado, NS = no significativo y $p < 0,05$ = valor significativo.

	Grupo de estudio 2		P valor
	Grupo 2 A	Grupo 2 B	
Tasa de fecundación	1214 (61,4 %)	77 (51,3 %)	$P < 0,05$
Tasa de transferencia	224 (91,1 %)	19 (70,4 %)	$P < 0,05$
Tasa de implantación	81 (19,5 %)	7 (20,0 %)	NS

En las últimas pruebas de este estudio, la tasa de embarazos del grupo 2 A (27,7 %) y el grupo 2 B (31,6 %) junto a la tasa de abortos en el grupo 2 A (11,3 %) y 2 B (0,0 %), no mostraron ninguna diferencia significativa (*tabla 9*).

Tabla 9. Comparación de las tasa de embarazo y aborto donde el resultado del chi-cuadrado NS = no significativo.

	Grupo del estudio 2		P valor
	Grupo 2 A	Grupo 2 B	
Tasa de embarazo	62 (27,7 %)	6 (31,6 %)	NS
Tasa de aborto	7 (11,3 %)	0 (0,0 %)	NS

3. Estudio de la población general según el ratio progesterona/ovocitos en metafase II

En este último estudio, se valoró el ratio de P_4/MII ya que existe una estrecha relación entre los niveles de P_4 en sangre y la correcta maduración ovocitaria, para ello se incluyeron 271 mujeres puncionadas, ya que fue el número de pacientes en las que se obtuvo al menos un ovocito en MII. Del total de mujeres puncionadas en este estudio, 221 pertenecieron al grupo 3 A ($P_4/MII < 0,32$ ng/ml) y 50 al grupo 3 B ($P_4/MII \geq 0,32$ ng/ml).

En este tercer estudio, se obtuvieron valores significativos para el número medio de ovocitos obtenidos mediante punción folicular ya que el grupo 3 A consiguió una media de $12 \pm 6,78$ ovocitos, mientras que el grupo 3 B tan solo alcanzó una media de $5 \pm 2,73$ ovocitos. Además, se observaron valores significativos para la media de ovocitos en MII, ya que el grupo 3 A consiguió $9 \pm 5,35$ mientras que el grupo 3 B tan solo logró una media de $3 \pm 1,45$ ovocitos maduros y también para el nº de ovocitos fecundados donde el grupo 3 A tuvo una media de 2PN2PC de $5 \pm 4,09$, mientras que el grupo 3 B consiguió tan solo $2 \pm 1,11$. Por último, en el nº medio de embriones transferidos también se obtuvieron diferencias significativas al obtenerse un $2 \pm 0,32$ embriones transferidos en el grupo 3 A y $2 \pm 0,49$ en el grupo 3 B (*tabla 10*).

Tabla 10. Comparación de la media de edades, número de ovocitos, número de ovocitos en metafase II, número de ovocitos fecundados y del número de sacos entre el grupo de pacientes que tuvo unos ratios de $P_4/MII < 0,32$ ng/ml y el grupo que tuvo una $P_4/MII \geq 0,32$ ng/ml. En esta tabla se puede observar la media \pm la desviación típica de cada una de las variables, y el resultado del T-student, donde NS = no significativo y $p < 0,05$ = valor significativo.

	Grupo de estudio 3		P valor
	Grupo 3 A	Grupo 3 B	
Edad	36,08 \pm 3,30	36,68 \pm 2,70	NS
Nº Ovocitos	12 \pm 6,78	5 \pm 2,73	P < 0,05
Nº Metafases II	9 \pm 5,35	3 \pm 1,45	P < 0,05
Nº 2PN2CP	5 \pm 4,09	2 \pm 1,11	P < 0,05
Nº embriones transferidos	2 \pm 0,32	2 \pm 0,49	P < 0,05
Nº Sacos	1 \pm 0,45	2 \pm 0,58	NS

Tras este primer examen, se estudió si también se encontraban valores significativos entre la calidad embrionaria de ambos grupos. Sin embargo, en este caso, tanto en los embriones de buena calidad del grupo 3 A (57,1 %) y grupo 3 B (42,5 %), como los de mala calidad para el grupo 3 A (19,2 %) y para el grupo 3 B (25,0 %), al igual que para los embriones de calidad mixta para el grupo 3A (23,8 %) y para el grupo 3 B (32,5 %), no se obtuvo ninguna diferencia significativa al compararse ambos grupos (*tabla 11*).

Tabla 11. En esta tabla se muestra el % de embriones de diferente calidad transferidos de ambos grupos. Los embriones fueron clasificados en uno u otro rango de calidad a partir de los rasgos morfológicos que se analizaron en D + 2 y D + 3. En el resultado del chi-cuadrado, NS = no significativo.

	Grupo del estudio 3		P valor
	Grupo 3 A	Grupo 3 B	
Buena calidad	116 (57,1 %)	17 (42,5 %)	NS
Mala calidad	39 (19,2 %)	10 (25,0 %)	NS
Calidad mixta	48 (23,8 %)	13 (32,5 %)	NS

Al igual que en los dos primeros estudios, también se examinó las tasas de fecundación para el grupo 3 A (60,7 %) y el grupo 3 B (63,4 %) y las tasas de transferencia (91,9 %) para el grupo 3 A y (85,1 %) para el grupo 3 B, pero en ninguna de estas dos tasas se observaron diferencias significativas. No obstante, en las tasas de implantación para el grupo 3 A (21,6 %) y el grupo 3 B (7,7 %) si se encontraron diferencias significativas (*tabla 12*).

