

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Obstetricia y Ginecología



TESIS DOCTORAL

**Efecto de la elevación precoz de progesterona sobre la efectividad de la
fecundación in vitro**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Miguel Caballero Campo

Directores

**Luis Ortiz Quintana
Federico Pérez Milán**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA



**EFFECTO DE LA ELEVACIÓN PRECOZ DE
PROGESTERONA SOBRE LA EFECTIVIDAD DE
LA FECUNDACIÓN IN VITRO**

TESIS DOCTORAL

Miguel Caballero Campo

Directores:

**Luis Ortiz Quintana
Federico Pérez Milán**

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA



**EFFECTO DE LA ELEVACIÓN PRECOZ DE
PROGESTERONA SOBRE LA EFECTIVIDAD DE
LA FECUNDACIÓN IN VITRO**

TESIS DOCTORAL

Miguel Caballero Campo

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

D. LUIS ORTIZ QUINTANA, Profesor Titular del Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado “**Efecto de la elevación precoz de progesterona en la efectividad de la fecundación in vitro**”, del que es autor **D. Miguel Caballero Campo**, ha sido realizado bajo su dirección, y reúne las características necesarias para para su presentación y defensa pública con el fin de optar al Grado de Doctor.

Y para que conste, firma el presente certificado en Madrid, a 15 de octubre de 2015.

Prof. L. Ortiz Quintana



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

D. FEDERICO PÉREZ MILÁN, Profesor Asociado del Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado “**Efecto de la elevación precoz de progesterona en la efectividad de la fecundación in vitro**”, del que es autor **D. Miguel Caballero Campo**, ha sido realizado bajo su dirección, y reúne las características necesarias para para su presentación y defensa pública con el fin de optar al Grado de Doctor.

Y para que conste, firma el presente certificado en Madrid, a 15 de octubre de 2015.

Dr. F. Pérez Milán

ÍNDICE

1. ÍNDICE DE ABREVIATURAS	
2. INDICE DE TABLAS	
3. INDICE DE FIGURAS	
4. RESUMEN/SUMMARY	
5. INTRODUCCIÓN	
5.1. Marco conceptual	
5.1.1. Concepto y frecuencia elevación precoz de progesterona	
5.1.2. Síntesis de progesterona en la esteroidogénesis ovárica fisiológica.....	
5.1.2.1. Regulación de la actividad enzimática CYP17	
5.1.2.2. Regulación de otros enzimas de la esteroidogénesis ovárica.....	
5.1.3. Sensibilidad folicular a las gonadotropinas en el ciclo natural	
5.1.3.1. Acciones gonadotrópicas sobre la granulosa en fase folicular precoz.....	
5.1.3.2. Sensibilidad a LH en la granulosa en fase folicular avanzada	
5.1.3.3. Acciones tecales de LH	
5.1.4. Efectos de la estimulación ovárica sobre la síntesis de progesterona	
5.1.5. Papel de la progesterona en la regulación molecular de la receptividad endometrial	
5.1.6. Efectos de la elevación precoz de progesterona sobre la receptividad endometrial	
5.1.7. Efectos de la elevación precoz de progesterona sobre los resultados gestacionales de la FIV-TE	
5.1.8. Factores asociados a la elevación precoz de progesterona durante la estimulación ovárica y a su efecto sobre resultados los gestacionales.....	
5.1.9. Estimadores complementarios y alternativos de EPP en relación con ¿?.....	
5.2. Justificación del estudio	
6. OBJETIVOS	
6.1. General	
6.2. Específicos.....	
6.2.1. Principal	
6.2.2. Secundarios	
7. HIPÓTESIS.....	
7.1. Conceptuales	
7.2. Operativas.....	

8. MATERIAL Y MÉTODOS	
8.1. Diseño	
8.2. Ámbito y fuentes de información.....	
8.3. Población de interés.....	
8.4. Población de estudio: criterios de selección	
8.5. Definición de variables	
8.6. Métodos de observación y medida	
8.6.1. Criterios diagnósticos y unidades de medida	
8.6.2. Métodos de cuantificación específicos.....	
8.7. Procedimiento	
8.7.1. Fase de tratamiento	
8.7.2. Periodo de observación.....	
8.8. Reclutamiento de participantes.....	
8.9. Determinación del tamaño muestral	
6.10. Métodos estadísticos	
9. RESULTADOS	
9.1. Descripción de variables	
9.1.1. Características basales y antecedentes de las pacientes	
9.1.2. Características de la estimulación ovárica	
9.1.3. Resultados de la estimulación ovárica	
9.1.4. Características y resultados del proceso de fecundación	
9.1.5. Resultados gestacionales	
9.2. DISCUSIÓN	
10. CONCLUSIONES	
11. BIBLIOGRAFÍA	37

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

3 β -HSD	3 β -HSD hidroxiesteroide –deshidrogenasa
AUC	Area under the curve
CitP450	Citocromo p-450
DAR	Diferencia absoluta de riesgos
DHEA	Dehidroepiandrosterona
EGF	epidermal growth factor
EPP	Elevación precoz de progesterona
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FIV –TE	Fecundación in vitro
FOX 1	forkhead box 1
FSH	Hormona folículo estimulante
FSHr	Hormona folículo estimulante recombinante
FSHu	Hormona folículo estimulante urinaria
GnRH	Hormona liberadora de Gonadotropina
HCG	Gonadotropina Coriónica Humana
HMG	Hormona gonadotropa de menopausia
IC	Intervalo de confianza
ICSI	Intracytoplasmatic sperm injection
IGF-I	Insulin growth factor -I
IGF-II	Insulin growth factor -II
IHH	indian hedgehog
IMC	Índice de masa corporal
Klf	Kruppel-like factor
LH	Hormona luteotropa
LHr	Hormona luteotroparecombinante
MAP-kinasa	Mitogen –activated protein kinase
Mig-6	Mitogen inducible gens-6
MMP	Metaloproteinasas de matriz extracelular
NK	Natural Killer
NNH	Number needed to harm
OR	Odds Ratio
P	Progesterone
P450arom	Aromatase enzyme
P450scc	P450 side-chain cleavage enzyme
PFI	Progesterone –to-follicle index
PR	Progesterone receptors
RP	Receptores de Progesterona
RFA	Recuento de Folículos antrales
RR	Riesgo relativo
SOP	Síndrome de ovario poliquístico
SRC	receptor epitelial de estrógenos
STAR	steroid acute regulatory protein
TE	Transferencia embrionaria
TGF-b	transforming growth factor b
UI	Unidades internacionales
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
Wnt	Wingless-Type MMTV integration site

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características basales de las pacientes y antecedentes del proceso de esterilidad.

Tabla 2: Características de la estimulación ovárica.

Tabla 3: Resultados de la estimulación ovárica y de la técnica de fecundación.

Tabla 4: Resultados gestacionales por ciclo iniciado.

Tabla 5: Asociación y magnitud de efecto de la progesterona sérica final sobre la frecuencia de implantación embrionaria según diferentes criterios de dicotomización

Tabla 6: Asociación y magnitud de efecto de la progesterona sérica final sobre la frecuencia de gestación clínica según diferentes criterios de dicotomización

Tabla 7: Asociación y magnitud de efecto de la progesterona sérica final sobre la frecuencia de nacido vivo según diferentes criterios de dicotomización

Tabla 8: Asociación y magnitud de efecto de la progesterona sérica final sobre la frecuencia aborto según diferentes criterios de dicotomización

Tabla 9: Asociación y magnitud de efecto de la progesterona sérica final sobre la frecuencia de gestación bioquímica según diferentes criterios de dicotomización

Tabla 10: Asociación y magnitud de efecto de covariables relacionadas con características basales de las pacientes y antecedentes del proceso de esterilidad sobre nacido vivo

Tabla 11: Asociación y magnitud de efecto de covariables relacionadas con la estimulación ovárica sobre nacido vivo.

Tabla 12: Asociación y magnitud de efecto de covariables relacionadas con la fecundación y la transferencia embrionaria sobre nacido vivo

Tabla 13: Asociación y magnitud de efecto de covariables relacionadas con características basales de las pacientes y antecedentes del proceso de esterilidad sobre progesterona final

Tabla 14: Asociación y magnitud de efecto de covariables relacionadas con la estimulación ovárica sobre progesterona

Tabla 15: Asociación y magnitud de efecto de covariables relacionadas con la fecundación y transferencia embrionaria sobre progesterona

Tabla 16: Análisis Univariado del efecto de la elevación de la progesterona sobre la frecuencia de nacido vivo

Tabla 17: Análisis bivariado del efecto de la progesterona sobre la probabilidad de nacido vivo según covariables asociadas

ÍNDICE DE FIGURAS

- **Figura 1:** Distribución cronológica de los ciclos de tratamiento durante el periodo de estudio.
- **Figura 2:** Distribución de la edad de las pacientes según estratos estándar para registros de efectividad.
- **Figura 3:** Distribución del IMC por estratos ponderales de la OMS.
- **Figura 4:** Distribución del recuento basal de folículos antrales.
- **Figura 5:** Distribución de la concentración sérica basal de FSH.
- **Figura 6:** Años de duración de la esterilidad.
- **Figura 7:** Frecuencia de factores causales de esterilidad.
- **Figura 8 :** Distribución de ciclos previos de tratamiento con FIV-TE y criotransferencia.
- **Figura 9 :** Distribución de niveles basales de progesterona sérica.
- **Figura 10:** Distribución de ciclos por protocolo de análogo GnRH empleado.
- **Figura 11:** Distribución de ciclos por dosis inicial de actividad FSH (UI/día).
- **Figura 12:** Distribución de ciclos por dosis inicial de actividad LH.
- **Figura 13:** Distribución de ciclos por consumo de actividad FSH.
- **Figura 14:** Distribución de ciclos por protocolo de análogo GnRH empleado.
- **Figura 15:** Distribución de ciclos por duración del tratamiento con antagonista GnRH.
- **Figura 16:** Distribución de ciclos por duración de la estimulación ovárica.
- **Figura 17:** Distribución de ciclos por concentración sérica de estradiol en día de HCG.
- **Figura 18:** Distribución de ciclos por concentración sérica de progesterona en día de HCG.
- **Figura 19:** Distribución de ciclos por número y tamaño de folículos visibles en día de HCG.
- **Figura 20:** Distribución de ciclos por número de ovocitos maduros obtenidos.
- **Figura 21:** Distribución de ciclos por técnica de fecundación.
- **Figura 22:** Número de embriones en división en segundo día de cultivo.
- **Figura 23:** Número de embriones evolutivos en el día de la transferencia.
- **Figura 23:** Número de embriones evolutivos en el día de la transferencia.
- **Figura 24:** Número de embriones de tipo A-B disponibles en el día de la transferencia.
- **Figura 25:** Distribución porcentual de ciclos por número de embriones transferidos.

- **Figura 26:** Distribución porcentual de ciclos por número de embriones A-B transferidos.
- **Figura 27:** Frecuencia de ciclos con preservación embrionaria por número de embriones preservados.
- **Figura 28:** Frecuencia de ciclos con preservación embrionaria por número de embriones preservados.
- **Figura 29:** Frecuencia de implantación embrionaria según estratos de progesterona: intervalos de amplitud fija (A), estratificada por múltiplos de la mediana (B) y por deciles (C).
- **Figura 30:** Diferencia absoluta de riesgos de la tasa de implantación según diferentes puntos de corte en la distribución de progesterona sérica final (ng/mL).
- **Figura 31:** Curva ROC de evaluación de progesterona sérica final como predictor de gestación clínica.
- **Figura 32:** Frecuencia relativa de gestación clínica por estratos de progesterona: intervalos de amplitud fija (A), estratificada por múltiplos de la mediana (B) y por deciles (C).
- **Figura 33:** Frecuencia relativa de gestación clínica por estratos de progesterona comprendidos entre percentiles 90 y 100.
- **Figura 34:** Riesgos relativos de gestación clínica según diferentes puntos de corte en la distribución de progesterona sérica final (ng/mL).
- **Figura 35:** Curva ROC de evaluación de progesterona sérica final como predictor de nacido vivo.
- **Figura 36:** Frecuencia relativa de nacido vivo por estratos de progesterona: intervalos de amplitud fija (A), estratificada por múltiplos de la mediana (B) y por deciles (C).
- **Figura 37:** Frecuencia relativa de gestación clínica por estratos de progesterona comprendidos entre percentiles 90 y 100.
- **Figura 38:** Riesgos relativos de nacido vivo según diferentes puntos de corte en la distribución de progesterona sérica final (ng/mL).
- **Figura 39:** Curva ROC de evaluación de progesterona sérica final como predictor de aborto.
- **Figura 40:** Frecuencia relativa de aborto por estratos de progesterona: intervalos de amplitud fija (A), estratificada por múltiplos de la mediana (B) y por deciles (C).
- **Figura 41:** Curva ROC de evaluación de progesterona sérica final como predictor de gestación bioquímica.

- **Figura 42:** Frecuencia relativa de aborto por estratos de progesterona: intervalos de amplitud fija (A), estratificada por múltiplos de la mediana (B) y por deciles (C).

RESUMEN

TÍTULO DEL ESTUDIO

Efecto de la elevación precoz de progesterona sobre la efectividad de la fecundación in vitro.

ÁMBITO DEL ESTUDIO

Clínica Tambre C/ Tambre, 8 28002 Madrid

OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar el efecto de la elevación precoz de la progesterona sérica durante la hiperestimulación ovárica controlada para fecundación in vitro sobre la probabilidad de gestación clínica evolutiva y de nacido vivo.

DISEÑO

Estudios de cohortes retrospectivo

PALABRAS CLAVE

Elevación de progesterona, fecundación in vitro, nacido vivo

MARCO CONCEPTUAL Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La elevación precoz de progesterona ha sido catalogada como un efecto colateral desfavorable de la estimulación ovárica, que produce un aumento de la masa de células granulosas capaces de sintetizar progesterona y favorece su producción. La exposición precoz del endometrio a la progesterona puede producir una alteración de la regulación de la ventana de implantación, y reducir la probabilidad de implantación embrionaria, de gestación clínica y de nacido vivo.

El efecto de la progesterona puede ser interferido por el de otras variables que pueden condicionar el resultado gestacional del ciclo de FIV-TE. En concreto, se ha sugerido que la intensidad de respuesta a la estimulación y la dosis de gonadotropinas pueden estar en relación con la cantidad de progesterona sintetizada. Igualmente, el número de ovocitos obtenidos y el número y calidad de los embriones disponibles y transferidos podrían modular el efecto adverso de la elevación precoz de progesterona.

OBJETIVOS:

Evaluar la asociación de la elevación precoz de progesterona con la frecuencia de nacido vivo, ajustando su efecto por el resto de variables independientes relacionadas con este resultado. Como objetivo secundario, el estudio pretende analizar la asociación con implantación embrionaria, gestación clínica y aborto,

METODOLOGÍA:

Análisis de asociación entre exposición a elevación precoz de progesterona y variables de resultado gestacional, mediante pruebas estadísticas de contraste adecuadas. Estimación de magnitud de efecto, mediante el riesgo relativo y la diferencia de riesgos, aplicando análisis univariado, bivariado y multivariado

RESULTADOS:

Se analiza una cohorte de 3741 ciclos de FIV con transferencia embrionaria, realizados entre 2003 y 2013. Se ha identificado asociación significativa entre la progesterona sérica en el día de la HCG y la frecuencia de implantación embrionaria, gestación clínica y nacido vivo, pero no con aborto. Se ha estimado un umbral de exposición a progesterona para cada tipo de resultado.

Ninguna de las covariables asociadas tanto con obtención de nacido vivo como con la elevación precoz de la progesterona ejerció interacción ni confusión en el efecto de la progesterona sobre el resultado del ciclo.

La elevación de la progesterona sérica, junto con la dosis de FSH, el número de embriones transferidos y de calidad, y la existencia de embriones para criopreservar se asociaron como a la obtención de nacido vivo variable independiente. El número de ovocitos obtenidos y el tratamiento con LH no fueron identificadas como variables independientes.

CONCLUSIONES:

La elevación precoz de progesterona reduce la frecuencia de nacido vivo, y se asocia a menor frecuencia de implantación y gestación clínica, pero no muestra relación con aborto. El punto de corte en la distribución de progesterona más adecuado para estimar el efecto fue distinto para cada resultado. La asociación entre elevación precoz de progesterona y reducción de la frecuencia de nacido vivo no fue interferida por el efecto de ninguna covariable. La elevación precoz de progesterona tuvo un efecto sobre la frecuencia de nacido vivo independiente del resto de las variables explicativas (edad, dosis de FSH, número y calidad de los embriones disponibles y transferidos, y existencia de embriones para criopreservar).

TITTLE

Effect of early progesterone elevation on the IVF effectiveness.

SETTING

Clínica Tambre C/ Tambre, 8 28002 Madrid

OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluate the effect of early progesterone rise during controlled ovarian hyperstimulation IVF cycle and it deleterious effect on pregnancy and life birth rates.

DESIGN

Retrospective cohort study

KEY WORDS

Early Progesterone elevation, Life birth rate, IVF

PATIENTS

Progesterone elevations were first described, during follicular advanced stages of ovarian stimulation in IVF treatments, occurred in the context of cycles without suppression of pituitary function by using GnRH analogues. These elevations were blamed on the occurrence of undetected peaks of endogenous LH in response to supraphysiological increase of estradiol. In the cycles with multiple follicular development, the absence of a dominant follicle dominance and multiple development of greater follicles cohort, leads to supraphysiological estradiol synthesis and an increase in progesterone production. This phenomenon is known as premature luteinization.

However the systematic use of GnRH analogues has not suppressed the progesterone early elevations in all cases. "Premature luteinization" has lost relevance today, since in most PPE, can not show increases in serum LH. EEP deleterious effect on pregnancy in IVF cycles remains controversial. The early increase in progesterone (PPE) has been described with frequencies ranging 35-38% of stimulation cycles under protocol agonist or antagonist to far lower of 8.9% estimated large retrospective studies .

Most frequently used indicator to estimate EPP incidence is serum on the day of hCG administration, which can be a source of systematic error. Heterogeneity of these observations are probably due to different causes. Most PPE initial studies defined by arbitrary stratifications in serum progesterone level in ranges of between 0.8 and 2 ng / mL. Most recently published studies, also made with modern methods of quantification have selected more consistently cut of levels of 1.5 ng / mL of serum progesterone rise.

OBJECTIVES

To assess early progesterone association with life birth rate, adjusting by independent related variables. As a secondary goal we aim to assess association with implantation, pregnancy and miscarriage rate.

METHODS

Association analysis between early progesterone rise and primary results variables, on going pregnancy. Estimation of effects magnitude through relative risk, difference of risks, with contrast appropriate statistical tests. We have applied univariate, bivariate and multivariate analysis.

RESULTS

We analysed 3741 cycles of transferred IVF patients with known pregnancy results between 2003 and 2013. We have identified a significant correlation between serum progesterone on HCG, and implantation rate, on going pregnancy rate and life birth rate but not with miscarriage. We have estimated the cut-off value for all the associated results variables.

CONCLUSIONS

Early progesterone elevation reduces life birth rates, on going pregnancy rates and implantation rates but it does not affect miscarriage. The cut-off point in our sample was different for each of the results variables. Association between early progesterone elevation and life birth rate was not affected for any of the other potential modifying factors. Early progesterone rise had an independent effect on life birth rate which was not affected by any other modifying variables (age, FSH dosages, number and quality of embryos available and transferred and cryopreserved embryos).

5. INTRODUCCIÓN

5.1. MARCO CONCEPTUAL

5.1.1. Concepto y frecuencia de elevación precoz de progesterona

Las primeras observaciones de la elevación de la progesterona durante la fase avanzada de la estimulación ovárica para FIV-TE se produjeron en el contexto de ciclos sin supresión de la función hipofisaria mediante el uso de análogos agonistas de la GnRH (1). Estas elevaciones fueron achacadas a la aparición de picos no detectados de LH endógena en respuesta a la elevación suprafisiológica del estradiol (2).

Este mecanismo, denominado entonces 'luteinización prematura', debía ser por tanto susceptible de prevención por medio la desensibilización hipofisaria con protocolo largo de agonistas GnRH. Sin embargo, se constató que el uso de agonistas no era capaz de suprimir la elevación precoz de la progesterona (EPP) en la totalidad de los ciclos de estimulación. Para explicar este fenómeno, algunos autores invocaron el bloqueo incompleto de la función hipofisaria, que sería inhábil para producir un pico de LH con capacidad de desencadenar la reanudación de la maduración ovocitaria, pero podría ser capaz de estimular la expresión de genes reguladores de la síntesis de progesterona (3, 4). Para otros autores, esta hipótesis resultaba poco compatible con las evidencias sobre la profunda supresión de la liberación de LH bajo protocolos largos de agonista GnRH, que a menudo se asocian a niveles de LH extremadamente bajas (5).

La generalización del uso de frenación hipofisaria con agonistas GnRH permitió la acumulación de observaciones de ciclos de estimulación con niveles persistentemente bajos de LH, que sin embargo cursaban con incrementos de progesterona sérica al final de la estimulación superiores a los normalmente observados durante la fase folicular tardía de ciclos espontáneos (6-8). Estos hechos sirvieron de base para cuestionar la interpretación de este fenómeno como fruto de una diferenciación luteinizante, ya que la producción de la progesterona, probablemente fruto de la actividad esteroideogénica de la

granulosa folicular en desarrollo, se producía en ausencia de elevaciones de la LH. Por ello, Venetis propuso en 2007 la supresión del término 'luteinización prematura' para aludir a estos cambios funcionales (9). Como este mismo autor señala, este cambio conceptual no excluye la posibilidad, infrecuente por otra parte, de que el origen de la elevación precoz de la progesterona pueda ser un escape esporádico de LH endógena como consecuencia de una mala absorción de la dosis de análogo agonista, de un intervalo horario entre dosis inadecuado, o de otras situaciones que pudieran afectar a la biodisponibilidad del fármaco. Por añadidura, la existencia real de picos endógenos de LH ha sido documentada en el curso de ciclos bajo protocolo de antagonista (10) y en ciclos espontáneos naturales o modificados (11, 12).

La frecuencia de la elevación precoz de la progesterona al término de la estimulación ovárica para FIV-TE continúa siendo motivo de controversia en la literatura. La EPP ha sido descrita con frecuencias que varían entre el 35-38 % de los ciclos de estimulación bajo protocolo de agonista (13, 14) o de antagonista (6, 15) hasta cifras muy inferiores y en torno al 8-9% estimada en estudios retrospectivos amplios (16). Hay que señalar, como reserva conceptual, que el indicador más frecuentemente utilizado para la estimación de la frecuencia de la EPP es su concentración sérica en el día de administración de HCG, lo cual puede constituir una fuente de error sistemático. La heterogeneidad de estas observaciones deriva probablemente de diferentes causas. En primer lugar, la mayoría de los estudios iniciales definieron la EPP mediante estratificaciones arbitrarias en el nivel de progesterona sérica, en rangos comprendidos entre 0.8 y 2 ng/mL (3, 13, 17). Los estudios de más reciente publicación, elaborados además con métodos modernos de cuantificación, han seleccionado más consistentemente niveles de corte de 1,5 ng/mL de progesterona sérica para definir la elevación precoz de la misma (16, 18, 19). Diversos autores han descrito que la exposición a niveles de progesterona superiores a este punto de corte se asocian a cambios relevantes en el perfil de expresión génica endometrial, y a una reducción en la frecuencia de nacido vivo (20).

Una segunda fuente de variabilidad en la frecuencia estimada de EPP estaría en relación con el procedimiento de cuantificación utilizado. La heterogeneidad de los procedimientos analíticos comercializados para la cuantificación de progesterona constituye probablemente una limitación en la comparabilidad de los estudios de importancia no desdeñable. Los equipos comerciales de reactivos para la cuantificación de progesterona fueron desarrollados, en su mayor parte, para la determinación de niveles séricos propios de fase lútea, y los menos versátiles están dotados de sensibilidades del orden de 5-10 veces menores de las necesarias para determinar

fiablemente niveles de progesterona habituales en fase folicular (21) por lo que sus mediciones están afectadas por un grado considerable de imprecisión.

Un estudio belga sobre reproducibilidad y fiabilidad de seis sistemas automatizados de determinación analítica de progesterona concluyó que los coeficientes de variación entre laboratorios obtenidos tras el análisis de cinco muestras variaron entre 6 y 45%. Se observaron desviaciones de los valores obtenidos respecto al patrón estándar comprendidas entre -23% y 81%. Varios sistemas mostraron sobreestimaciones de al menos un 25 % en las determinaciones de una de las muestras. La regresión lineal mostró una tendencia ajustada hacia la sobreestimación de un 7-41% (22).

