



¿SE MODIFICA EL PATRÓN HISTOLÓGICO ENDOMETRIAL Y LOS RESULTADOS EN FUNCIÓN DE LA DOSIS Y DE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN DE PROGESTERONA EN CICLOS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES CONGELADOS?

Autores:

Jonay Alejandro Afonso Chávez

Paula Alfonso Izquierdo

Tutora: Delia Rosa Báez Quintana¹

Colaboradoras: Verónica Janet Carballo Lorenzo¹ e Idaira J. Expósito Afonso²

Grado en Medicina

Área de Obstetricia y Ginecología de la Universidad de la Laguna¹

Servicio de Obstetricia y Ginecología¹

Servicio de Anatomía Patológica²

Complejo Hospitalario Universitario de Canarias

Curso 2019-2020

Resumen

Introducción: La vitrificación de embriones es una técnica básica en la reproducción asistida actual. Para su éxito se precisa una preparación endometrial que se consigue con la administración de progesterona. Investigar cuál es la vía y dosis óptimas lleva a lo que se conoce como personalización de la suplementación.

Objetivos: Valorar la influencia del valor de la progesterona y el tipo de fármaco usado en los resultados del programa de TEC. Evaluar la histología endometrial en base a ello.

Material y métodos: Análisis retrospectivo del valor de progesterona en sangre medido el día previo a la transferencia embrionaria con diferentes protocolos de sustitución hormonal, y estudio de las modificaciones histológicas endometriales, según los criterios de Noyes, en función de la dosis y vía de administración de la progesterona.

Resultados: No se observan diferencias significativas en la tasa de implantación, gestación ni aborto respecto al grupo control de los dos grupos analizados, siendo nuestro nivel crítico de progesterona inferior a 10.5 ng/ml. En cuanto a la histología, solo la reacción decidual varía en función del valor de progesterona, siendo mayor en el grupo que asocia los dos tipos de progesterona. 5 pacientes con fallos en la implantación previos consiguen quedarse embarazadas después de realizar el ciclo piloto.

Discusión: Se observa que la TEC aporta a las pacientes una solución efectiva para aumentar su tasa de embarazo, superando los resultados del ciclo en fresco. Nuestro dintel de P₄ está más cerca del 8 que del 10.5 ng/ml como se ha sugerido en estudios recientes. El grupo con P₄ vaginal presenta tasas de embarazo similares a los otros grupos, siendo por ahora la vía de administración más cómoda y fiable. Se consiguen 5 embarazos en pacientes con fallos de implantación previos, sin poder afirmar si fue por aumento de la dosis de P₄ o por el efecto *scratching*.

Conclusiones: La administración desde el inicio de P₄ subcutánea simultáneamente a la vaginal eleva los niveles en sangre de ésta, pero no se observa un aumento de la tasa de embarazo. No podemos concluir que el aumento en la tasa de embarazo de los ciclos transferidos tras la biopsia endometrial no sea debido al efecto *scratching*. Ampliar la población estudiada permitiría conseguir diferencias significativas en los resultados.

Palabras clave: progesterona, transferencia embriones congelados, fecundación in vitro, histología endometrial.

Abstract

Introduction: Embryo vitrification is a basic technique in current assisted reproduction. Its success requires an endometrial preparation that is achieved with the administration of progesterone. Researching which is the most successful way and dose leads to what is known as personalization of supplementation.

Objectives: To assess the influence of the progesterone level, as well as the type of drug used in the results from the frozen embryo transfer program. To study the endometrial histology on this basis.

Material and Methods: Retrospective analysis of the progesterone level in blood measured on the previous day to the blastocyst transfer with different hormone substitution protocols, and study of the endometrial histological modifications according to Noyes criteria and depending on the dose and way of progesterone administration.

Results: No significant differences were observed in the implantation rate, neither pregnancy nor abortion in relation to the control group for the two analyzed groups, being our critical progesterone level inferior to 10,5 ng/ml. With regard to the histology, only the decidual reaction shows variations depending on the progesterone level, being higher in the group which combines the two types of progesterone. 5 patients with previous implantation failures got pregnant after going through the pilot cycle.

Discussion: It has been observed that FET is an effective solution to increase pregnancy rates, overcoming the results obtained from fresh cycles. Our progesterone threshold is closer to 8 than to 10.5 ng/ml, as it has been suggested by recent studies. The group with vaginal progesterone has similar pregnancy rates to the other groups, the former being the most comfortable and reliable way of administration. Five patients with previous implantation failures got pregnant, but it was not possible to state if this was due to the increasing progesterone dose or to the scratching effect.

Conclusions: It can be observed that an initial administration of subcutaneous progesterone simultaneously to vaginal increases progesterone levels in blood, but not the pregnancy rate. We cannot conclude that increased pregnancy rate from the transferred cycles after the

endometrial biopsy is not due to the scratching effect. Expanding the studied population would allow significant differences in the results.

Key words: progesterone, frozen embryo transfer, in vitro fertilization, endometrial histology.

Lista de abreviaturas

TRA: Técnicas de reproducción asistida

TEC: Transferencia de embriones congelados

FIV: Fecundación in vitro

ICSI: Microinyección intracitoplasmática

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina

GnRH-a: Análogo agonista de la hormona liberadora de gonadotropina

hCG: Gonadotropina coriónica humana

LH: Hormona luteinizante

FSH: Hormona folículo estimulante

P₄: Progesterona

E₂: Estradiol

SHO: Síndrome de hiperestimulación ovárica

ERA: Test genético de receptividad endometrial

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

DMSO: Dimetil sulfóxido

ACP: Agente crioprotector

DGP: Diagnóstico genético preimplantacional

SARA: Sistema de ayuda a la reproducción asistida

SAP: Sistema de aplicaciones y productos

Índice

1. Introducción	9
1.1 Criopreservación en un laboratorio de reproducción asistida	9
1.2 Implantación y receptividad endometrial	12
1.3 Ciclo sustitutivo para la transferencia embrionaria y valor de la progesterona	13
1.4 Características histológicas del ciclo endometrial	14
1.4.1 Fase proliferativa	15
1.4.2 Fase secretora	16
1.5 Ciclo piloto	17
2. Hipótesis de trabajo y objetivos	18
2.1 Objetivo principal	18
2.2 Objetivos secundarios	18
3. Material y métodos	19
3.1 Diseño del estudio	19
3.1.1 Valor sérico de Progesterona	19
3.1.1.1 Criterios de inclusión	22
3.1.1.2 Criterios de exclusión	23
3.1.2 Ciclo piloto	23
3.1.2.1 Criterios previstos para la retirada de los sujetos del estudio.	24
3.3 Protocolo de sustitución hormonal	24
3.4 Análisis de datos	26
4. Resultados	28
4.1 Valor sérico de Progesterona	28
4.1.1 Tasa de embarazo	29
4.1.2 Tasa de aborto	30
4.1.3 Valor de progesterona el día previo a la transferencia embrionaria	31
4.1.4 Valor de progesterona en relación con los embarazos	32
4.2 Histología endometrial - ciclo piloto	34
4.2.1 Valor de la progesterona el día previo a la biopsia endometrial	34
4.2.2 Biopsias endometriales	35
4.2.3 Tasa de embarazo y aborto	37
5. Discusión	39
6. Conclusiones	44

6.1 Conclusiones valor sérico de progesterona	44
6.2 Conclusiones histología endometrial - ciclo piloto	44
7. ¿Qué hemos aprendido durante este TFG?	45
8. Bibliografía	46

1. Introducción

Si bien la Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la esterilidad como la “incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales no protegidas” (1), la realidad supera y trasciende esta definición. La asistencia a la salud reproductiva hoy, mediante las TRA, permite la asistencia a mujeres solas y mujeres pareja mujer, la preservación de la fertilidad en pacientes oncológicos, el diagnóstico genético preimplantacional, así como la creación de embriones histocompatibles. Todo esto es posible gracias al desarrollo y mejora de las técnicas, como la fertilización in vitro y la criopreservación.

La prevalencia de la esterilidad en España es de aproximadamente un 14%. Esto supone que 1 de cada 7 parejas en edad reproductiva presentan dificultad para tener descendencia. Las causas de esterilidad se distribuyen de la siguiente forma: un 30% por causa femenina, un 30% por causa masculina, un 25% por causa mixta y un 15% que corresponde a la esterilidad sin causa aparente. (2)

1.1 Criopreservación en un laboratorio de reproducción asistida

La posibilidad de criopreservar gametos, embriones o tejido ovárico ha supuesto un gran avance en las TRA. La criopreservación permite la conservación a largo plazo de células viables y tejidos a muy bajas temperaturas en un estado de animación suspendida (3). Tuvo sus inicios en 1983, cuando Trounson y Mohr publican el primer embarazo a partir de un embrión congelado, hecho que marcó un antes y un después en la historia de la reproducción. En 1984, Zeilmarker y colaboradores consiguieron el primer nacimiento por TEC. Ambos procedimientos utilizaron DMSO como ACP, enfriando a un ritmo aproximado de 0,5 °C/min de -6°C a -75°C, y posterior introducción en nitrógeno líquido a -196°C dando inicio al desarrollo del protocolo de congelación lenta como método de criopreservación de embriones (4).

Desde entonces, las técnicas de criopreservación han mejorado mucho en eficacia y eficiencia. En la última década se ha visto una mejora sustancial con la introducción de la vitrificación, la cual le ha ganado terreno a la congelación lenta por sus mejores resultados. La vitrificación difiere de la congelación lenta en que evita la formación de cristales de hielo

en el espacio intracelular y extracelular, solidificando una solución mediante una elevación extrema de la viscosidad en la que se utilizan altas concentraciones de crioprotector (8 mol/L) y tasas de enfriamiento ultrarrápido (15000-30000°C/min) (5). No precisa equipos costosos ni largos tiempos para su aplicación, mejorando los resultados anteriores en cuanto a la supervivencia de los embriones (6; 7), embarazo clínico (8; 9; 10) y las tasas de nacidos vivos (11).

Los ACP son sustancias de alto o bajo peso molecular que se agregan al medio de congelación con el objetivo de proteger las estructuras biológicas del proceso de congelación y descongelación y proporcionar un ambiente favorable para la supervivencia post-descongelación. Se pueden dividir en dos categorías: crioprotectores penetrantes y no penetrantes (12; 13).

Los ACP difusibles y penetrantes, como el DMSO y el glicerol, pueden atravesar pasivamente las membranas celulares y desplazar el agua contenida en el interior celular. Se ha visto que el DMSO juega un papel importante en la crioprotección de la membrana gracias a las interacciones electrostáticas con los fosfolípidos de membrana (14). Los ACP no penetrantes, como la trehalosa, sacarosa y dextrosa, no son difusibles y permanecen en la solución extracelular sin cruzar la membrana debido a un mayor peso molecular (12).

Masashige Kuwayama, pionero en la criopreservación de embriones y ovocitos, en el 2000, mejoró el método de criopreservación a través del uso del método Cryotop®. Este método requiere únicamente de dos etapas, una en la que se deja al embrión u ovocito en una gota de aproximadamente 50 µl en un medio equilibrado entre 6 y 10 minutos, dependiendo del estado embrionario u ovocitario y una segunda en la que se sumerge en una gota del mismo volumen de medio de vitrificación durante un máximo de 1 minuto, limitando así la toxicidad de los ACP y reduciendo al mínimo el tiempo de exposición a la solución. A continuación, se carga el embrión en microgotas sobre el soporte Cryotop® y se sumerge rápidamente en nitrógeno líquido alcanzando una velocidad de enfriamiento de -43000°C/min; de este modo, la formación de hielo es virtualmente imposible, lo que elimina totalmente el riesgo de fractura de la zona pelúcida (4). El volumen mínimo utilizado para la vitrificación disminuye la probabilidad de nucleación y formación de cristales de hielo, consiguiendo un volumen final de 0,1 µl, siendo 10 veces inferior al que utiliza el resto de los sistemas de vitrificación (15).