Tabla 12. Tasas de fecundación, transferencia e implantación junto a su chi-cuadrado, donde NS = no significativo y $p < 0,05$ = valor significativo.

	Grupo del estudio 3		P valor
	Grupo 3 A	Grupo 3 B	
Tasa de fecundación	2000 (60,7 %)	78 (63,4 %)	NS
Tasa de Transferencia	203 (91,9 %)	40 (85,1 %)	NS
Tasa de Implantación	83 (21,6 %)	5 (7,7 %)	$p < 0,05$

Por último, el ratio P_4/MII que se asignó parece no tener ningún efecto sobre la tasa de aborto entre el grupo 3 A (10,8 %) y 3 B (0,0 %). En cambio, si se observan diferencias significativas entre ambos grupos cuando estudiamos las tasas de embarazo (32,0 %) para el grupo 3 A (7,5 %) y para el grupo 3 B (*tabla 13*).

Tabla 13. Tasas de embarazos y abortos junto con el chi-cuadrado, donde NS = no significativo y $p < 0,05$ = valor significativo.

	Grupo de estudio 3		P valor
	Grupo 3 A	Grupo 3 B	
Tasa de embarazo	65 (32,0 %)	3 (7,5 %)	$p < 0,05$
Tasa de aborto	7 (10,8 %)	0 (0,0 %)	NS

V. DISCUSIÓN

La finalidad de las TRA es llevarse un niño sano a casa, lo cual depende en gran medida de la calidad de los gametos y embriones así como del desarrollo endometrial (Cakmak and Taylor, 2011; Labarta et al., 2011; Van Vaerenbergh et al., 2011), de tal manera que para mejorar los resultados de estas técnicas es muy importante valorar las variables que se encuentran relacionadas con estos factores, siendo uno de estos parámetros los niveles de P_4 en sangre.

Desde el primer caso en 1990 en el que se observó la relación que existía entre los niveles elevados de P_4 y la luteinización prematura (Edelstein et al., 1990) y debido al uso cada vez más extendido de las TRA, ha aumentado el número de investigaciones enfocadas en estudiar la posible influencia de los niveles supra-fisiológicos de la P_4 el día de la administración de la hCG sobre los resultados de estas técnicas. El problema, es que existe una gran disparidad entre los resultados, mientras que algunos trabajos (Bosch et al., 2010; Bu et al., 2014; Elgindy, 2011; Haouzi et al., 2014; Hill et al., 2015; Huang et al., 2015; Mascarenhas et al., 2015; Ou et al., 2008; Xu et al., 2012; Yang et al., 2015) obtienen diferencias significativas en las tasas de embarazo, en aquellas pacientes en las que se encuentran elevados los niveles de P_4 , en otros, al igual que en nuestro caso, no se observa tal diferencia (Acet et al., 2015; Cai et al., 2014; Corti et al., 2013; Lin et al., 2015; Martinez et al., 2016; Tsai et al., 2015). Estas desigualdades podrían deberse tanto por causas estadísticas, como por el uso de diferentes inmunoensayos o por las diferentes poblaciones de estudio.

El éxito en las tasas de embarazo depende de múltiples factores además de la P_4 , como son la edad de la mujer, los niveles de E_2 , el número de embriones de buena calidad, el número de embriones que se transfirieron, o el IMC entre otros (Tsai et al., 2015), por lo que parece razonable admitir que en el análisis estadístico se debería de calcular los cambios que producen estas variables en el efecto que tienen los elevados niveles de P_4 sobre el éxito en las tasas de embarazo (Venetis et al., 2015). Hasta la fecha, el número de artículos que utiliza este tipo de análisis es escaso (Griesinger et al., 2013; Huang et al., 2015; Tsai et al., 2015; Venetis et al., 2015) y al igual que en este estudio, el resto de trabajos analizan el efecto que tiene la P_4 sin ninguna corrección, por lo que según Venetis *et al.* (Venetis et al., 2015) esta es una razón por la que estos trabajos no consiguen observar el efecto

perjudicial de los niveles supra-fisiológicos de la P₄ en las técnicas de fecundación *in vitro*.

En segundo lugar, las discrepancias observadas también podrían deberse al inmunoensayo empleado, ya que existen muchos modelos en el mercado con diferente sensibilidad y diferente variación intraserie e interserie, lo que justifica que los resultados entre laboratorios varíen ligeramente. Un ejemplo es el punto de corte utilizado en este trabajo, 1,5 ng/ml, el cual parece ser el punto de corte más apropiado para definir los efectos nocivos de la P₄ sobre las tasas de embarazo en aquellos laboratorios en los que se ha utilizado Axsym System (Axsym System[®], Abbott Científica S.A., Madrid, España) (Bosch et al., 2010), sin embargo, en este estudio que se ha utilizado Advia Centaur (ADVIA Centaur[®], Siemens, Madrid, España) no se ha encontrado ninguna diferencia significativa. Esta podría ser otra razón a considerar en aquellos artículos, que como en este trabajo, no han conseguido diferencias significativas. Además, al elegir un inmunoensayo es necesario que este tenga una alta sensibilidad y una baja variación tanto intraserie como interserie (Patton et al., 2014), al igual que el utilizado en este estudio.