En relación con la precisión analítica de las determinaciones de progesterona, Patton ha publicado recientemente un estudio comparativo de métodos comercializados para la determinación de la concentración sérica de progesterona mediante quimioluminiscencia (*Immolute 1000*, Siemens Healthcare Diagnostics; *Access II Immunoassay System*, Beckman Coulter; *Tosoh AIA 600II*, Tosoh Biosciences; *Roche Cobas e411*, Roche Diagnostics), aplicados en cuatro diferentes laboratorios y utilizando como medida de la variabilidad los coeficientes de variación inter e intraensayo. Para la medida de las desviaciones respecto al 'patrón oro' se consideraron como valores de referencia los obtenidos por medio de cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem. Cada centro procesó tres alícuotas de cada muestra de suero, repitiendo en tres ocasiones las determinaciones. Se estudió tanto la precisión de la cuantificación de las muestras originales como el efecto sobre la misma de la dilución necesaria para la determinación de concentraciones fuera del rango analítico de cada prueba. Aunque todos los sistemas de cuantificación evaluados mostraron una alta correlación con las determinaciones de la técnica de referencia (R: 0,993; 0,995; 0,995; 0,987) sólo dos de los sistemas presentaron coeficientes de variación intraensayo inferiores al 10 % en todas las mediciones de las tres iteraciones realizadas. Con respecto a la variabilidad interensayo, sólo dos de los sistemas evaluados mostraron coeficientes de variación inferiores al 10 %. Además, el grado de imprecisión no se asoció a un grupo concreto de muestras o a una tanda de determinaciones, sino sólo al procedimiento analítico empleado. En seis de los diez lotes de muestras analizadas, las diferencias entre los valores medios más bajo y más alto determinados por los cuatro procedimientos evaluados fue próxima al 50 % del promedio global, lo que da idea de la magnitud de la variabilidad. La conclusión del estudio es que el nivel de imprecisión de los métodos convencionales de determinación analítica automatizada de progesterona obligan a interpretar cautelosamente los umbrales críticos de progesterona para la toma de decisiones respecto al manejo del ciclo, y en especial, cuando se adoptan puntos de corte procedentes de estudios que han empleado procedimientos distintos del aplicado

en cada centro. La solución ideal sería la utilización de estándares propios validados en la determinación e interpretación clínica de los niveles de progesterona durante la estimulación ovárica (23).

No existe en la actualidad un consenso sobre las características que debe reunir el método analítico apropiado para la determinación de elevaciones leves y moderadas de progesterona, por lo que cada centro debe conocer de forma exhaustiva las propiedades de precisión, exactitud, apreciación, sensibilidad y reproducibilidad de la técnica que emplea (24).

5.1.2. Síntesis de progesterona en la esteroidogénesis folicular fisiológica

La producción de progesterona reside fundamentalmente en el ovario, y en mucha menor medida en las suprarrenales. La progesterona ovárica es resultado de la acción de la 3- β -OH-esteroide-deshidrogenasa sobre la pregnenolona. De acuerdo con la teoría de las dos células-dos gonadotropinas, una parte de la progesterona sintetizada en la granulosa difunde a la teca donde se transforma en 17-OH-progesterona por la acción de la 17- α -hidroxilasa (CYP17), que sólo poseen las células de este compartimento folicular. La 17-OH-progesterona sigue después la ruta de transformación en andrógenos y su conversión posterior a estrógenos.

La síntesis ovárica de progesterona comienza a incrementarse al final de la fase folicular, y de forma claramente anterior al pico de LH (25). Además, existen algunas pruebas de la implicación de este incremento sutil de progesterona en la emergencia del pico de LH (26), y de que la exposición secuencial a niveles adecuados de estrógenos seguidos de progesterona resulta imprescindible para el desencadenamiento del aumento crítico de la LH (27). Estos datos sustentan la teoría de que la progesterona sintetizada en la fase folicular tardía actúa facilitando la retroalimentación positiva ejercida por los estrógenos sobre el centro de control hipotálamo-hipofisario, y contribuye al pico de LH.

El paso enzimático limitante en el proceso de esteroidogénesis ovárica es la transformación de colesterol en pregnenolona, mediado por la actividad de P450_{scc}. La pregnenolona resultante de esta transformación puede seguir tres vías metabólicas diferentes, dos de las cuales existen en el ovario: la vía $\Delta 5$ y la $\Delta 4$.

La vía $\Delta 5$ conduce a la transformación de pregnenolona en 17-hidroxipregnenolona, por la acción de la 17- α -hidroxilasa (CYP17, P450_{17a}), y de ésta, por la misma acción enzimática, en dehidroepiandrosterona, precursora a su vez de la androstendiona. La 17-

α -hidroxilasa, que es en realidad una enzima compleja dotada tanto de actividad hidroxilasa como liasa, se localiza exclusivamente en las células tecaintersticiales del ovario. Por el contrario la P450arom se expresa únicamente en las células granulosas. Por tanto, la teca provee la síntesis de andrógenos, que actúan como sustratos de la aromatización que tiene lugar sólo en el compartimento granuloso del folículo.

La vía $\Delta 4$ se inicia con la transformación de pregnenolona en progesterona, por la acción de la 3- β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (3 β -HSD). Esta conversión es irreversible, como todas las reacciones de deshidrogenización catalizadas por este enzima. A continuación, la progesterona puede ser transformada en 17-hidroxiprogesterona por la acción de CYP17. Esta molécula es terminal en el ovario humano, que no dispone de actividades enzimáticas capaces de metabolizarlo, por lo que, junto con la progesterona, constituyen los productos finales de síntesis de la vía $\Delta 4$ (28). La síntesis de estradiol depende por tanto de forma exclusiva de la testosterona sintetizada por medio de la vía $\Delta 5$, a la que pueden revertir por interconversión parte de la androstendiona, que es un producto de la vía $\Delta 4$. La actividad de la CYP17 es, en consecuencia, el principal modulador del equilibrio entre la síntesis de progesterona y 17-hidroxiprogesterona (29)

La síntesis de andrógenos, predominante en los folículos de pequeño tamaño, tiene un carácter tónico, y como se ha dicho, depende ante todo de la actividad intrínseca de los enzimas responsables. A partir de la aparición del antro folicular aumenta la síntesis de estradiol, en especial en el folículo dominante. Finalmente, el folículo preovulatorio desarrolla una creciente capacidad para la producción de progesterona, sin merma de la producción de estradiol (30). Por el contrario, la producción folicular de progesterona, detectable ya en folículos antrales pequeños (5-6 mm), está en relación directa con el diámetro folicular y con el número de días transcurridos desde la ovulación (31). Durante la fase folicular precoz de un ciclo ovárico normal, las concentraciones de estradiol en la vena ovárica homolateral al ovario donde se localiza en folículo dominante son el doble de las detectables en sangre periférica, y se incrementan aún más durante la fase folicular media (32). La elevación en la concentración de progesterona es detectable también en la fase folicular precoz, antes incluso del establecimiento de la dominancia folicular, y al igual que sucede con el estradiol, su concentración en fase folicular media es muy relevante (32). Este incremento tiene su origen en el folículo dominante, que vierte a la circulación sistémica una fracción de la progesterona que produce. Parte de ésta experimenta además un rápido metabolismo hepático, lo que explica que las concentraciones en sangre periférica en la fase previa a la ovulación no sean aún mayores.

La síntesis global de progesterona, que alcanza niveles generalmente inferiores a 1 mg/día en fase folicular, se incrementa de 20 a 30 veces durante la fase lútea (33). En términos de concentración plasmática, la cantidad de progesterona en fase preovulatoria en mujeres en edad fértil suele ser menor de 100 ng/dL, y se incrementa hasta 500-2000 ng/dL a partir de la fase lútea precoz.

5.1.2.1. Regulación de la actividad CYP17

La actividad de FSH estimula la expresión de CYP17-ARNm en células tecales pero no en células granulosas, según se ha constatado en modelos experimentales animales (34), a pesar de que los receptores de FSH se expresan únicamente en la granulosa. Se ha hipotetizado que la acción promotora de FSH sobre la expresión de CYP17 podría estar mediada por factores reguladores no hormonales (30).

Otros factores capaces de modular la actividad CYP17 son la insulina y el IGF-I y II (Insulin-like growth factor), capaces de estimular la síntesis androtendiona en la teca, y la inhibina sintetizada en la granulosa como efecto de la acción de la FSH, que promueve la síntesis tecal de androstendiona (35). Esta acción de la inhibina sobre la síntesis de andrógenos podría ser el efector de la regulación paracrina de la granulosa sobre la actividad CYP17 en la teca, dependiente en último término de FSH, y que se añadiría a la propia acción de la LH sobre las células tecales (35).

Se han descrito otros sistemas reguladores de la síntesis de 17-hidroxipregnenolona, DHEA y andrógenos tecales por medio de la modificación de la actividad de CYP17, y que incluyen mediaciones por EGF (Epidermal growth factor), FGF (Fibroblast growth factor), TGF- β (Transforming growth factor β) y activina (30).

5.1.2.2. Regulación de otros enzimas de la esteroidogénesis ovárica

La actividad de CYP11a, que ya se ha definido como el paso limitante de la toda la síntesis esteroidea está basalmente regulada por la transcripción de su gen codificador. La regulación crítica depende del nivel de la proteína de regulación aguda de la síntesis de esteroides (StAR; Steroid Acute Regulatory protein), que facilita el ingreso de colesterol a las mitocondrias, en cuyo interior se localiza P450_{scc}. La expresión de StAR se ve estimulada por los niveles de AMPc y por la acción de FSH, LH y HCG sobre las células de la granulosa.

La 3 β -HSD es la responsable de la conversión de los esteroides sintetizados por la vía Δ 5 a la configuración Δ 4, y por tanto resulta esencial para la síntesis de diferentes productos hormonales. La actividad relativa de 3 β -HSD y de CYP17 determina la fracción de pregnenolona que sigue la vía Δ 5 hacia la síntesis de estradiol y la que se transforma en progesterona y 17-hidroxiprogesterona a través de la vía metabólica Δ 4. La acción FSH sobre cultivos in vitro de células granulosas de rata núbil produce incremento de la síntesis de 3 β -HSD-ARNm, de los niveles de proteína y de su actividad enzimática (36). La acción LH/HCG tiene análogos efectos sobre cultivos in vitro de células tecales humanas (37). Datos procedentes de estudios sobre fisiología folicular humana señalan que la producción de andrógenos en la teca es relativamente constante a lo largo del ciclo, lo que sugiere una dependencia primordial de la actividad intrínseca de las células tecales, que es fruto de una actividad tecal de 3 β -HSD fundamentalmente tónica y constitucional. Sin embargo, no puede excluirse la posibilidad de un incremento funcional, tanto por la acción de FSH sobre la granulosa como por la de LH en la teca, aunque las consecuencias clínicas de esta regulación en el contexto de los ciclos estimulados no se conocen en la actualidad.

5.1.3. Sensibilidad folicular a las gonadotropinas en el ciclo natural

5.1.3.1. Acciones gonadotrópicas sobre la granulosa en fase folicular precoz

La elevación de progesterona durante la fase folicular es, debe recordarse, un fenómeno fisiológico (20). La regulación específica que FSH y LH ejercen sobre la síntesis de progesterona a lo largo de la fase folicular no está suficientemente dilucidada. Durante la fase folicular precoz, la FSH es el principal estimulador de la síntesis de progesterona, promoviendo la expresión de actividad la 3- β -OH-esteroide-deshidrogenasa en la granulosa, mientras que la acción de LH es menos conocida. Paralelamente, la acción de LH tiene lugar predominantemente sobre las células tecales, dotadas de receptores a la misma, y consiste principalmente en estimular la actividad 17- α -hidroxilasa y con ello la conversión de progesterona en 17OH-progesterona (24).

El desarrollo y diferenciación de los folículos ováricos depende principalmente de la acción combinada y secuencial de las dos gonadotropinas –FSH y LH–. La acción de FSH sobre las células granulosas de los folículos antrales precoces, estimula su proliferación mitótica, su capacidad esteroideogénica y, a partir de un cierto grado de desarrollo, la aparición de receptores a LH. La LH actúa sinérgicamente con la FSH

sobre los folículos previamente expuestos a la acción de ésta, manteniendo su crecimiento y desencadenando los cambios propios de la luteinización y en el folículo preovulatorio. A medida que progresa el desarrollo folicular terminal, se incrementa la producción ovárica de progesterona, que tiene lugar principalmente en las células de la granulosa (29). De hecho, la síntesis de progesterona en la granulosa depende en su inicio de la acción tónica de FSH que del pico LH, al que precede en horas y del que se considera un facilitador (38).

En el contexto de un ciclo natural, el folículo dominante mantiene su capacidad de proliferación y diferenciación a pesar del descenso de FSH determinado por la retroalimentación negativa ejercida por los estrógenos, gracias en parte a haber incrementado su sensibilidad a la acción de LH. La estimulación de los receptores a LH y FSH de la granulosa folicular, tras la interacción con las respectivas gonadotropinas, se sigue de la activación de varios sistemas de señalización, de la que dependen tanto el crecimiento folicular como la síntesis de esteroides. Estos sistemas comprenden tanto vías de síntesis de segundos mensajeros intracelulares, como adenilato-ciclasa (39, 40). La proteínaquinasa C (productora de inositol-trifosfato), MAP-kinasa (mitogen-activated protein kinase) como sistemas de señalización extracelular dependientes de proteínaquinas (39). La diferenciación de las células granulosas inducida por FSH induce la expresión de receptores a LH, incrementa progresivamente la esteroidogénesis y la expresión creciente de varios factores de crecimiento pertenecientes a la familia del TGF- β . En la teca, las vías de señalización intra e intercelular son menos conocidas, aunque estudios realizados en modelos animales han descrito que la actividad Akt-fosforilasa (fosfatidilinositol-3-kinasa) dependiente de LH está regulada por la vía de la MAP-kinasa (28).

5.1.3.2. Modificación de la sensibilidad a LH en fase folicular avanzada

En el ciclo natural normal, el folículo dominante continúa creciendo y diferenciándose a pesar de que la concentración sérica de FSH, y con ella su actividad sobre la granulosa, va decreciendo a medida que progresa el crecimiento folicular terminal. Ello se debe a que este folículo ha incrementado su sensibilidad a las gonadotropinas, de forma mucho más acusada que los no dominantes, lo que incluye el establecimiento progresivo de sensibilidad a LH.

Mientras que la acción tecal de LH es relativamente constante a lo largo de ciclo, el efecto sobre la granulosa tiene un perfil más evolutivo, lo que está en probable relación con la modificación cíclica de sus receptores (30). Está bien establecido que la

receptividad folicular a la acción de LH es mínima en los folículos antrales precoces, y va aumentando con el crecimiento folicular, de forma que se sigue incrementando incluso a pesar de la paulatina reducción de la sensibilidad a FSH (41). La expresión de receptores a LH en las células granulosas se va incrementando gradualmente a lo largo de la fase folicular, y es máximo en el momento de la ovulación. Se ha establecido que en fase folicular tardía la estimulación de la síntesis de progesterona mediada por LH es tres veces más intensa que la ejercida por la FSH (42).

La interacción de la LH con su receptor de la célula granulosa estimula la síntesis de dos enzimas clave para la esteroidogénesis: la enzima de desdoblamiento de la cadena lateral del colesterol (CYP11a, P450_{scc}; P450 side-chain cleavage enzyme) y la aromatasa (CYP19, P450_{arom}; P450 aromatase enzyme). En estudios de fisiología folicular realizados en modelos de cultivo in vitro células de granulosa folicular de rata se ha observado que la expresión de ARNm codificante de P450 fue intensamente estimulada por la acción de FSH y LH, y que tanto la expresión de P450_{arom} como la síntesis de progesterona fueron máximas sólo en presencia de ambas gonadotropinas en el medio de cultivo (43). Por tanto, el papel regulador de la LH sobre la esteroidogénesis no sólo residiría en la estimulación de la síntesis tecal del sustrato –los andrógenos– sino también en la regulación de la propia actividad aromatasa (30)

5.1.3.3. Acciones de LH sobre la teca

Las células de la teca responden a la acción de LH transformando pregnenolona en andrógenos, parte de los cuales es a su vez aromatizada a estrógenos en la granulosa por la acción de la CitP450 aromatasa, cuya actividad está estimulada por la FSH. Otra fracción de los andrógenos tecaes difunde hasta la granulosa y alcanza el líquido folicular, y una tercera pasa a la circulación general. En los ciclos naturales, la concentración plasmática de LH es relativamente constante durante la fase folicular, y su acción estimula, por medio de la ocupación de una pequeña fracción de receptores disponibles, una producción androgénica tecal suficiente. Esta oferta sostenida de sustrato para la aromatización permite, en virtud del incremento de la acción aromatasa mediada por la FSH –en especial en el folículo dominante– un incremento progresivo de la síntesis de estradiol. La cuantificación diferencial de estradiol y progesterona en sangre venosa procedente del ovario en el que reside el folículo dominante y del contralateral ha revelado que la síntesis de estradiol y de progesterona radica predominantemente en el ovario donde se localiza el folículo ovulatorio.

Aunque en la teca predomina la síntesis de andrógenos, sus células también son capaces de sintetizar progesterona en cantidades significativas (44). A diferencia de

otros pasos de la esteroidogénesis, las actividades enzimáticas responsables de la síntesis de progesterona son unidireccionales, por lo que la ésta puede considerarse el producto final de la síntesis de esteroides ováricos (20).

5.1.4. Papel de la progesterona en la regulación molecular de la receptividad endometrial

La implantación es un complejo proceso, caracterizado por un diálogo equilibrado y continuo entre el endometrio y el embrión (45). Este proceso, localizado fundamentalmente en el epitelio y el estroma del endometrio funcional, se desarrolla en un determinado intervalo temporal, conocido como *ventana de implantación*, que clásicamente se ha considerado comprendido entre el 6º y 9º día postfecundación. Durante la ventana de implantación tienen lugar una serie de transformaciones morfológicas y funcionales, que determinan la aparición en el endometrio de moléculas de adhesión, cambios vasculares y producción transitoria de citoquinas proinflamatorias en la que intervienen múltiples y complejas vías moleculares, destinadas a propiciar la adherencia e invasión del blastocisto. La progesterona y las proteínas inducidas por ésta constituyen uno de los principales reguladores transversales de la mayoría de estos procesos. Sus efectos tienen lugar por medio de mecanismos genómicos y no genómicos, que convergen en la producción de cambios tisulares específicos (46).

Los efectos de la progesterona se ejercen por medio de dos mecanismos moleculares básicos (18). Por un lado, existe un efecto directo sobre sus receptores cuya sensibilidad está regulada por diferentes sistemas intracelulares. La especificidad tisular del receptor de progesterona se ve influenciada por la isoforma del receptor mayoritaria y por el patrón predominante de dimerización (AA, BB, AB), así como por el contexto de proteínas reguladoras expresadas en el tejido diana. Por otra parte, se conocen efectos de nivel secundario, que actúan por medio de la promoción o inhibición de proteínas reguladoras (47).

Las acciones genómicas de la progesterona son mediadas por sus receptores nucleares clásicos (*Progesterone Receptors; PR*), que pertenecen a la superfamilia de los factores de transcripción, y se localizan predominantemente en la membrana nuclear de la célula diana, al igual que los receptores específicos de otras hormonas esteroideas. Las dos isoformas predominantes, PR-A y PR-B, son codificadas por el mismo gen, y presentan un patrón de distribución tisular no uniforme, de modo que PR-A es la predominante en el útero. Ambas son inducidas por estrógenos, y se expresan en el epitelio y estroma endometrial durante la fase proliferativa. Con la transformación secretora del endometrio

y la posterior deciduización, se produce una disminución del PR-B, mientras que la expresión de PR-A se mantiene. Gracias a estudios en modelos animales, se ha esclarecido que el PR-A es fundamental para el proceso de deciduización endometrial y de implantación embrionaria (45).

El PR-B es además capaz de desencadenar acciones no genómicas, por medio de intracelulares rápidas, interactuando con sistemas de señalización como Src-tirosinquinasa y activando la vía Ras/Raf-1/MPAK, que interviene en los procesos de proliferación, diferenciación y angiogénesis implicados en la deciduización (48). Se han descrito otros receptores para progesterona a nivel intracelular y de membrana (isoformas PR-C, PR-M, PR-S, PR-T). Los receptores citoplasmáticos parecen desempeñar un papel de regulación intracelular del efecto progestacional, fijando parte de la progesterona y ejerciendo un efecto de “secuestro” que antagoniza las acciones derivadas de la interacción con los receptores nucleares (49).

La expresión de los PR está modulada primordialmente por las acciones endocrinas de los estrógenos y de la propia progesterona, así como por la acción paracrina de ésta última. El incremento de estradiol en fase preovulatoria estimula el crecimiento y proliferación de las células epiteliales del endometrio, y suprime en éstas la expresión de PR, mientras que la induce en el estroma. Posteriormente el incremento de progesterona en fase lútea atenúa la proliferación epitelial e incrementa la estromal (50).

La progesterona también regula la disponibilidad y activación del PR por medio de mecanismos paracrinos. El nivel de P determina la fracción de PR citoplasmáticos unidos en complejo a *heat shock proteins* (proteínas de shock caliente) que mantienen al receptor preparado para unirse a la progesterona y activar la transcripción de DNA. Antes de la unión a progesterona, el PR ha de experimentar un cambio conformacional, separándose de las *heat shock proteins* y formando dímeros. Estos cambios, dependientes de la concentración citoplasmática de P, favorecen la afinidad del receptor por coactivadores y mediadores de transcripción como P160/SRC (coactivador de receptores esteroideos) y Krüppel-like factor (Klf9), factor de transcripción secundario que coactiva el RP.

Tras la unión de progesterona a su receptor, se activan dos conjuntos vías de señalización, que regulan tanto la receptividad endometrial como la invasividad del trofoblasto (45, 50). Dentro del primer grupo, la progesterona interviene en procesos de remodelación endometrial –bloqueando la proliferación del epitelio y estimulando la del estroma–, induce inmunotolerancia y facilita la adhesión embrionaria. En relación con el segundo, la progesterona es un importante regulador negativo de la invasividad

trofoblástica, inhibiendo el sistema de metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP) (51), modificando la actividad del sistema activador del plasminógeno (52) y antagonizando la migración del trofoblasto extraveloso.

Los mecanismos de control de la receptividad más relevantes regulados por progesterona incluyen el factor de transcripción estroma endometrial *Hand2*, responsable de la inhibición de la producción de factores citotróficos (FGF-1, -2, -9 y -18) (50). Otra vía es la mediada por *Indian Hedgehog (Ihh)*, relacionada con la interacción entre epitelio y estroma endometrial por su carácter activador de COUP-TFII (NR2F2), que reduce la expresión del factor coactivador-1 del receptor epitelial de estrógenos (SRC-1) y por tanto actúa como mediador de la supresión del efecto proliferativo de los estrógenos sobre el epitelio endometrial ejercida por la progesterona (45, 50). Otros sistemas, como el de las proteínas Wnt (*Wingless-Type MMTV integration site*), modulan la invasividad del blastocisto. También intervienen sistemas de citoquinas y otros reguladores del ciclo celular como C-erb-2, -que controlan la proliferación celular estromal-, Errfi1 o Mig-6, reguladores de otros puntos de control del ciclo celular. Un tercer grupo de mediadores sobre los que la P tiene acción son los receptores de prostaglandinas, cuya acción resulta esencial en los procesos de angiogénesis implantatoria. Finalmente, la P se comporta asimismo como corregulador de la expresión de factores de transcripción tales como la familia *Homebox* (y en concreto *Hoxa10*), *C/ERP β (CCAAT/enhancer binding protein β)*, *Hand2* y *FOX 1 (Forkhead box 1)*, responsables del control de la proliferación y diferenciación de las células del estroma endometrial, de la supresión de citoquinas mitogénicas con FGF (*Fibroblast growing factor*).

Desde el punto de vista de la actividad del trofoblasto, hay que recordar que el crecimiento invasivo del trofoblasto extravascular está regulado por enzimas proteolíticas, fundamentalmente metaloproteinasas (MMPs), cuya actividad regula también la P, modulando negativamente la invasión trofoblástica. Así mismo, a través de acciones genómicas, la progesterona también media la migración del trofoblasto extraveloso (45, 50).

En síntesis, las vías que hemos enumerado, inducen, entre otras, el bloqueo de la proliferación estrogénica y la expresión de factores de adhesión, fundamentales para la decidualización e implantación.

5.1.5. Efectos de la estimulación ovárica sobre la síntesis de progesterona

La estimulación con gonadotropinas del desarrollo folicular múltiple representa una oferta suprafisiológica de actividad FSH –o de FSH más LH– a cada uno de los folículos de la cohorte en fase de selección en el momento en que se inicia la estimulación. Estos niveles no son sólo muy superiores a los fisiológicos, sino que su patrón temporal difiere notablemente de la dinámica endógena de fluctuación de la FSH endógena (53, 54). La estimulación ovárica modifica un proceso continuo de desarrollo folicular, durante el cual existe en cada fase del ciclo un conjunto heterogéneo de folículos en diferentes fases de desarrollo, al menos en pacientes con reserva folicular conservada. La anulación de la dominancia folicular resultante de la estimulación conlleva el desarrollo terminal de mayor número de folículos, y determina una síntesis suprafisiológica de estradiol, y un incremento de la producción de progesterona, cuya liberación a la circulación general está relacionada con el número de folículos en desarrollo, la intensidad de la acción FSH sobre la granulosa, así como de la de LH sobre la teca. Así, la concentración hormonal detectable en sangre periférica constituye solo un reflejo indirecto de la actividad global del conjunto de folículos esteroideogénicamente activos.

Varios factores podrían contribuir al incremento de la progesterona en el contexto de un ciclo estimulado para obtener desarrollo folicular múltiple de alto grado. En primer lugar, las elevadas cantidades de FSH que actúan sobre la granulosa durante la estimulación ovárica aumentan muy intensamente la producción de estradiol y progesterona en el conjunto de los folículos receptivos a su acción presentes en ambos ovarios. La asociación entre dosis de actividad FSH y producción de progesterona ha sido ampliamente descrita, incluso en ausencia de cuerpo lúteo funcional, así como la mayor correlación entre las dos variables en los ciclos en los que se detectó la existencia de un escape de LH a pesar de la administración de agonistas GnRH en protocolo largo (55, 56). A pesar de ello, el incremento de la síntesis de progesterona al final de la estimulación que se observa en la mayoría de los ciclos de tratamiento con gonadotropinas exógenas más análogos agonistas o antagonistas de la GnRH, no se debe generalmente a un incremento prematuro de LH.