El desarrollo de la vitrificación, con sus excelentes tasas de supervivencia, superiores al 97 % (16), ha permitido realizar dos tipos de estrategia de transferencia: una transferencia única de embriones frescos y, en ciclos posteriores, una o más transferencias de embriones congelados-descongelados y la estrategia *freeze-all*, en la que solo se transfieren embriones congelados-descongelados.

La primera facilita varias transferencias con una sola punción. La segunda de las estrategias se realiza principalmente para evitar el SHO o para evitar factores endometriales negativos inherentes a la inducción de la ovulación (17).

Hoy en día, el SHO ha disminuido hasta un 1-3 % (18) gracias al uso de un bolo de agonista de la GnRH-a como fármaco de descarga ovulatoria, es decir, para la maduración final de los ovocitos. Se puede utilizar solamente cuando se usan antagonistas de la GnRH para la supresión hipofisaria. Su aplicación provoca una liberación brusca de FSH y, sobre todo, de LH, capaz de imitar el pico fisiológico e iniciar los últimos estadios madurativos del ovocito previo a la ovulación. Se ha comprobado que este fármaco reduce significativamente el riesgo de SHO, pero hay que diferir la transferencia, ya que se ha demostrado que con él la tasa de implantación (19) y de embarazo (20) decaen significativamente y podría ser debido a la luteólisis previa o a una acción primaria en el endometrio. La estrategia *freeze-all* también se usa en los casos en los que no se obtengan espermatozoides el día de la punción, se detecta un pólipo endometrial o cualquier otro evento negativo intrauterino, se tenga que realizar DGP (18) y, recientemente, se erige como pauta para evitar el efecto deletéreo sobre el endometrio de altos niveles de E₂ o precozmente de P₄ y así poder desvitrificar y transferir en ciclos posteriores (21). El número de ovocitos en los que la estrategia *freeze-all* no presentaría ventajas se ha establecido en menos de 15 ovocitos (22).

Las numerosas ventajas que posee la criopreservación han llevado a que la proporción de ciclos de TEC esté creciendo en Europa. Se estima que los ciclos criopreservados constituyeron el 32% de las transferencias en 2011 en comparación con el 28% en 2010 hasta llegar a un 42% de los ciclos en 2019. Esto es posible ya que hay evidencias que muestran que no existe diferencia en la tasa acumulada de nacidos vivos por mujer en transferencias de embriones en un ciclo en fresco o en congelado (58 % frente a un 56-65%) (23), e incluso otros estudios apuntan a una mejoría significativa en las tasas de nacidos vivos en ciclos con TEC (24; 25). Esta realidad se reproduce también en nuestro medio.

Las políticas de buena praxis apuntan a realizar transferencias de un solo embrión, esto contribuye a aumentar la realización de ciclos con embriones criopreservados (26). Estudios actuales han demostrado que la criopreservación no afecta los resultados en cuanto a tasa de nacido vivo y peso al nacer (27). La transferencia en estadio de blastocisto aumenta la sincronización del endometrio y permite una selección más avanzada de aquellos embriones que son más adecuados para la transferencia, en comparación con embriones en el día tres del desarrollo (28).

Algunos estudios han sugerido que podrían beneficiarse de la vitrificación aquellos embriones que están blastulando y que se congelan en el día 7. Pese a que los embriones que blastulan en el día 5 pueden tener un mayor potencial para la implantación, en aquellos embriones de crecimiento más lento merecería la pena ampliar el cultivo y congelarlo en este estadio para realizar posteriores transferencias, ya que el ciclo de TEC puede evitar a algunas mujeres una estimulación ovárica adicional y un ciclo de FIV (29).

1.2 Implantación y receptividad endometrial

La implantación humana representa uno de los pasos más importantes para el éxito de las TRA (24), ya que aproximadamente 1/3 de los blastocistos transferidos no consiguen implantar. Requiere un diálogo sincrónico entre un embrión de buena calidad y un endometrio receptivo (30). Su eficacia se basa en tres parámetros principales: la calidad del embrión, la receptividad endometrial (ER) y una interacción embrión-endometrio bien equilibrada (24).

Para que ocurra un embarazo, un embrión normal debe implantarse en el endometrio y, para que esto suceda, debe estar en un estado receptivo que se conoce como "ventana de implantación". Es el momento en que el endometrio está más preparado morfológica y funcionalmente para recibir el embrión. Ocurre durante un corto período de tiempo, alrededor de los días 22-24 de un ciclo ideal de 28 días. En las TRA, este proceso está limitado farmacológicamente por una combinación de suplementos de E₂ y P₄, monitorizándose por ultrasonografía del desarrollo del endometrio midiendo su grosor (aunque sigue siendo una cuestión controvertida) y niveles de P₄ en sangre (30).

En los programas de donación de ovocitos en los que se trata de forma farmacológica y controlada el endometrio por sustitución hormonal exógena, consiguen rutinariamente hasta

un 60% de gestaciones. Sin embargo, en FIV en la que la estimulación ovárica multiplica los niveles hormonales y altera la respuesta endometrial, no ha sido posible mejorar las tasas de implantación y embarazo a pesar de transferir tres (y en algunos casos cuatro) embriones de buena calidad en algunos centros de Estados Unidos, siendo el porcentaje de gestaciones por ciclo de 35-40% (31).

La alteración en estos ciclos de los niveles suprafisiológicos de E_2 y P_4 produce cambios endometriales morfológicos y bioquímicos y un endometrio más avanzado que en los ciclos naturales (31). El efecto del nivel elevado de P_4 el día de la descarga ovulatoria en los ciclos de fertilización *in vitro* es controvertido. Algunos estudios apuntan que parece tener un impacto negativo en la implantación y el embarazo al desincronizar el endometrio, mientras que otros no encuentran diferencias significativas (32).

Varios estudios han observado el potencial de la proteómica para caracterizar los patrones de expresión del endometrio. Algunos perfiles de expresión génica han llevado a un análisis diferencial de patrones receptivos y no receptivos en la señalización endometrial. A través del análisis molecular extenso de estos patrones de expresión se desarrolló un ERA (33) como método para identificar de forma precisa y reproducible el estado de receptividad endometrial (30). Sin embargo, las anomalías genéticas y la aneuploidía de los embriones son los principales contribuyentes en los resultados negativos de las TRA, y el cribado mediante un screening cromosómico debe estar entre las primeras herramientas empleadas para mejorar las tasas de embarazo en pacientes con antecedentes de fallo implantacional. Las pacientes con embriones euploides que tienen un patrón endometrial no receptivo, según el test ERA, se beneficiarían de la transferencia personalizada de un embrión, utilizando un ciclo de preparación endometrial con P_4 (30).

1.3 Ciclo sustitutivo para la transferencia embrionaria y valor de la progesterona

La P_4 es una hormona esteroidea esencial para la función reproductiva. Tiene un papel muy importante en la receptividad endometrial, implantación embrionaria y mantenimiento del embarazo (34). La administración temprana de suplementos de P_4 mejora los resultados en ciclos de FIV (35), compensando la secreción del cuerpo lúteo. En el caso de la TEC, la P_4 se usa para inducir los cambios secretorios indispensables en un endometrio previamente preparado con estrógenos. Desde hace muchos años hay diferentes protocolos que imitan el

ciclo natural y se usan en los de recepción de embriones donados. Se administra por vía oral o vaginal, intramuscular o subcutánea, así como en anillo o gel vaginal.

Hasta hace 3 años se aceptaba que la dosis de P₄ de 200 mg/8 horas vaginal producía niveles adecuados en sangre para la implantación. Sin embargo, se constata una elevada tasa de aborto en los ciclos de TEC. Esta dosis se aceptó por los trabajos de farmacocinética que desarrolló el laboratorio farmacéutico cuando se introdujo el fármaco en el mercado.

A raíz de una comunicación hecha en el Congreso de la Sociedad Americana de Reproducción del año 2017, en la que se afirmaba que el 30% de las pacientes no absorbía la P₄ por vía vaginal, se inician investigaciones clínicas tanto del grupo IVI (36) como del grupo Dexeus (37), que observaron que las pacientes con niveles séricos de P₄ menores a 10,5 ng/ml el día de la transferencia del embrión, tras una preparación endometrial artificial con P₄ micronizada vaginal, presentaban una tasa de embarazo en curso significativamente reducida. El valor de corte se ha ido modificando desde 10,5 hasta 9,2 ng/ml en el caso del grupo IVI.

Además, no se observó asociación entre el volumen endometrial y los niveles de P₄ sérica o tasa de embarazo en curso, lo cual sugiere que, una vez alcanzado el grosor endometrial mínimo, los niveles de P₄ en sangre en el día de transferencia del embrión aportan mayor predicción en cuanto a la posibilidad de embarazo que la valoración del endometrio por ecografía.

Un estudio clásico (38) demostró que el rango óptimo de P₄ era de 9,4 ng/ml en un embarazo natural, sin embargo, se trata de una afirmación muy cuestionada por la rápida fluctuación que sufren estos niveles. Por el contrario, en los ciclos artificiales, la P₄ alcanza la circulación sistémica rápidamente y logra la estabilidad en 24 horas, por lo que la medida de esta es más fiable.

El momento de la exposición a la P₄ también es crítico para una adecuada implantación, y el éxito reducido de la FIV se asocia con un aumento prematuro de la hormona, aunque el umbral requerido, la concentración y la duración siguen siendo inciertos (39; 40; 41).

1.4 Características histológicas del ciclo endometrial

El desarrollo embrionario, una vez transferido el embrión, tiene lugar en la cavidad endometrial. La pared uterina se compone de tres capas: endometrio, miometrio y perimetrio.

La vascularización de la capa basal del endometrio se debe a las arterias rectas. Son vasos pequeños que vienen desde el miometrio como arterias radiales, surgiendo a partir de 6-10 arterias arciformes, cuyo origen es la arteria uterina. La rama principal de la arteria radial continúa su trayecto hacia la superficie del endometrio, pasando a denominarse arteria espiral. Las arterias espirales dan lugar a arteriolas que se anastomosan formando un lecho capilar con segmentos dilatados denominados lagunas. La porción distal de las arterias espirales sufre una degeneración y regeneración con cada ciclo menstrual debido a la influencia de los E_2 y la P_4 (42).

El endometrio es la capa mucosa que tapiza la superficie luminal, junto al miometrio ambos sufren cambios durante el ciclo menstrual. El endometrio dispone de receptores de E_2 y P_4 , entre otros, que producen la modificación en su estructura a lo largo del ciclo. Se conoce como ciclo endometrial que dividiéndose en fase proliferativa y fase secretora.

1.4.1 Fase proliferativa

Se encuentra regulada hormonalmente por los estrógenos, consigue el crecimiento máximo debido a la gran actividad mitótica de las células epiteliales (del estroma) y llega a tener aproximadamente 10 mm de espesor. Esta fase coincide con el desarrollo folicular en el ovario.

El estudio histológico de esta fase no se puede fechar por días, como sí ocurre en la fase secretora, pues los cambios no son tan marcados, de tal manera que se diferencia en tres etapas que suceden bajo el influjo del E_2 :

Fase proliferativa temprana o inicial: el endometrio tiene aproximadamente 1 mm de espesor, está compuesto por una capa epitelial basal con pocas glándulas tubulares con luz recta y estrecha, revestidas de células columnares bajas. Los núcleos son ovales y pequeños. El estroma contiene células fusiformes laxas y hay una red reticular fina con vasos delgados imperceptibles.

Fase proliferativa media: las glándulas aumentan su altura y se hacen tortuosas, las células se aprecian altas, cilíndricas y comprimidas. Los núcleos son grandes, con gran actividad mitótica. El estroma es laxo y edematoso, con poco citoplasma y muchas mitosis.