Por último, una de las posibles razones por las que actualmente existe tanta discrepancia entre los resultados de las diferentes publicaciones podría ser la diferencia en el tamaño de la población de estos trabajos. Posiblemente, este sea el motivo por el que aunque recientes meta-análisis encuentran diferencias significativas en sus estudios (Bosch et al., 2010; Venetis et al., 2015), en la URA, al tener un menor volumen de muestra, no se pueden apreciar. Además, la causa de la esterilidad y la respuesta a la EOC también influyen en la concentración hormonal final y en las expectativas de éxito de las técnicas de fecundación *in vitro* por lo que en futuros trabajos deberían de tenerse en cuenta.

Por otra parte, es bien conocido que tanto la maduración folicular como la receptividad endometrial se encuentran determinadas por la interacción entre el E₂ y la P₄ (Anifandis et al., 2005), por este motivo, en un segundo estudio se analizó a la población según la relación P₄/E₂. Uno de los primeros autores en establecer un punto de corte para este ratio fue Younis *et al.* (Younis et al., 2001), el cual asignó el valor de 1 ng/ml para definir la luteinización prematura, ya que asegura que este

valor puede diferenciar la secreción fisiológica de la P_4 por parte de los ovocitos maduros de aquella secreción que procede de folículos inmaduros, es por esta razón, por la que, al igual que la mayoría de estudios, en este trabajo se decidió utilizar este punto de corte.

En este segundo estudio, el grupo con mayores niveles de P_4/E_2 , tuvo un número significativamente más bajo de ovocitos maduros, esto podría ser debido a que la luteinización prematura suele ser más frecuente en mujeres bajas respondedoras (Younis et al., 2001), las cuales se caracterizan por tener un reducido número de folículos maduros, y por ser las pacientes a las que se suministra mayores dosis de gonadotropinas con el fin de aumentar el número de folículos reclutados, lo cual tendrá como consecuencia un incremento de los niveles de P_4 (Al-Azemi et al., 2012; Fleming and Jenkins, 2010). Además, el E_2 entre otras funciones, ayuda a que se produzca la maduración citoplasmática al incrementar la concentración intracitoplasmática de calcio (Tesarik and Mendoza, 1995), por lo que parece claro que estas pacientes, que tienen menores cantidades de E_2 el día de la administración de la hCG, asimismo tengan un número menor de ovocitos maduros.

En cuanto a la tasa de ovocitos fecundados, los resultados de este estudio coinciden con los resultados obtenidos por Elgindy *et al.* (Elgindy, 2011), lo cual podría ser consecuencia del menor número de ovocitos maduros que poseían (Mittal et al., 2014). Además, debido a este menor número de ovocitos fecundados también se obtuvo una menor tasa de fecundación y transferencia, resultados que coinciden con el grupo de Ou *et al.* (Ou et al., 2008). Por otra parte, esta menor tasa de fecundación y transferencia podrían ser debidas a una peor calidad ovocitaria como consecuencia de la alta estimulación que tuvieron, lo que secundariamente se tradujo en una peor calidad embrionaria y por último, en un número reducido de embriones que se pudiesen transferir.

En este estudio, al igual que en el anterior, tampoco se observó diferencias significativas en las tasas de embarazo, lo que reafirmaría la hipótesis de algunos artículos que afirman que este ratio no predice del todo los efectos negativos de la P_4 y que por tanto no debería usarse (Kyrou et al., 2012; Lin et al., 2015; Roque et

al., 2015). No obstante, otra razón puede ser que en este trabajo no se ha podido utilizar el punto de corte que correspondería a esta unidad, debido a que el tamaño de la población de estudio era pequeño y por tanto, se tuvo que emplear el más utilizado por la bibliografía. Es por este motivo, por lo que los mismos artículos que afirman que este no es un indicador del todo fiable, proponen un mejor ratio para predecir los efectos de la P_4 en las TRA, el ratio P_4/MII , el cual afirman que además de ser mucho mejor predictor, también consigue agrupar a la población en base a su respuesta ovárica (Kyrou et al., 2012; Lin et al., 2015; Roque et al., 2015).

Al analizar los resultados obtenidos en el ratio P_4/MII , este trabajo coincidió con Roque *et al.* (Roque et al., 2015) al encontrar diferencias significativas tanto para el número de ovocitos puncionados, maduros y fecundados como para el número de embriones transferidos, siendo los resultados mucho menores en el grupo de mayores niveles de P_4/MII . Estos resultados son lógicos, ya que al utilizar un ratio como el de P_4/MII se estará diferenciando a las pacientes por su reserva ovárica y solo aquellos casos en los que existan ovocitos maduros podrán ser fertilizados y transferidos. Además, tal y como asegura Huang *et al.* (Huang et al., 2015) los niveles supra-fisiológicos de la P_4 se encuentran relacionados con ovocitos de peor calidad, por lo que estas pacientes además de obtener un menor número de ovocitos debido a su reserva ovárica, también serán las que obtengan los ovocitos de peor calidad.