La secuencia de la cascada de la esteroideogénesis es obviamente la misma en el ciclo natural y en el contexto de la estimulación ovárica para FIV-TE, aunque ciertas actividades enzimáticas pueden verse afectadas por el efecto de las concentraciones suprafisiológicas de estradiol por efecto de la exposición a dosis elevadas de FSH. No existen datos directos sobre el posible efecto de la hiperestimulación ovárica controlada sobre la actividad de CYP17, y sobre las repercusiones que podrían tener en la síntesis de progesterona respecto al ciclo no estimulado. Es posible que estimulación ovárica modifique no sólo la cantidad total sintetizada, sino la contribución relativa de la teca y la granulosa en su producción. Por una parte, el incremento de la actividad de P450arom

ejercida por el incremento de la acción FSH podría aumentar el consumo del sustrato común pregnenolona, y con ello reducir la producción de progesterona por medio de la acción 3β -HSD. Por otro lado, es probable que la proporción de progesterona total sintetizada en las células granulosas vaya en incremento a medida que progresa la estimulación ovárica y según aumenta la sensibilidad a LH en estas células. Considerando que la actividad de CYP17 puede ser estimulada tanto por la LH como por otros sistemas paracrinos ya mencionados, es muy probable que sea intensamente sobreexpresada en células estimuladas, lo que podría determinar cambios en su aptitud diferencial por sus sustratos con predominio de la transformación de 17-hidroxiprogesterona, o catalizar su transformación a progesterona simplemente por la hiperabundancia de sustrato (57). Parece claro que durante la fase folicular precoz, las células granulosas de los folículos en fase de selección no tienen gran sensibilidad a LH, por lo que el incremento de progesterona que sigue a la elevación de LH –observado por ejemplo en la fase de *flare-up* del protocolo largo de agonistas– podría ser más bien fruto del rescate funcional del cuerpo lúteo preexistente (58).

Por otro lado, la acción de LH sobre las células de la teca que regula la transformación de progesterona en andrógenos por la acción de CYP17. Se ha propuesto que la acumulación del ‘sustrato progesterona’, que facilitaría su paso a la circulación y la aparición de efectos endocrinos –entre otros sobre el endometrio–, no sólo podría derivar de una síntesis excesiva, sino también de una metabolización insuficiente a andrógenos (Andersen 2014 (30)). No está bien establecido si durante la estimulación ovárica, la acción sobre la teca de la LH disponible podría incrementar la producción de andrógenos y reducir así la disponibilidad del sustrato común para la síntesis alternativa de progesterona.

5.1.1. Efectos de la elevación precoz de progesterona sobre la receptividad endometrial

La mayoría de las publicaciones disponibles describen una asociación entre la EPP al final de la estimulación ovárica y la reducción de la probabilidad de gestación tras transferencia embrionaria en fresco. Sin embargo, el mecanismo de señalización endocrina o de otra índole responsable de la disminución de la receptividad endometrial sigue sin ser completamente dilucidado.

En relación con el componente embrionario del proceso de implantación, diversos autores han observado que los ovocitos y los embriones procedentes de ciclos con y sin EPP no difieren significativamente en cuanto a calidad (3, 8, 59-62). Las evidencias

procedentes del modelo de donación de ovocitos con consistentes con esta hipótesis. Un estudio inicial de carácter retrospectivo sobre el efecto de la EPP sobre la calidad de ovocitos y embriones fue realizado por Melo sobre 240 ciclos de ovodonación realizados por 120 donantes, de las que se seleccionaron para estudio dos ciclos –uno con elevación de progesterona y otro sin ésta–. En dicho estudio no se observaron diferencias en frecuencia de implantación embrionaria, gestación clínica y aborto entre los ovocitos procedentes de ciclos de estimulación con EPP ($> 1,2$ ng/mL) y aquéllos que se obtuvieron de ciclos con progesterona normal (60). Los resultados del metaanálisis de Venetis se orientan también en el sentido de la inocuidad de la EPP sobre la calidad ovocitaria y embrionaria, tanto en el contexto de la ovodonación como en el de la transferencia de embriones criopreservados (63). Estos datos han fundamentado la hipótesis de que el efecto de la EPP sobre la probabilidad de gestación está en relación con sus acciones sobre el endometrio y no sobre la calidad embrionaria.

Se ha sugerido que el incremento de progesterona circulante al final de la fase de estimulación actuaría sobre el endometrio, acelerando su maduración y alterando la sincronía fisiológica entre su diferenciación y la capacidad implantatoria del embrión (64). Según los estudios de Kolibianakis al respecto, el desfase de tres o más días entre el estadio de desarrollo embrionario y de diferenciación endometrial reduce significativamente la probabilidad de gestación en ciclos de FIV con transferencia embrionaria en fresco (65). Estos datos han sido corroborados por estudios posteriores, que han observado que un periodo de diferenciación endometrial postovulatoria de 3 o más días determina cambios sustanciales en el perfil de expresión molecular (66).

Siguiendo esta hipótesis, Liu ha estudiado la relación entre los niveles de progesterona previos a la punción folicular y la estructura funcional del endometrio en el periodo periimplantatorio, así como con el recuento de células NK en el estroma endometrial. Para este propósito, realizó un estudio de cohortes prospectivo incluyendo 106 pacientes procedentes de un solo centro, tratadas bajo protocolo largo de agonista GnRH y con estimulación con 225-300 UI/día de FSHr, y en las que no se llevó a cabo transferencia embrionaria principalmente por riesgo de hiperrespuesta o por EPP (> 2 ng/mL). Las pacientes fueron sometidas a biopsias de endometrio 7 días después de la administración de HCG. El punto de corte para definición de EPP fue el percentil 90 de la distribución (1,7 ng/mL en día de HCG y de 9,5 ng/mL en el día de administración de HCG), de acuerdo con resultados previos de este grupo. Los niveles de progesterona sérica fueron la única variable asociada de forma independiente al adelantamiento de la maduración endometrial establecida según criterios de Noyes, de forma que los endometrios de pacientes con EPP presentaron una frecuencia superior de maduración acelerada que los de mujeres con progesterona normal. En relación con el recuento de

células NK endometriales, la elevación de progesterona sérica fue también la única variable asociada de forma independiente al recuento (medianas: 9,6% [rango: 2,3-21,6] vs 5,5% [rango: 1,4-18,7]).

El primer estudio sobre el efecto de la EPP en el perfil de expresión génica endometrial fue realizado por el grupo de Van Vaerenbergh en 2011 (19). Estos autores practicaron una biopsia endometrial en el día de la punción folicular a 14 pacientes tratadas para FIV-TE, a las que se realizó posteriormente TE en fresco. Las pacientes fueron catalogadas en tres grupos en función de los niveles séricos de progesterona en el día de administración de HCG ($\leq 0,9$ ng/mL, 1-1,5 ng/mL y $> 1,5$ ng/mL). El análisis de expresión génica diferencial mostró escasas diferencias entre los dos primeros grupos, y mucho más llamativas entre el segundo y el tercero, lo que sugirió la existencia de un posible efecto umbral de la EPP en la expresión génica endometrial, que podría ser la base de una disregulación de la receptividad a la implantación.

Aplicando procedimientos de cuantificación de expresión génica diferencial, Labarta analizó prospectivamente el perfil de expresión génica del endometrio durante la ventana de implantación en donantes de ovocitos, en función del nivel de elevación de progesterona sérica. En las pacientes que experimentaron una EPP superior a 1,5 ng/mL, se apreció un incremento sustancial de la expresión o inhibición de 140 genes, de los cuales 13 pertenecen al grupo de los firmemente asociados a la receptividad endometrial. A pesar de ello, la frecuencia de gestaciones obtenidas tras la donación de los de ovocitos fue similar en ambos grupos, lo que apoya la hipótesis de que la EPP no afecta a la calidad ovocitaria (18). Estas diferencias en la expresión génica y en los perfiles moleculares podrían explicar, para estos autores, la reducción de la receptividad endometrial y de la probabilidad de implantación (18, 19).

Un tercer estudio de prueba de concepto realizado por Li y colaboradores en 2011 analizó el efecto de la EPP sobre la receptividad endometrial por medio de la cuantificación de microRNA y el perfil de expresión de ARNm en muestras de endometrio obtenidas durante la ventana de implantación (día HCG+8) en 14 pacientes en las que se canceló la transferencia embrionaria, y que fueron clasificadas en función del nivel de progesterona sérica de la HCG ($< 1,2$ ng/mL y $> 1,9$ ng/mL) (67). Mediante el estudio con tecnología de *microarrays* de las muestras endometriales, se detectó expresión diferencial en 4 microRNAs (todos infrarregulados en el grupo de EPP) y en 22 ARNm (13 sobrerregulados y 9 infrarregulados). Los autores destacan que dos de los reguladores de receptividad más relevantes, como el VEGF y la osteopontina, mostraron expresión diferencial entre los grupos, de forma que los endometrios de pacientes con EPP presentaron infraexpresión de VEGF y sobreexpresión de osteopontina.

En la misma línea, Haouzi ha realizado un estudio similar, analizando las modificaciones de la expresión génica endometrial –considerada como biomarcador de receptividad y medida a través de la cuantificación de microRNAs– en biopsias de endometrio obtenidas en fase prerreceptiva (día de la punción folicular) y fase receptiva (día +3 de transferencia embrionaria) en un grupo de 15 pacientes sometidas a estimulación ovárica para FIV-TE. La conclusión fue que la elevación de la progesterona sérica por encima de 1,5 ng/mL se asoció a la modificación del patrón de expresión génica desde el estado prerreceptivo al estado receptivo, lo que sugiere la subsiguiente aceleración de la maduración endometrial y su disincronía con el desarrollo embrionario. Otro hallazgo relevante del estudio es que un elevado número de genes infraexpresados en el grupo de pacientes con EPP superior a 1,5 ng/mL están implicados en el control del ciclo celular, lo que refuerza la hipótesis de que su regulación a la baja favorece el inicio precoz de procesos de crecimiento y proliferación celular (68).

Como ha señalado Fatemi en una reciente revisión de conjunto al respecto, los estudios disponibles se alinean con la hipótesis de que la exposición prematura a niveles elevados de progesterona durante la fase de estimulación ovárica para FIV-TE alteran la expresión de un amplio conjunto de genes relacionados con la regulación de la maduración y la receptividad endometrial, aunque los resultados acumulados hasta el momento son insuficientes para concluir sobre qué grupo de genes críticamente implicados podrían constituir una diana para el diagnóstico clínico (20).

La implicación de la EPP en la alteración de la angiogénesis asociada a la decidualización endometrial, crítica para la implantación embrionaria, ha sido analizada por Chen (69). Este autor focaliza su atención en dos de los sistemas promotores de la angiogénesis más involucrados en el proceso precoz de la implantación, como son el VEGF (Vascular Growth Endotelial Factor) y el PLGF (Platelet Growth Factor). El objetivo específico del estudio es comparar las diferencias en la expresión de VEGF-A, VEGF-C y PLGF en endometrios de pacientes con progesterona normal y elevada durante la estimulación para FIV, y a las que se suspendió la transferencia embrionaria. VEGF-A y PLGF están estructuralmente relacionados y se unen receptores comunes, favoreciendo la proliferación y migración celular, y regulando la apoptosis y la permeabilidad vascular, con un efecto final de inducción sinérgica la angiogénesis. El VEGF-C es un factor de crecimiento selectivo para vasos linfáticos, y promueve la migración y proliferación de células endoteliales para su conformación. Por medio de un diseño de cohortes retrospectivo, se analizaron, las expresiones de estos factores angiogénicos en el endometrio de 119 pacientes expuestas y no expuestas a EPP en el día de la HCG ($\geq 1,7$ ng/mL) y en el día posterior a la administración de la misma ($\geq 9,5$ ng/mL). Ambos puntos de corte representaban el percentil 95 de las distribuciones. La

cuantificación de la expresión de los mediadores angiogénicos se realizó en todos los casos en el epitelio adluminal, en el glandular y en el estroma. Las características basales de las pacientes, así como el curso de la estimulación fueron similares al comparar las pacientes expuestas a EPP y las no expuestas. Se halló presencia de VEGF-A, VEGF-C y PLGF en todos los compartimentos del endometrio, si bien la tinción fue más intensa en el epitelio glandular tanto en el grupo con progesterona normal como en el de EPP. En el epitelio luminal, la expresión fue ligeramente más intensa en el grupo de EPP, aunque la diferencia no resultó significativa. En el epitelio glandular se objetivó una tinción significativamente más intensa para VEGF-A, VEGF-C y PLGF en el grupo de EPP, mientras que el estroma presentó un aumento significativo de expresión de VEGF-A y PLGF. Estos resultados pueden indicar que el impacto de la EPP tiene lugar predominantemente sobre la angiogénesis periglandular, y por tanto que está más relacionado con los procesos angiogénicos periimplantatorios. Se ha postulado que los efectos de la progesterona sobre la expresión de estos factores puede ser mediado por acciones genómicas –dependientes de la interacción con los receptores nucleares clásicos– o por medio de acciones indirectas ejercidas a través de regulación de proteínas señalizadoras o de la actividad de las células NK uterinas Chen, 2015 #353}.

5.1.6. Efectos de la elevación precoz de progesterona sobre los resultados gestacionales de la FIV-TE

Los efectos nocivos de la EPP durante la estimulación del desarrollo multifolicular para FIV-TE han sido objeto de discusión desde la publicación, hace más de dos décadas, de los primeros estudios observacionales al respecto (1). Los estudios primarios que no han constatado efectos desfavorables de la EPP sobre la probabilidad de gestación en ciclos de FIV-TE (3, 13, 17, 70, 71) son actualmente menos numerosos que los que han descrito una reducción significativa de la probabilidad de gestación asociada a EPP (13, 16, 72, 73).

Una de las publicaciones recientes de mayor relevancia analizó retrospectivamente más de 4000 ciclos de estimulación ovárica, concluyendo que la elevación de la progesterona por encima de 1,5 ng/mL (4,77 nmol/L) se asociaba a una reducción significativa y clínicamente relevante de la probabilidad de gestación en ciclos de FIV-ICSI (31% vs 19,1%; $p < 0,00006$) (16)

A partir de estos y otros estudios, se han elaborado diferentes revisiones metaanalíticas de las evidencias disponibles. En 2007, Venetis (9) elaboró el primer metanálisis a partir

de doce estudios primarios seleccionados, de los cuales diez eran retrospectivos, y sólo cinco aportaban datos sobre gestación clínica. La conclusión principal de este estudio fue que la reducción de la probabilidad de gestación clínica asociada a la EPP no resultaba estadísticamente significativa (OR: 0,75; IC 95% 0,53; 1,06; $p = 0,10$). Este resultado no se modificó realizando análisis de sensibilidad mediante exclusión de los estudios con menos información sobre la conducta que determinó la detección de EPP en relación con la transferencia embrionaria, ni tampoco realizando análisis de subgrupos por tipo de análogo GnRH utilizado ni por punto de corte considerado para la definición de la EPP. Una parte relevante de los estudios incluidos en este metanálisis no informan suficientemente sobre los métodos de cuantificación de la progesterona, y sobre su variabilidad y reproducibilidad. Por ello, las conclusiones del estudio inicial de Venetis han sido relativizadas por algunos autores (74).

El mismo grupo de investigadores publicó más recientemente un segundo metanálisis sobre el efecto de la EPP en la probabilidad de gestación en ciclos de estimulación ovárica para FIV-TE bajo protocolo de antagonistas de la GnRH (65). Este autor metaanalizó cinco estudios primarios con tamaños muestrales pequeños (595 pacientes en total) y observó que las pacientes con EPP presentaron un estadiol sérico en el día de administración de HCG significativamente superior (Diferencia de medias: 956 pg/mL, IC 95% 248; 1664 pg/mL; $p=0,008$ según modelo de efectos aleatorios) y mayor número de ovocitos recuperados (Diferencia de medias: 2,9; IC 95% 1,5; 4,4; $p < 0,001$ según modelo de efectos fijos). En relación con su objetivo primario, el estudio concluyó que la elevación de la progesterona se asociaba a una reducción significativa –cerca al 10 %– de la probabilidad de gestación clínica (DAR: 9%, IC 95% 17% ; 2%, $p < 0,001$ según modelo de efectos fijos).

Venetis publicó en 2013 un tercer metanálisis acerca del efecto de la EPP sobre la probabilidad de gestación, analizando globalmente casi 60.000 ciclos de tratamiento, y añadiendo análisis de subgrupos relevantes (63). El metanálisis seleccionó estudios primarios publicados hasta 2012 acerca de ciclos de FIV con ovocitos propios o de donante, y con transferencia embrionaria en fresco o tras descongelación, que aportasen resultados de gestación en función del valor de progesterona en el día de HCG. Fueron excluidas aquellas publicaciones en las que se afirmó que la EPP condicionaba el manejo terapéutico. En total se incluyeron 63 estudios, que totalizaban 55.199 ciclos con transferencia embrionaria en fresco. Además del metanálisis para la síntesis de resultados, los autores realizaron un análisis de meta-regresión para control de la heterogeneidad y la estimación de probabilidad de gestación. La variable principal de resultado fue la gestación clínica, evolutiva o la obtención de recién nacido vivo; como variables secundarias se consideraron el consumo de gonadotropinas, la duración de la

estimulación, el número de ovocitos obtenidos y estradiol sérico en el día de la hCG. Ante la gran variabilidad en el umbral utilizado para definir la EPP en los distintos estudios, los autores agrupan éstos por estratos (0,4-0,6 ng/ml; 0,8- 1,1 ng/mL; 1,2-1,4 ng/mL; 1,5-1,75 ng/mL; 1,9-3 ng/mL). En lógica correspondencia, la frecuencia de EPP resultó muy variable (entre 12.6% y 46%), aunque resultaba inferior en los ciclos con antagonista GnRH. La principal conclusión de este estudio es que en todos los estratos de punto de corte se constató una asociación negativa significativa entre EPP en el día de la hCG y la frecuencia de gestación en ciclos de FIV con transferencia embrionaria en fresco. Por el contrario, no se detectó asociación de la EPP con la probabilidad de gestación en ciclos posteriores de criotransferencia de embriones congelados, ni en ciclos con ovocitos donados. Estos hallazgos parecen respaldar que la afectación de la probabilidad gestación se debe a la alteración endometrial.

Para evaluar la relevancia clínica de la EPP, los autores de este metaanálisis calcularon el número de exposiciones necesario para producir un efecto negativo (*number needed to harm; NNH*) que resultó 9, lo cual equivale a estimar que por cada diez exposiciones a EPP se perdería una gestación, es decir, se produciría un descenso del 10% en la probabilidad de gestación esperada (63). Considerando la frecuencia media de EPP estimada en el estudio (17%), queda por esclarecer si la aplicación de alguna medida específica en casos de EPP estaría justificada en términos de coste-efectividad. Las limitaciones de este meta-análisis radican en la heterogeneidad de las poblaciones de estudio, en el protocolo de estimulación ovárica, y en el umbral para definir EPP. Por otro lado los estudios incluidos son observacionales, y su grado de control de sesgos no resulta tampoco homogéneo.

Muy recientemente, Griesinger ha realizado un metanálisis de seis ensayos clínicos diseñados con otros objetivos, pero con control de las concentraciones de progesterona al final de la estimulación (75). El análisis global de los 1866 ciclos evaluados en los estudios originales estimó una frecuencia global de EPP superior a 1,5 ng/mL del 8,4 % (IC 95%: 7,2%; 9,8%). Analizando en conjunto todas las pacientes, la exposición a EPP se asoció a una pérdida significativa de probabilidad de gestación clínica por ciclo iniciado (OR: 0,55; IC 95%: 0,37; 0,81) y por transferencia (0,56; IC 95%: 0,57; 0,86). Además, la EPP fue más frecuente (19,9%) entre las pacientes con respuestas superiores a 18 ovocitos que entre las que produjeron menos de 6 (4,5%).

La posibilidad de que el efecto nocivo de la EPP sobre el resultado gestacional de la FIV-TE pueda ser compensado, al menos parcialmente, por el efecto de factores pronósticos favorables como edad no avanzada, respuesta ovárica elevada o alta disponibilidad de embriones de buena calidad ha constituido la hipótesis del estudio de Hill (76), que ha

analizado retrospectivamente una cohorte de 1620 transferencias embrionarias en fresco, de las cuales 934 se realizaron en fase de blastocisto, y 686 en fase de mórula. Los niveles de progesterona no exhibieron relación con indicadores de calidad ovocitaria ni embrionaria, incluyendo frecuencia de fecundación, estadio evolutivo de los embriones en el día de la transferencia y embriones disponibles para la preservación. La edad de la paciente, el día de la transferencia, el número de embriones transferidos y el nivel sérico de progesterona se relacionaron significativamente con la frecuencia de nacido vivo. La EPP se asoció con menor probabilidad de nacido vivo tanto en los ciclos con transferencia de mórulas como de blastocistos, en ciclos con embriones de buena y de baja calidad, y en estimulaciones con baja y elevada respuesta. El análisis bivariado no reveló interacciones de estas variables sobre el efecto de la EPP en la frecuencia de nacido vivo, por lo que se asumió que su efecto era independiente de éstas.

Con posterioridad a la publicación de los metanálisis mencionados, han aparecido estudios relevantes, como el de Nayak, que evalúa el efecto de la EPP sobre la probabilidad de implantación, gestación clínica y aborto por medio de un estudio de cohortes prospectivo (77). Este autor analizó la asociación entre el nivel de progesterona sérica en el día de la extracción de ovocitos –y no de la administración de HCG, a diferencia de la mayoría de los estudios– y la probabilidad de implantación y gestación clínica en una cohorte de 186 pacientes tratadas con ciclos de estimulación ovárica para FIV-TE bajo protocolo de antagonistas con inicio flexible. Ni los valores basales de progesterona, ni los del día e inicio de antagonista GnRH o de la administración de la HCG mostraron asociación estadísticamente significativa con la probabilidad de gestación clínica. Por el contrario, la concentración de progesterona en el día de la extracción de ovocitos fue significativamente más elevada entre las pacientes que no gestaron (10,2 vs 7,8 ng/mL; $p=0,007$). La asociación del nivel de progesterona en el día de la punción folicular con el resultado gestacional del ciclo fue explorado además estratificando la distribución de progesterona en intervalos discretos de amplitud uniforme y estimando la probabilidad de implantación y de nacido vivo para cada estrato. Las frecuencias de gestación bioquímica y clínica mostraron una asociación lineal inversa con la EPP, de forma que cuanto mayor resultaba la elevación de progesterona, menor fue el resultado gestacional. Además, la tendencia al descenso de la probabilidad de gestación se acentuó a partir de cifras de progesterona en el día de la extracción de ovocitos mayores de 12 ng/mL. Utilizando este punto de corte para dicotomizar la distribución de progesterona, los autores observaron que la probabilidad de gestación clínica fue significativamente mayor en las pacientes que presentaron progesteronas séricas en el día de la extracción de ovocitos inferiores a este umbral (43,9% vs 31,6%; $p=0,01$). Por el contrario, no se observaron diferencias en la frecuencia de aborto (12% vs 16,7%, $p=0,64$).

El efecto desfavorable de la EPP sobre la receptividad endometrial ha sido evaluado por algunos autores estimando éste a través de una de sus posibles expresiones clínicas: el fallo recurrente de implantación en FIV-TE. Liu realizó un estudio de cohortes retrospectivo sobre una muestra de oportunidad de pacientes menores de 40 años que produjeron hasta 20 ovocitos como respuesta a la estimulación ovárica para FIV-TE, analizando separadamente las pacientes sin ciclos previos de tratamiento, las que habían experimentado una única transferencia fallida, y las que presentaban fallo de dos o más ciclos de FIV con transferencia. Tras el análisis global de 6673 ciclos, los autores observaron una frecuencia de EPP del 25,5 %, definiendo ésta como una concentración en el día de administración de HCG superior a 6 nmol/L. El análisis global de los ciclos reveló que la probabilidad de implantación embrionaria y gestación clínica se redujo significativamente en los ciclos que experimentaron EPP (33,3% vs 44% y 22,4% vs 32,1; $p < 0,05$), a pesar de que no se observaron diferencias en calidad ovocitaria, porcentaje de fecundación y calidad embrionaria. La frecuencia de EPP difirió significativamente al comparar los grupos de pacientes que recibían su primer tratamiento (24,4%), las pacientes con un ciclo previo fallido (30,7%) y las mujeres con fallo recurrente de FIV (40,2%; $p < 0,05$). Estas diferencias en la frecuencia de EPP se mantuvieron ajustando el análisis por edad, número de ovocitos y estradiol en día de HCG, tanto en la muestra global como estratificándola por tipo de respuesta a la estimulación (normal y baja). Los resultados de este estudio señalan que entre el 24,5% y el 48% de las pacientes con dos o más fallos de tratamientos previos con FIV-TE experimentan EPP en el ciclo subsiguiente, frecuencia muy superior a la observada en las pacientes sometidas a primer tratamiento. Los autores concluyen que la EPP en el día de la HCG se asocia con el antecedente de fallo recurrente de FIV, aun ajustando por potenciales factores confusores. Como limitación de la validez externa del estudio, hay que subrayar la elevada proporción de EPP observada en toda la serie, y el hecho de que la transferencia embrionaria se cancelase en el 66,7% de las pacientes con EPP, que no formaron parte del análisis.