Fase proliferativa tardía: Ya no se observa edema. Las células epiteliales adquieren un aspecto de pseudoestratificación. Los gránulos PAS-positivos, debido a su contenido en glucógeno, demuestran de forma precoz la acción de la P₄ a mitad del ciclo. El estroma es denso. Las arterias espirales tienen paredes delgadas, siendo poco aparentes.

1.4.2 Fase secretora

Se regula mediante la P₄, afectando a la capa funcional del endometrio. En esta fase los cambios histológicos son diarios, de tal manera que se pueden fechar con mayor exactitud que en la fase proliferativa. Se edematiza, alcanzando 5-6 mm de espesor. Las glándulas aumentan de tamaño y adquieren forma de “serrucho o tirabuzón”, además, la luz crece por el acúmulo de producto secretor. En esta fase la frecuencia de la actividad mitótica desciende (43).

En el endometrio se diferencian dos capas, que son las que sufren los cambios nombrados anteriormente. La capa basal está formada por células poliédricas bajas con poca actividad mitótica, en su estroma se encuentran las arterias rectas, las cuales tienen un esfínter contráctil que da lugar a la menstruación. La capa funcional o glandular prolifera desde la basal debido al estímulo del E₂ cuando alcanza niveles por encima de 30 pg/ml. Tras la fase proliferativa, la capa funcional se divide en capa superficial o compacta (cuellos glandulares) y capa profunda o esponjosa (cuerpos glandulares).

El epitelio glandular consta de una capa de células columnares cuya altura varía desde 6 micras hasta las 20, según la fase en la que se encuentre. En un primer momento las células son cilíndricas, posteriormente tiene lugar una pseudoestratificación y, finalmente, a consecuencia del estímulo estrogénico, se hacen columnares. En la fase proliferativa, las células epiteliales presentan mayor actividad mitótica, así como un aumento en la síntesis de RNA, que se acumula en el citoplasma y apreciándose múltiples ribosomas al final de la fase. Tras esto, la P₄ hace que se almacene glicógeno, mucopolisacáridos, proteínas y lípidos en el citoplasma en forma de vacuolas subnucleares. En la fase proliferativa los núcleos son alargados con cromatina densa, luego se transforman en redondos y ovales con disminución del DNA en la fase secretora.

El estroma está compuesto por células pluripotenciales del mesénquima, con forma de huso y unidas entre sí por una red. Durante la fase proliferativa, las células estromales permanecen

inactivas y las mitosis se inician en la mitad de la secretora, coincidiendo con la máxima secreción de P₄ cuando se transforman en célula decidual o en granulocitos.

La célula decidual aparece 3-4 días después de haber ocurrido el máximo edema; inicialmente se ubican de forma difusa, luego perimetrando los vasos y por último debajo del epitelio columnar. Sintetiza prolactina y prostaglandinas. Los granulocitos estromales contienen en su citoplasma vacuolas de glicógeno y glicoproteína. Se concentran en el lugar donde se produciría la implantación del blastocisto.

1.5 Ciclo piloto

Con este concepto se incluye lo que se podría llamar un simulacro de ciclo de transferencia para analizar que los niveles de P₄ en sangre, así como la transformación secretora del endometrio, sean favorables y acordes con la “ventana de implantación” embrionaria. Su realización, que se ha postergado en la práctica clínica actual, era de obligado desarrollo en los comienzos de las transferencias de los ciclos con óvulos donados en mujeres con fallo ovárico. De hecho, se convirtió en el modelo ideal de estudio de las transformaciones endometriales, dado que eran pacientes sin actividad ovárica. Basándose en él, se han desarrollado protocolos de TEC provocando una castración química con el uso de análogos de la GnRH agonistas o antagonista. Ello hace que la paciente no produzca E₂ ni P₄ y su ciclo pueda ser manipulado exógenamente con fármacos sustitutivos, cuyos efectos y dosis se conocen o se dan por conocidas. Sin embargo, la absorción no es homogénea como demuestran las últimas publicaciones.

Una de las pruebas que completa el estudio del ciclo piloto es la biopsia endometrial que se realiza con cánulas flexibles de plástico. Esto produce una herida en el endometrio cuya reparación implica aumento de los factores de crecimiento que, teóricamente, facilitan la implantación. Esto es lo que se conoce como efecto *scratching*.

2. Hipótesis de trabajo y objetivos

A pesar de las buenas tasas de gestación en los programas de TEC, se sigue observando una alta incidencia de abortos. Sabemos que la implantación depende de la calidad embrionaria, de un correcto endometrio receptivo y de la interacción entre los dos. Se necesita profundizar en el conocimiento de la implantación y del mecanismo de acción de los fármacos que utilizan P₄. Dado el gasto económico de la vía subcutánea y los costes de todo tipo de los procedimientos, consideramos que nuestro trabajo puede aportar conocimiento.

En este estudio queremos analizar si la vía y distintas pautas de administración de la P₄ en los ciclos de TEC tienen alguna relación con el valor de P₄ en sangre medido el día previo a la transferencia en estadio de blastocisto, y determinar la relación con el embarazo y aborto. Secundariamente, analizar si la vía y las pautas de administración de la P₄ tienen relación con la histología endometrial, obteniéndose diferentes patrones histológicos de las pacientes que, en ciclos previos, no han conseguido gestación, modificando en los ciclos subsiguientes, en base a los resultados, la dosis y vía de la P₄, valorando si se mejoran las tasas de implantación y embarazo y disminuyen las de aborto.

2.1 Objetivo principal

Analizar si mejoran las tasas de implantación y de aborto en el programa de TEC en base a modificaciones de tratamiento en el ciclo de transferencia.

2.2 Objetivos secundarios

1. Determinar los valores medios de P₄ el día anterior a la transferencia de blastocitos.
2. Valorar si hay un patrón de receptividad endometrial histológico específico según cada valor de P₄.
3. Evaluar tres protocolos de sustitución hormonal.

3. Material y métodos

3.1 Diseño del estudio

Este trabajo fue evaluado por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) y clasificado como “estudio posautorización con otros diseños diferentes al de seguimiento prospectivo” y aceptado por el CEI del CHUC.

La investigación se desarrolla desde dos vertientes diferentes, una analítica y otra histológica, que pretenden profundizar en el valor de la determinación de la P₄ en los ciclos de TEC.

3.1.1 Valor sérico de Progesterona

La primera parte es un estudio descriptivo retrospectivo. Se analizaron 270 ciclos en los que se determinó en sangre la P₄ el día previo a la transferencia de los embriones y se aleatorizaron de la siguiente forma:

1) Grupo 1 o Control: se administraron 200 mg cada 8 horas de P₄ vaginal micronizada, valorando el nivel sérico de la P₄ el día +5 de la sustitución hormonal como se describe en la tabla 1.

2) Grupo 2: se administraron 200 mg cada 8 horas de P₄ vía vaginal micronizada, determinando el nivel sérico de P₄ el día +5 de suplementación de esta, y si era inferior a 10.5 ng/ml, se añadía desde ese día P₄ subcutánea a dosis de 25 mg cada 24 horas, siempre a la misma hora, como se describe en la tabla 2.

3) Grupo 3: se administraron 200 mg cada 8 horas de P₄ vía vaginal micronizada a lo que se añadían 25 mg de P₄ subcutánea diaria desde el primer día de suplementación con P₄, como se describe en la tabla 3. Este grupo está subdividido en dos, debido a que en algunos ciclos la P₄ sérica estaba determinada en el día +5, siendo este el subgrupo 3A; y un subgrupo 3B en el que no se determinó el nivel sérico de P₄.

Tabla 1. Protocolo sustitución hormonal - Grupo 1

<i>Día del ciclo</i>	<i>Parches 75 microgramos 17β estradiol</i>	<i>Progesterona vaginal micronizada</i>
<i>1</i>		
<i>2</i>		
<i>3</i>	2 parches	
<i>4</i>		
<i>5</i>		
<i>6</i>	2 parches	
<i>7</i>		
<i>8</i>		
<i>9</i>	2 parches	
<i>10</i>	Ecografía transvaginal	
<i>11</i>		200 mg/ 8 horas vaginal
<i>12</i>	2 parches	200 mg/8 horas vaginal
<i>13</i>		200 mg/8 horas vaginal
<i>14</i>		200 mg/8 horas vaginal
<i>15</i>	Determinación de P ₄ 2 parches	200 mg/8 horas vaginal
<i>16</i>	Transferencia de blastocisto	200 mg/8 horas vaginal

Tabla 2. Protocolo sustitución hormonal - Grupo 2.

<i>Día del ciclo</i>	<i>Parches 75 microgramos 17β estradiol</i>	<i>Progesterona vaginal micronizada/subcutánea</i>
<i>1</i>		
<i>2</i>		
<i>3</i>	2 parches	
<i>4</i>		
<i>5</i>		
<i>6</i>	2 parches	
<i>7</i>		
<i>8</i>		
<i>9</i>	2 parches	
<i>10</i>	Ecografía transvaginal	
<i>11</i>		200 mg/ 8 horas vaginal
<i>12</i>	2 parches	200 mg/8 horas vaginal
<i>13</i>		200 mg/8 horas vaginal
<i>14</i>		200 mg/8 horas vaginal
<i>15</i>	Determinación de P ₄ 2 parches	200 mg/8 horas vaginal + 25 mg subcutánea
<i>16</i>	Transferencia de blastocisto	200 mg/8 horas vaginal + 25 mg subcutánea

Tabla 3. Protocolo sustitución hormonal - Grupo 3.

<i>Día del ciclo</i>	<i>Parches 75 microgramos 17β estradiol</i>	<i>Progesterona vaginal micronizada/subcutánea</i>
<i>1</i>		
<i>2</i>		
<i>3</i>	2 parches	
<i>4</i>		
<i>5</i>		
<i>6</i>	2 parches	
<i>7</i>		
<i>8</i>		
<i>9</i>	2 parches	
<i>10</i>	Ecografía transvaginal	
<i>11</i>		200 mg/8 horas vaginal + 25 mg subcutánea
<i>12</i>	2 parches	200 mg/8 horas vaginal + 25 mg subcutánea
<i>13</i>		200 mg/8 horas vaginal + 25 mg subcutánea
<i>14</i>		200 mg/8 horas vaginal + 25 mg subcutánea
<i>15</i>	Determinación de P ₄ 2 parches	200 mg/8 horas vaginal + 25 mg subcutánea
<i>16</i>	Transferencia de blastocisto	200 mg/8 horas vaginal + 25 mg subcutánea

3.1.1.1 Criterios de inclusión

1. Disponer de embriones en estadio de blastocisto o de día +3 que se descongelaron y llevaron a aquel estadio.
2. Consentimiento informado firmado de la técnica a realizar.
3. Poder acudir al hospital el día anterior a la transferencia.

3.1.1.2 Criterios de exclusión

1. No disponer de blastocistos.
2. No firmar el consentimiento informado.
3. No poder acudir al hospital por ser de isla periférica o lejanía.

3.1.2 Ciclo piloto

La segunda parte del trabajo es un estudio de cohortes observacional con un grupo de 14 muestras endometriales de pacientes con sustitución hormonal como en el grupo control o grupo 1 del anterior estudio, y otro grupo que quedó reducido a 3 por imposibilidad de reclutamiento debido a la pandemia, que fueron suplementadas como las del grupo 3 anterior (P₄ vaginal y subcutánea). La población incluida en esta parte de nuestra investigación fueron pacientes del programa de TEC de la Unidad de Reproducción Humana a las que se les realizó un ciclo que reprodujo el de la supuesta transferencia, en el día previo se determinó la P₄ sérica y en el día +6 se realizó una biopsia endometrial, tal como lo muestra la tabla 4.