La P_4 es la hormona clave en la transformación de un endometrio proliferativo a un endometrio secretor en el que el embrión pueda implantar, sin embargo, en aquellos casos en los que la P_4 excede sus niveles fisiológicos este cambio se producirá de manera prematura, lo que conducirá a que la ventana de implantación se abra antes de que el embrión esté listo para implantar. Esta posible alteración de la ventana de implantación junto a la peor calidad que tendrán estos embriones puede ser el motivo por el que en este trabajo, al igual que en los trabajos de Aflatoonian *et al.* y Roque *et al.* (Aflatoonian et al., 2014; Roque et al., 2015), se encuentre menores tasas de implantación y embarazo. Por último, cabe destacar, que este es el único de los tres estudios en el que sí se ha observado diferencias significativas en las tasas de embarazo, por lo que parece reafirmar la hipótesis de que esta relación es más eficiente que la P_4 sola o el ratio de P_4/E_2 para

pronosticar los efectos de la P₄ sobre las tasas de éxito en las técnicas de fecundación *in vitro* (Kyrou et al., 2012; Lin et al., 2015; Roque et al., 2015).

VI.CONCLUSIÓN

1. En el día de la administración de la gonadotropina coriónica humana, los niveles de progesterona, por si solos, no se encuentran relacionados con las tasas de éxito en las técnicas de fecundación *in vitro* de la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.
2. La relación progesterona/estradiol, aunque analiza más eficazmente a la población que los niveles de progesterona por si solos, sigue sin ser un parámetro efectivo para predecir los efectos de la progesterona sobre el éxito de las técnicas de fecundación *in vitro* del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.
3. La relación progesterona/ovocitos en metafase II es el mejor indicador para predecir los efectos de la progesterona sobre el éxito de las técnicas de fecundación *in vitro* del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.
4. Sería recomendable volver a valorar la situación cuando se disponga de una población de estudio mayor, de este modo, se podría calcular los puntos de corte más adecuados para la unidad. Además, también sería conveniente tener en cuenta otros parámetros, como es el caso de la respuesta a la estimulación ovárica controlada.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acet, M., Aktün, L.H., Başaranoğlu, S., Yorgunlar, B., Acet, T., Deregözü, A., 2015. Premature Progesterone Elevation Does Not Affect Pregnancy Outcome in High-Responder Patients Undergoing Short-Interval Coasting in IVF Cycles. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 21, 247–252.
- Aflatoonian, A., Davar, R., Hojjat, F., 2014. Elevated serum progesterone/MII oocyte ratio on the day of human chorionic gonadotropin administration can predict impaired endometrial receptivity. *Iran. J. Reprod. Med.* 12, 427–434.
- Al-Azemi, M., Kyrou, D., Kolibianakis, E.M., Humaidan, P., Van Vaerenbergh, I., Devroey, P., Fatemi, H.M., 2012. Elevated progesterone during ovarian stimulation for IVF. *Reprod. Biomed. Online* 24, 381–388.
- Andersen, C.Y., Ezcurra, D., 2014. Human steroidogenesis: implications for controlled ovarian stimulation with exogenous gonadotropins. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 12, 128.
- Anifandis, G., Koutselini, E., Louridas, K., Liakopoulos, V., Leivaditis, K., Mantzavinos, T., Sioutopoulou, D., Vamvakopoulos, N., 2005. Estradiol and leptin as conditional prognostic IVF markers. *Reprod. Camb. Engl.* 129, 531–534.
- Arroyo, G., Busquets, A., Calderón, G., Cuadros J., Cuadros, M., Cuevas, I., De los Santos, M.J., Figueroa, M.J., González, B., Hurtado de Mendoza, M.V., Moragas, M., Mugica, A., Pons, M.C., Prados, F., Rives, N., Ten, J., Torelló, M.J., Vilches M. A., 2015. *Criterios ASEBIR de valoración morfológica de Oocitos, Embriones tempranos y Blastocistos Humanos.*, 3^a ed. Góballo, Agencia Creativa Digital., Madrid, España. 54.

- Barri, P., 2005. [Indications and results of oocyte donation in Spain]. *J. Gynecologie Obstétrique Biol. Reprod.* 34, 5S45–45S47.
- Benjamin C., 2007. *Human Physiology: An Integrated Approach*, 4^a ed. Editorial Médica panamericana. 870, 872.
- Bosch, E., Labarta, E., Crespo, J., Simón, C., Remohí, J., Jenkins, J., Pellicer, A., 2010. Circulating progesterone levels and ongoing pregnancy rates in controlled ovarian stimulation cycles for in vitro fertilization: analysis of over 4000 cycles. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 25, 2092–2100.
- Bourgain, C., Devroey, P., 2003. The endometrium in stimulated cycles for IVF. *Hum. Reprod. Update* 9, 515–522.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1976. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science* 191, 150–154.
- Bu, Z., Zhao, F., Wang, K., Guo, Y., Su, Y., Zhai, J., Sun, Y., 2014. Serum progesterone elevation adversely affects cumulative live birth rate in different ovarian responders during in vitro fertilization and embryo transfer: a large retrospective study. *PloS One* 9, e100011.
- Cahill, D.J., Wardle, P.G., 2002. Management of infertility. *BMJ* 325, 28–32.
- Cai, Q., Wan, F., Appleby, D., Hu, L., Zhang, H., 2014. Quality of embryos transferred and progesterone levels are the most important predictors of live birth after fresh embryo transfer: a retrospective cohort study. *J. Assist. Reprod. Genet.* 31, 185–194.