Se ha propuesto que la EPP podría afectar negativamente a la probabilidad de gestación a través de mecanismos distintos de la disregulación endometrial, como la reducción de la calidad ovocitaria. Esta hipótesis ha sido evaluada en el estudio de Huang, que analiza la asociación entre EPP y frecuencia de fallo de fecundación (78). Tras analizar retrospectivamente una cohorte de casi 10000 ciclos de FIV convencional, estos autores concluyeron que la necesidad de ICSI de rescate –indicada por la no extrusión del segundo corpúsculo polar a las 4-6 horas de la inseminación en FIV convencional– fue superior en los ciclos que presentaron niveles de progesterona sérica en el día de la HCG superiores a 1,5 ng/mL (OR: 1,16; IC 95%: 1,01; 1,57) o a 2,5

ng/mL (OR. 1,49; IC 95%: 1,06; 2,1). Este estudio señala además el incremento progresivo aunque no lineal de la frecuencia de ICSI de rescate a medida que se incrementa el nivel de progesterona en el día de la HCG. La principal recomendación que los autores derivan de la conclusión de este estudio es que la elevación de la progesterona final, especialmente si es superior a 1,5 ng/mL, constituye un factor de riesgo para el fallo de fecundación, y podría afectar desfavorablemente al resultado de ciclo por mecanismos adicionales al trastorno endometrial (78).

Un nuevo concepto, surgido de los datos de una publicación de Santos-Ribeiro, propone la hipótesis de que la exposición endometrial a bajas concentraciones de progesterona durante la estimulación podría tener un efecto adverso sobre el resultado gestacional del ciclo similar al producido por la situación contraria, es decir, por la EPP (79). El análisis de una cohorte retrospectiva de 2373 ciclos que finalizaron con transferencia embrionaria se realizó por estratos de progesterona sérica en el día de la HCG (amplitud de 0,25 ng/mL; rango entre 0 y >1,5 ng/mL). La frecuencia de nacido vivo fue significativamente inferior en las pacientes con progesteronas más elevadas (>1,5 ng/mL) pero también más bajas (\leq 0,5 ng/mL). Para depurar el posible efecto confusor de la respuesta ovárica, se aplicó análisis multivariado mediante regresión logística, que evidenció que la asociación permanecía significativa tanto para el estrato con progesterona más elevada como más baja tras ajustar por edad, número de ovocitos, estradiol final, dosis total de actividad FSH administrada, número de embriones transferidos y día de la transferencia. Los autores discuten el significado de este hallazgo, proponiendo que la baja síntesis folicular de progesterona puede ser en sí misma la explicación del descenso de la frecuencia de nacido vivo, o ser la expresión de un factor causal común no identificado capaz de producir tanto una síntesis gestacional insuficiente como un descenso en la frecuencia de gestación (79).

5.1.1. Factores relacionados con la EPP durante la estimulación ovárica y con su efecto sobre el resultado de la FIV-TE

Edad

La posibilidad de que ciertos factores pronósticos relevantes –como la edad de la mujer– puedan modular el efecto de la EPP sobre la probabilidad de implantación, gestación y nacido vivo ha sido evaluada recientemente por el estudio de Venetis sobre una amplia cohorte retrospectiva de pacientes procedentes de un único centro, que recibieron casi 3300 ciclos de tratamiento a lo largo de los 12 años del periodo de observación. Sin bien el análisis univariado no halló asociación entre la EPP –definiendo ésta como >1,5

ng/mL– y la probabilidad de nacido vivo (OR: 0,78; IC 95%: 0,56; 1,09), estos autores concluyen la existencia de un efecto confusor ejercido por la edad de la paciente y por número de ovocitos, cuyo ajuste por medio de análisis multivariado pone de manifiesto el efecto real de la EPP. La inclusión de la edad de la mujer en el modelo de regresión determinó un incremento del 11,4 % de la OR de EPP en relación con la obtención de nacido vivo. Los autores concluyen que, la edad de la mujer podría ejercer confusión ocultando el efecto real de la EPP sobre el resultado de ciclo, que quedaría de manifiesto al realizar un ajuste por el efecto de la misma, contrario al de la EPP (80).

En el referido estudio de Hill sobre el posible efecto compensador que los factores de pronóstico favorable podrían ejercer minimizando la influencia negativa de la EPP sobre el resultado gestacional de la FIV-TE, no se detectó interacción de la edad –ni del resto de las covariables analizadas– sobre el efecto de la EPP sobre la frecuencia de gestación y de nacido vivo, es decir, la magnitud del efecto negativo de la EPP fue similar en las pacientes de menor edad y en las de edad avanzada (76).

LH endógena

Los primeros estudios sobre el efecto potencial de la concentración basal de LH –o de su incremento gradual durante la estimulación– sobre la EPP no constataron claramente dicha asociación (6, 56, 81).

El concepto de la EPP como consecuencia fisiológica de la *luteinización prematura* fue más extensamente analizado por Hughes en el primero de una serie de estudios centrados en la relación de la actividad LH con la EPP (82). Este autor analizó una cohorte retrospectiva de 708 ciclos de estimulación ovárica para FIV realizados en un único centro, con el objetivo primario de evaluar el efecto del tipo de protocolo de análogo GnRH utilizado durante la estimulación ovárica para FIV sobre la probabilidad de EPP. Como objetivo secundario, los autores pretendieron analizar la asociación entre los niveles endógenos de LH durante la estimulación y la EPP. Para asegurar el origen endógeno de toda la actividad LH detectable, los ciclos estimulados con preparados gonadotrópicos con actividad LH no fueron incluidos en el estudio. Como era previsible, las concentraciones de LH en día 1º y 6º de estimulación fueron significativamente inferiores en los ciclos bajo protocolo largo de agonista, en comparación con los de antagonista. Por otro lado, las concentraciones séricas de progesterona, similares a lo largo de la estimulación, difirieron en día de la administración de la HCG, ya que la media de la progesterona de los ciclos con antagonista fue significativamente inferior a la observada en los ciclos con protocolo largo de agonista (0,84 vs 0,91 ng/mL; $p < 0,05$).

Con respecto a la asociación entre niveles de LH endógena y EPP, el área bajo la curva de la concentración sérica de LH durante la estimulación no mostró correlación significativa con el nivel de progesterona en el día de la HCG en ciclos de agonista ni de antagonista. Los niveles de LH en 6º día de estimulación se correlacionaron con la progesterona al término de la estimulación sólo en protocolos de agonista ($R^2=0,14$; $p<0,05$). Finalmente, los niveles de LH y de progesterona en el día de la administración de HCG mostraron correlación significativa aunque discreta tanto en ciclos de agonista ($R^2=0,18$; $p<0,05$) como de antagonista ($R^2=0,16$; $p<0,05$). Aplicando análisis multivariado al estudio de correlación, y ajustando por variables potencialmente confusoras actividad de FSH administrada, número de folículos mayores de 11 mm y estradiol en el día de la HCG, los autores concluyeron que la correlación entre los niveles séricos de LH y de progesterona en el día de la administración de HCG sólo se mantenía para los ciclos de agonista ($R^2= 0,12$; $p<0,05$), y resultaba por otra parte discreta.

Los autores concluyen que los niveles de LH endógena, bien a lo largo de la estimulación o al final de la misma, pueden contribuir a la EPP, pero no parecen desempeñar un papel causal nuclear respecto a la misma cuando se ajusta su efecto por las variables que suelen actuar como confusoras. Entre éstas, se destacaría la intensidad de la estimulación, estimada por medio de la dosis de FSH administrada, y principal responsable de la elevada esteroidogénesis en la granulosa. El efecto de la elevación de LH endógena en la fase final de la estimulación puede ser considerado por tanto real pero de escasa magnitud. (82). En conclusión, la mayor parte de la diferencia en la progesterona al término de la estimulación observada al comparar ciclos de agonista y de antagonista sería achacable a la menor actividad esteroidogénica asociada generalmente a éste último protocolo, y sólo en segundo término a las diferencias de LH endógena.

Progesterona basal

La elevación de progesterona sérica con carácter previo al inicio de la estimulación ha sido objeto de varios estudios, que han tratado de evaluar su efecto sobre la probabilidad de gestación clínica, y, más recientemente, su capacidad predictiva en relación con la EPP al término de la estimulación.

Kolibianakis realizó un estudio de cohortes prospectivo para evaluar el impacto de la elevación de progesterona en el segundo día del ciclo sobre la probabilidad de gestación en pacientes tratadas con FIV-TE bajo protocolo de antagonistas GnRH (83). El inicio de la estimulación ovárica se llevó a cabo en segundo día del ciclo en aquellas pacientes

con niveles de progesterona normales ($\leq 1,6$ ng/mL) ($n = 390$), mientras que se postpuso en las que presentaban niveles basales elevados ($n=20$) hasta comprobar su normalización tras uno o dos días. Todas las pacientes recibieron estimulación ovárica con FSHr y administración de antagonista GnRH a partir del 6° día de tratamiento gonadotrópico. La exposición global durante a progesterona y a estradiol durante la estimulación fue estimada calculando el área bajo la curva a partir de las determinaciones séricas basales y en día 6° y 8° de estimulación. Las pacientes con progesterona basal normal presentaron un área bajo la curva de progesterona significativamente menor, y bajo la curva de estradiol significativamente mayor respecto al grupo con progesterona basal elevada (4,7 vs 8,4 ng/mL-día ; $p=0,001$; 2954 vs 1439 pg/mL-día; $p=0,001$). Con respecto a los resultados gestacionales, las pacientes con progesterona basal elevada presentaron menor frecuencia de gestación por ciclo inicio iniciado (5% vs 31,8%; $p=0,01$) y por transferencia embrionaria (6,3% vs 36,9%; $p=0,01$), así como menor probabilidad de implantación (3,6% vs 21,1%; $p=0,01$).

Con este mismo objetivo, Blockeel (84) realizó un estudio de cohortes prospectivo en el que las pacientes con niveles basales menores de 1,5 pg/mL de progesterona iniciaron la estimulación ovárica, mientras que las que superaban este umbral de progesterona recibieron tres días de tratamiento previo con antagonista de la GnRH, que logró la reducción de la progesterona basal en todos los casos. No se observó diferencia significativa en la frecuencia de gestación al comparar los dos grupos. La conclusión de este estudio es que el pretratamiento con antagonistas GnRH es eficaz en la reducción de la progesterona basal elevada, no perjudica el rendimiento de la estimulación ovárica, y podría prevenir eficazmente el posible efecto nocivo de la exposición endometrial precoz a progesterona.

Otro estudio de casos y controles anidado acerca del efecto de la progesterona basal sobre la probabilidad de gestación evolutiva ha sido publicado por Hamdine en 2014 (85). Con este objeto, estos autores analizaron 158 pacientes procedentes de un estudio prospectivo aleatorizado y multicéntrico destinado a evaluar el efecto del día de inicio del antagonista GnRH sobre la frecuencia de gestación (día 2 frente a día 6 de estimulación). Se consideró como caso a las pacientes que presentaron una progesterona al inicio de la estimulación superior a 1,5 ng/mL, y controles a las que presentaban progesteronas séricas por debajo de este umbral. Los resultados gestacionales fueron además analizados considerando separadamente los ciclos que habían recibido antagonista desde el segundo día de estimulación y las que lo recibían desde el sexto día. Este estudio no detectó la existencia de diferencias significativas en frecuencia de gestación clínica entre el grupo de casos y el de controles (27% vs 19%; $p=0,6$).

En esta misma publicación, los autores aportan adicionalmente un metaanálisis de dos de los estudios previamente descritos (83, 84), que aunque destinados a otros objetivos principales, evalúan secundariamente la influencia del nivel basal de progesterona sobre la frecuencia de gestación evolutiva. El metaanálisis concluye la existencia de asociación significativa entre los niveles elevados de progesterona basal y la frecuencia de gestación evolutiva, y estima la reducción del porcentaje de gestación clínica en un 15% (DAR: -0,15; IC 95%: -0,23; -0,07; $p < 0,003$). Los autores recomiendan dar un valor limitado a estas conclusiones, considerando que se trata de un metaanálisis basado en dos estudios, que analizan estrategias de intervención diferentes y sólo abordan como objetivo colateral el análisis sobre el efecto de la progesterona basal (85).

La relevancia del nivel de progesterona basal como factor predictivo de elevación del progesterona sérica en día de HCG fue analizada por el estudio de Papaleo, en el contexto de un estudio de cohortes retrospectivo destinado a identificar factores pronósticos asociados a la elevación precoz de progesterona durante la estimulación para FIV-TE (86). Analizando una cohorte de 303 pacientes, no se halló asociación significativa entre la concentración sérica de progesterona en el día de la HCG y la probabilidad de gestación clínica tras transferencia embrionaria en día +3 de desarrollo embrionario (AUC: 0,58; IC 95%: 0, 51; 0,66, $p = 0,02$). Considerando sólo la parte de la muestra con valores de progesterona final por encima de la media (0,9 ng/mL), se identificó un umbral de progesterona al final de la estimulación (1,35 ng/mL) con efecto negativo en la probabilidad de gestación clínica (OR: 2,24, IC95%: 1,05; 4,80). En este estudio, la edad de la paciente, así como los niveles basales de FSH, LH, AMH y recuento de folículos antrales no mostraron asociación con la EPP. Por el contrario, el nivel de progesterona basal, la dosis total de FSHr administrada, el estradiol final y la duración de la estimulación sí se asociaron a la frecuencia de EPP, siendo la progesterona basal el factor pronóstico con mayor OR (OR = 12,21, 95 % CI 1,82-81,7).

En este mismo estudio se aplicó un diseño de casos y controles anidado en la cohorte para evaluar el efecto de la exposición a niveles altos de progesterona basal comparando las pacientes con EPP al término de la estimulación ($>1,35$ ng/mL; casos) y las que no presentaron dicha elevación (controles), hallándose diferencias significativas (OR = 2,90; IC95 %; 1,24–6,78). Aun considerando con cautela los resultados teniendo en cuenta el escaso tamaño de la muestra y el análisis parcial de la misma, los autores concluyen que la progesterona basal es la principal causa de EPP, cuya utilidad reside en que puede ser detectado antes del inicio de la estimulación.

Dosis de actividad FSH

La dosis inicial de actividad FSH adecuada para la estimulación debería seleccionarse con la intención de obtener un rendimiento idóneo del ciclo, que en términos cuantitativos podría estimarse en la obtención de entre 8 y 15 ovocitos (Shunkara, 2011). La estimación de la dosis inicial de FSH más idónea para lograr este objetivo terapéutico debe tener en cuenta características de la paciente como su edad, índice de masa corporal, antecedentes de respuesta a estimulaciones previas, y predictores de respuesta como el recuento de folículos antrales, y las concentraciones séricas de AMH y FSH, y tratar de no rebasar los límites de seguridad que expondrían a una hiperrespuesta y a un incremento del riesgo de EPP (20, 87).

En relación con el perfil de esteroidogénesis propio de los ciclos estimulados en protocolo de antagonista, el estudio de Out (88), destinado a comparar la eficacia y seguridad de la estimulación diaria con 150 frente a 200 UI de FSHr observó del tratamiento con antagonista determinó una previsible reducción de las concentraciones séricas de LH en los dos brazos, mientras que las de FSH se mantuvieron a expensas de la aportación exógena. Sin embargo, el grupo que recibió dosis más altas de FSHr presentó también niveles séricos de LH, de estradiol y de progesterona significativamente superiores al grupo de baja dosis de FSHr.

Fuente de actividad FSH

Las diferencias en el perfil de bioactividad descritas entre las diferentes preparaciones comerciales de gonadotropinas con actividad FSH han generado prolongadas discusiones en relación con su posible efecto en la efectividad. La FSH endógena es en realidad una superfamilia de productos de síntesis que presentan diferencias en su fracción glucídica, que resulta marcadamente heterogénea, aunque reconoce un cierto patrón de evolución durante la fase folicular (89). Se han descrito también variaciones diacrónicas en el perfil de glicosilación de la FSH relacionadas con el periodo de la vida fértil, lo que podría estar en relación con su vida media, su afinidad por los receptores específicos de la célula gonadotropa y con su actividad molecular sobre los mismos (90). En cultivos experimentales de complejos cúmulo-ovocito, las isoformas con menor carácter ácido producen una acumulación de AMPc mayor que la observada tras exposición a formas más ácidas. La liberación característicamente intermitente de isoformas de FSH poco ácidas, dotadas de menor vida media de eliminación y de menor afinidad por el receptor, parece suficiente para generar las respuestas fisiológicas habituales y para permitir el mantenimiento de una receptividad adecuada a FSH. Este

patrón, junto con la liberación ocasional de pulsos de isoformas más ácidas, parece el idóneo para producir la maduración folicular en las fases de este proceso sensibles y dependientes de gonadotropinas, y de contribuir así la ovulación de ovocitos fecundables. La proporción relativa de isoformas ácidas/poco ácidas presentes en los preparados de actividad FSH de origen urinario y recombinante podría determinar diferencias sutiles en sus acciones biológicas, que podrían no tener expresión en parámetros de efectividad relacionados con respuesta ovárica, pero sí ser capaces de producir efectos diferenciales sobre la modificación de la esteroidogénesis folicular durante la estimulación ovárica. Se ha propuesto que esta heterogeneidad en los patrones de actividad podría asociarse a la producción de progesterona como respuesta a la acción farmacológica de los preparados de FSH (2), aunque no se dispone de estudios diseñados específicamente a contrastar esta hipótesis.

Adición de actividad LH

Como se ha señalado con anterioridad, la adecuada comprensión del efecto de la acción fisiológica de LH –y de la esperable en el contexto del ciclo estimulado con adición de actividad LH– requiere considerar por separado sus acciones sobre teca y granulosa. Por un lado, la LH interactúa de forma tónica los receptores de las células tecales, estimulando a actividad CYP17 del complejo CitP450, responsable de la conversión de progesterona (por la vía $\Delta 4$) y pregnenolona (por la vía $\Delta 5$) en sus respectivos derivados hidroxilados. El resultado de esta acción es el consumo de parte de la progesterona sintetizada en la teca. Por otro lado, la LH estimula también la actividad 3β -HSD, que estimula la conversión de pregnenolona en progesterona. En consecuencia, la acción global de la LH sobre la producción tecal de progesterona depende del balance entre estas dos actividades enzimáticas (57). También se ha referido que la acción de LH sobre la granulosa depende de la adquisición por parte de sus células de receptividad a la misma, lo que ocurre a partir de la fase folicular avanzada. Se ha demostrado la existencia de un sinergismo entre FSH y LH en la estimulación de la producción de progesterona en la granulosa, y que la potencia relativa de LH en la inducción de la esteroidogénesis es mayor que la de FSH (42).

La complejidad y evolutividad de las acciones de LH sobre teca y granulosa permiten comprender la controversia que rodea el uso de preparados gonadotrópicos con acción LH sobre el riesgo de EPP es motivo de discusión actual (57). Las discrepancias entre los estudios publicados al respecto podrían explicarse en virtud de su heterogeneidad, y más específicamente en la diferente pauta de inicio en la administración de LH (desde el comienzo de la estimulación o a partir del 5º-6º día), en razón de la mencionada evolutividad de la receptividad a LH de las células granulosas. Otra fuente de

heterogeneidad, que limita la comparabilidad de los estudios, es el tipo de actividades FSH y LH utilizadas, que fue de origen recombinante en algunas publicaciones y de origen extractivo en otras (24).

El estudio MERIT, ensayo clínico pragmático y multicéntrico destinado a comparar la eficacia y seguridad de HMG frente a FSHr en la estimulación ovárica para FIV-TE bajo protocolo largo de agonistas, incluyó entre sus objetivos secundarios evaluar la producción de progesterona al término de la estimulación (91). El efecto de la EPP sobre la frecuencia de gestación pudo ser analizada con potencia estadística adecuada gracias su gran tamaño muestral utilizado, dado su carácter multicéntrico (92). Las concentraciones de progesterona en sangre periférica y en líquido folicular fueron significativamente superiores en las pacientes tratadas con 225 UI de FSHr en comparación con las que recibieron la misma dosis de HMG ultrapurificada, incluso ajustando por número de ovocitos obtenido. Por tanto, este hallazgo no podría explicarse sólo en virtud de la mayor respuesta ovárica a la acción de la FSHr, que se tradujo en una media de ovocitos significativamente superior (2 ovocitos). Contrariamente, las concentraciones de andrógenos y estrógenos en líquido folicular (androstenediona, testosterona, fracción libre de andrógenos, y ratios estradiol/androstenediona, estradiol/testosterona total and estradiol:progesterona) fueron más elevadas en el grupo tratado con HMG. Además, en las pacientes estimuladas con FSHr se detectó una correlación significativa entre el volumen de masa celular granulosa (estimada a través del número y diámetro de los folículos en crecimiento) y la cantidad de progesterona circulante (91). Un análisis conjunto de los dos grupos de este estudio reveló asociación entre niveles elevados de progesterona sérica en el día de la HCG (> 4nmol/L) y mayor respuesta ovárica. Estos hallazgos resultan consistentes con los obtenidos en el análisis primario de los resultados del ensayo, en el que el grupo tratado con FSHr se caracterizó por mayor respuesta a la estimulación y un perfil endocrinológico que sugiere menor conversión de progesterona a andrógenos, hipotéticamente asociado a la ausencia de actividad LH/HCG en los preparados de FSHr. La limitación más importante de las conclusiones del estudio es que la administración de HCG se realizó con tamaños foliculares significativamente mayores en el brazo tratado con FSHr, lo que podría constituir una fuente de sesgo (2).

El otro gran estudio destinado sobre efectividad y seguridad de HMG ultrapurificada frente a FSHr, conocido como MEGASET, comparó aleatorizadamente el resultado de la administración de 150 UI/día de HMG frente a la misma dosis de FSHr, en pacientes con perfil de normorrespuesta y bajo protocolo de antagonista GnRH (93). Este estudio no detectó diferencias significativas en los niveles de progesterona en el día de la HCG, a pesar de que sí observó diferencias en el número de ovocitos obtenidos, que fue mayor

en el brazo tratado con FSHr. Por tanto, la hipótesis de que la exposición farmacológica a la actividad LH desde el inicio de la estimulación puede prevenir la EPP no puede considerarse confirmada.

La contribución más extensa al conocimiento del efecto de la adición de actividad LH al régimen de estimulación ovárica sobre la EPP lo constituye una revisión sistemática no metaanalítica publicada en 2012 por Hugues (57), elaborada a partir de 21 estudios primarios que comparaban la efectividad y seguridad de HMG o HMG ultrapurificada frente a FSH de origen urinario o recombinante, de otros 6 en los que comparó el efecto de FSH aislada frente a la combinación FSH+LHr, y de siete más que compararon FSH frente a FS+HCG. Todos los estudios primarios fueron prospectivos, y una amplia mayoría aleatorizados; en todos ellos se registraron los datos relativos a la concentración final de progesterona al término de la estimulación de forma también prospectiva. Los autores consideran, a pesar de la considerable heterogeneidad de los estudios en lo relativo a dosis, tratamientos adicionales e intervenciones asociadas, que es posible concluir en la inexistencia de impacto significativo de la adición de actividad LH sobre la elevación de progesterona en la mayoría de los estudios. Sin embargo, en cuatro estudios –tres con HMG y uno con LHr, en los que la actividad LH fue administrada desde el inicio de la estimulación – los valores de progesterona en el día de la HCG fueron significativamente inferiores en el grupo que recibió tratamiento con actividad LH. Por el contrario, en dos de los estudios en los que la actividad LH fue administrada al final de la estimulación, las concentraciones séricas de progesterona fueron significativamente mayores en el grupo con actividad LH (57). El análisis sobre posibles efectos confusores, aunque limitado, sugirió que la intensidad de la respuesta a la estimulación podría explicar las diferencias observadas en la progesterona final, ya que los estudios en los que se observó un descenso de la misma en el grupo que recibió LH fueron también los que registraron menor respuesta a la estimulación. A pesar de ello, Hugues propone interpretar el efecto diferencial de la LH sobre la producción de progesterona en función del momento de inicio de la adición de LH a través de hipótesis con base fisiológica: en la teca, la LH ejerce un efecto dual sobre la producción de progesterona, mientras que la granulosa es un potente estimulador de su síntesis sólo a partir de la fase final de la estimulación. La incorporación precoz de LH a la estimulación estimularía la conversión de progesterona tecal, y por tanto reduciría su liberación a la circulación periférica, mientras que el inicio tardío del tratamiento con LH incidiría sobre una granulosa sensibilizada a su acción, y se saldaría con un notable incremento de la producción, que determinaría su ingreso en la circulación una vez difundida a la teca.

Un estudio danés analiza los efectos de distintas dosis de HCG administradas desde el primer día de estimulación con 150 UI/día de FSHr y bajo protocolo largo de agonista

(94). A través de un diseño de ensayo clínico de búsqueda de dosis, administraron entre 0, 50, 100 y 150 UI/día de HCG a 62 pacientes distribuidas aleatoriamente en cuatro grupos. Según las observaciones de este estudio, la concentración sérica de progesterona y de 17-hidroxiprogesterona se incrementó progresivamente a lo largo de la estimulación en los cuatro grupos de dosis de HCG, y la magnitud de dicho incremento resultó dependiente de la dosis de HCG administrada, ascendiendo desde el 49% (IC 95%: 18%; 90%) en el grupo sin adición de HCG hasta 160 % (IC 95%: 95%: 247%) en el grupo tratado con 150 UI/día de HCG. En consecuencia, la exposición precoz a la actividad LH aportada por la HCG es capaz de incrementar, incluso a dosis bajas, la síntesis de progesterona, y por lo tanto, el riesgo de EPP.