Las pacientes cuyo nivel de P₄ en sangre fue <10,5 ng/ml, se les suplementó la P₄ en el ciclo posterior de transferencia embrionaria con P₄ en dosis de 25 mg/24 horas vía subcutánea desde el día anterior a la transferencia embrionaria.

Tabla 4. Protocolo sustitución hormonal - Ciclo piloto.

<i>Día del ciclo</i>	<i>Parches 75 microgramos 17β estradiol</i>	<i>Progesterona vaginal micronizada</i>
<i>1</i>		
<i>2</i>		
<i>3</i>	2 parches	
<i>4</i>		
<i>5</i>		
<i>6</i>	2 parches	
<i>7</i>		
<i>8</i>		
<i>9</i>	2 parches	

10	Ecografía transvaginal	
11		200 mg/ 8 horas vaginal
12	2 parches	200 mg/8 horas vaginal
13		200 mg/8 horas vaginal
14		200 mg/8 horas vaginal
15	Determinación de P ₄ 2 parches	200 mg/8 horas vaginal
16	Biopsia endometrial	200 mg/8 horas vaginal

Esta segunda parte del estudio tuvo los mismos criterios de inclusión y exclusión y además haber tenido 2 o más transferencias fallidas de TEC con el protocolo habitual de la Unidad y firmar el consentimiento informado y autorización para la biopsia endometrial.

3.1.2.1 Criterios previstos para la retirada de los sujetos del estudio.

Las pacientes que no acudieron a las citas y, por tanto, no se realizaron las pruebas previstas, fueron retiradas del estudio. Teniendo las pacientes la posibilidad de revocación del consentimiento informado en cualquier momento del estudio.

3.3 Protocolo de sustitución hormonal

Las pacientes iniciaron en el tercer día del ciclo menstrual la autoadministración de E₂ en forma de parches transdérmicos para promover la preparación endometrial. Se colocaron 2 parches de 75 microgramos cada 72 horas, es decir, 150 microgramos cada 72 horas (Evopad®, Janssen-Cilag S.A., España), situándolos en piel sana, limpia y alejadas de la mama.

Tras la 3ª tanda de parches se valoró el grosor endometrial mediante ecografía por vía transvaginal. En caso de que el endometrio superase los 7 mm de grosor, se iniciaba la administración de P₄, según en el grupo en el que se encuentre la paciente. Esta sustitución se realizó con P₄ natural micronizada, 200 mg cada 8 horas vía vaginal (Utrogestan®, Seid, España o Progeffik®, Effik S.A, España) y en aquellas pacientes que estaban incluidas en el grupo 3 se les añadía P₄ subcutánea a dosis de 25 mg/24 horas (Prolutex®, Ibsa S.A, Italia). El ciclo de transferencia se continúa con el mismo esquema de sustitución hormonal.

Las biopsias endometriales fueron obtenidas bajo control ecográfico el día 6 de sustitución hormonal, el cual se correspondería con el hipotético día de la transferencia de embriones. Se llevó a cabo mediante una cánula de Cornier (Gynetics). Este procedimiento tiene un efecto *scratching* sobre el ciclo de transferencia real que se realizó en el siguiente ciclo y donde sí se transfirieron embriones con las modificaciones farmacológicas de dosis en base a la información del ciclo piloto.

Las biopsias endometriales incluidas en formol eran enviadas al Departamento de Anatomía Patológica, donde la misma especialista procedía a su interpretación tras la fijación y tinción, de manera ciega. Las muestras eran incluidas en un tubo con el fijador designado (formol tamponado al 10%), siendo la fijación mínima de al menos 6 horas, para proceder posteriormente a su inclusión en parafina y tinción con Hematoxilina-Eosina. El procesamiento de las muestras era el habitual para las biopsias de endometrio, y se procedió a analizar los cortes a medida que se tallaban, fijaban y teñían. El análisis se llevó a cabo en un microscopio óptico, siendo el observador siempre el mismo, acompañado por los alumnos de 6º curso del grado de Medicina y autores de esta memoria.

Las características histológicas que valoramos, según los criterios de Noyes, fueron el grado de desarrollo vascular (puntuado de 0 a 3) y de transformación deciduoide (puntuado de 0 a 3), el número de mitosis presentes en el estroma (puntuado de 0 a 3), la posición basal o apical de las vacuolas, fase del ciclo endometrial predominante y el grado de diferenciación hacia una u otra fase del mismo (puntuado de 1 a 3). Todos los aspectos descritos fueron puntuados en función de si eran menos o más prominentes, excepto el tipo de vacuolas y la fase predominante. Una de las muestras obtenidas fue insuficiente para establecer un diagnóstico.

La medida de P₄ sérica el día +5 de su administración se realizó en el laboratorio de hormonas del HUC mediante ensayo inmunoenzimático de micropartículas Axsym System (Abbott Científica S.A., Madrid, España). Los valores de P₄ se expresan en ng/ml. La extracción de sangre se llevó a cabo a la misma hora (8-9 de la mañana).

Los embriones congelados procedían de un ciclo de FIV/ICSI donde la punción para extracción de los ovocitos se llevaba a cabo a las 36 horas de la descarga ovulatoria bajo guía ecográfica.

Tras la punción, se procedió a la inseminación de los ovocitos con el semen capacitado. En el caso de la FIV, se necesitan 300.000 espermatozoides por mililitro y en el caso de la ICSI, la microinyección de un único espermatozoide por ovocito. Se realizó un seguimiento diario de la calidad de los embriones hasta el día de la transferencia, siguiendo el criterio de ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción), y con el criterio de Gardner para aquellos superiores a tres días post-fertilización. Tras consultar a las pacientes, se decidió el número de embriones a transferir (siendo el máximo 2 por política de prevención del embarazo múltiple de la Unidad). Los embriones no transferidos se criopreservaron utilizando el protocolo de Irvine-vitrificación para vitrificación rápida en sistema Cryotop®, siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos embriones son los que se transfieren en los ciclos de TEC de nuestro estudio.

3.4 Análisis de datos

Para la recopilación de los datos se ha utilizado el programa SARA y el SAP.

El análisis estadístico del valor sérico de P₄ se realizó con el programa SPSS (“Statistical Package for the Social Sciences”) v. 15 (Chicago, IL). Se estableció el punto de corte de los niveles de P₄ en 10,5 ng/ml, según refieren Labarta et al (36). En primer lugar, se llevó a cabo un análisis de los datos descriptivo, incluyendo la edad de la mujer como covariante y neutralizando su efecto en el caso de que resultase significativa y, a continuación, se realizó un contraste de hipótesis para las variables de interés a estudio. Las variables cuantitativas se expresan como media y desviación típica. Para la comparación de variables cualitativas se empleó la prueba de Chi-cuadrado; para una cualitativa con una cuantitativa no dicotómica, el ANOVA; y, para dos cuantitativas, el coeficiente de correlación de Pearson. Se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

El análisis estadístico del estudio histológico se desarrolló con el programa SPSS (“Statistical Package for the Social Sciences”) v. 21 (Armonk, NY). Se han realizado tablas de contingencia para comparar la frecuencia de presentación de diferentes variables de naturaleza cualitativa (nominales u ordinales) en dos o más grupos y poder así determinar si existía una asociación entre ellas; y las medias muestrales de los diferentes datos clínicos, de laboratorio e histológicos, con el objetivo de estimar si había diferencias entre los grupos anteriormente citados. Irá dirigido a determinar si existe correlación con el valor de P₄ de los parámetros histológicos que permiten datar el endometrio según criterios de Noyes y que son

el grado de desarrollo vascular (puntuado de 0 a 3) y de transformación decidual (puntuado de 0 a 3), número de mitosis presentes en el estroma (de 0 a 3), posición basal o apical de las vacuolas, fase del ciclo endometrial predominante (proliferativo, intervalo, secretor inicial (15-17 del ciclo), secretor avanzado (21-24 del ciclo)). Los aspectos descritos fueron puntuados en función de si eran menos o más prominentes, excepto el tipo de vacuolas y la fase predominante. Una segunda parte del estudio evaluará los resultados del ciclo de transferencia en cuanto a tasa de implantación, gestación y aborto en base a las modificaciones que los resultados del ciclo piloto permitieron implementar. Finalmente, se podrá concluir si la realización de éste introduce o no mejoras en los resultados.

4. Resultados

Nuestro trabajo se compone de dos vertientes. Por un lado, nos hemos centrado en el análisis de la influencia del valor de la P₄ el día +5 de sustitución hormonal en el ciclo de TEC y, por otro, realizamos el análisis de la histología endometrial en dos de los grupos del llamado ciclo piloto.

4.1 Valor sérico de Progesterona

Se han analizado 270 ciclos de transferencias de blastocistos distribuidos de la siguiente forma en base a la suplementación de P₄:

Grupo 1: 200 mg/8 horas de P₄ vía vaginal micronizada, n= 31.

Grupo 2: 200 mg/8 horas y en el día +5 se analizó la P₄ sérica siendo <10,5 ng/ml, por lo que se suplementó con 25 mg/24 horas por vía subcutánea, n= 125.

Grupo 3: 200 mg/8 horas vaginal y 25 mg/24 horas subcutánea conjuntamente desde el día +0, n=114. Este grupo se subdividió en 3A, disponían de determinación de P₄ el día +5 con un tamaño muestral de n=45 y un subgrupo 3B a las que no se le midió, n=69.

El grupo con mayor número de ciclos es el 2, 125 ciclos, constituyendo un 46,3% del tamaño muestral total. En la tabla 5 se puede observar la distribución de los tamaños muestrales en los diferentes grupos.

Tabla 5. Frecuencias.

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>
<i>Grupo 1 o Control</i>	31	11,5
<i>Grupo 2</i>	125	46,3
<i>Grupo 3A</i>	45	16,7
<i>Grupo 3B</i>	69	25,6
<i>Total</i>	270	100,0

Los tres grupos son homogéneos en cuanto a causa de esterilidad (siendo más frecuente el factor femenino), el número de ciclo de inducción de la ovulación de FIV/ICSI de donde proceden los embriones, indicación de la congelación (bolo agonista, sobrantes, P₄ alta, riesgo de hiperestimulación ovárica). No hay diferencias estadísticamente significativas en las indicaciones entre los grupos.

4.1.1 Tasa de embarazo

La tasa de embarazo global fue de 41,48% lo que asciende a 112 embarazos. En el grupo 1 o control se sucedieron 13 gestaciones; en el grupo 2, 54 embarazos; en el grupo 3A, 20 embarazos y en el grupo 3B, 25. Si no tenemos en cuenta la medición de la P₄ en el grupo 3 y por lo tanto la división en dos subgrupos, el número de embarazos asciende a 45. Dicha tasa en cada grupo se describe en las tablas 6 y 7 sin que se hayan detectado diferencias estadísticamente significativas en la prueba de χ^2 de Pearson obteniendo una $p > 0,05$.

Tabla 6. Tasa de embarazo.

Grupo	Embarazo	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Grupo 1 o control	<i>No</i>	18	58,1
	<i>Sí</i>	13	41,9
	Total	31	100,0
Grupo 2	<i>No</i>	71	56,8
	<i>Sí</i>	54	43,2
	Total	125	100,0
Grupo 3A	<i>No</i>	25	55,6
	<i>Sí</i>	20	44,4
	Total	45	100,0
Grupo 3B	<i>No</i>	44	63,8
	<i>Sí</i>	25	36,2
	Total	45	100,0

Tabla 7. Tasa de embarazo con el grupo 3 unificado.