- Cakmak, H., Taylor, H.S., 2011. Implantation failure: molecular mechanisms and clinical treatment. *Hum. Reprod. Update* 17, 242–253.
- Chen, Q., Zhang, Y., Elad, D., Jaffa, A.J., Cao, Y., Ye, X., Duan, E., 2013. Navigating the site for embryo implantation: biomechanical and molecular regulation of intrauterine embryo distribution. *Mol. Aspects Med.* 34, 1024–1042.
- Cicek, M.N., Kahyaoglu, I., Kahyaoglu, S., 2015. The comparison of microdose flare-up and multiple dose antagonist protocols based on hCG day estradiol (E2), progesterone (P) and P/E2 ratio among poor responder patients in ICSI-ET cycles. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 19, 539–544.
- Corti, L., Papaleo, E., Pagliardini, L., Rabellotti, E., Molgora, M., La Marca, A., Viganò, P., Candiani, M., 2013. Fresh blastocyst transfer as a clinical approach to overcome the detrimental effect of progesterone elevation at hCG triggering: a strategy in the context of the Italian law. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 171, 73–77.
- Coticchio, G., Dal Canto, M., Mignini Renzini, M., Guglielmo, M.C., Brambillasca, F., Turchi, D., Novara, P.V., Fadini, R., 2015. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Hum. Reprod. Update* 21, 427–454.
- Edelstein, M.C., Seltman, H.J., Cox, B.J., Robinson, S.M., Shaw, R.A., Muasher, S.J., 1990. Progesterone levels on the day of human chorionic gonadotropin administration in cycles with gonadotropin-releasing hormone agonist suppression are not predictive of pregnancy outcome. *Fertil. Steril.* 54, 853–857.

- Elgindy, E.A., 2011. Progesterone level and progesterone/estradiol ratio on the day of hCG administration: detrimental cutoff levels and new treatment strategy. *Fertil. Steril.* 95, 1639–1644.
- Filant, J., Spencer, T.E., 2014. Uterine glands: biological roles in conceptus implantation, uterine receptivity and decidualization. *Int. J. Dev. Biol.* 58, 107–116.
- Filicori, M., Cognigni, G.E., Gamberini, E., Parmegiani, L., Troilo, E., Roset, B., 2005. Efficacy of low-dose human chorionic gonadotropin alone to complete controlled ovarian stimulation. *Fertil. Steril.* 84, 394–401.
- Fleming, R., Jenkins, J., 2010. The source and implications of progesterone rise during the follicular phase of assisted reproduction cycles. *Reprod. Biomed. Online* 21, 446–449.
- Gellersen, B., Fernandes, M.S., Brosens, J.J., 2009. Non-genomic progesterone actions in female reproduction. *Hum. Reprod. Update* 15, 119–138.
- Gianaroli, L., Magli, M.C., Ferraretti, A.P., Fortini, D., Grieco, N., 2003. Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertil. Steril.* 80, 341–349.
- Givens, C.R., Schriock, E.D., Dandekar, P.V., Martin, M.C., 1994. Elevated serum progesterone levels on the day of human chorionic gonadotropin administration do not predict outcome in assisted reproduction cycles. *Fertil. Steril.* 62, 1011–1017.

- Graham, J.D., Clarke, C.L., 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.* 18, 502–519.
- Griesinger, G., Mannaerts, B., Andersen, C.Y., Witjes, H., Kolibianakis, E.M., Gordon, K., 2013. Progesterone elevation does not compromise pregnancy rates in high responders: a pooled analysis of in vitro fertilization patients treated with recombinant follicle-stimulating hormone/gonadotropin-releasing hormone antagonist in six trials. *Fertil. Steril.* 100, 1622–1628.e1–3.
- Halasz, M., Szekeres-Bartho, J., 2013. The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion. *J. Reprod. Immunol.* 97, 43–50.
- Haouzi, D., Bissonnette, L., Gala, A., Assou, S., Entezami, F., Perrochia, H., Dechaud, H., Hugues, J.-N., Hamamah, S., 2014. Endometrial receptivity profile in patients with premature progesterone elevation on the day of HCG administration. *BioMed Res. Int.* 2014, 951937.
- Hess, A.P., Hamilton, A.E., Talbi, S., Dosiou, C., Nyegaard, M., Nayak, N., Genbecev-Krtolica, O., Mavrogianis, P., Ferrer, K., Kruessel, J., Fazleabas, A.T., Fisher, S.J., Giudice, L.C., 2007. Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. *Biol. Reprod.* 76, 102–117.
- Hill, M.J., Royster, G.D., Healy, M.W., Richter, K.S., Levy, G., DeCherney, A.H., Levens, E.D., Suthar, G., Widra, E., Levy, M.J., 2015. Are good patient and embryo characteristics protective against the negative effect of elevated progesterone level on the day of oocyte maturation? *Fertil. Steril.* 103, 1477–1484.e1–5.