Este mismo grupo ha publicado posteriormente nuevas observaciones acerca de la dinámica de producción de estos esteroides en ciclos de estimulación ovárica, concluyendo que, en la fase final de la estimulación, los niveles de 17-hidroxiprogesterona son mucho más elevados de los de progesterona (95). Considerando que la 17-hidroxiprogesterona es capaz de interactuar con el receptor de progesterona, estos autores proponen que podría ser un marcador más preciso de exposición progestagénica precoz del endometrio con más utilidad que la propia progesterona. Así la relación progesterona/17-hidroxiprogesterona en fases folicular y lútea representa, para estos autores, un promotor estimador dinámico de actividad progestacional. En la fase preovulatoria de un ciclo espontáneo, esta relación suele ser 4:1, mientras que el mencionado estudio de Thuesen ha observado concentraciones séricas de 17-hidroxiprogesterona superiores a las de progesterona. Esta alteración de la relación podría deberse a la conversión folicular de progesterona a su derivado 17-hidroxilado por la vía $\Delta 4$, que difundiría la circulación general y sería detectable.

El grupo de Thuesen ha elaborado un tercer estudio orientado a conocer la influencia de la acción LH aportada por la HCG en el medio esteroideo intrafolicular, y su traducción en el perfil endocrinológico del ciclo estimulado (96). En la misma serie de 62 pacientes, estos autores relacionan las concentraciones de esteroides en líquido folicular con dosis de HCG recibida, tamaño folicular y calidad embrionaria. La suplementación con HCG produjo un incremento significativo de estradiol, androstendiona y testosterona de entre 3 y 5 veces. La ratio estradiol/testosterona decayó con la cantidad de HCG administrada, y los folículos cuyos ovocitos generaron embriones de buena calidad presentaron mayor tamaño, niveles intrafoliculares de estradiol y progesterona y ratios estradiol/testosterona, estradiol/androstendiona y progesterona/estradiol significativamente superiores, en comparación con los folículos de los que se derivaron embriones de menor calidad. Según estos datos, la suplementación con actividad LH aportada por la HCG incrementaría de forma muy notable la producción de andrógenos y

de estrógenos, sin merma de la producción de progesterona en los folículos funcionalmente más aptos.

Un estudio de cohortes prospectivo publicado en 2014 por Requena fue diseñado con el objetivo primario de comparar el perfil endocrinológico asociado a la estimulación con FSHr+LHr frente al obtenido con HMG+FSHu en un grupo de 100 donantes de ovocitos. El uso de la combinación de gonadotropinas recombinantes se asoció a mayor número de ovocitos obtenidos (16,5 vs 11,9; $p=0,049$), aunque con menor frecuencia de madurez ovocitaria (71,2% vs 80,6%; $p=0,003$). Las concentraciones séricas de esteroides – incluyendo progesterona– en 6º día de estimulación y en día de HCG no mostraron diferencias significativas, que tampoco fueron detectadas en los líquidos foliculares aspirados. En términos de resultados clínicos, las frecuencias de gestación obtenidas con los dos regímenes de estimulación fueron comparables (97).

El estudio de Nayak acerca el efecto de la concentración de progesterona sérica en el día de la punción folicular sobre la probabilidad de gestación clínica y nacido vivo planteó como objetivo secundario un análisis de subgrupos para determinar la posible asociación de la adición de LH para la estimulación ovárica, con la EPP y el resultado gestacional de ciclo. Analizando por separado ambos tipos de pacientes, la asociación negativa entre la EPP y probabilidad de gestación mantuvo la significación estadística en el grupo de pacientes tratado sólo con FSHr ($n=138$) –incluso ajustando por edad, número de ovocitos obtenidos, dosis total de FSH administrada y estradiol final– pero no entre las que recibieron tratamientos que contenían además actividad LH ($n=38$). Los autores argumentan que esta modificación de la asociación detectada en el análisis bivariado puede estar en relación con su escaso tamaño muestral (77).

Considerando los estudios de la revisión de Hugues y del estudio MERIT en relación con la relación entre la exposición a actividad LH y el menor incremento de la progesterona al final de la estimulación, Werner analizó una cohorte retrospectiva de más de 10000 ciclos con el objeto de evaluar si la proporción de actividad LH y FSH aportada por el tratamiento de estimulación determinaba el aumento de la progesterona final, partiendo de la hipótesis de un posible efecto protector de la exposición a LH, y realizando tanto un análisis global como por subgrupos según la respuesta ovárica obtenida (98). Se incluyeron en el análisis primeros ciclos de FIV/ICSI desarrollados bajo protocolo de agonistas o antagonistas, definiendo la exposición como la ratio LH/FSH alta. Se consideró como variable de resultado la obtención de progesterona sérica final igual o mayor de 1,5 ng/mL (que determinó la vitrificación electiva de los embriones). Las covariables consideradas fueron el número de folículos obtenido, el número de ovocitos –estratificado por tipo de respuesta–, la edad, el diagnóstico, el protocolo de análogo

agonista y el estradiol final. Los ciclos sin adición de actividad LH el mayor riesgo de incremento de progesterona sérica (RR: 2,0; IC 95%: 1,8; 2,2), mientras que los ciclos con menor riesgo de EPP fueron los estimulados con ratios LH/FSH comprendidos entre 0,3 y 0,6 (RR: 1; categoría basal). Los ciclos tratados con ratio LH/FSH menor de 0,3 se caracterizaron por incremento significativo de la EPP aunque menor (RR: 1,6; IC 95%: 1,5; 1,7), mientras que los que recibieron ratios LH/FSH mayores de 0,6 presentaron un incremento de la EPP que comprendió el límite de la significación (RR: 1,1; IC 95%: 1,0; 1,3). El efecto de la ratio LH/FSH sobre la EPP persistió tras el ajuste por número de folículos > 14 mm, estradiol final, diagnóstico de SOP y tipo de estimulación (OR ajustado: 0,42; IC 95%: 0,38; 0,47). La frecuencia de EPP estuvo en relación directa y lineal con el grado de respuesta a la estimulación, ya que se observó en el 11% de los ciclos con baja respuesta (<5 ovocitos) en el 22% de las respuestas normales (5-19 ovocitos) y en el 37% de los ciclos con hiperrespuesta (≥ 20 ovocitos) ($p < 0,001$). Dentro de los estratos de normo e hiperrespuesta, los ciclos estimulados sólo con FSH presentaron frecuencias de EPP más elevadas (32% y 57% respectivamente), y la de los segundos fue significativamente superior a la de los primeros. A partir de este análisis, autores concluyen que la adición de actividad LH en la proporción idónea protege frente a la EPP, por lo que la exclusión de la LH de la estimulación ovárica es una medida antifisiológica que puede producir una disregulación yatrogénica de la receptividad endometrial. Además, según los resultados, el efecto protector de la actividad LH se produce en todos los estratos de respuesta a la estimulación, y la proporción LH/FSH de 1:3 a 2:3, fácil de mantener en los esquemas terapéuticos, es la que se se asocia a menor riesgo de EPP.

Protocolo de análogo GnRH

Asumiendo las diferencias en el perfil evolutivo las gonadotropinas endógenas y en la respuesta a la estimulación según el tipo de análogo de la GnRH aplicado, se consideró la hipótesis de asociación entre éste y el nivel de progesterona. Sin embargo, los resultados de los estudios que han analizado esta cuestión como objetivo primario o secundario no han proporcionado resultados consistentes respecto a la diferencia en la magnitud del efecto de la EPP en función del tipo de análogo GnRH. (2, 24)

Hugues realizó un análisis sobre la influencia de los niveles endógenos de LH tras la administración de análogos de la GnRH sobre la frecuencia de EPP en el día de la HCG siguiendo un diseño de estudio retrospectivo de cohortes sobre una muestra de 708 ciclos de FIV/ICSI (82). Los niveles séricos de progesterona al final de la estimulación fueron significativamente menores en el grupo de pacientes tratadas con antagonista GnRH en comparación con las que recibieron protocolo largo de agonista. En el grupo

tratado con agonista se identificó una correlación positiva entre la progesterona final y el nivel de LH en 6º día de la estimulación, así como con el área bajo la curva de LH. En ambos grupos –ciclos con agonista y con antagonista– se detectó correlación entre los niveles de progesterona y de LH en el día de la HCG. Por medio del análisis multivariado, se detectó asociación entre la progesterona final y los niveles séricos de estradiol en el día de la HCG, y entre aquella y la dosis total de FSH administrada; dichas asociaciones resultaron significativas tanto en pacientes tratadas con agonistas como con antagonistas. La asociación entre progesterona y LH en el día de la HCG sólo se mantuvo significativa en el análisis multivariado del grupo tratado con agonista. La mayor frecuencia de EPP observada en el grupo de agonistas podría ser explicada, según los autores, por la mayor actividad esteroideogénica de las células granulosas.

La influencia del tipo de análogo de GnRH empleado en la estimulación ovárica sobre la prevalencia de EPP fue abordada análisis por subgrupos específico en el estudio de Venetis de 2013, que objetivó una tendencia a la disminución de la EPP con el uso de antagonistas de la GnRH en comparación con los agonistas, si bien ésta no alcanzó significación estadística (Coeficiente de correlación= -0.53, IC 95%: -1,10; 0,03) (63).

El relevante estudio de cohortes retrospectivo publicado por Bosch en 2010 observó que la EPP era mayor en las pacientes tratadas con agonistas de la GnRH, respecto a aquellas que reciben tratamiento con protocolo de antagonistas ($0,84 \pm 0,67$ vs $0,75 \pm 0,66$ ng/ml, $p= 0,0003$). Al tratarse de un estudio no aleatorizado el grado de heterogeneidad podría introducir factores de confusión (16).

Otro estudio de interés al este respecto es el publicado por Papanikolau en 2012. Se trata de un ensayo clínico controlado aleatorizado sobre 94 pacientes bajo tratamiento con protocolo largo de agonistas, y 96 pacientes con protocolo de antagonistas fijo, y diseñado con otro objetivo. La incidencia de EPP, definida con progesterona sérica en el día de la hCG >1.5 ng/ml, fue similar en ambos grupos (23% con antagonistas vs 24.1% bajo agonista) Los resultados reproductivos en ambos grupos fueron similares, y se objetivó un descenso en la frecuencia de gestación en presencia de EPP (9.5% vs 31.8% en el grupo de agonistas, y 14.3 %vs 34.3% en el grupo de antagonista) (99).

En relación con la influencia del inicio del tratamiento con antagonista, se ha referido ya el subanálisis realizado por Hamdine a partir de los datos de un ensayo clínico sobre el efecto de la introducción precoz (2º día de estimulación) o tardía (6º día) de la primera dosis del antagonista de la GnRH en ciclos de estimulación con dosis de FSH propias de paciente normrespondedora (150-225 UI/día) (85). La frecuencia global de elevación de progesterona ($< 1,5$ ng/mL) fue 13,3%. La aparición de EPP se asoció reducción de

la frecuencia de gestación (19,0% vs 27,0%; $p=0,6$), y no se apreció efecto del día de inicio del antagonista sobre la frecuencia de EPP ni sobre la de gestación.

Respuesta a la estimulación

Diversas publicaciones han sugerido que el riesgo de elevación de progesterona está en relación con el grado de respuesta a la actividad FSH durante la estimulación ovárica. De hecho, la elevación de la progesterona en el día de la HCG está fuertemente correlacionada con el estradiol sérico al término de la estimulación y con el número de ovocitos obtenidos (16, 33, 87). Este hecho es explicable desde la hipótesis del incremento de la masa de células granulosas productoras de progesterona, por efecto directo de la estimulación ovárica. Diversos autores han propuesto la existencia de una correlación lineal entre respuesta ovárica y síntesis de progesterona previa a la administración de HCG, que permitiría identificar puntos de corte predictores de EPP (9,5 folículos > 11 mm y 1790,5 pg/mL de estradiol) (33)

En una serie de estudios relevantes para entender el mecanismo que asocia el desarrollo folicular múltiple inducido por la estimulación ovárica y la EPP, Kyrou describió la ausencia de asociación entre la concentración de estradiol en el día de la administración de HCG y la frecuencia de gestación clínica, por medio de un diseño de cohorte prospectiva compuesta por 207 pacientes (100). Posteriormente, la misma autora detectó una relación entre el incremento del estradiol al término de la estimulación, el número de folículos en desarrollo y la elevación de progesterona (33). Según los resultados del segundo estudio, la elevación del estradiol por encima de 1790,5 pg/mL y la presencia de más de 9,5 folículos con diámetro ≥ 11 mm se asocian con un aumento significativo de elevaciones de progesterona superiores a 1,5 ng/mL al término de la estimulación. A partir de estos datos, este mismo grupo desarrolló un modelo de predicción del riesgo de EPP basado en la concentración de estradiol y en el número de folículos que permitiría adoptar decisiones preventivas, como adelantar la administración de HCG, de eficacia aún por evaluar (2, 101).

Otra evidencia acerca de la correlación entre la producción de progesterona en fase folicular y la intensidad de la respuesta a la estimulación procede de estudio de Bosch sobre el efecto de la EPP en la frecuencia de gestación, que concluyó que la obtención de mejor respuesta a la estimulación es un factor pronóstico favorable para la gestación sólo en caso de que no se incremente la progesterona sérica (16).

Así, Kolibianakis en su metanálisis de 2012 relaciona la presencia de EPP con el nivel de estradiol sérico y el número de ovocitos recuperados (65). En el metanálisis posterior de

Venetis et al. 2013 (63) se aportan subanálisis de la capacidad predictiva de la EPP sobre el resultado gestacional en función del tipo de respuesta a la estimulación. Las conclusiones al respecto son que en las pacientes con perfil SOP y/o con hiperrespuesta a la estimulación ovárica, la EPP solo se asocia a una reducción significativa de la frecuencia de gestación clínica, gestación clínica evolutiva y/o nacido vivo cuando dicha elevación es extrema (rango de 1,9 a 3 ng/mL). Por el contrario, en las pacientes con baja respuesta se observó la reducción de la probabilidad de gestación en todos los rangos de puntos de corte empleados para definir EPP (63).

La influencia del patrón de respuesta ovárica a la estimulación gonadotrópica fue analizado también por el estudio de Xu (102). Estos autores estudiaron retrospectivamente una cohorte de 11.055 pacientes tratadas con protocolo largo de agonistas, y observaron una asociación inversa entre la progesterona al final de la estimulación, y la probabilidad de gestación en todos los estratos de respuesta ovárica. Sin embargo, el punto de corte más adecuado para discriminar el resultado del ciclo sí estuvo en dependencia del nivel de respuesta, ya fue de 1,5 ng/mL para las bajas respondedoras (< 5 ovocitos) 1,75 ng/mL para las normorrespondedoras (5-19 ovocitos), y 2,25 ng/mL para las hiperrespondedoras.

El metanálisis de Venetis publicado en 2013 tenía como objetivo secundario evaluar el efecto de la EPP considerando diferentes variables con capacidad teórica de modificación de aquél. Este estudio no observó relación de la EPP con el tipo de respuesta a la estimulación (baja, normal o alta), duración de la estimulación ovárica, ni estadio de desarrollo embrionario en la transferencia. Por el contrario, la EPP sí se asoció en algunos estratos de punto de corte de P con la dosis de actividad FSH empleada, con el número de ovocitos obtenidos y estradiol sérico el día de la hCG (63).

Como se ha mencionado, Griesinger analizó la modificación de efecto de la exposición a EPP en función del número de ovocitos obtenido. La frecuencia de gestación clínica fue del 29,9% en el grupo de baja respuesta, y de 39,2% en las pacientes hiperrespondedoras. En el grupo de bajas respondedoras, las pacientes con EPP presentaron una frecuencia de gestación evolutiva del 18,2% frente al 29,8% observado en las que no presentaron EPP. Por el contrario, las pacientes con hiperrespuesta y EPP gestaron en un 43,2 % de los casos, frente al 39,2 % registrado entre pacientes con hiperrespuesta sin EPP. La conclusión fue que el incremento de la progesterona durante la estimulación se asocia a disminución significativa de la frecuencia de gestación en pacientes con respuesta baja y normal, pero no en el estrato de pacientes de las que se obtuvieron 18 o más ovocitos (OR: 1,18; IC 96%: 0,60: 2,29). A pesar de tratarse de un metanálisis de datos, este estudio cuenta entre sus limitaciones el tamaño reducido de la

muestra, que se hace más patente en los extremos de las distribuciones de número de ovocitos, y la falta de ajuste por parámetros fundamentales como edad, y diagnóstico (75). Aunque estos resultados requieren confirmación por medio de estudios adicionales, parecen sugerir que el efecto adverso de la EPP podría verse compensado por un hipotético aumento de la calidad de los ovocitos disponibles.

Las conclusiones de este estudio han suscitado una reciente controversia sobre la capacidad del mismo para concluir en relación con el análisis de subgrupos, y en concreto sobre el de hiperrespondedoras, considerando su escasa presencia en los ensayos clínicos valorados como fuentes primarias de información (103). Los autores del estudio afirman, en sintonía con el último metanálisis publicado, que la explicación de la discordancia de resultados en el grupo de las hiperrespondedoras entre su estudio y alguno de los precedentes (103) radica en la necesidad de considerar diferentes umbrales para la definición de la EPP en función del tipo de respuesta (63).

El estudio de Bu, orientado también a determinar la influencia de la EPP sobre la probabilidad de nacido por estrato de respuesta ovárica, analizó retrospectivamente un total de 4651 pacientes sometidas a su primer ciclo de FIV-TE. La concentración umbral de progesterona que determinó diferencias significativas en la probabilidad de nacido vivo fue específica por tipo de respuesta: 1,6 ng/mL para respuestas menores de 6 ovocitos, 2,14 ng/mL para respuestas de 6 a 19 ovocitos, y 2,5 para ciclos que produjeron 20 o más ovocitos. La frecuencia acumulada de gestación por ciclo con punción se asoció inversamente con la concentración de progesterona. También se detectó asociación entre la elevación de progesterona con mayor número de ovocitos, menor proporción de embriones de buena calidad, y menor probabilidad acumulada de nacido vivo. Por medio de regresión logística uni y bivariada, se identificó asociación inversa entre la EPP y la probabilidad acumulada de gestación, que resultó independiente de la respuesta ovárica (104).

El análisis multivariado incluido en estudio de Venetis de 2015 analizó la posible modificación de efecto de la respuesta ovárica a la estimulación –estimado por el número de ovocitos obtenido– en relación con la asociación de EPP y probabilidad de nacido vivo. El número de ovocitos fue identificado como el principal factor confusor de esta relación, de modo que la OR cruda de EPP en función del resultado del ciclo fue de 0,79 (IC 95%: 0,56; 1,09), mientras que el ajuste por número de ovocitos redujo en un 29,4 % el valor de la OR, que tras el ajuste dejó de comprender el valor neutro y reveló la asociación significativa (80).

Más recientemente, Fatemi ha analizado la relación entre el grado de respuesta a la estimulación ovárica y la elevación de progesterona en ciclos estimulados con corifolitropina- α y FSHr, como objetivo secundario del estudio ENGAGE, ensayo clínico destinado primariamente a la evaluación de eficacia y seguridad de corifolitropina- α . Este estudio detectó asociación entre la elevación de progesterona sérica por encima de 1,5 ng/mL y el descenso significativo de la frecuencia de gestación en ambos brazos de tratamiento. También observó que elevación de la progesterona sérica por encima de 1 de este umbral fue más frecuente entre las hiperrespondedoras (>18 ovocitos) en los dos brazos de tratamiento, que fueron, por otra parte, las pacientes con mayor frecuencia de gestación (41,9% con corifolitropina- α y 43,4% con FSHr). A pesar de ello, la hiperrespuesta se asoció a un incremento de la probabilidad de gestación, incluso ajustando el efecto por el resto de covariables analizadas, que incluían la elevación de progesterona (OR: 1,87; IC 95%: 1,34; 2,59) (105). Estos datos, junto con los procedentes del estudio de Gresinger, que no halló asociación entre el EPP y la frecuencia de gestación clínica en hiperrespondedoras pero sí en bajas respondedoras (75), han inducido la formulación de una hipótesis sobre el posible efecto diferencial de la EPP en función del tamaño de la cohorte folicular productora de progesterona. Según la misma, el incremento de progesterona como consecuencia del crecimiento de un elevado número de folículos –como ocurre en las hiperrespondedoras– sería efecto de la sumación de múltiples ‘síntesis normales individuales de progesterona’ en cada uno de los folículos en crecimiento, que ejercerían en conjunto el efecto disregulador clásico sobre el endometrio. En contraposición, cuando el incremento de progesterona se produce a expensas de una síntesis muy elevada en una cohorte pequeña de folículos en desarrollo, escenario más frecuente en el contexto de una baja respuesta, los efectos endometriales tendrían lugar igualmente, pero a ellos se añadiría el detrimento de la calidad ovocitaria y embrionaria resultante de una foliculogénesis más defectuosa. No obstante, el posible efecto covariante que factores como la edad, asociada a la intensidad de la respuesta, pudieran ejercer sobre la probabilidad final de gestación queda fuera de la explicación sugerida por esta hipótesis (106).

En un estudio de cohorte prospectivo destinado a comparar la asociación de la progesterona sérica y del cociente estradiol/progesterona con la frecuencia de gestación clínica, los autores identificaron asociación significativa definiendo puntos de corte diferenciados para la asociación de la EPP con la gestación en función del tipo de respuesta: el umbral de EPP para las normorrespondedoras (5-19 ovocitos) fue 1,075 ng/mL, mientras que para las hiperrespondedoras (\geq 20 ovocitos) fue más elevado (1,275 ng/mL) (107).

Otro estudio de cohortes retrospectivo de interés para conocer la posible modificación de efecto producida por la respuesta ovárica en la asociación entre EPP y resultado gestacional ha sido publicado por Li en 2015 (108). Los autores dividieron la cohorte de 3841 ciclos analizada en subgrupos de respuesta ovárica (< 5, 5-19 y > 20 ovocitos). De forma análoga al estudio anterior, los umbrales de progesterona en el día de la HCG que determinaron diferencias significativas en la frecuencia de gestación (2,5 ng/mL para pacientes hiperrespondedoras, 2,25 ng/mL en el grupo de respuesta normal y 1,5 ng/mL en el grupo de baja respuesta). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de fecundación, división embrionaria y calidad embrionaria.

La posible influencia de características de la paciente o de la respuesta a la estimulación sobre el efecto de la EPP sobre la obtención de gestación y nacido vivo ha sido estudiada también por Tsai, por medio de un estudio de cohortes retrospectivo realizado sobre 1508 ciclos de FIV. La exposición a progesterona fue estratificada en baja, intermedia y elevada por medio de dos puntos de corte (1,1 ng/mL y 1,5 ng/mL). La edad de la paciente, así como el día de la transferencia embrionaria, el número de embriones transferidos, el número de embriones de calidad transferidos y la concentración de progesterona en el día de HCG se asociaron a la frecuencia de gestación y de nacido vivo. Sin embargo, al excluir del análisis los ciclos con elevación extrema de la progesterona (>1,94 ng/mL), sólo la edad, el día de la transferencia, y el número y calidad de los embriones transferidos mantuvieron la asociación significativa con la probabilidad de gestación y nacido vivo.

La hipótesis dominante en la actualidad es por tanto que la frecuencia de EPP es superior en pacientes con alta respuesta a la estimulación ovárica, como consecuencia del desarrollo de una mayor 'masa celular' granulosa y de un incremento en la capacidad de producción de progesterona en este compartimento funcional folicular. Sin embargo, la EPP puede detectarse también en ciclos que cursan con baja respuesta a la estimulación, lo que quizá tendría su origen en las elevadas dosis de actividad FSH frecuentemente utilizadas en estas pacientes (24). De hecho, algunos autores han propuesto la EPP durante la estimulación ovárica como una posible manifestación precoz de fallo ovárico oculto, aunque el defecto en la esteroidogénesis ovárica que podría explicarla permanece sin aclarar (109).

Duración de la EPP

Un interrogante adicional es si la EPP actuaría sólo como fenómeno crítico, es decir, cuando la progesterona plasmática alcanza sus niveles más elevados, o si la acción negativa de la P podría deberse también a una elevación discreta pero mantenida.

Aunque no existen datos suficientes para dilucidar esta cuestión, dos estudios han hallado asociación entre la exposición prolongada a elevaciones no extremas de progesterona a lo largo de la estimulación ovárica con una reducción significativa de la probabilidad de gestación clínica.

Kyrou estudió prospectivamente una serie de pacientes menores de 39 años tratadas con protocolo antagonista con inicio fijo. Mediante un diseño de casos y controles, observó que las pacientes que no gestaron tras el ciclo de FIV-TE presentaron una concentración media de progesterona sérica durante la estimulación significativamente mayor que las pacientes con gestación (4,20 ng/mL vs 2,54 ng/mL; $p=0,004$). La capacidad predictiva de gestación de la media de las progesteronas durante la estimulación (AUC: 0,63; $p=0,031$) resultó mayor que la de la progesterona en día de la HCG (AUC: 0,44; $p=0,33$). Además, el único modelo predictivo asociado significativamente con la probabilidad de gestación fue el que contenía el número de ovocitos obtenido más el AUC de la elevación de progesterona (110).

Huang ha publicado un estudio de cohortes retrospectivo destinado a evaluar el efecto de la duración de la EPP sobre la probabilidad de gestación. Tras analizar una muestra de 1784 ciclos de FIV e ICSI, este autor concluyó que el número de días con progesterona sérica superior a 1 ng/mL condicionaba la probabilidad de gestación clínica (OR = 0,77, IC 95%: 0,66; 0,89, $p < 0,001$), incluso ajustando el análisis por covariables potencialmente confusoras. Por el contrario, la concentración de progesterona en el día de la HCG se asoció significativamente en el análisis crudo (OR = 0,65, IC 95%: 0,54; 0,79, $p < 0,01$), pero no en el ajustado (OR = 0,73, IC 95%: 0,53; 1,006, $p=0,054$) (111).