		<i>Embarazo</i>		<i>Total</i>
		<i>No</i>	<i>Sí</i>	
Grupo 1 o Control	Recuento	18	13	31
	%	58,1%	41,9%	100,0%
Grupo 2	Recuento	71	54	125
	%	56,8%	43,2%	100,0%
Grupo 3	Recuento	69	45	114
	%	60,5%	39,5%	100,0%
Total	Recuento	158	112	270
	%	58,5%	41,5%	100,0%

χ^2 de Pearson $p = 0.344$

4.1.2 Tasa de aborto

La tasa de aborto global fue del 21,4%, es decir, en el total de los grupos se han producido 24 abortos de 112 embarazos, dividiéndose de la siguiente forma entre los grupos: 2 abortos en el grupo 1 (15,4%), 13 en el grupo 2 (24,1%) y 9 en el grupo 3 (20%). Dicha tasa en cada grupo se describe en la tabla 8 sin que se hayan detectado diferencias estadísticamente significativas en la prueba de χ^2 de Pearson obteniendo una $p > 0,05$.

Tabla 8. Tasa de aborto.

		<i>Aborto</i>		<i>Total</i>
		<i>NO</i>	<i>SÍ</i>	
Grupo 1	Recuento	11	2	13
	%	84,6%	15,4%	100,0%
Grupo 2	Recuento	41	13	54
	%	75,9%	24,1%	100,0%
Grupo 3	Recuento	36	9	45
	%	80,0%	20,0%	100,0%
Total	Recuento	88	24	112
	%	58,5%	41,5%	100,0%

χ^2 de Pearson 0.561

V de Cramer de 0.071

4.1.3 Valor de progesterona el día previo a la transferencia embrionaria

En cuanto a los niveles de P₄ en sangre el día antes de la transferencia embrionaria de los diferentes grupos, dividiendo los grupos por rango de P₄, <8, 8-10,5 y >10,5 ng/ml, donde el grupo 3 incluye solo las pacientes que tenían determinación de P₄ y por tanto analizando 201 ciclos, se observa lo siguiente:

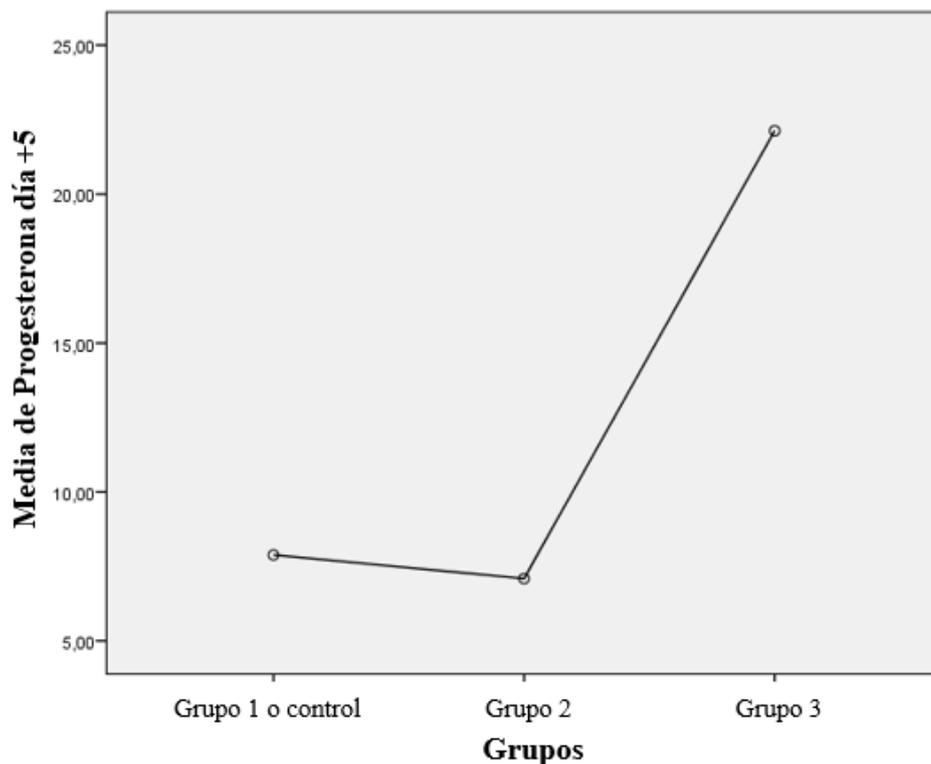
- La mayor parte de los ciclos, 113, presentan P₄ en el rango <8 ng/ml. Esto equivale al 56,2% de los ciclos totales. El grupo con mayor número de ciclos en este rango es el grupo 2, con 90, (72%).
- En cuanto a los otros dos rangos, empatan en número de ciclos y porcentaje, siendo 44 ciclos para cada rango (21,9%). El grupo con mayor número de ciclos en el rango de 8-10,5 ng/ml corresponde al 2, con 34 ciclos (27,2%).
- El rango >10,5 ng/ml, se presenta predominantemente en el grupo 3, 34 ciclos (75,6%).

Tabla 9. Rango progesterona.

		<i>Rango de progesterona (ng/ml)</i>			<i>Total</i>	
		<i><8</i>	<i>8-10,5</i>	<i>> 10,5</i>		
<i>Grupo 1</i>	<i>Recuento</i>	17	5	9	31	
	<i>%</i>	54,8%	16,1%	29,0%	100,0%	
<i>Grupo 2</i>	<i>Recuento</i>	90	34	1	125	
	<i>%</i>	72,0%	27,2%	0,8%	100,0%	
<i>Grupo 3</i>	<i>Recuento</i>	6	5	34	45	
	<i>%</i>	13,3%	11,1%	75,6%	100,0%	
<i>Total</i>		<i>Recuento</i>	113	44	44	201
		<i>%</i>	56,2%	21,9%	21,9%	100,0%

En la gráfica I se observa el nivel de progesterona medio el día +5, que corresponde al día anterior a la transferencia embrionaria, en los tres grupos. Como es de esperar el grupo con mayor nivel medio de progesterona en sangre es el 3 como se describió en el apartado anterior.

Gráfica I. Media de P₄ en el día +5



4.1.4 Valor de progesterona en relación con los embarazos

Si dividimos como en el apartado anterior los niveles de P₄ en tres rangos, <8, 8-10,5 y >10,5 ng/ml, y relacionamos con embarazo, se observa lo siguiente:

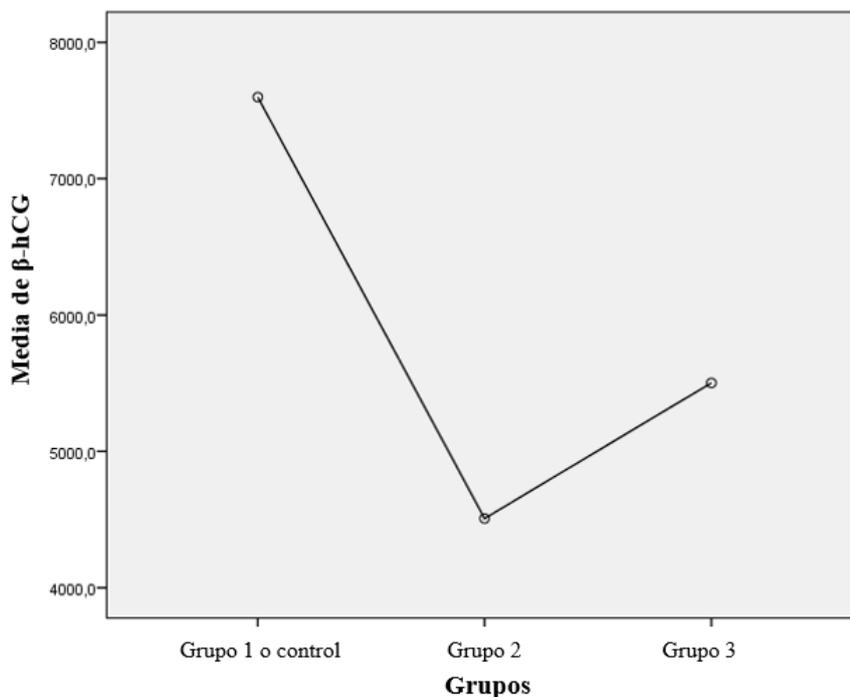
- El rango con mayor número de embarazos es el rango <8 ng/ml, ascendiendo a 49 de los 87 totales y correspondiendo el 56,3% de los embarazos totales.
- En el rango >10,5 ng/ml se generan 21 embarazos, correspondiendo al 24,1% de los embarazos totales.
- En el rango de 8-10,5 ng/ml se observan 17 embarazos, que es el 19,5% de los embarazos totales.
- En cuanto a los no embarazos, el rango con mayor número se corresponde con el <8 ng/ml, con 64 no embarazos (56,1%). Le sigue el rango 8-10,5 ng/ml con 27 no embarazos (23,7%). Y, por último, el rango >10,5 con 23 no embarazos (20,2%).

Tabla 10. Rango de progesterona/embarazo.

			<i>Rango de progesterona</i>			<i>Total</i>
			<i><8</i>	<i>8-10,5</i>	<i>> 10,5</i>	
<i>Embarazo</i>	<i>No</i>	<i>Recuento</i>	64	27	23	114
		<i>%</i>	56,1%	23,7%	20,2%	100,0%
	<i>Sí</i>	<i>Recuento</i>	49	17	21	87
		<i>%</i>	56,3%	19,5%	24,1%	100,0%
<i>Total</i>		<i>Recuento</i>	113	44	44	201
		<i>%</i>	56,2%	21,9%	21,9%	100,0%

La gráfica II muestra la media de β -hCG que es sinónimo de gestación. El valor de esta hormona es mayor en el grupo 1. Podemos concluir que, aunque el valor de la progesterona medido en sangre es más alto en aquellas pacientes que recibieron los dos tipos de progesterona desde el principio (vaginal y subcutánea), esto no redundó en un aumento de la tasa de embarazo.

Grafica II. Media β -hCG.



4.2 Histología endometrial - ciclo piloto

Dos grupos configuran esta parte del estudio. Grupo 1: ciclo piloto en 14 pacientes que recibieron 200 mg de P₄ cada 8 horas vía vaginal; Grupo 2: solo 3 pacientes que recibieron lo mismo y, además, 25 mg de P₄ subcutánea. Este grupo no pudo completarse debido a la interrupción de la actividad por la crisis del Covid-19. Posteriormente al ciclo piloto, se realiza otro ciclo con transferencia embrionaria con las debidas modificaciones en dosis en base a la información obtenida del ciclo piloto. A las pacientes con P₄ sérica <10,5 ng/ml se le añadió P₄, 25 mg/24 horas vía subcutánea junto con la vaginal.

Son pacientes con edades comprendidas entre 31-41 años con una media de 36 años, con IMC inferior a 30. Tenían embriones congelados en estadio de blasto o de día +3 que se descongelaron y llevaron a aquel estadio, de buena calidad. Previamente habían tenido 3 transferencias fallidas.

4.2.1 Valor de la progesterona el día previo a la biopsia endometrial

El valor medio de P₄ en sangre el día +5 fue de 7.42 ng/ml, (1.61-10.9 ng/ml). Agrupando los valores en tres rangos: 1.61, 6-8,6 y 8,6-10,9 ng/ml, observamos:

- 9 de 14 pacientes (64%) presentaron P₄ entre 6-8,6 ng/ml.
- 4 pacientes (29%) entre 8,6-10,9.
- 1 (7%) su valor fue de 1,61 ng/ml.

Tabla 11. Rango de progesterona/Frecuencias

<i>Nº de casos / %</i>	<i>Rango Progesterona (ng/ml)</i>
1 / 7%	1,61
9 / 64%	6-8,6
4 / 29%	8,6 -10,9

El grosor endometrial medio que se determinó por ecografía vía transvaginal para iniciar las terapias con progesterona fue de 9.2 mm, con un rango comprendido entre 7.3-12.7 mm.

4.2.2 Biopsias endometriales

El análisis histológico de las muestras endometriales rebela 5 fases predominantes:

- La predominante fue la secretora inicial: 12 biopsias del grupo 1 (85,7%) y 3 biopsias del grupo 2 (100%).
- Una paciente presentó endometrio en fase proliferativa y otra en fase secretora avanzada (7,1%).
- En las fases de intervalo e intervalo - secretor inicial no se detecta ninguna biopsia.