- Huang, B., Ren, X., Wu, L., Zhu, L., Xu, B., Li, Y., Ai, J., Jin, L., 2016. Elevated Progesterone Levels on the Day of Oocyte Maturation May Affect Top Quality Embryo IVF Cycles. *PloS One* 11, e0145895.
- Huang, Y., Wang, E.Y., Du, Q.Y., Xiong, Y.J., Guo, X.Y., Yu, Y.P., Sun, Y.P., 2015. Progesterone elevation on the day of human chorionic gonadotropin administration adversely affects the outcome of IVF with transferred embryos at different developmental stages. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 13, 82.
- Hugues, J.N., Massé-Laroche, E., Reboul-Marty, J., Boïko, O., Meynant, C., Cédric-Durnerin, I., 2011. Impact of endogenous luteinizing hormone serum levels on progesterone elevation on the day of human chorionic gonadotropin administration. *Fertil. Steril.* 96, 600–604.
- Keith, L., Persaud, T.V.N., Torchia, M., 2013. *Embriología clínica.*, 9^a ed. ELSEVIER, Madrid, España. 263.
- Khairy, M., Clough, A., El-Toukhy, T., Coomarasamy, A., Khalaf, Y., 2008. Antral follicle count at down-regulation and prediction of poor ovarian response. *Reprod. Biomed. Online* 17, 508–514.
- Knöfler, M., 2010. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 269–280.
- Kolibianakis, E.M., Albano, C., Camus, M., Tournaye, H., Van Steirteghem, A.C., Devroey, P., 2004. Prolongation of the follicular phase in in vitro fertilization results in a lower ongoing pregnancy rate in cycles stimulated with recombinant follicle-stimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Fertil. Steril.* 82, 102–107.

- Kurihara, I., Lee, D.K., Petit, F.G., Jeong, J., Lee, K., Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Tsai, M.J., Tsai, S.Y., 2007. COUP-TFII mediates progesterone regulation of uterine implantation by controlling ER activity. *PLoS Genet.* 3, e102.
- Kyrou, D., Al-Azemi, M., Papanikolaou, E.G., Donoso, P., Tziomalos, K., Devroey, P., Fatemi, H.M., 2012. The relationship of premature progesterone rise with serum estradiol levels and number of follicles in GnRH antagonist/recombinant FSH-stimulated cycles. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 162, 165–168.
- Labarta, E., Martínez-Conejero, J.A., Alamá, P., Horcajadas, J.A., Pellicer, A., Simón, C., Bosch, E., 2011. Endometrial receptivity is affected in women with high circulating progesterone levels at the end of the follicular phase: a functional genomics analysis. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 26, 1813–1825.
- Lee, K.Y., Jeong, J.-W., Wang, J., Ma, L., Martin, J.F., Tsai, S.Y., Lydon, J.P., DeMayo, F.J., 2007. Bmp2 is critical for the murine uterine decidual response. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5468–5478.
- Lessey, B.A., Killam, A.P., Metzger, D.A., Haney, A.F., Greene, G.L., McCarty, K.S., 1988. Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67, 334–340.
- Levin, E.R., 2011. Minireview: Extranuclear Steroid Receptors: Roles in Modulation of Cell Functions. *Mol. Endocrinol.* 25, 377–384.

- Lin, Y.J., Lan, K.C., Huang, F.J., Lin, P.Y., Chiang, H.J., Kung, F.T., 2015. Reproducibility and clinical significance of pre-ovulatory serum progesterone level and progesterone/estradiol ratio on the day of human chorionic gonadotropin administration in infertile women undergoing repeated in vitro fertilization cycles. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 13, 41.
- Li, R., Qiao, J., Wang, L., Li, L., Zhen, X., Liu, P., Zheng, X., 2011. MicroRNA array and microarray evaluation of endometrial receptivity in patients with high serum progesterone levels on the day of hCG administration. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 9, 29.
- Li, R.R., Dong, Y.Z., Guo, Y.H., Sun, Y.P., Su, Y.C., Chen, F., 2013. Comparative study of pregnancy outcomes between day 3 embryo transfer and day 5 blastocyst transfer in patients with progesterone elevation. *J. Int. Med. Res.* 41, 1318–1325.
- Li, X., O'Malley, B.W., 2003. Unfolding the action of progesterone receptors. *J. Biol. Chem.* 278, 39261–39264.
- Lonard, D.M., Lanz, R.B., O'Malley, B.W., 2007. Nuclear receptor coregulators and human disease. *Endocr. Rev.* 28, 575–587.
- Lonergan, P., 2011. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology* 76, 1594–1601.
- Margarit, L., Taylor, A., Roberts, M.H., Hopkins, L., Davies, C., Brenton, A.G., Conlan, R.S., Bunkheila, A., Joels, L., White, J.O., Gonzalez, D., 2010. MUC1 as a discriminator between endometrium from fertile and infertile patients with PCOS and endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 5320–5329.