La acción endometrial de la EPP como vía patogénica de alteración de la receptividad ha sido estudiada por Lee en una publicación reciente, que ha analiza el efecto de la EPP sobre la probabilidad de gestación clínica evolutiva en 619 ciclos naturales de criotransferencia de embriones en 2º y 3er día de desarrollo. La EPP ($> 1,5$ ng/mL) se observó en el 28,4 % de los ciclos de CT, y su presencia en el día del pico de LH no determinó diferencias en la frecuencia de gestación clínica (39% vs 37,3%) ni evolutiva (32,5% vs 31,7%). Sin embargo, la EPP previa al pico de LH de dos o más días de duración (que representó el 16,8% de los ciclos con EPP) se asoció a una reducción significativa y muy relevante de la frecuencia de gestación clínica (39,4% vs 20,7%). La frecuencia de EPP fue significativamente superior en pacientes que en las que se había observado durante el ciclo de estimulación ovárica (40,5 % vs 20,0%; $p < 0,001$). Los resultados del análisis multivariado mostraron que la edad de la paciente, la EPP durante más de dos días y la calidad embrionaria se comportaban determinantes independientes de la probabilidad de gestación clínica. (112)

La relevancia de la duración de la EPP ha sido estudiada por Dai en relación con el perfil de respuesta a la estimulación ovárica. Este autor ha realizado un estudio de cohortes retrospectivo sobre un total de 8575 ciclos estimulados bajo protocolo largo de agonista GnRH y destinados a tratamiento con ICSI, en los que tuvo lugar la transferencia embrionaria (113). Las pacientes fueron clasificadas en función del número de ovocitos obtenidos tras estimulación en bajas respondedoras (menos de cinco ovocitos), normorrespondedoras (5 a 15 ovocitos) e hiperrespondedoras (más de 15 ovocitos). La elevación de progesterona en el día de la HCG no se asoció a la frecuencia de gestación en el grupo de bajas respondedoras, aunque sí en las pacientes con respuesta normal o excesiva. Los niveles umbrales de progesterona sérica a partir de los cuales se observó disminución de la frecuencia de gestación fueron específicos para normo e hiperrespondedoras (1 ng/mL y 1,75 ng/mL respectivamente). El análisis multivariado reveló que el efecto de la EPP dejaba de ser significativo una vez ajustado por resto de covariables estudiadas, mientras que el de la duración de la EPP sí resultaba asociado como factor independiente en los tres estratos de respuesta a la estimulación (113).

Los datos precitados pueden apoyar la hipótesis de que que la exposición prolongada a concentraciones leves-moderadas de progesterona sérica podría tener un efecto endometrial acumulado similar –o superior- al ejercido por elevaciones críticas. La consecuencia práctica de esta hipótesis sería que una determinación única de progesterona realizada en el día de la administración de HCG podría no ser un estimador adecuado de la exposición endometrial a este efecto, y que la determinación de un parámetro más cercano al ‘área bajo la curva’ de progesterona sérica podría mejorar la capacidad predictiva sobre gestación y/o nacido vivo.

Cronología de la administración de HCG

Los datos del ensayo de Kyrou sobre el efecto de la administración precoz de HCG en ciclos bajo protocolo con antagonista señalan que realizar la descarga ovulatoria a partir de la existencia de tres o más folículos de 16 mm o más, en comparación con efectuarla un día después, no tiene efectos negativos sobre la frecuencia de gestación evolutiva (34,4% vs 40,7%) pero sí determina una reducción significativa de las concentraciones de estradiol (1388 vs 2014 pg/mL; $p < 0,05$) y de progesterona (0,8 vs 1,1 ng/mL; $p < 0,05$) al término de la estimulación (114).

En una reciente revisión sistemática, Chen ha analizado el efecto de la cronología de la administración de la descarga ovulatoria con HCG sobre la eficacia de la FIV-TE. El

metaanálisis de los seis ensayos clínicos seleccionados, que representa el análisis acumulado de intervenciones sobre 1295 pacientes, observó diferencias en los niveles de estradiol y progesterona al término de la estimulación al comparar los ciclos en los que se administró precozmente la descarga de HCG y aquéllos en los que la administración fue tardía, que se caracterizaron por concentraciones de estradiol y progesterona significativamente más elevadas. No obstante, el metaanálisis no detectó efectos desfavorables de la administración diferida de la HCG respecto a la probabilidad de gestación (115).

Día de transferencia

Un estudio de cohorte prospectiva obtenido del subanálisis de los resultados de un estudio aleatorizado (116), y otro de cohortes puro (117) –ambos con tamaño muestral reducido– han concluido que la EPP reduce la frecuencia gestación si la transferencia embrionaria se realiza en día +3, mientras que no la afecta en ciclos con transferencia de blastocistos en día +5 de desarrollo.

El estudio de cohortes retrospectivo publicado por Ochsenkünn sobre una muestra de 2555 transferencias realizadas en día +5 observó una reducción significativa de la frecuencia implantación y de nacido en los ciclos estimulados bajo protocolo de agonistas en presencia de niveles de progesterona sérica final superiores a 2 ng/mL (17,4% de nacido vivo), en comparación con los que presentaron niveles de progesterona comprendidos entre 1,5 y 1,99 ng/dL (26,7%) y con las que no alcanzaron la concentración de 1,5 ng/mL (24,6%). En contraposición, el efecto de la EPP sobre la frecuencia de gestación en ciclos bajo protocolo de antagonista no resultó significativo (118).

La posibilidad de soslayar el efecto de la EPP mediante la transferencia embrionaria tardía también ha sido explorada por el estudio de Corti publicado en 2013, que consistió en el análisis retrospectivo de una cohorte de 204 pacientes infértiles tratadas mediante ICSI y en las que se programó la transferencia de blastocistos en día +5. Las pacientes consideradas expuestas fueron las que presentaron concentraciones séricas de progesterona superiores a 1,5 ng/mL. Los grupos de expuestas y no expuestas resultaron comparables respecto a edad, IMC, recuento de folículos antrales, niveles de AMH y de FSH séricas, duración de la estimulación, frecuencia de uso de agonistas y antagonistas GnRH y consumo total de actividad FSH. El estradiol final y el número de ovocitos obtenidos fue significativamente más elevado en las pacientes expuestas a EPP. La frecuencia de fecundación, el porcentaje de embriones de alta calidad y el

número de blastocistos transferidos tampoco fue similar. La frecuencia de gestación clínica fue superior en el grupo de pacientes sin EPP (50,0% vs 33,3%; OR: 2,0; IC 95%: 1,07; 3,75). En consecuencia, el efecto de la EPP se mantiene en pacientes que reciben la transferencia de blastocistos, por lo que esta estrategia podría no ser eficaz en la prevención del efecto negativo sobre la receptividad endometrial derivado de la EPP. No obstante, el estudio no cuenta con el diseño adecuado para evaluar la eficacia de la intervención, como señalan sus propios autores (119).

El único ensayo clínico de prueba de concepto que analiza la asociación el momento de la transferencia embrionaria y la frecuencia de gestación en ciclos con EPP ha sido publicado en 2015 por Yang (120). Este autor aleatorizó a un total de 123 pacientes en tres grupos de intervención: transferencia de blastocistos (38 pacientes), vitrificación y transferencia diferida (42 pacientes) y transferencia en fresco en fase de mórula (43 pacientes). Las características basales fueron comparables entre los tres grupos. La frecuencia de gestación fue más elevada en el grupo de criotransferencia (38,1%), intermedia en el grupo de transferencia de blastocistos (31,6%) y significativamente menor a ambas en el grupo de transferencia precoz (13,9%; $p=0,0037$). La frecuencia de implantación del grupo de transferencia en fresco precoz fue muy inferior a las de los dos restantes grupos (6,7% vs 21,9% y 19,8%; $p=0,016$). Finalmente, la frecuencia de nacido vivo no mostró diferencias estadísticamente significativas, a pesar de la magnitud observada en la muestra (11,6% vs 18,4 y 31,0%; $p=0,08$). La recomendación final de los autores, con las cautelas propias del tamaño muestral estudiado, es preferir la criotransferencia en ciclo posterior a las otras opciones como medio de prevención del perjuicio que la EPP produce sobre el rendimiento gestacional de la FIV-TE.

5.2. Estimadores complementarios o alternativos de EPP

Relación estradiol/progesterona

Younis ya señaló que la elevación precoz de progesterona era más frecuente en pacientes con reserva folicular elevada, y sugirió que su producción debía ser entendida como fruto de la actividad del conjunto de folículos en fase de crecimiento terminal (109). A partir de esta idea, estudios posteriores han evaluado la hipótesis de que la ratio estradiol/progesterona permitiría diferenciar las EPP debidas predominantemente a la síntesis de los folículos maduros en crecimiento de aquellas más dependientes de la producción de progesterona por parte de folículos pequeños e intermedios que no han

completado una foliculogénesis idónea al final de la estimulación ovárica (121). La primera situación sería más propia de pacientes con una reserva folicular conservada, mientras que la segunda podría ser una expresión precoz de la reducción sustancial de la reserva ovárica. Partiendo de esta hipótesis, Cetinkaya analizó retrospectivamente una cohorte de 129 pacientes normorrespondedoras tratadas con protocolo de antagonista, con el fin de determinar la capacidad predictiva del cociente E_2/P respecto de la probabilidad de gestación clínica. La curva ROC obtenida presentó un área bajo la curva de 0,67 (IC 95%: 0,56; 0,77; $p < 0,001$) y el punto de corte de cociente E_2/P más adecuado para la predicción de probabilidad de gestación clínica fue 0,48 ng/mL. Utilizando este nivel como umbral de discriminación, se obtuvo una sensibilidad del 69%, una especificidad del 61%, un valor predictivo positivo del 78 % y negativo del 50%, lo que determinó valores modestos de razón de probabilidades positiva (1,76) y negativa (0,51), así como un porcentaje de concordancia diagnóstica del 67 %. Este estudio concluye que, a partir de sus datos, la ratio E_2/P carece de capacidad predictiva suficiente como para ser incorporada como instrumento de valor en el manejo de los ciclos de estimulación ovárica para FIV-TE (121).

La utilidad predictiva de la concentración de progesterona ajustada por la concentración de estradiol en la predicción de la gestación en ciclos de FIV-TE ha sido evaluada también por un estudio de Singh de muy reciente aparición (107). Este grupo ha realizado un estudio retrospectivo sobre una cohorte de 544 pacientes tratadas en un único centro con 539 ciclos, considerando como variables explicativas la progesterona y el cociente progesterona/estradiol, y como covariable principal el número de ovocitos obtenidos. El análisis global de la cohorte puso de manifiesto una asociación negativa de ambas variables –concentración sérica de progesterona en el día de HCG y cociente progesterona/estradiol– y la frecuencia de gestación clínica, sin afectación de la frecuencia de fecundación ni de división embrionaria. La concentración de estradiol no se asoció *per se* a la frecuencia de gestación. Los umbrales a partir de los cuales se identificó esta asociación significativa fueron 1,075 ng/mL para la progesterona y 0,35 para la ratio progesterona/estradiol. Los autores de este estudio identificaron puntos de corte diferenciados para la asociación de la EPP con la gestación en función del tipo de respuesta: el umbral de EPP para las normorrespondedoras (5-19 ovocitos) fue 1,075 ng/mL, mientras que para las hiperrespondedoras (≥ 20 ovocitos) fue más elevado (1,275 ng/mL). Los valores de sensibilidad y especificidad resultantes de estas dicotomizaciones fueron 56% para la primera y 62% para la segunda. El área bajo la curva ROC de análisis de capacidad predictiva de la progesterona sobre la gestación obtenida por este estudio fue significativa pero baja (0,58; IC 95%: 0,53; 0,63; $p=0,006$). En el subgrupo de bajas respondedoras no se apreció asociación significativa. A pesar de la limitación que representa en bajo tamaño muestra y la consiguiente amplitud de los

intervalos de confianza, los resultados de este estudio reconocen el valor de la ratio progesterona/estradiol y se alinean con los estudios que han descrito asociación entre la EPP y la pérdida de oportunidad de gestación en pacientes normo e hiperrespondedoras, pero no en ciclos con baja respuesta.

Progesterona en día de HCG u en día HCG+1

El valor pronóstico respecto de la progesterona sérica en de la administración de la HCG ha sido comparado con el de la progesterona del día previo en un estudio reciente de Lee (122), que ha realizado un análisis retrospectivo de una cohorte de 1457 ciclos consecutivos que alcanzaron la transferencia embrionaria. Los niveles de progesterona en el día posterior a la administración de HCG se incrementaron más de 5 veces respecto al día previo. La frecuencia de implantación embrionaria fue superior en las pacientes con progesterona no elevada en el día de la HCG (35,2% vs 26,6%; $p < 0,05$). La elevación de progesterona sérica por encima del umbral definido para el día HCG+1 se asoció a diferencias significativas en la frecuencia de implantación (35,3% vs 25,7%; $p < 0,05$) y de gestación clínica (49,1% vs 39,3%; $p < 0,05$) respecto a las pacientes que presentaron niveles normales. Mediante regresión logística, se determinó que las tres variables asociadas de forma independiente a la probabilidad de gestación clínica fueron la edad de la paciente, el número de embriones de buena calidad transferidos, y la suma de los niveles de progesterona del día de la HCG y del día previo, que presentaba mejor asociación con la probabilidad de embarazo que la concentración sérica en el día de la HCG. Esta autora describe además una asociación entre la probabilidad de implantación y los diferentes patrones de evolución de la progesterona sérica en la fase previa y posterior a la administración de la HCG, considerando el percentil 90 de las distribuciones como el umbral para definir la EPP (1,7 ng/mL en día de HCG y 9,5 ng/mL en día HCG+1). En el grupo de pacientes que presentaron progesteronas no elevadas en ambas determinaciones, la frecuencia de implantación fue del 36%. En caso de que ambas concentraciones fuesen elevadas, la implantación descendió al 22%. Los datos de este estudio apoyan que la utilización conjunta de los niveles de progesterona en el día de la HCG y en el día siguiente podría mejorar la capacidad predictiva del primer valor aislado, y resultar más útiles para la toma de decisiones en relación con la transferencia embrionaria o la vitrificación electiva.

Ratio progesterona sérica/número de folículos

Algunos autores han propuesto la hipótesis de que la EPP resultaría tanto más nociva para la receptividad endometrial a la implantación embrionaria cuanto más antifisiológica

resulte la dinámica de la síntesis folicular de progesterona (123). De este modo, la EPP que resultaría de una producción normal de progesterona por un número elevado de folículos tendría menor efecto de disregulación endometrial que la EPP fruto de una producción folicular excesiva. Para estos autores, la EPP no debería ser interpretada por tanto a través de la concentración final de progesterona sérica, sino por medio de la relación entre este parámetro y los que expresan respuesta cuantitativa a la estimulación (123). Con el fin de evaluar la influencia de la respuesta ovárica en el efecto de la EPP sobre la probabilidad de gestación en FIV, Shufaro ha evaluado la capacidad predictiva de la ratios progesterona final/nº de folículos ≥ 14 mm (*Progesterone-to-follicle index, PFI*) como estimador del efecto de la EPP. Su estudio analiza una cohorte retrospectiva de 8649 ciclos de FIV convencional e ICSI realizados en un mismo centro a lo largo de nueve años, considerando como población de estudio las pacientes normorrespondedoras –que presentaban entre 3 y 15 folículos de 15 o más mm de diámetro en el día de administración de hCG–, y que recibieron transferencia embrionaria en fresco. Se observó un descenso significativo de la probabilidad de gestación sólo a partir del percentil 93 de la distribución de progesterona sérica (4,2 nmol/L), de forma que pacientes con progesteronas séricas por encima de este umbral presentaron frecuencias de gestación más bajas (OR inversa: 1,11; IC 95%: 1,07; 1,16). La utilización del cociente progesterona/número de folículos para analizar las diferencias en frecuencia de gestación estimó mayor efecto de la elevación de progesterona y con más precisión (OR inversa: 4,1, IC 95%: 3,18; 5,28), y además se relacionó de forma inversa y lineal con la frecuencia de gestación analizada por deciles de PFI. Los autores concluyen a favor de la hipótesis del carácter adverso de la EPP sólo cuando es fruto de un incremento de la producción de progesterona por folículo, y no cuando resulta de un simple reclutamiento folicular elevado.

Algunos autores han propuesto la hipótesis de que la EPP resultaría tanto más nociva para la receptividad endometrial a la implantación embrionaria cuanto más antifisiológica resulte la dinámica de la síntesis folicular de progesterona (123). Así, la ratio progesterona /número de folículos permitiría diferenciar dos situaciones de EPP con distinta fisiopatología y significado pronóstico. Una de los escenarios sería la EPP fruto de una hiperproducción de progesterona por un número normal –o bajo– de folículos en crecimiento como respuesta a la estimulación gonadotrópica. El otro estaría representado por la EPP que resultaría de la síntesis de cantidades normales de progesterona en el seno de un número elevado de folículos (123). Un estudio reciente ha contrastado esta hipótesis comparando la asociación del valor absoluto de la elevación de progesterona y del cociente progesterona/número de folículos en crecimiento (*Progesterone-to-follicle index, PFI*) con la probabilidad de gestación clínica {Shufaro, 2015 #283}. Según esta hipótesis, la primera situación constituiría en mucha mayor

medida un factor de riesgo para la desregulación de la receptividad endometrial, en comparación con la segunda. Los autores realizaron un análisis retrospectivo de una cohorte de 8649 ciclos de FIV-TE aplicados en un único centro a pacientes con perfil de normorrespuesta bajo protocolo de agonista o de antagonista de la GnRH. Tanto la progesterona absoluta en el final de la estimulación como la relación progesterona/folículos ≥ 14 mm en día de HCG se asociaron significativamente con la probabilidad de gestación clínica. Mediante análisis de intervalos, se determinó que la probabilidad de gestación decreció de forma significativa y no lineal a partir de valores superiores al percentil 93 de la distribución de progesteronas en día de HCG, mientras que el índice progesterona/nº folículos también se asoció de manera significativa, lineal e inversa a la probabilidad de gestación clínica. La edad de la paciente, el número de ciclos fracasados previos y el número de ovocitos obtenidos determinaron significativamente la frecuencia de gestación, mientras que el estradiol final y el número de embriones transferidos no mostraron asociación. La frecuencia de gestación fue significativamente superior en las pacientes con progesterona inferior al percentil 93 de la distribución, en comparación con los ciclos en los que la progesterona superó este umbral (RR estimado por OR inverso: 1,11; IC 95%: 1,07; 1,65). La utilización del cociente progesterona/número de folículos para analizar las diferencias en frecuencia de gestación estimó mayor efecto de la elevación de progesterona y con más precisión (OR inversa: 4,1, IC 95%: 3,18; 5,28). Esta asociación se mantuvo tras ajustar por edad de la paciente y tipo de protocolo de supresión hipofisaria (Progesterona final: RR estimado por OR inverso: 1,11; IC 95%: 1,07; Progesterona/nº folículos: RR estimado por OR inverso: 2,98; IC 95%: 2,3; 3,8).

5.3. Justificación de estudio:

El conocimiento acumulado hasta la actualidad con respecto al efecto de la EPP sobre la posibilidad de gestación, que no puede calificarse de escaso, sugiere claramente una asociación negativa entre ambas, que permitiría considerar, la EPP como factor de riesgo para la implantación embrionaria y la gestación subsiguiente. Sin embargo, a pesar de la abundancia de estudios primarios y metaanalíticos, hay varias cuestiones relevantes sin esclarecer en relación con esta asociación. Muchos de estos interrogantes son de interés netamente clínico, puesto que afectan al modo en que podría traducirse la detección de la EPP, en una modificación operativa de la conducta clínica en el ciclo en curso.

El umbral crítico en la concentración sérica de progesterona adecuado predecir un resultado gestacional adverso en ciclos de FIV-TE, y aun la propia posibilidad de definirlo, son aún materia de controversia. Existen además dudas sobre si ese umbral crítico podría ser único, o debería ajustarse en relación con el perfil de la propia paciente, y en especial, con su capacidad de respuesta a la estimulación ovárica.

Se ha señalado reiteradamente que una parte sustancial de la heterogeneidad de los resultados y de la limitada comparabilidad de los estudios, es la dificultad para la propia definición conceptual de la EPP. Una consecuencia de esta heterogeneidad en los criterios de definición es la marcada discrepancia en la frecuencia de EPP estimada por distintos estudios. Muchos de los estudios iniciales parten de una definición arbitraria de la concentración umbral de progesterona utilizada para definir la EPP, que fue adoptada generalmente por criterios de analogía. Son menos los autores, que han escogido el punto de corte en la distribución por procedimientos objetivos, como análisis por intervalos, curva ROC o dicotomización por la mediana.

Otra fuente de variabilidad que limita la validez externa de los umbrales de EPP, baja reproducibilidad y consistencia de los procedimientos de cuantificación analítica utilizados en una buena parte de los estudios disponibles. La mayor parte de los estudios no informa además de esta dimensión de la validez de la prueba, ni en relación con la repetibilidad, ni tampoco con la reproducibilidad o con la robustez. Esta limitación podría resolverse mediante la determinación del nivel crítico en cada centro.

A pesar de todo, gracias a la acumulación de observaciones, a la selección de puntos de corte objetivos para la definición de EPP y a la progresiva mejora de la reproducibilidad de las técnicas de cuantificación, los estudios más recientes convergen hacia la definición de un umbral de progesterona sérica entorno a 1,3-1,6 ng/mL como umbral crítico asociado a la frecuencia de gestación. Sin embargo la selección de un punto de corte para definir un umbral de exposición en una variable continua como la elevación de progesterona entraña la asunción de linealidad en la asociación de esta con la probabilidad de gestación. Esta hipótesis de asociación lineal entre la progesterona sérica al término de la estimulación y la frecuencia de gestación no ha sido constatada en diferentes estudios al respecto.

Otra fuente de discrepancia es la modificación del efecto que la EPP que podrían ejercer variables como la edad de la mujer, el tipo de análogo GnRH utilizado, la magnitud de la respuesta a la estimulación ovárica o el número y calidad de los embriones transferidos. La posibilidad de que la edad de la mujer, por sí misma o a través de su asociación con

el número de ovocitos obtenidos y de embriones de calidad disponibles, pudiera contrarrestar parcialmente el efecto nocivo de la EPP sobre la receptividad endometrial ha sido propuesta como hipótesis explicativa de la ausencia de efecto de la EPP sobre los ciclos con hiperrespuesta, constatada en varios estudios, pero no confirmada por otros {Fatemi, 2015 #286}.

Por otro lado, diversos estudios recientes proponen reformular el concepto de EPP, y entenderla como la exposición acumulativa a elevaciones discretas y mantenidas de progesterona a lo largo de la mayor parte de la estimulación, en contraposición con el concepto clásico de EPP, más cercano a un incremento crítico y final. Hasta la actualidad, sólo dos estudios de cohortes han analizado el efecto de la EPP así definida, y ambos han constatado asociación significativa entre la exposición y la menor probabilidad de gestación (110, 111).

La EPP se ha asociado en la mayoría de los estudios disponibles a ciertos perfiles de paciente, de tratamientos de estimulación y de respuestas a la misma. Se ha observado mayor frecuencia de EPP a mayor número de ovocitos obtenidos, mayor concentración de estradiol sérico en día de HCG, mayor consumo de actividad gonadotrópica y con el uso de FSHr como fuente de estimulación. Como se ha argumentado previamente, cuanto mayor sea la producción suprafisiológica de estradiol, mayor porcentaje de éste se desviará hacia la síntesis de progesterona. Por tanto, de confirmarse el efecto sobre la EPP de ciertas variables relacionadas con la estimulación ovárica que son fruto de decisiones del clínico, podrían proponerse algunos métodos de prevención, si quiera parcial, de la EPP.

Los estudios sobre EPP que han considerado como variable principal de resultado la probabilidad de nacido vivo son desafortunadamente los menos numerosos, ya que la mayoría contemplan como resultado la gestación clínica o evolutiva. No se ha identificado asociación de la EPP con el mayor riesgo de pérdida gestacional, por lo que no parece probable una reducción subsiguiente de la frecuencia de nacido vivo. No obstante, las observaciones directas para determinar esta relación representan una proporción notablemente reducida entre de los estudios disponibles.

Por último, y como señala Venetis en su metanálisis de 2013, conviene recordar que la gran mayoría de los estudios disponibles son de carácter retrospectivo, y se caracterizan además por un grado variable del control de sesgos. Además, en la propia selección de estudios primaria de este metanálisis, la proporción de estudios basados en estimulación ovárica bajo protocolo de agonistas frente a antagonistas es 4:1 (63). A pesar de que el subanálisis correspondiente no halló diferencias en capacidad predictiva en función del

protocolo de análogo aplicado, quedaría por resolver el interrogante de si la luteolisis precoz del ciclo previo inducida por los protocolos largos de agonista podría representar un factor de protección frente a la EPP.