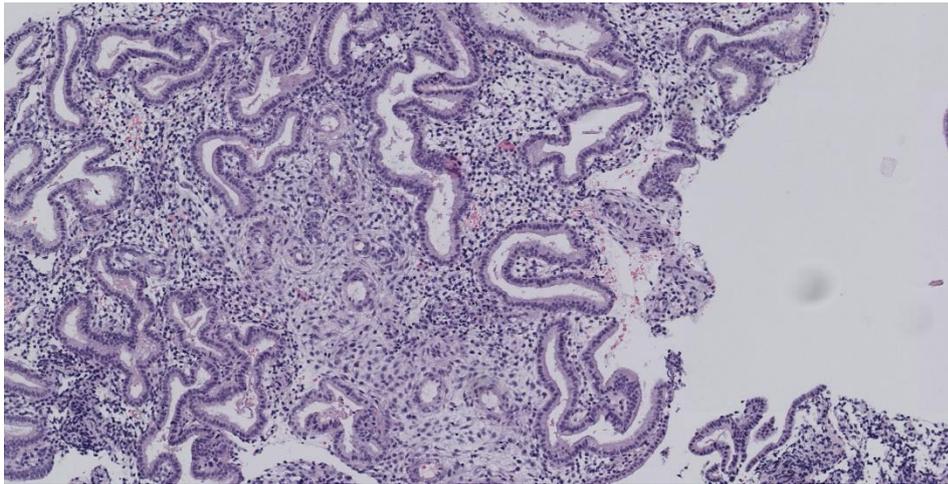
Tabla 12. Histología endometrial.

<i>Fase predominante</i>	<i>Grupo 1</i>	<i>Grupo 2</i>
	<i>Progesterona vaginal</i>	<i>Progesterona vaginal + subcutánea</i>
<i>Proliferativo</i>	1	
<i>Intervalo</i>	0	
<i>Intervalo - Secretor Inicial</i>	0	
<i>Secretor Inicial</i>	12	3
<i>Secretor Avanzado</i>	1	

Según los criterios de Noyes observamos las siguientes características histológicas:

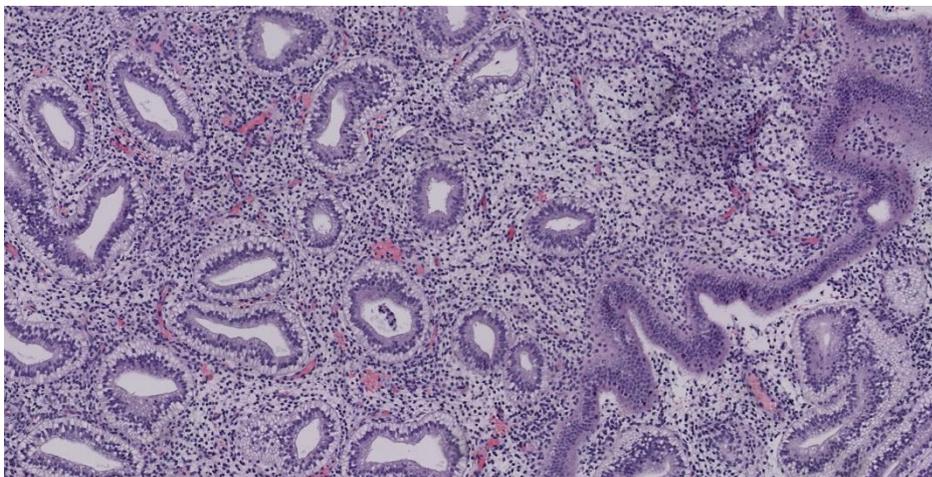
- Vacuolas: 1 paciente no las presentó, 2 presentaron vacuolas apicales y 11 vacuolas basales.
- Transformación decidual: 2 presentaron dicha transformación y 12 no.
- Desarrollo vascular: 3 muestras se clasificaron como grado 0, 8 pacientes grado 1 y 3 grado 2.
- Mitosis: 10 se clasificaron como grado 0, y 4 como grado 1.

Imagen 1: Transformación decidual.



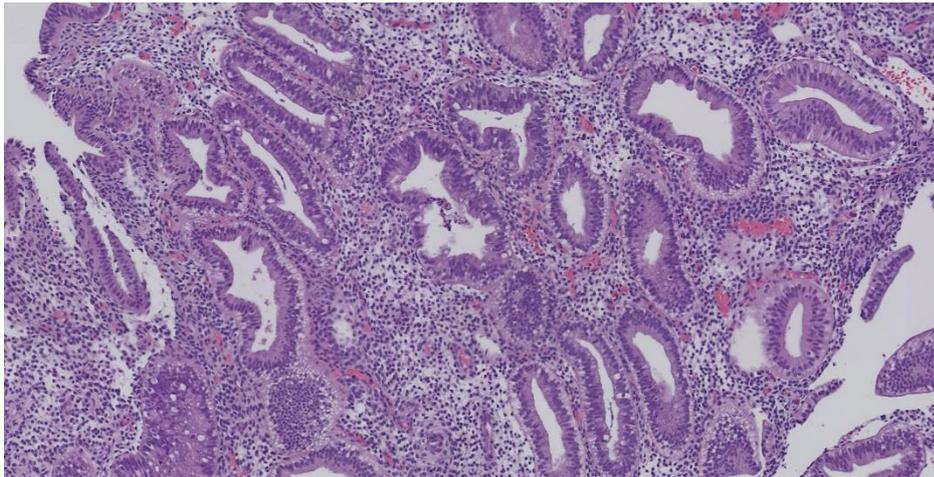
Tinción hematoxilina-eosina. Aumento 10x. Mucosa endometrial con glándulas irregulares con secreción en la luz revestidas por células cilíndricas sin actividad. Estroma con desarrollo vascular y transformación decidual perivascular. Autora: Idaira J. Expósito Afonso.

Imagen 2: Endometrio secretor – Vacuolas basales.



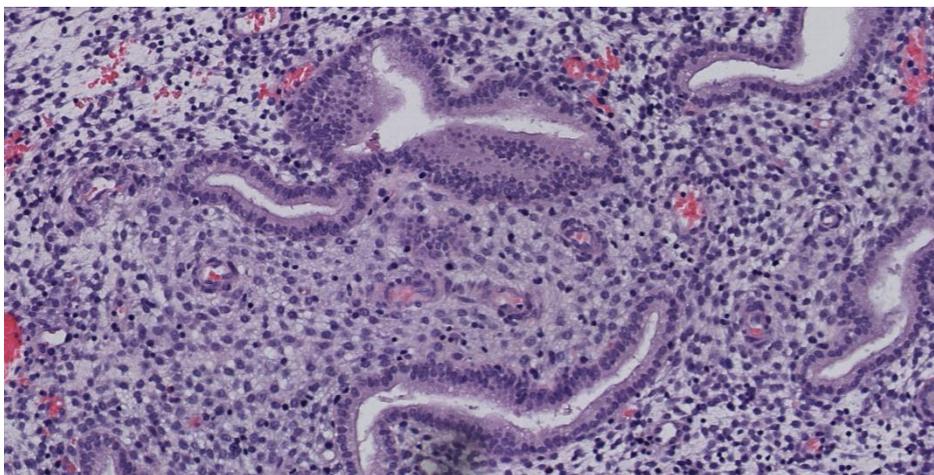
Tinción hematoxilina-eosina. Aumento 10x. Mucosa endometrial con glándulas generalmente tubulares revestidas por epitelio cilíndrico con marcadas vacuolas secretoras basales.

Imagen 3: Endometrio secretor – vacuolas basales y apicales.



Tinción hematoxilina-eosina. Aumento 10x. Mucosa endometrial con glándulas irregulares revestidas por epitelio cilíndrico con vacuolas mayoritariamente basales, observándose en algunas glándulas vacuolas apicales.

Imagen 4. Desarrollo vascular.



Tinción hematoxilina-eosina. Aumento 20x. Mucosa endometrial con estroma que incluye estructuras vasculares desarrolladas.

4.2.3 Tasa de embarazo y aborto

En el ciclo posterior al de la obtención de la biopsia endometrial, se programó el ciclo de la transferencia embrionaria. Se siguió el esquema de sustitución descrito y se subió la dosis de progesterona si en el piloto ésta era inferior a 10,5 ng/ml (solo a las mujeres del grupo 1):

- Al actuar aumentando la dosis de progesterona añadiendo 25 mg vía subcutánea junto con la vaginal en los casos de endometrio con predominio de fase secretora inicial y

con un nivel de progesterona en sangre <10,5 ng/ml, se logran 5 embarazos, correspondiendo a un 35,71% del total.

- Por tanto, el número de no embarazos fue de 9, lo que corresponde con el 64,28% del total.
- De esos 5 embarazos hubo un aborto bioquímico que se corresponde con la paciente que en el ciclo piloto obtuvo el nivel más bajo de P₄, 1,61 ng/ml y la β-hCG fue también la más baja: 395 mUI/ml.
- La P₄ en las pacientes que gestaron estuvo en el rango de 1,61-10,2 ng/ml, siendo la media de 6,56 ng/ml.
- Todas las pacientes que se quedaron embarazadas presentaron en la biopsia endometrial un patrón histológico de secretor inicial en el ciclo piloto.

La relación de la histología con el embarazo o el aborto no mostró diferencias significativas excepto para la transformación deciduoide donde se observa una correlación de Pearson de 0.601 y una p de 0.023 ($p \leq 0.05$)

Tabla 13. Correlación de Pearson de la histología endometrial/embarazo y aborto.

<i>CORRELACIONES</i> <i>Progesterona día +5</i>	<i>Fase</i> <i>Predominante</i>	<i>Vacuolas</i>	<i>Transformación</i> <i>deciduoide</i>	<i>Desarrollo</i> <i>vascular</i>	<i>Mitosis</i>
<i>Correlación de</i> <i>Pearson</i>	0.102	0.97	0.601	0.041	0.130
<i>Significación</i>	0.727	1.741	0.023	0.889	0.658

5. Discusión

En los últimos años se ha puesto en valor la determinación de P₄ en dos momentos clave de los tratamientos de reproducción asistida: el día de la descarga ovulatoria en los ciclos de FIV/ICSI y el día previo a la TEC en estadio de blastocisto. Nuestro trabajo profundiza en este segundo escenario.

Si bien es verdad que muchos grupos no utilizan su determinación para tomar decisiones clínicas, la mayoría deciden congelar todos los embriones si el valor el día de la descarga ovulatoria supera el nivel de 1,5 ng/ml. El programa de FIV/ICSI del CHUC así lo hace y ha concluido que debe seguir teniéndose en cuenta (44).

Sin embargo, en los programas de TEC la situación no está tan clara. Entre los defensores a ultranza de que se debe determinar y actuar subiendo dosis o cambiando vía de administración si el valor es inferior a 10,5 ng/ml (36; 41; 45) y los que no la utilizan. Hay profesionales que solo determinan la P₄ en casos especiales.

Alur-Gupta S et al (46) confirma que el hecho de determinar y conducir el ciclo en base a los resultados de la medición de P₄ aumenta la tasa de embarazo en ese ciclo significativamente. La Unidad de Reproducción ya la tiene incluida en sus protocolos porque se investiga si el hecho de determinar y actuar incide positivamente no solo en el aumento de la tasa de embarazo sino en la disminución de la de aborto que siempre ha sido muy alta (20%) en los ciclos de TEC. Recientemente y tras esta investigación se está planteando disminuir el nivel de corte para administrar la progesterona subcutánea a 8,5 ng/ml. Esto es así porque se ha ampliado el grupo control y está en fase de análisis.