- Martinez, F., Rodriguez, I., Devesa, M., Buxaderas, R., Gómez, M.J., Coroleu, B., 2016. Should progesterone on the human chorionic gonadotropin day still be measured? *Fertil. Steril.* 105, 86–92.
- Mascarenhas, M., Kamath, M.S., Chandy, A., Kunjummen, A.T., 2015. Progesterone/Estradiol Ratio as a Predictor in the ART Cycles with Premature Progesterone Elevation on the Day of hCG Trigger. *J. Reprod. Infertil.* 16, 155–161.
- Mittal, S., Gupta, P., Malhotra, N., Singh, N., 2014. Serum Estradiol as a Predictor of Success of In Vitro Fertilization. *J. Obstet. Gynaecol. India* 64, 124–129.
- Navarro, I., Quintero, L.A., Jimenez-Moreno, V., Monzo, A., Santana, A.G., Montañana, V., Romeu, A., 2001. Comparación del porcentaje de fecundación y la calidad embrionaria tras la realización de FIV e ICSI en un mismo ciclo de tratamiento: estudio preliminar. 2, 18, 75–79.
- Nielsen, M.E., Rasmussen, I.A., Kristensen, S.G., Christensen, S.T., Møllgård, K., Wreford Andersen, E., Byskov, A.G., Yding Andersen, C., 2011. In human granulosa cells from small antral follicles, androgen receptor mRNA and androgen levels in follicular fluid correlate with FSH receptor mRNA. *Mol. Hum. Reprod.* 17, 63–70.
- Nikas, G., Makrigiannakis, A., 2003. Endometrial pinopodes and uterine receptivity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 997, 120–123.
- Ou, Y.C., Lan, K.C., Chang, S.Y., Kung, F.T., Huang, F.J., 2008. Increased progesterone/estradiol ratio on the day of HCG administration adversely affects success of in vitro fertilization-embryo transfer in patients stimulated

with gonadotropin-releasing hormone agonist and recombinant follicle-stimulating hormone. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 47, 168–174.

- Pandian, Z., Marjoribanks, J., Ozturk, O., Serour, G., Bhattacharya, S., 2013. Number of embryos for transfer following in vitro fertilisation or intra-cytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst. Rev.* 7, CD003416.
- Papanikolaou, E.G., Kolibianakis, E.M., Pozzobon, C., Tank, P., Tournaye, H., Bourgain, C., Van Steirteghem, A., Devroey, P., 2009. Progesterone rise on the day of human chorionic gonadotropin administration impairs pregnancy outcome in day 3 single-embryo transfer, while has no effect on day 5 single blastocyst transfer. *Fertil. Steril.* 91, 949–952.
- Par, G., Geli, J., Kozma, N., Varga, P., Szekeres-Bartho, J., 2003. Progesterone regulates IL12 expression in pregnancy lymphocytes by inhibiting phospholipase A2. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 49, 1–5.
- Patton, P.E., Lim, J.Y., Hickok, L.R., Kettel, L.M., Larson, J.M., Pau, K.Y.F., 2014. Precision of progesterone measurements with the use of automated immunoassay analyzers and the impact on clinical decisions for in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 101, 1629–1636.
- Peluso, J.J., 2013. Progesterone receptor membrane component 1 and its role in ovarian follicle growth. *Front. Neurosci.* 7, 99.
- Perez, P., Gutierrez, G., Perez, L., Rojas, R., 2010. Estimulación ovárica controlada. Tiempo de reevaluar. *Rev Mex Med Repro.* 3, 1–9.

- Pollheimer, J., Loregger, T., Sonderegger, S., Saleh, L., Bauer, S., Bilban, M., Czerwenka, K., Husslein, P., Knöfler, M., 2006. Activation of the canonical wingless/T-cell factor signaling pathway promotes invasive differentiation of human trophoblast. *Am. J. Pathol.* 168, 1134–1147.
- Ralph, C., Lehman, M., Goodman, R.L., Tilbrook, A., 2016. Impact of psychosocial stress on gonadotropins and sexual behaviour in females: role for cortisol? *Reprod. Camb. Engl.* 1741–7899.
- Roque, M., Valle, M., Sampaio, M., Geber, S., Checa, M.A., 2015. Ratio of progesterone-to-number of follicles as a prognostic tool for in vitro fertilization cycles. *J. Assist. Reprod. Genet.* 32, 951–957.
- Salamonsen, L.A., Nie, G., Hannan, N.J., Dimitriadis, E., 2009. Society for Reproductive Biology Founders' Lecture 2009. Preparing fertile soil: the importance of endometrial receptivity. *Reprod. Fertil. Dev.* 21, 923–934.
- SEGO Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, S.S.E. de G. y O., 2003. *Tratado de Ginecología, Obstetricia y Medicina de la Reproducción.*, 2^a ed. Editorial médica panamericana, Madrid, España. 78-79, 88.
- Spencer, T.E., Johnson, G.A., Burghardt, R.C., Bazer, F.W., 2004. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biol. Reprod.* 71, 2–10.
- Staun-Ram, E., Shalev, E., 2005. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 3, 56.