Considerando las lagunas de conocimiento existentes, y la gran sensibilidad que ha suscitado la información disponible sobre la EPP como factor de riesgo para la implantación embrionaria, nuestro trabajo pretende realizar aportaciones adicionales por medio de una aproximación con las siguientes características:

- a) Partir de una definición de la variable de exposición (EPP) no necesariamente dicotómica, asumiendo la posibilidad de una asociación no lineal entre ésta y la probabilidad de gestación y de nacido vivo. Con este objeto, analizaremos la asociación de la variable por medio de técnicas que permitan evaluar su capacidad predictiva conservando el carácter de variable continua.
- b) En orden a su versatilidad, evaluar asimismo la capacidad predictiva de la EPP dicotomizada, pero aplicando procedimientos de estandarización de los valores, por medio de estratificación percentilar o por múltiplos de la mediana.
- c) Considerar la probabilidad de recién nacido vivo como variable primaria de resultado, por ser la más relevante clínicamente. El resto de las variables de resultado serán la frecuencia de gestación clínica, la de gestación clínica evolutiva y la de aborto espontáneo.
- d) Abordar el análisis de causalidad por medio de un estudio de cohorte retrospectiva sobre una muestra de oportunidad de mayor tamaño, destinada a evaluar la asociación, a realizar análisis bivariado de confusión e interacción con respecto a covariables relevantes, y a establecer un modelo de regresión logística con finalidad predictiva, destinado a evaluar la pérdida de probabilidad de gestación asociada a EPP en cada perfil de paciente. El número de observaciones de esta serie proporcionará presumiblemente un poder estadístico adecuado para el análisis multivariado.
- d) Reducir al mínimo el riesgo de sesos, considerando como covariables todas las que pudieran tener efectos relevantes sobre las variables de exposición y efecto (edad de la mujer, IMC, diagnóstico, tipo de análogo agonista utilizado, fuente de actividad gonadotrópica, consumo de gonadotropinas, número de ovocitos obtenidos, número y calidad de embriones disponibles, día de la transferencia, número y calidad de embriones transferidos, entre otras), partiendo de un análisis exploratorio de asociación entre estas variables, la de exposición y las de resultado.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Evaluar el efecto de la elevación precoz de la progesterona durante la hiperestimulación ovárica controlada sobre el resultado gestacional en pacientes tratadas con fecundación in vitro.

5.2. Específicos

5.2.1. Principal

Analizar con intención predictiva la asociación entre la elevación precoz de progesterona, estimada por medio de su concentración al término de la estimulación ovárica, y la probabilidad de nacido vivo en pacientes de la población general tratada con FIV-TE, ajustando por otros factores pronósticos de gestación.

5.2.2. Secundarios

- a) Estimar la frecuencia de la EPP con arreglo a criterios de estratificación obtenidos de la distribución cruda y estandarizada de los valores observados.
- b) Evaluar la existencia de interacción o confusión ejercida por factores pronósticos de resultado gestacional sobre el efecto de la EPP en la frecuencia de gestación y nacido vivo.
- c) Estimar el número de exposiciones necesario para producir daño (*number needed to hard; NNH*) para la cohorte completa, y por subgrupos de pronóstico basados en edad, dosis total de gonadotropinas administradas, respuesta a la estimulación y número y calidad de embriones disponibles y transferidos.

6. HIPÓTESIS

Hipótesis conceptual:

La exposición a niveles elevados de progesterona durante la hiperestimulación ovárica controlada para el desarrollo folicular múltiple en tratamientos de fecundación in vitro reduce por sí misma la probabilidad de nacido vivo, y este efecto tiene lugar con independencia de la edad, del tipo de respuesta a la estimulación y de la calidad de los embriones obtenidos y transferidos.

Hipótesis operativa:*Hipótesis alternativa (H_1):*

La elevación de progesterona sérica, considerada como concentración única en el día de la administración de HCG, reduce por sí misma y en al menos un 10% la probabilidad la probabilidad nacido vivo en pacientes tratadas con estimulación ovárica para fecundación in vitro

Hipótesis nula (H_0):

La elevación de progesterona sérica, considerada como concentración única en el día de la administración de HCG, no causa de forma independiente a una reducción de al menos un 10% de la probabilidad nacido vivo en pacientes tratadas con estimulación ovárica para fecundación in vitro

7. METODOLOGÍA

7.1. DISEÑO

Estudios de cohortes prospectivo y retrospectivo.

7.2. ÁMBITO Y FUENTES DE INFORMACIÓN

La fuente de información del estudio han sido los datos clínicos y de laboratorio generados por la intervención terapéutica en una muestra de la población estudiada, y registrados en la historia clínica. El estudio ha desarrollado en en el ámbito de Clínica Tambre de Madrid, centro especializado en medicina reproductiva.

7.3. POBLACIÓN DE INTERÉS

Pacientes con esterilidad primaria o secundaria, con indicación de tratamiento mediante fecundación in vitro destinadas a transferencia embrionaria en el ciclo de estimulación.

7.4. POBLACIÓN DE ESTUDIO: CRITERIOS DE SELECCIÓN

- Criterios de inclusión:
 - Tratamiento mediante FIV/ICSI realizado con indicación basada en la práctica clínica habitual y tras exclusión de contraindicaciones.
 - Ciclos de tratamiento realizados durante el periodo de estudio con posibilidad de determinar la exposición y la respuesta en los términos definidos por el estudio.

- Criterios de exclusión:
 - Ciclos de tratamiento con imposibilidad de determinar la exposición y la respuesta en los términos definidos por el estudio.

7.5. DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES DEL ESTUDIO

- **Variables independientes (explicativas):**

Concentración sérica de progesterona en el día de la administración de HCG al término de la estimulación ovárica (progesterona final)

- **Variables dependientes (de respuesta):**

- Principal: Frecuencia de nacido vivo tras ciclo de FIV-TE iniciado.

- Secundarias:

- Frecuencia de implantación embrionaria por transferencia
- Frecuencia de gestación clínica por transferencia
- Frecuencia de aborto por transferencia

- **Covariables:**

- Edad
- Índice de masa corporal
- Consumo de tabaco
- Número de cigarrillos consumidos al día
- Recuento basal de folículos antrales
- FSH basal
- Carácter primario o secundario de la esterilidad
- Duración de la esterilidad
- Indicación principal del tratamiento con FIV (factores causales de la esterilidad)
- Número de ciclos previos de FIV-TE
- Número de ciclos previos de criotransferencia
- Progesterona basal
- Protocolo de análogo de GnRH
- Cotratamientos previos o concurrentes con la estimulación ovárica
- Tipo de FSH administrada
- Uso y tipo de actividad LH
- Dosis inicial de actividad FSH
- Dosis inicial de actividad LH
- Consumo total de actividad FSH
- Consumo total de actividad LH

- Día de inicio del tratamiento con antagonista
- Duración del tratamiento con antagonista
- Duración de la estimulación ovárica
- Estradiol sérico en día de administración de HCG
- Número folículos mayores de 10, de 15 y de 17 mm en día de administración de HCG
- Número de ovocitos totales
- Número de ovocitos en metafase II
- Tipo de respuesta a la estimulación
- Origen de los espermatozoides
- Recuento de espermatozoides móviles progresivos
- Técnica de fecundación
- Frecuencia de fecundación normal de ovocitos maduros.
- Número de embriones evolutivos en día +2
- Número de embriones evolutivos en el día de la transferencia
- Número de embriones de calidad A-B disponibles en el día de la transferencia
- Número de embriones transferidos
- Número de embriones A-B transferidos
- Día de transferencia embrionaria
- Dificultad para la transferencia
- Cripreservación embrionaria

7.6. DEFINICIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS DE OBSERVACIÓN Y MEDIDA

7.6.1. Criterios diagnósticos y unidades de medida:

- Progesterona final: concentración sérica de progesterona en el día de la administración de HCG (ng/mL)
- Edad: medida en años completos.
- Índice de masa corporal: cociente entre el peso corporal en kg y la talla en metros (kg/m^2)
- Consumo de tabaco: variable dicotómica.
- Número de cigarrillos consumidos al día: recuento referido por la paciente
- Recuento basal de folículos antrales: recuento de imágenes sonolucetas intarováricas con características morfológicas compatibles con folículos ováricos antrales visibles mediante ecografía transvaginal de alta resolución en fase folicular

- precoz (días 2º a 4º del ciclo). En pacientes sin menstruación clínica, se considerará válido dicho recuento en cualquier exploración.
- FSH basal: concentración en suero de FSH en día 2º-3º de un ciclo espontáneo (UI/L).
 - Carácter primario o secundario de la esterilidad:
 - Esterilidad primaria: incapacidad para obtener gestación tras 12 meses de relaciones sexuales con finalidad conceptiva y frecuencia normal en una pareja que no ha logrado gestación previa (124, 125).
 - Esterilidad secundaria: incapacidad para obtener gestación tras 12 meses de relaciones sexuales con finalidad conceptiva y frecuencia normal en una pareja que ha logrado gestación previa, con independencia de su resultado (124, 125).
 - Duración de la esterilidad: medida en años completos
 - Indicación principal (factores causales de esterilidad):
 - Factor masculino: existencia de patología seminal diagnosticada con arreglo a los criterios enunciados en el Manual de Estudio del Semen Humano de la Organización Mundial de la Salud (126)
 - Anovulación crónica: existencia de criterios diagnósticos de anovulación secundaria a síndrome de ovario poliquístico, según el Consenso Diagnóstico del Síndrome de Ovario Poliquístico de la Sociedad para el Estudio de los Hiperandrogenismos (127).
 - Endometriosis: Diagnóstico histopatológico o ecográfico de endometriosis ovárica
 - Factor tubárico: antecedentes clínicos (salpinguectomía bilateral) o resultados de pruebas de imagen compatibles con la existencia de factor tubárico determinante.
 - Factor etario: edad superior a 38 años.
 - Baja reserva ovárica: existencia de criterios diagnósticos de baja respuesta a la estimulación para FIV-TE según el Consenso de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (128).
 - Esterilidad de causa desconocida con fracaso de tratamiento convencional previo.
 - Número de ciclos previos de FIV-TE: ciclos de tratamiento con FIV-TE realizados antes del ciclo de observación, con independencia de su resultado.
 - Número de ciclos previos de criotransferencia: ciclos de transferencia de embriones criopreservados realizados antes del ciclo de observación, con independencia de su resultado.
 - Progesterona basal: concentración sérica de progesterona en el día de inicio de la estimulación ovárica, en determinación previa a ésta (ng/mL).

- Protocolo de análogo GnRH: uso de agonista o antagonista de la GnRH en asociación a la estimulación ovárica.
- Otros cotratamientos previos o concurrentes con la estimulación ovárica: uso de anticonceptivos combinados, agentes androgenizantes directos (testosterona, DHEA) o indirectos (letrozol, LH).
- Tipo de actividad FSH utilizada: preparados con actividad FSH utilizados durante la estimulación (FSH urinaria, FSH urinaria ultrapurificada, FSH recombinante, HMG, HMG ultrapurificada).
- Tipo de actividad LH utilizada: preparados con actividad LH utilizados durante la estimulación (LH recombinante, HMG, HMG ultrapurificada).
- Dosis inicial de actividad FSH: cantidad de actividad FSH administrada por día (UI).
- Dosis inicial de actividad LH: cantidad de actividad LH administrada por día (UI)..
- Consumo total de actividad FSH: cantidad total de actividad FSH administrada a lo largo el tratamiento (UI).
- Consumo total de actividad LH: cantidad total de actividad LH administrada a lo largo el tratamiento (UI).
- Día de inicio de antagonista: día de estimulación en el que se inicia la administración diaria de antagonista GnRH.
- Duración del tratamiento con antagonista: medido en días.
- Duración de la estimulación ovárica: días de tratamiento con gonadotropinas.
- Estradiol sérico en día de administración de HCG: concentración sérica de estradiol (pg/mL).
- Número de folículos mayores de 10, 15 y 17 mm: recuento de imágenes sonolucidas intravaginales con características morfológicas compatibles con folículos en desarrollo bajo estimulación gonadotrópica y diámetro folicular medio superior a 10, 15 y 17 mm.
- Número de ovocitos totales: recuento de ovocitos obtenidos.
- Número de ovocitos en metafase II: recuento de ovocitos decumulados con extrusión del primer corpúsculo polar.
- Tipo de respuesta a la estimulación ovárica: baja (menos de 5 ovocitos), normal (entre 5 y 18 ovocitos) y elevada (más de 18 ovocitos).
- Origen de los espermatozoides: procedencia de los espermatozoides utilizados en el tratamiento (eyaculado, testiculares, epididimarios, deferenciales o muestra seminal criopreservada)
- Técnica de fecundación: fecundación in vitro convencional, microinyección espermática o técnica mixta.
- Frecuencia de fecundación normal de ovocitos maduros: número de embriones con dos pronúcleos dividido por número de ovocitos en metafase II íntegros.

- Número de embriones evolutivos en segundo día de desarrollo: recuento de embriones con signos de división activa (al menos tres blastómeras).
- Número de embriones evolutivos en día de la transferencia: recuento de embriones con signos de división activa en el día de la transferencia:
 - Con al menos tres blastómeras en transferencias en día +2.
 - Con al menos seis blastómeras en transferencias en día +3.
- Número de embriones A-B en día de la transferencia: recuento de embriones de categorías A y B, según los criterios de valoración morfológica de valoración morfológica de ovocitos, embriones tempranos y blastocistos de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción (129).
- Número de embriones transferidos: recuento de embriones depositados en la cavidad uterina por medio de transferencia embrionaria.
- Número de embriones A-B transferidos: recuento de embriones de categorías A y B según la mencionada clasificación (129) depositados en la cavidad uterina por medio de transferencia embrionaria.
- Día de transferencia: segundo o tercer día de desarrollo embrionario.
- Dificultad para la transferencia: definida por la necesidad de aplicar catéteres o vainas de transferencia de rigidez superior a la convencional.
- Número de embriones criopreservados
- Número de sacos gestacionales: recuento del número vesícula gestacional intrauterina con estructuras embrionarias definidas, según criterios de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (130).
- Frecuencia de implantación embrionaria: número de sacos gestacionales intrauterinos visibles mediante ecografía transvaginal cuatro semanas después de la transferencia embrionaria, dividido por número de embriones transferidos.
- Frecuencia de gestación clínica: número de gestaciones clínicas dividido por número de ciclos. Se define gestación clínica como visualización mediante ecografía transvaginal de vesícula gestacional intrauterina con estructuras embrionarias definidas, según criterios de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (130).
- Frecuencia de aborto: número de gestaciones clínicas no evolutivas dividido por número total de gestaciones.
- Frecuencia de nacido vivo: número de partos con nacimiento de al menos un feto vivo dividido por número de ciclos iniciados.

7.6.2. Métodos de cuantificación específicos:

- Cuantificación analítica de parámetros séricos:

- Progesterona: Determinación cuantitativa automatizada mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) comercial en suero (Vidas® Progesterone; bioMérieux, Estados Unidos), con intervalo de medición comprendido entre el límite inferior de detección (0,1 ng/mL) y el máximo de la curva master (100 ng/mL), con coeficientes de variación máximos de repetibilidad del 5% y de precisión intermedia de 8,1%.
- Estradiol: Determinación cuantitativa automatizada mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) comercial en suero (Vidas® Estradiol II; bioMérieux, Estados Unidos), con intervalo de medición comprendido entre el límite inferior de detección (9 ng/mL) y el máximo de la curva master (3000 ng/mL), con coeficientes de variación máximos de repetibilidad del 6% y de precisión intermedia de 11%.
- FSH: Determinación cuantitativa automatizada mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) comercial en suero (Vidas® FSH; bioMérieux, Estados Unidos), con intervalo de medición comprendido entre el límite inferior de detección (0,1 mUI/mL) y el máximo de la curva master (100 mUI/mL), con coeficientes de variación máximos de repetibilidad del 4,1% y de precisión intermedia de 7,7%.
- LH: Determinación cuantitativa automatizada mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) comercial en suero (Vidas® LH; bioMérieux, Estados Unidos), con intervalo de medición comprendido entre el límite inferior de detección (0,1 mUI/mL) y el máximo de la curva master (100 mUI/mL), con

coeficientes de variación máximos de repetibilidad del 4,6% y de precisión intermedia de 7,2%.

- Cuantificación de parámetros seminales: análisis de concentración y motilidad mediante autoanalizador espermático; análisis de morfología espermática mediante tinción de Papanicolau modificada y con arreglo a los criterios estrictos de Kruger asumidos por la última edición del Manual de Estudio del Semen Humano y de la Interacción Moco-Semen de la Organización Mundial de la Salud (126)
- Diagnóstico por imagen ultrasonográfico: ecografía endovaginal con sonda multifrecuencia de alta resolución (6,5-12,5 MHz).

7.7. PROCEDIMIENTO TERAPÉUTICO

Fase de tratamiento:

- Administración de dosis diaria de preparado de agonista GnRH de vida media corta por la vía apropiada (subcutánea o pernasal) desde la fase lútea media del ciclo previo a la estimulación, en ciclos bajo tratamiento con protocolo largo de análogos agonistas de la GnRH.
- Determinación analítica basal de estradiol y progesterona basales, Con carácter previo al inicio de la estimulación.
- Estimulación ovárica con actividad FSH a dosis ajustada por edad, reserva funcional ovárica, peso corporal y/o resultado de tratamientos previos a partir del 2º-3º día de la menstruación iniciada espontáneamente o tras el cese de contraceptivo oral u otros cotratamientos previos. Se procedió al ajuste sucesivo de dosis según respuesta a partir del 5º-6º día de estimulación.
- Determinaciones analíticas sucesivas de estradiol en cada uno de los días de control de respuesta a la estimulación (cada 48 horas tras el control inicial en 5º-6º día).
- Administración de dosis diaria de 0,25 mg de ganirelix o cetrorelix con criterio fijo (a partir del 5º-6º día de estimulación) o flexible (existencia de al menos dos folículos de 14 mm de diámetro y/o de estradiol sérico superior a 400-500 pg/mL) en ciclos bajo tratamiento con análogo antagonista de la GnRH. Dicha dosis se mantuvo hasta el día de la administración de HCG (gonadotropina coriónica humana de origen recombinante).
- Inducción de la maduración folicular final mediante administración de 250 mg de HCGr al constatar la existencia de al menos tres folículos ováricos con diámetro

folicular medio superior a 17 mm y una concentración plasmática de estradiol superior a 750 pg/mL.

- Extracción de ovocitos mediante punción folicular transvaginal ecoguiada a las 36 horas de la administración de HCG.
- Aislamiento, lavado y procesamiento de los complejos cúmulo-corona-ovocito con fines fecundantes.
- Evaluación, fraccionamiento seminal y selección de espermatozoides móviles progresivos mediante *swim-up* o centrifugación en gradientes de densidad en caso de eyaculados o muestras seminales criopreservadas de calidad suficiente. En caso de muestras criopreservadas con muy baja concentración espermática, se procedió a lavado simple.
- Fecundación in vitro/microinyección espermática según indicaciones clínicas y características seminales.
- Incubación de los ovocitos, evaluación de los signos de fecundación (extrusión de segundo corpúsculo polar y condensación de pronúcleos) a las 17-20 horas del inicio del procedimiento.
- Evaluación del desarrollo embrionario in vitro, y clasificación de los embriones con arreglo a sus características morfológicas y de cinética divisional, según los Criterios del Grupo de Calidad Embrionaria de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción (129).
- Transferencia embrionaria transcervical ecoguiada con arreglo a criterios clínicos preestablecidos en relación con el número de embriones, considerando edad de la paciente y calidad de los embriones disponibles.
- Soporte farmacológico de fase lútea mediante administración de progesterona natural micronizada (200 mg/6-8 horas) por vía oral y/o vaginal, iniciada el día de la punción folicular
- Diagnóstico analítico de gestación bioquímica a los 14 días de la transferencia embrionaria, mediante determinación de β -HCG sérica.
- Confirmación de la gestación clínica mediante ecografía transvaginal a los 28-35 días de la transferencia embrionaria.

7.8. PERIODO DE ACUMULACIÓN DE OBSERVACIONES

La cohorte analizada está constituida por una muestra de oportunidad constituida por los ciclos de tratamiento realizados a pacientes que cumplieran los criterios de selección y que fueron tratadas durante el periodo comprendido entre 2006 y 2013. Se estima que las observaciones acumuladas durante este periodo completarán, incluyendo la corrección

por pérdidas, el tamaño muestral necesario para concluir sobre la hipótesis nula relacionada con el objetivo principal con la potencia adecuada.

Con el objeto del registro de las variables de interés, la observación retrospectiva de las pacientes tratadas se inició a partir de la primera dosis del primer fármaco relacionado con la estimulación ovárica, y finalizó con el parto, en casos de gestación con nacido vivo, y con la constatación de la interrupción de la gestación en caso de embarazos no evolutivos.

7.9. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL

La evaluación de la inferioridad de la frecuencia de nacido vivo en pacientes expuestas (p_1) respecto a las no expuestas (p_2) se ha realizado mediante un contraste de la hipótesis nula $p_1=p_2$ mediante una prueba χ^2 unilateral para dos muestras independientes. Asumiendo un nivel de confianza mínimo del 95%, una frecuencia en no expuestas del 25%, una frecuencia en expuestas del 15%, y una frecuencia estimada de elevación de progesterona del 5 % requería observaciones sobre 150 expuestas y 2850 no expuestas, por lo que resultaba necesario incluir al menos 3000 ciclos para obtener una potencia del 80% que permita concluir respecto al objetivo principal. Estimando un porcentaje de pérdidas del 5 % por observaciones incompletas, se precisaba la inclusión de un total de 3150 ciclos de tratamiento

Este tamaño muestral proporcionará una potencia del 80 % para el contraste unilateral de la hipótesis de inferioridad del porcentaje de nacido vivo, asumiendo un 10% como diferencia de proporciones clínicamente relevante. La elección del contraste unilateral está determinada por la hipótesis conceptual y por los objetivos del estudio. Por otra parte, dicha muestra es mayor a la necesaria para conseguir una precisión de 0,25 unidades en la estimación, mediante un intervalo de confianza asintótico al 95% unilateral, de un riesgo relativo esperado del 0,6, lo que asegura el logro de dicha estimación.

7.10. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

7.10.1. Descripción de las variables

Se ha estudiado la normalidad de la distribución de las variables cuantitativas, analizando su media, mediana y desviación típica, así como su histograma. En caso de duda, se ha aplicado pruebas de contraste de normalidad. Las variables cuantitativas en las que asumió la distribución normal se describen por medio de su media y desviación estándar, y aquellas con distribución de tendencia no normal a través de su mediana y su rango intercuartílico: Las variables cualitativas se describen mediante su distribución de frecuencias.

7.10.2. Análisis de asociación:

Se ha evaluado la asociación entre la progesterona y las variables de resultado, entre las covariables consideradas y las variables de resultado, y finalmente entre covariables y progesterona sérica. Los contrastes se han realizado con pruebas estadísticas apropiadas a la naturaleza de las variables:

- Los contrastes de diferencias de medias se han efectuado por medio de la prueba t de Student o mediante ANOVA –con contrastes *post hoc* en caso necesario– en caso de variables con distribución normal. Para el contraste de la diferencia de distribuciones de variables no normales se han aplicado pruebas no paramétricas como la U de Mann-Whitney, la prueba de la mediana o la de Kruskal-Wallis.
- Las diferencias de proporciones se han analizado por medio de la prueba χ^2 , aplicando la corrección de Yates o el test exacto de Fischer en caso necesario. Si no podía asumirse la normalidad de las variables explicativas o de las covariables, se han aplicado pruebas de comparación de proporciones bajo supuestos no paramétricos.
- Para los análisis de correlación se han estimado los coeficientes de correlación de Pearson en caso de variables normales, y de Spearman para no normales.

7.10.3. Análisis de magnitud de efecto :

7.10.3.1. Análisis univariado

Las variables categóricas y continuas han sido dicotomizadas mediante punto de corte oportunos, seleccionado según la morfología de las distribuciones o con criterios de relevancia clínica. Tras la elaboración de las correspondientes tablas de contingencia, se

ha calculado del efecto estimando el riesgo relativo (RR) con su correspondiente intervalo de confianza al 95 %.

7.10.3.2. Análisis bivariado

La influencia de las variables modificadoras de efecto se ha estudiado aplicando en primer lugar la pruebas de interacción de Breslow-Day. En caso de detectarse ésta, la magnitud del efecto se expresa por medio del RR por estrato. Si no se detectó interacción, se ha evaluado la existencia de confusión. Las covariables se han considerado confusoras cuando la diferencia entre el RR crudo y el ajustado por la covariable ha resultado superior al 10 % del valor del RR crudo.

7.10.3.3. Análisis multivariado

Se han elaborado modelo de regresión logística binaria con finalidad explicativa, que resultará de la elaboración sucesiva de modelos con la variable explicativa principal, modelo completo sin interacciones. A partir de todos ellos, se eliminarán las variables sucesiva y selectivamente, para escoger el mejor modelo explicativo, seleccionado mediante el criterio de información de Akaike, así como el modelo predictivo que proporcione mejores valores de sensibilidad y especificidad predichas para la frecuencia global del evento en modelos logísticos y de la probabilidad de nacido vivo en modelos no binarios.

Para los contrastes de las hipótesis nulas de igualdad se asumirá un nivel de confianza del 95 %. Los análisis estadísticos han realizado con el paquete informático IBM SPSS Statistics versión 21 para Windows (licencia corporativa del Hospital General Universitario Gregorio Marañón).

5. ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES

5.1. Autorización del estudio

El presente estudio fue abordado su autorización, en fase de proyecto, por el Comité Ético de Investigación Clínica de Hospital General Universitario Gregorio Marañón. El mismo CEIC aprobó la ampliación de centros a petición de los investigadores pertenecientes a la Clínica Tambre, de donde proceden los registros clínicos a partir de los cuales se han generado las observaciones del estudio.