Históricamente y basados en estudios de farmacocinética cuando se introdujo la vía vaginal con la P₄ micronizada se aceptaba que la dosis de 200 mg/8 horas era suficiente para crear un endometrio secretor adecuado para la implantación. Sin embargo, cuando en el año 2017 en el Congreso de la Sociedad Americana de Reproducción se comunica que se ha detectado que un 30% de mujeres presentaban niveles muy bajos de la hormona cuando se administra por dicha vía, fue cuando se inició la investigación en este campo.

Factores como la edad, el IMC y el momento de la extracción de la sangre han sido investigados por González-Foruria I et al (46). Nosotros tenemos una población homogénea

en cuanto al peso dado que es un criterio para poder realizar los tratamientos de reproducción. El IMC tiene que ser inferior a 30 y una edad inferior a 45. En cuanto al momento de extracción de sangre para la determinación de P_4 , nuestras pacientes acuden al laboratorio de hormonas a la misma hora, de 8 a 9 de la mañana.

En la actualidad, la estrategia de congelar todos los embriones generados en los ciclos de FIV/ICSI, en casos de P_4 por encima de un valor de 1,5 ng/ml (41) el día de la descarga ovulatoria está ampliamente aceptada ya que hay numerosos estudios que recogen los efectos deletéreos que produce en el endometrio y también los resultados clínicos obtenidos en cuanto a tasa de embarazo y aborto (43; 47). Sin embargo, el valor de corte continúa siendo controvertido, e incluso se han llegado a sugerir otros valores dependiendo de la respuesta de la paciente a los fármacos de estimulación (42; 43; 48; 49). Incluso algunos de ellos mostrarían que no hay diferencias significativas en cuanto a las tasas de embarazo clínico y aborto con un valor de corte. La revisión de la literatura constata amplias diferencias en cuanto a este valor y al peso que sobre la tasa de embarazo en fresco pudiera tener. Esto viene dado por la gran variabilidad existente en cuanto al método y las unidades de medida, así como el tipo de ciclos y de pacientes que se incluyen en los estudios.

En la Unidad de Reproducción Humana del CHUC se tiene como protocolo congelar los embriones que proceden de ciclos con $P_4 > 1,5$ ng/ml. Las indicaciones de congelación se han ampliado a embriones de pacientes con riesgo de SHO, causas endometriales detectadas durante la estimulación y embriones sobrantes tras transferencias en fresco. Esto ha aumentado el número de ciclos y el programa de vitrificación siendo uno de los más importantes, por lo que poner a punto protocolos de determinación de la P_4 con el objetivo de aumentar las tasas de embarazo y minimizar las de abortos nos llevó a decidir realizar esta investigación.

Es de destacar la buena supervivencia embrionaria a la descongelación independientemente del tipo de ciclo donde se originaron. Es una afirmación importante para la tranquilidad de las pacientes y los técnicos que trabajan en reproducción asistida cuando se informa de la necesidad de vitrificar. Nuestros resultados coinciden con la de la mayoría de los autores (50; 51) que afirman que la opción de vitrificar es muy eficiente y justifica el concepto de *freeze-all*. En nuestro medio, se ha comprobado una mejoría tangible con la introducción del medio Irvine Scientific, con lo que cada vez se vitrifica más y se han ampliado las indicaciones de

congelación (4). Este hecho, la homogeneidad en los medios y los protocolos no solo del laboratorio de FIV sino en el de hormonas del HUC le da valor a nuestra investigación.

En nuestros resultados, al valor de corte de P₄, parece ser inferior a 10,5 ng/ml, sin embargo, será necesario aumentar el tamaño muestral del grupo control para poder realizar dicha afirmación. Ya hay estudios que disminuyen a 8-9 ng/ml, que parece estar más cercano a nuestra población. Dado que se han seguido recogiendo casos, no incluidos en nuestra muestra, se analizarán con este fin.

El grupo control presenta tasas de embarazo similar a los otros grupos con progesterona subcutánea, haciéndonos pensar que la P₄ vaginal sigue siendo una opción cómoda, eficaz y barata. Esto se ha visto en varios estudios que demuestran que con esta vía de administración el nivel de P₄ es bajo en sangre, pero en el útero alcanza rápidamente valores elevados. En los grupos con P₄ subcutánea observamos un mayor nivel en sangre, sin embargo, esto no se traduce en una mayor tasa de embarazos y una menor tasa de abortos. Para asegurar esta afirmación debemos ampliar el número de casos.

En futuras líneas de investigación será necesario revisar el valor de corte de la P₄ el día previo a la transferencia de los embriones en estadio de blastocisto independientemente del tratamiento farmacológico recibido. Incorporar los *microarrays DNA* de receptividad endometrial, y relacionarlos con la histología. Analizar el valor de progesterona en ciclos de transferencias de embriones en fresco diferenciando dos grupos de estudios: un grupo con embriones en día 3 y otro grupo en embriones en estadio de blastocisto (52). Nuestro trabajo ha abierto un futuro de investigación de la implantación y de la principal hormona implicada.

Elena Labarta, ginecóloga especializada en TRA y citada en varias ocasiones en este trabajo, realizó un webinar en mayo del 2020 (53). En dicha ponencia habló sobre un estudio que realizó en 2019 sobre la importancia P₄ en la fase lútea. En este utilizó un valor de corte de 9,2 ng/ml y analizó dos tipos de estrategia de rescate: una estrategia en la que utilizó P₄ vía vaginal micronizada a 400 mg/12 horas más P₄ subcutánea a 25 mg/24 horas desde el inicio de la suplementación de la fase lútea y una segunda estrategia en la que utilizó P₄ vía vaginal a la misma dosis, pero la vía subcutánea la administró desde el día +5, es decir, desde el mismo día de la transferencia embrionaria. Los resultados fueron que las pacientes con una P₄ <9,2 ng/ml a las que no se añadió progesterona subcutánea mostraron una tasa de embarazo inferior al 18-20%. Cuando se añade la vía subcutánea (rescate) los resultados fueron

similares al grupo con $P_4 > 9,2$ ng/ml. Este grupo se corresponde con nuestro grupo 2 de la primera parte del estudio, aunque en nuestra población no se objetivó un aumento significativo de la tasa de embarazo. Este estudio aporta aún más conocimiento e importancia a la personalización de la progesterona en las pacientes con TEC.

Nuestro trabajo se inició con la idea de analizar histológicamente el endometrio y relacionarlo con el valor de P_4 , la dosis y vía de administración del fármaco. Lamentablemente no se pudo concluir por la imposibilidad de incluir pacientes en el grupo de la P_4 subcutánea. Esto ocurre por tres razones fundamentales: el abandono por parte de dos mujeres, la falta de dosis de la P_4 subcutánea y la pandemia COVID-19. En este grupo solo se pudieron reclutar 3 casos y se pretende completar en el futuro.

Independientemente del valor de P_4 , en prácticamente todas las variables histológicas de Noyes no se encontraron diferencias significativas, salvo en la transformación decidual que fue más intensa en aquellos ciclos donde se asoció a la P_4 vía vaginal la dosis de 25 mg vía subcutánea. Destacamos que, de 14 pacientes con tres ciclos fallidos previos, 5 se quedaron embarazadas después del ciclo piloto, una de ellas con un nivel de P_4 muy bajo, siendo la única que sufrió un aborto en el primer trimestre. Este hecho nos hizo plantearnos el efecto *scratching* ya comentado en la introducción: ¿se debió el embarazo a este efecto o al hecho de aumentar la dosis de P_4 en el ciclo siguiente con 25 mg vía subcutánea? Para poder encontrar la respuesta a dicha pregunta, será necesario terminar cuando sea posible el estudio y aumentar el tamaño muestral de los diferentes grupos, siendo esto una de las debilidades de nuestro estudio.

Olesen MS et al (54) en un estudio publicado a finales de 2019, en el que se investigó si el *scratching* endometrial en la fase lútea antes de la estimulación ovárica, aumentaba las tasas de embarazo clínico en mujeres con uno o más fracasos previos demostró que no hubo mejoría entre los grupos excepto en aquellas mujeres con tres o más fracasos previos de implantación, obteniendo un aumento significativo en la tasa de embarazo clínico después de realizar la técnica. Esta información es de gran valor dado que demuestra que no es de utilidad en todas las pacientes como se había afirmado y publicado en estudios previos, sino que solo es beneficioso para aquellas pacientes con 3 o más fracasos.

Nuestro trabajo tiene la oportunidad de profundizar en dicho efecto que no estaba planteado en el diseño inicial y comprobar si es el causante del aumento de la tasa de embarazo en las

pacientes a las que se les realizó la biopsia endometrial, o si esto fue debido al cambio de dosis y vía de la P₄. Como ya se ha comentado, terminar este estudio, seguir investigando en esta línea y aumentar los tamaños muestrales puede aportar conocimiento, eficiencia en el sistema sanitario y mejores resultados en las TEC con mayores tasas de embarazo y menores de aborto.

6. Conclusiones

6.1 Conclusiones valor sérico de progesterona

1. No se han observado diferencias significativas en los resultados de los ciclos de TEC en función del valor de corte de P₄ de 10,5 ng/ml.
2. El grupo control que recibe solo 200 mg/8 horas vaginal presenta tasas de embarazo similares a los otros dos grupos con P₄ subcutánea.
3. El valor de P₄ medido en el día +5 en los ciclos de transferencias de blastocisto no predice el embarazo ni el aborto.
4. La administración desde el día 0 de P₄ subcutánea junto con la vaginal eleva los niveles en sangre de P₄, pero no aumenta la tasa de embarazo.
5. Sería necesario revisar el punto de corte de la P₄ a partir del cual se verían disminuidos significativamente los resultados clínicos y de laboratorio. Nuestro dintel de P₄ está más cerca del 8 que del 10,5 ng/ml, a expensas de ampliar el grupo control.
6. El programa de TEC aporta a las pacientes una solución efectiva para aumentar su tasa de embarazo, superando los resultados del ciclo en fresco.

6.2 Conclusiones histología endometrial - ciclo piloto

1. El valor de P₄ el día +5 de sustitución hormonal no guarda relación con los parámetros histológicos que definen la fase predominante del endometrio.
2. Sólo la reacción decidual mostró correlación con el valor de la progesterona. A mayor nivel mayor reacción decidual.
3. Hasta ahora sin realizar la determinación de P₄ se han obtenido buenas tasas de gestación, pero su medida puede contribuir a determinar qué pacientes son deficitarias en su absorción.
4. La histología no guarda relación con la tasa de embarazo.
5. Realizar el ciclo piloto permitió que 5 mujeres de 14 se quedaran embarazadas después de 3 o más ciclos fallidos. No podemos asegurar si hubo efecto *scratching* o fue el aumento de la dosis y el cambio de la vía de administración. Se precisa aumentar el tamaño muestral para poder hacer afirmaciones en ese sentido.

7. ¿Qué hemos aprendido durante este TFG?

Con este trabajo hemos aprendido a presentar una investigación al Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del CHUC, realizar un protocolo, consentimientos informados para las pacientes y la solicitud a la agencia española del medicamento, requisito para investigar con fármacos.

Hemos aprendido a trabajar en equipo con diferentes servicios y a hacerlo por vía telemática debido a la pandemia mundial COVID-19 en la que nos vimos envueltos a mitad del estudio.

Hemos mejorado nuestra capacidad, ya aprendida durante la carrera, de citar mediante las Normas Vancouver y afianzar la importancia que tiene la investigación médica en cuanto a ampliar y actualizar los conocimientos.

Realizar la actividad asistencial en base al estudio de las investigaciones y las evidencias científicas publicadas es un valor para ofrecer la mejor calidad asistencial y actuar en base a los principios fundamentales de la bioética con los pacientes. Esto nos lo han demostrado tanto la tutora como las colaboradoras de este trabajo.