- Takamoto, N., Zhao, B., Tsai, S.Y., DeMayo, F.J., 2002. Identification of Indian hedgehog as a progesterone-responsive gene in the murine uterus. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 16, 2338–2348.
- Takano, M., Lu, Z., Goto, T., Fusi, L., Higham, J., Francis, J., Withey, A., Hardt, J., Cloke, B., Stavropoulou, A.V., Ishihara, O., Lam, E.W.-F., Unterman, T.G., Brosens, J.J., Kim, J.J., 2007. Transcriptional cross talk between the forkhead transcription factor forkhead box O1A and the progesterone receptor coordinates cell cycle regulation and differentiation in human endometrial stromal cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 21, 2334–2349.
- Taraborrelli, S., 2015. Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 94 Suppl 161, 8–16.
- Tesarik, J., Mendoza, C., 1995. Nongenomic effects of 17 beta-estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 1438–1443.
- Thomas, M.R., Sparks, A.E., Ryan, G.L., Van Voorhis, B.J., 2010. Clinical predictors of human blastocyst formation and pregnancy after extended embryo culture and transfer. *Fertil. Steril.* 94, 543–548.
- Tsai, Y.R., Huang, F.J., Lin, P.Y., Kung, F.T., Lin, Y.J., Lin, Y.C., Lan, K.C., 2015. Progesterone elevation on the day of human chorionic gonadotropin administration is not the only factor determining outcomes of in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 103, 106–111.
- Sadler, T.W., 2012. *Embriología médica.*, 12^a ed. Lippincott Williams & Wilkins, Madrid, España. 39- 40.

- Ubaldi, F., Camus, M., Smitz, J., Bennink, H.C., Van Steirteghem, A., Devroey, P., 1996. Premature luteinization in in vitro fertilization cycles using gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH-a) and recombinant follicle-stimulating hormone (FSH) and GnRH-a and urinary FSH. *Fertil. Steril.* 66, 275–280.
- Van Vaerenbergh, I., Fatemi, H.M., Blockeel, C., Van Lommel, L., In't Veld, P., Schuit, F., Kolibianakis, E.M., Devroey, P., Bourgain, C., 2011. Progesterone rise on HCG day in GnRH antagonist/rFSH stimulated cycles affects endometrial gene expression. *Reprod. Biomed. Online* 22, 263–271.
- Veeck, L., 1992. Evaluación de ovocitos y preembriones en el laboratorio FIV. En : Remohi J, Pellicer A, BonillaMusoles F. Ediciones Díaz de Santos S.A, Madrid, España. 117-162.
- Venetis, C.A., Kolibianakis, E.M., Bosdou, J.K., Lainas, G.T., Sfontouris, I.A., Tarlatzis, B.C., Lainas, T.G., 2015. Estimating the net effect of progesterone elevation on the day of hCG on live birth rates after IVF: a cohort analysis of 3296 IVF cycles. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 30, 684–691.
- Venetis, C.A., Kolibianakis, E.M., Papanikolaou, E., Bontis, J., Devroey, P., Tarlatzis, B.C., 2007. Is progesterone elevation on the day of human chorionic gonadotrophin administration associated with the probability of pregnancy in in vitro fertilization? A systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* 13, 343–355.
- Wang, W., Li, Q., Bagchi, I.C., Bagchi, M.K., 2010. The CCAAT/enhancer binding protein beta is a critical regulator of steroid-induced mitotic expansion of uterine stromal cells during decidualization. *Endocrinology* 151, 3929–3940.

- Werner, M.D., Forman, E.J., Hong, K.H., Franasiak, J.M., Molinaro, T.A., Scott, R.T., 2014. Defining the “sweet spot” for administered luteinizing hormone-to-follicle-stimulating hormone gonadotropin ratios during ovarian stimulation to protect against a clinically significant late follicular increase in progesterone: an analysis of 10,280 first in vitro fertilization cycles. *Fertil. Steril.* 102, 1312–1317.
- Xu, B., Li, Z., Zhang, H., Jin, L., Li, Y., Ai, J., Zhu, G., 2012. Serum progesterone level effects on the outcome of in vitro fertilization in patients with different ovarian response: an analysis of more than 10,000 cycles. *Fertil. Steril.* 97, 1321–1327.e1–4.
- Yang, S., Pang, T., Li, R., Yang, R., Zhen, X., Chen, X., Wang, H., Ma, C., Liu, P., Qiao, J., 2015. The individualized choice of embryo transfer timing for patients with elevated serum progesterone level on the HCG day in IVF/ICSI cycles: a prospective randomized clinical study. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 31, 355–358.
- Yao, M.W.M., Lim, H., Schust, D.J., Choe, S.E., Farago, A., Ding, Y., Michaud, S., Church, G.M., Maas, R.L., 2003. Gene expression profiling reveals progesterone-mediated cell cycle and immunoregulatory roles of Hoxa-10 in the preimplantation uterus. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 17, 610–627.

- Younis, J.S., Matilsky, M., Radin, O., Ben-Ami, M., 2001. Increased progesterone/estradiol ratio in the late follicular phase could be related to low ovarian reserve in in vitro fertilization-embryo transfer cycles with a long gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertil. Steril.* 76, 294–299.
- Yu Ng, E.H., Yeung, W.S., Yee Lan Lau, E., So, W.W., Ho, P.C., 2000. High serum oestradiol concentrations in fresh IVF cycles do not impair implantation and pregnancy rates in subsequent frozen-thawed embryo transfer cycles. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 15, 250–255.