8. Bibliografía

1. Zegers-Hochschild F, Adamson G, Mouzon JD, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. Journal article - Fertility and Sterility, Vol. 92, No. 5, November 2009;24(11):2683–7.
2. Alamá-Faubel P, Remohí-Giménez JA. Los estudios y tratamientos de la infertilidad. Libro blanco sociosanitario “La Infertilidad en España: Situación Actual y Perspectivas”. SEF 2011. P 43-51.
3. Chatterjee A, Saha D, Niemann H, Gryshkov O, Glasmacher B, Hofmann N. Effects of cryopreservation on the epigenetic profile of cells. Cryobiology. 2017; 74:1-7.
4. Cano D, Blanes R, Hess S, González J, Vaca R, Fernández A, et al. Influencia de los medios y día de vitrificación en los resultados en pacientes con transferencia diferida. Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2017; 34:3-11.
5. Konc J, Kanyó K, Kriston R, Somoskői B, Cseh S. Cryopreservation of Embryos and Oocytes in Human Assisted Reproduction. BioMed Research International. 2014Mar;2014:1–9.
6. Kolibianakis EM, Venetis CA, Tarlatzis BC. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: which one is better? Curr Opin Obstet Gynecol. 2009; 21(3):270-4.
7. Loutradi KE, Sc MM, Kolibianakis EM, Ph D, Venetis CA, Sc M, et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. Fertil Steril. 2008; 90(1):186-93.
8. Abdelhafez FF, Desai N, Abou-setta AM, Falcone T, Goldfarb J. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. Reprod Biomed Online. 2010; 20(2):209–22.
9. Stehlik E, Stehlik J, Katayama KP, Kuwayama M, Jambor V, Brohammer R, et al. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. Reprod Biomed Online. 2005; 11(1):53–7.
10. Wong JY, Wong AY. Phasing-in of vitrification into routine practice: why, how, and what. 2011; 17(2):119–26.

11. Li Z, Wang YA, Ledger W, Edgar DH, Sullivan EA. Clinical outcomes following cryopreservation of blastocysts by vitrification or slow freezing: a population-based cohort study. *Hum Reprod.* 2014; 29(12): 2794-801.
12. Elliott GD, Wang S, Fuller BJ. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology.* 2017Jun;76:74–91.
13. Lucas CC, Melo LR, Luzia M, Martins N, Morais GB De, Martins MF, et al. Cryoprotectant agents and cooling effect on embryos of *Macrobrachium amazonicum*. *Zygote.* 2018; 15:1-8.
14. Ávila-Portillo, LM, Madero, JI, López, C, León, MF, Acosta, L, Gómez, C et al. Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología.* 2006; 57(4): 291-300.
15. Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohí J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril.* 2008; 89(6):1657-64.
16. Xue Y, Tong X, Zhu H, Li K, Zhang S. Freeze-all embryo strategy in poor ovarian responders undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Gynecol Endocrinol.* 2018; 21:1-4
17. Azcona-Ruiz B; Campo G; Zabaleta J. Síndrome de hiperestimulación ovárica. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra, [S.l.], p. 19-27, may. 2009. ISSN 1137-6627.*
18. Wang A, Santistevan A, Cohn H, Ph D, Copperman A. Freeze-only versus fresh embryo transfer in a multicenter matched cohort study: contribution of progesterone and maternal age to success rates. *Fertil Steril.* 2017; 108(2):254-261.
19. Kol S, Solt I. GnRH agonist for triggering final oocyte maturation in patients at risk of ovarian hyperstimulation syndrome: Still a controversy? *J Assist Reprod Genet.* 2008; 25(2–3):63–6.
20. Acevedo B, Gomez-Palomares JL, Ricciarelli E, Hernández ER. Triggering ovulation with gonadotropin-releasing hormone agonists does not compromise embryo implantation rates. *Fertility and Sterility.* 2006 Oct;86(6):1682–7.
21. Wu Z, Li R, Ma Y, Deng B, Zhang X, Meng Y, et al. Effect of HCG-day serum progesterone and oestradiol concentrations on pregnancy outcomes in GnRH agonist cycles. *Reprod Biomed Online.* 2012;24(5):511–20.

22. Dieamant FC, Petersen CG, Mauri AL, Comar V, Mattila M, Vagnini LD, et al. Review Fresh embryos versus freeze-all embryos - transfer strategies: Nuances of a meta-analysis. 2017; 21(3):260–72.
23. Wong KM, Wely M, Mol F, Repping S, Mastenbroek S. Fresh versus frozen embryo transfers in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;3:Cd011184
24. Roque M, Lattes K, Serra S, Solà I, Geber S, Carreras R, et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*. 2013 Jan;99(1):156–62.
25. Coates A, Kung A, Mounts E, Hesla J, Bankowski B, Barbieri E, et al. Optimal euploid embryo transfer strategy, fresh versus frozen, after preimplantation genetic screening with next generation sequencing: a randomized controlled trial. *Fertility and Sterility*. 2017; 107(3): 723-730.
26. Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, LaBarbera AR, Kaser DJ, Ubaldi FM, et al. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update*. 2017;23(2):139–55.
27. Sekhon L, Lee JA, Flisser E, Copperman AB, Stein D. Blastocyst vitrification, cryostorage and warming does not affect live birth rate, infant birth weight or. *Reprod Biomed Online*. 2018; 37(1):33–42.
28. Zeng M, Su S, Li L. Comparison of pregnancy outcomes after vitrification at the cleavage and blastocyst stage: a meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2017Sep22;35(1):127–34.
29. Berrin A, Isıl K, Baris A, Goktan K, Seda S. A comparison of the survival and implantation rates of blastocysts that were vitrified on post- fertilization day five, six and seven. *Hum Fertil*. 2018; 3:1–8.
30. Tan J, Kan A, Hitkari J, Taylor B, Tallon N, Warraich G, et al. The role of the endometrial receptivity array (ERA) in patients who have failed euploid embryo transfers. *J Assist Reprod Genet*. 2018; 35(4):1–10.
31. Reyes-Hernández M. Estudio del valor de la progesterona el día de la descarga ovulatoria en ciclos de FIV/ICSI. Trabajo de fin de titulación. La Laguna. Fundación General Universidad de La Laguna, 2017.
32. Aghahosseini M, Aleyasin A, Sarfjoo FS, Mahdavi A, Yaraghi M, Saeedabadi H. In vitro fertilization outcome in frozen versus fresh embryo transfer in women with

- elevated progesterone level on the day of HCG injection: An RCT. *Int J Reprod BioMed*. 2017; 15(12):757–62.
33. Díaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Alamá P, Pellicer A. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Genetics. Fertil Steril*. 2011; 95(1):50-60.
 34. Young SL, Savaris RF, Lessey BA, Sharkey, Balthazar U, Zaino RJ, et al. Effect of randomized serum progesterone concentration on secretory endometrial histologic development and gene expression. *Hum Reprod*. 2017; 32(9):1903-1914.
 35. Van der Linden M, Buckingham K, Farquhar C, Kremer JA, Metwally M. Luteal phase support for assisted reproduction cycles (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2015; 7(7):CD009154.
 36. Labarta E, Mariani G, Holtmann N, Celada P, Remohí J, Bosch E. Low serum progesterone on the day of embryo transfer is associated with a diminished ongoing pregnancy rate in oocyte donation cycles after artificial endometrial preparation: a prospective study. *Human Reproduction*. 2017 Oct 13; 32(12):2437–42.
 37. Gaggiotti-Marre S, Martínez F, Coll L, García S, Álvarez M, Parriego M, et al. Low serum progesterone the day prior to frozen embryo transfer of euploid embryos is associated with significant reduction in live birth rates. *Gynecological Endocrinology*. 2018 Dec 26; 35(5):439–42.
 38. Hull MG, Savage PE, Bromham DR, Ismail AA, Morris AF. The value of a single serum progesterone measurement in the midluteal phase as a criterion of a potentially fertile cycle ("ovulation") derived from treated and untreated conception cycles. *Fertil Steril*. 1982 Mar; 37(3):355-60.
 39. Huang B, Ren X, Wu L, Zhu L, Xu B, Li Y, et al. Elevated Progesterone Levels on the Day of Oocyte Maturation May Affect Top Quality Embryo IVF Cycles. *PLoS ONE*. 2016; 11(1): 4–11.
 40. Venetis, CA, Kolibianakis, EM, Bosdou, JK, Tarlatzis, BC. Progesterone elevation and probability of pregnancy after IVF: a systematic review and meta-analysis of over 60000 cycles. *Hum Reprod Up*. 2013; 19(5):433–457.
 41. Bosch E, Labarta E, Crespo J, Simón C, Remohí J, Jenkins J, et al. Circulating progesterone levels and ongoing pregnancy rates in controlled ovarian stimulation cycles for in vitro fertilization: Analysis of over 4000 cycles. *Hum Reprod*. 2010; 25(8):2092–100.
 42. Ross, M., Pawlina, W. and Kaye, G., 2005. *Histología*. Buenos Aires: Panamericana.

43. Díaz Calle C, Sánchez Escobar F. El endometrio en la infertilidad. Histología y fechado endometrial. Rev. Colomb. Obstet. Ginecol. [Internet]. 30 de junio de 1993 [citado 7 de abril de 2020];44(2):115-20.
44. Chicon Socas M, Báez Quintana DR, Blanes Zamora R, Vaca Sánchez R, Carballo Lorenzo J, Rodríguez Díaz R, et al. ¿Influye el valor de progesterona el día de la descarga ovulatoria en los resultados del ciclo de descongelación? 32º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF). 7º Congreso Nacional de Enfermería de la Reproducción. Madrid. 2018. Medicina Reproductiva y Embriología Clínica. Vol. 5. Pág. 70.
45. González-Foruria I, Gaggiotti-Marre S, Álvarez M, Martínez F, García S, Rodríguez I, et al. Factors associated with serum progesterone concentrations the day before cryopreserved embryo transfer in artificial cycles. Reproductive BioMedicine Online. 2020 Jun;40(6):797–804.
46. Alur-Gupta S, Hopeman M, Berger DS, Barnhart KT, Senapati S, Gracia C. Measuring serum estradiol and progesterone one day prior to frozen embryo transfer improves live birth rates. Fertility Research and Practice. 2020Apr14;6(1).
47. Griesinger G, Mannaerts B, Andersen CY, Witjes H, Kolibianakis EM, Gordon K. 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. Fertility and Sterility. 2013Dec;100(6).
48. Lawrenz B, Labarta E, Fatemi H, Bosch E. Premature progesterone elevation: targets and rescue strategies. Fertility and Sterility. 2018 Apr;109(4):577–82.
49. Lawrenz B, Samir S, Melado L, Ruiz F, Fatemi HM. Luteal phase serum progesterone levels after GnRH-agonist trigger - how low is still high enough for an ongoing pregnancy? Gynecol Endocrinol. 2018; 34(3):195–8.
50. Roque M, Valle M, Guimarães F, Sampaio M, Geber S. Cost-Effectiveness of the Freeze-All Policy. JBRA Assisted Reproduction. 2015;19(3):125–30.
51. Zhang W, Xiao X, Zhang J, Wang W, Wu J, Peng L, et al. Clinical outcomes of frozen embryo versus fresh embryo transfer following in vitro fertilization: a meta-analysis of randomized controlled trials. Archives of Gynecology and Obstetrics. 2018Jun7;298(2):259–72.

52. Cai Q, Wan F, Appleby D, Hu L, Zhang H. 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.* 2014; 31(2):185–94.
53. Labarta E. Is progesterone an essential hormonal marker in the luteal phase of a FET cycle? IBSA Educational Program. [video] 2020May25. Available in: <https://youtu.be/5TrfcCDMzY8>
54. Olesen MS, Hauge B, Ohrt L, Olesen TN, Roskær J, Bæk V, et al. Therapeutic endometrial scratching and implantation after in vitro fertilization: a multicenter randomized controlled trial. *Fertility and Sterility.* 2019Dec;112(6):1015–21.