5.2. Confidencialidad

El tratamiento de los datos clínicos se ha realizado manteniendo los máximos niveles de confidencialidad y de rigor en el secreto médico, y cumpliendo estrictamente la normativa legal en materia de protección de datos de carácter personal y clínico, y en particular lo establecido por la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

6. RESULTADOS

6.1. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES DEL ESTUDIO

El estudio se ha realizado sobre un total de 3741 ciclos de FIV-TE con ovocitos propios y transferencia embrionaria, que constituyeron la totalidad de los ciclos realizados durante el periodo de estudio que satisfacían los criterios de inclusión. Los tratamientos fueron aplicados a un total de 2469 pacientes durante el periodo comprendido entre febrero de 2004 y enero de 2013. La distribución cronológica de los ciclos a lo largo del periodo de observación se muestra en la figura 1.

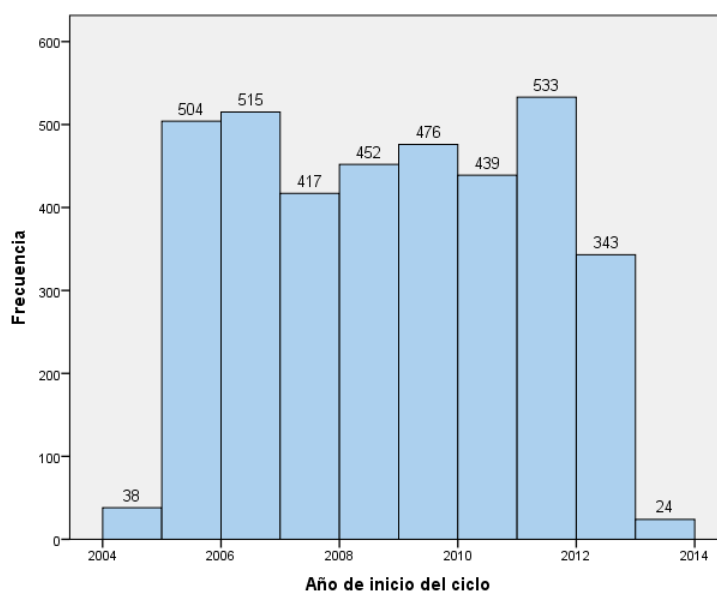


Figura 1: Distribución cronológica de los ciclos de tratamiento durante el periodo de estudio

6.1.1. Características basales de las pacientes

6.1.1.1. Edad

La tabla 1 muestra las características basales de las pacientes. Su edad estuvo comprendida entre 22 y 47 años, con una media fue 35,9 años y una DE de 3,4 años. El 25% de las pacientes presentaron edades superiores a 39 años en el momento del tratamiento.

Tabla 1:
Características basales de las pacientes y antecedentes del proceso de esterilidad

Media	DE	Mínimo	Máximo	Percentiles		
				25	50	75

Edad (años)	35,9	3,8	22	47	33	36	39
IMC (kg/m ²)	22,5	3,4	15,0	50,1	20	21	24
Consumo tabaco (cig/día)	10	6,9	1	40	5	10	15
Recuento de foliculos antrales	10,8	5,1	1	32	7	10	14
FSH basal (UI/L)	7,7	2,9	0,1	31	6	7	9
Duración de la esterilidad (meses)	26,7	20,9	0	240	12	24	36

La estratificación de la edad por las categorías descriptivas utilizadas en los registros internacionales de efectividad queda representada en la figura en la figura 2. El 43,7% de los ciclos fueron aplicados a pacientes con edades comprendidas en el estrato intermedio (35 a 39 años), mientras que el 19,3% de los tratamientos se realizaron a pacientes con 40 o más años.

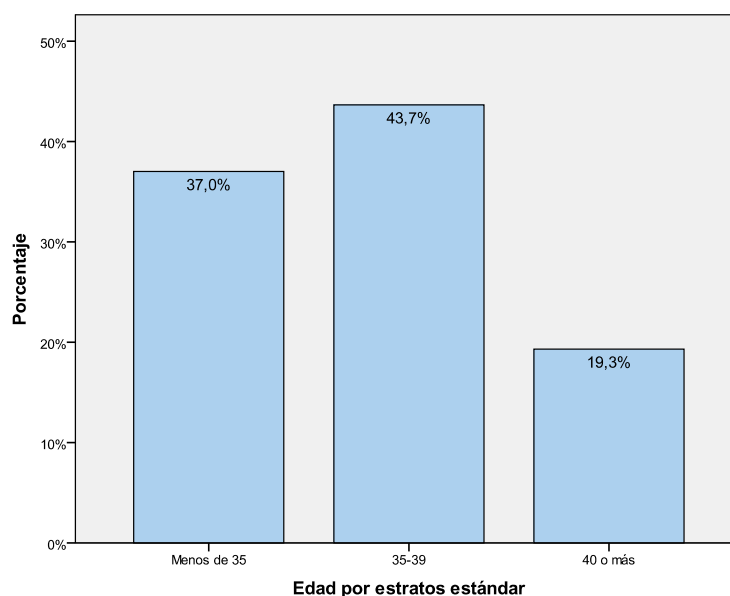


Figura 2: Distribución de la edad de las pacientes según estratos estándar para registros de efectividad

6.1.1.2. Índice de masa corporal

El índice de Quetelet varió entre 15 y 50,1 kg/m², aunque el 50 % de las pacientes presentaba IMC entre 20 y 24 kg/m² (tabla 1). La distribución por intervalos ponderales de la OMS se resume en la figura 3. El 79% de las pacientes se hallaban en el estrato de normalidad ponderal en el momento del tratamiento, mientras que un 12,9% presentaba sobrepeso. Las frecuencias de bajo peso para la talla y de obesidad resultaron ligeramente superiores al 4%.

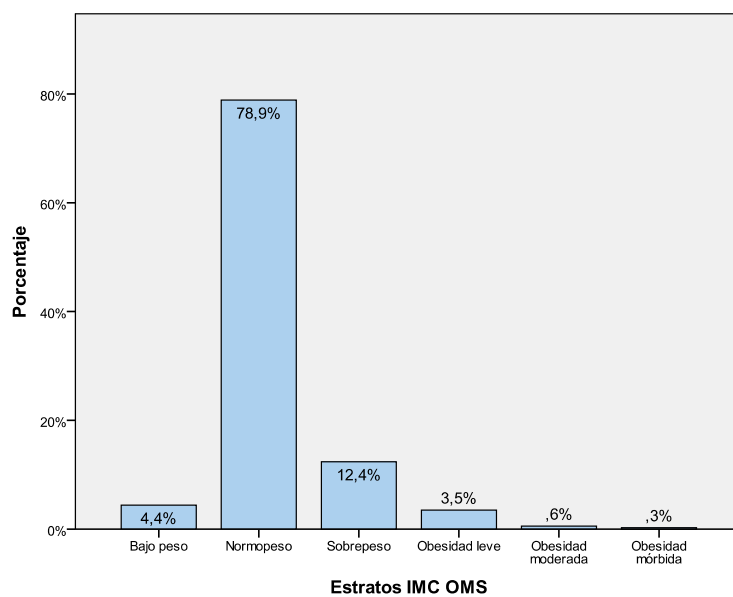


Figura 3: Distribución del IMC por estratos ponderales de la OMS

6.1.1.3. Consumo de tabaco

El 21% de las pacientes refirió consumo habitual de tabaco. Entre las pacientes fumadoras, el número medio de cigarrillos diarios consumidos fue de 10 (DE: 6,9). El intervalo intercuartil estuvo comprendido entre 5 y 15 cigarrillos/día.

6.1.1.4. Recuento de folículos antrales

En las pacientes el recuento basal de folículos antrales se distribuyó según un patrón cuasinormal, con una media de 10,8 folículos (DE: 5,1) y una mediana de 10 (tabla 1). Un 25 % de las pacientes presentaron recuentos foliculares menores de 5, y otro 25%, en la cola opuesta de la distribución, contaban con recuentos de más de 15 folículos.

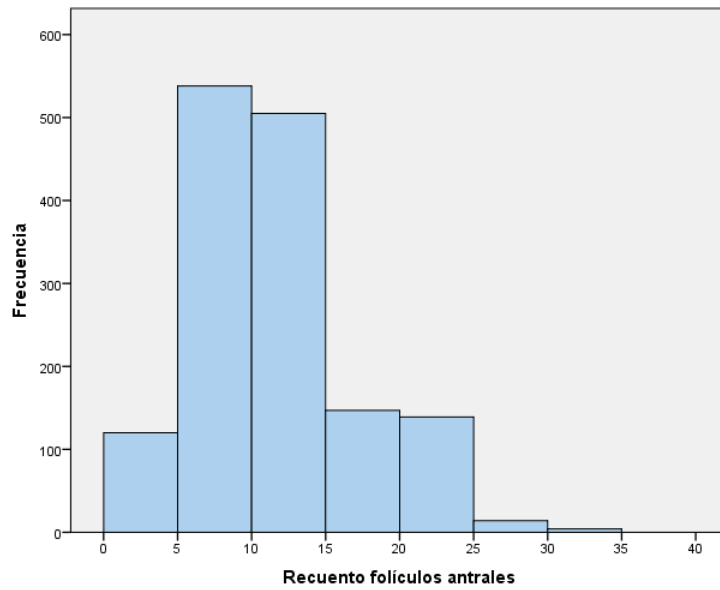


Figura 4: Distribución del recuento basal de folículos antrales

6.1.1.5. Nivel basal de FSH sérica

La concentración sérica de FSH promedio fue de 7,7 UI/L (DE: 2,9 UI/L). El 50% central de las observaciones quedó comprendido entre 6 y 9 UI/L (tabla 1; figura 5). Las pacientes con concentraciones de FSH en fase folicular precoz superiores a 10 UI/L representaron el 14,6 % del total.

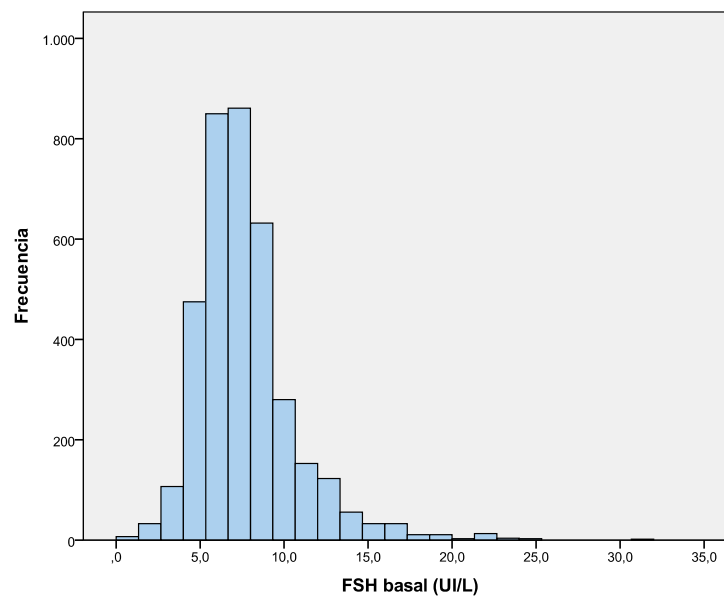


Figura 5: Distribución de la concentración sérica basal de FSH

6.1.1.6. Duración de la esterilidad

La duración media de la esterilidad de las pacientes en el momento del tratamiento fue de 26,7 meses (DE: 20,9 meses). La mínima duración observada fue de 0 meses, que correspondió a pacientes con causas absolutas de esterilidad previamente conocidas, y que consultaron directamente sin búsqueda gestacional previa. La esterilidad más prolongada tuvo una duración de 240 meses.

El 85,2% de las pacientes padecían esterilidades de duración no superior a 36 meses en el momento del tratamiento (figura 6).

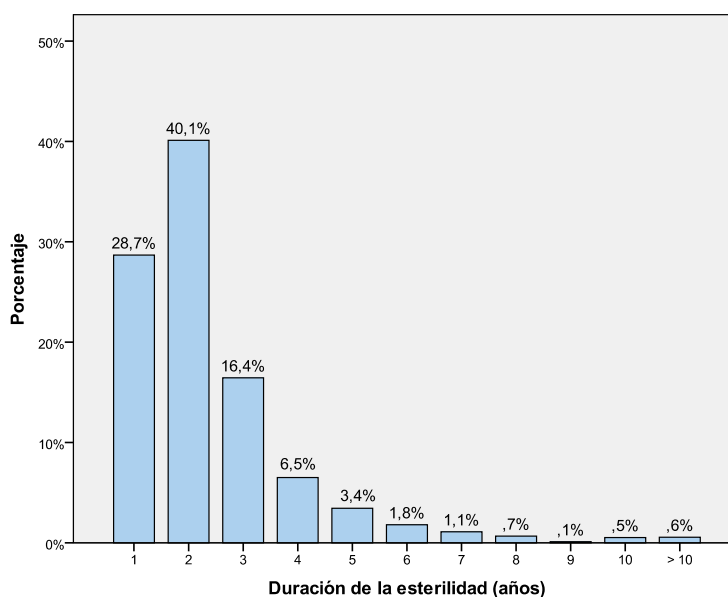


Figura 6: Años de duración de la esterilidad

6.1.1.7. Tipo de esterilidad

Más del 80 % de las pacientes estaban afectadas por esterilidad primaria (tabla 1).

6.1.1.8. Factores causales de esterilidad

Las causas principales de esterilidad más frecuentes resultaron el factor masculino (33,6%) y la baja reserva ovárica (14,2%). En el 22,3% de los casos se identificó más de un factor causal principal (figura 4).

La esterilidad de origen desconocido, la endometriosis, el factor tuboperitoneal y el factor etario femenino presentaron frecuencias inferiores al 10%. Los ciclos indicados por causas cromosómicas, genéticas o abortos de repetición representaron tan solo el 0,4% de la serie (tabla1; figura 7).

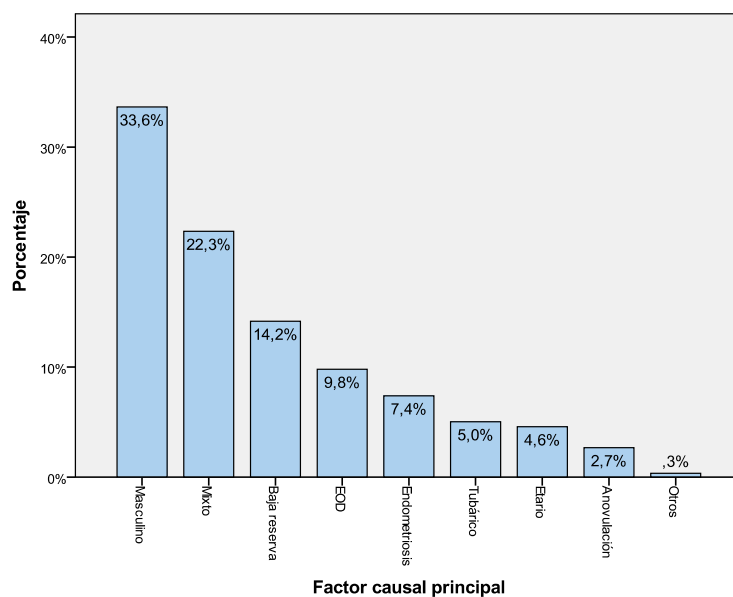


Figura 7: Frecuencia de factores causales de esterilidad

6.1.1.9. Tratamientos previos

Los antecedentes de ciclos previos de tratamiento con FIV-TE o transferencia de embriones descongelados se resumen en la figura 8.

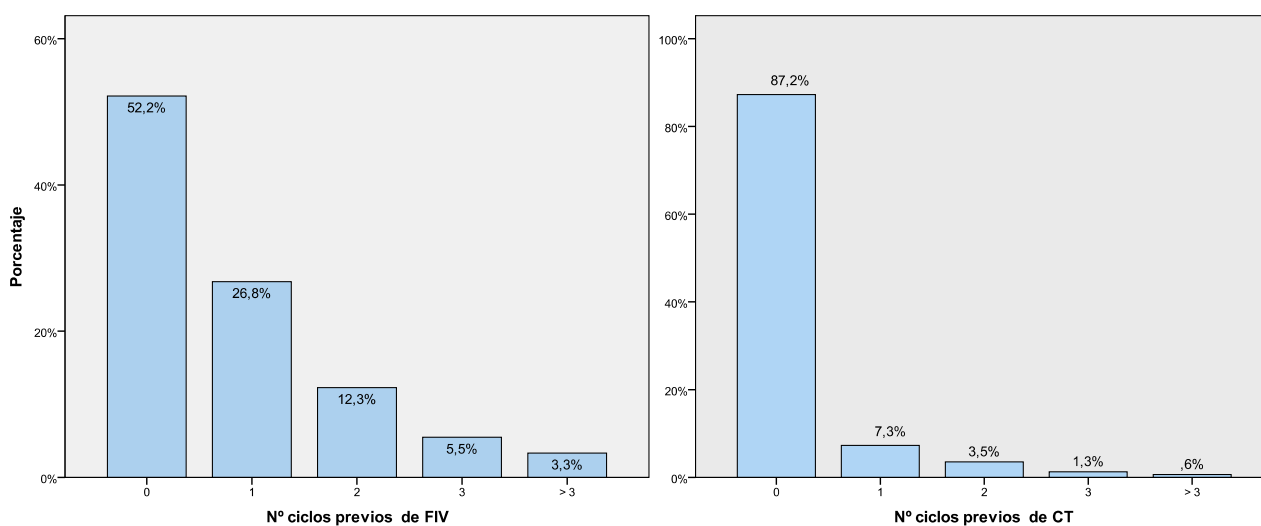


Figura 8 : Distribución de ciclos previos de tratamiento con FIV-TE y criotransferencia

El 52,1% de las pacientes tratadas de la cohorte no habían recibido tratamiento con ciclos previos de FIV-TE, mientras que el 26,8% presentaban antecedente de un ciclo

previo. Sólo el 8,9% de las pacientes había sido sometida a tres o más ciclos de FIV con anterioridad al que fue objeto de observación.

Con respecto las criotransferencias, el 87,2% de las pacientes no había sido sometido a este tratamiento con carácter previo a los ciclos objeto de observación.

6.1.2. Características del ciclo de tratamiento

6.1.2.1. Progesterona sérica basal al inicio del ciclo

Las determinaciones de progesterona en el día de inicio de la estimulación ovárica generaron una distribución que se ilustra en la figura 9. El valor medio resultó 0,47 ng/mL (DE: 0,43 ng/mL) y la mediana 0,41 ng/mL (IIC: 0,27-0,6 ng/mL). La mediana de la distribución fue 0,41 ng/mL y el percentil 75 correspondió a 0,6 ng/dL.

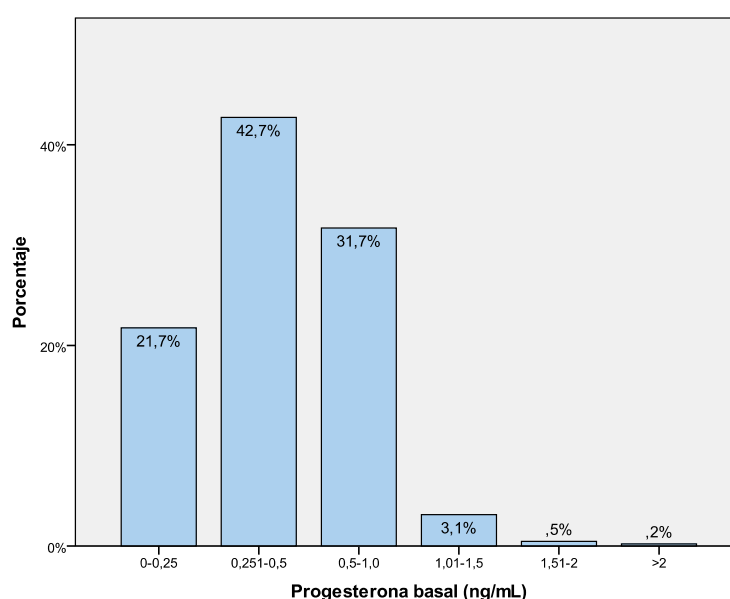


Figura 9 : Distribución de niveles basales de progesterona sérica

Sólo seis de los 3741 ciclos (0,2%) mostraron concentraciones basales de progesterona sérica superiores a 2 ng/mL, en los que se registraron valores comprendidos entre 2 y 12,2 ng/mL.

6.1.2.2. Protocolo de análogo GnRH

Para el control de la función hipofisaria, se indicó tratamiento con protocolo largo de agonista en el 14,9% de los ciclos (561), mientras que se aplicó protocolo se antagonista en el 84,5% casos (3161 ciclos). El 0,6% restante de los ciclos correspondió a protocolos

de antagonista flexible que no llegaron a iniciarse por desarrollo folicular acelerado antes de la primera dosis (12 ciclos), y a un caso de protocolo largo de agonista que no obtuvo frenación hipofisaria, por lo que fue reconvertido a protocolo de antagonista (figura 10).

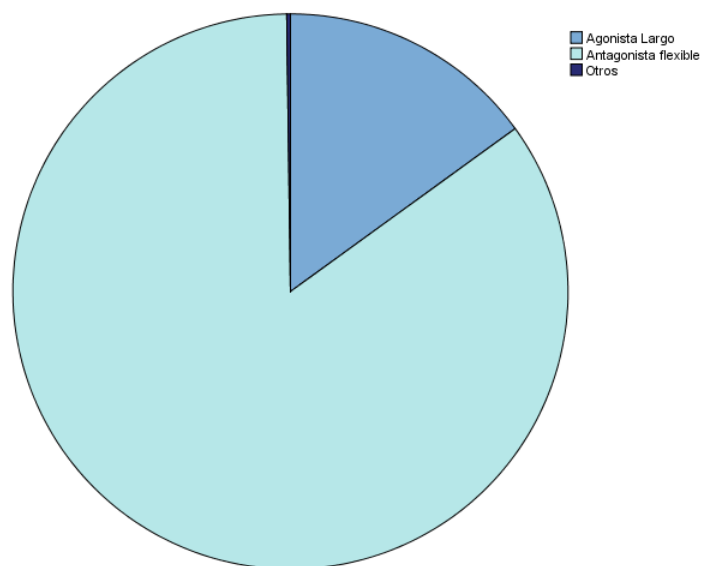


Figura 10: Distribución de ciclos por protocolo de análogo GnRH empleado.

6.1.2.3. Tratamiento previo con anovulatorios orales

El uso de anovulatorios orales con carácter previo al inicio de la estimulación ovárica se registró en 1867 ciclos (49,9%), de los cuales 1508 se realizaron bajo protocolo de antagonista.

6.1.2.4. Tipos de gonadotropina

En relación con el régimen de estimulación gonadotrópica, se utilizó actividad FSH exclusiva en el 27,3% de los ciclos, y combinada con actividad LH en el 72,3% restante. La principal fuente de actividad FSH la de origen recombinante (97,9% de los ciclos), seguida de los preparados de FSH urinaria (0,2%), HMG (1,7%) y pautas combinadas (0,1%).

Respecto a la actividad LH, se administró en forma de LH recombinante en el 72,6% y a través de HMG en el 27,4% restante.

6.1.2.5. Dosis inicial de actividad FSH

La dosis inicial promedio de actividad FSH fue 276,6 UI/día (DE: 100,7 UI/día); las dosis mínimas y máximas administradas fueron 37,5 y 675 UI/día respectivamente. El 50 % de las pacientes recibieron dosis de más de 300 UI/día (tabla 2).

Tabla 2:
Características de la estimulación ovárica

	Media	DE	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Dosis inicial actividad FSH (UI)	276,6	100,7	37,5	675	200	300	325
Dosis inicial actividad LH (UI)	106,9	50,0	15	450	75	75	150
Consumo de actividad FSH (UI)	2335	1076	375	7525	1150	2100	3000
Consumo de actividad LH (UI)	885,3	556,2	75	6187	525	750	1200
Duración de la estimulación	8,3	1,7	4	27	7	8	9

Las dosis iniciales de actividad FSH más frecuentes estuvieron comprendidas entre 150 y 249 UI/día (37,2%), seguida por dosis iniciales más elevadas, comprendidas entre 300 y 349 UI/día, que fue administrada a casi un tercio de las pacientes (29,4%)

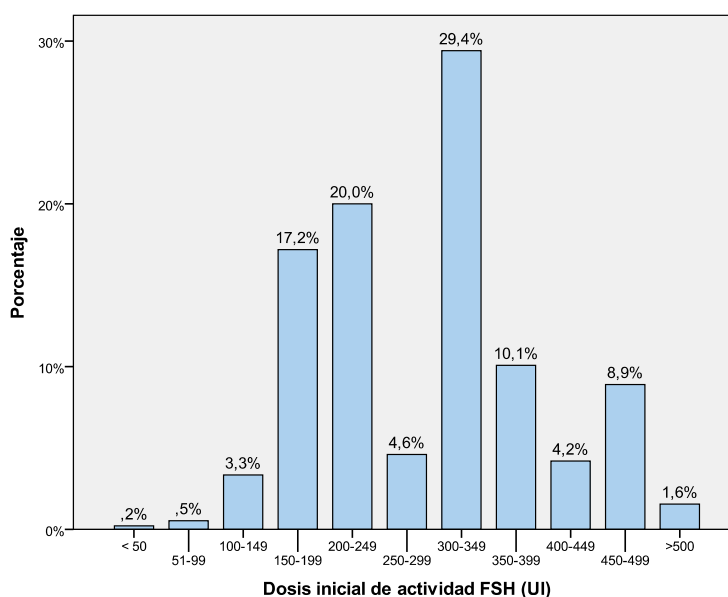


Figura 11: Distribución de ciclos por dosis inicial de actividad FSH (UI/día)

6.1.2.6. Dosis inicial de actividad LH

Las pacientes tratadas con actividad LH recibieron una dosis media de 77,6 UI/día (rango: 15-450 UI/día).

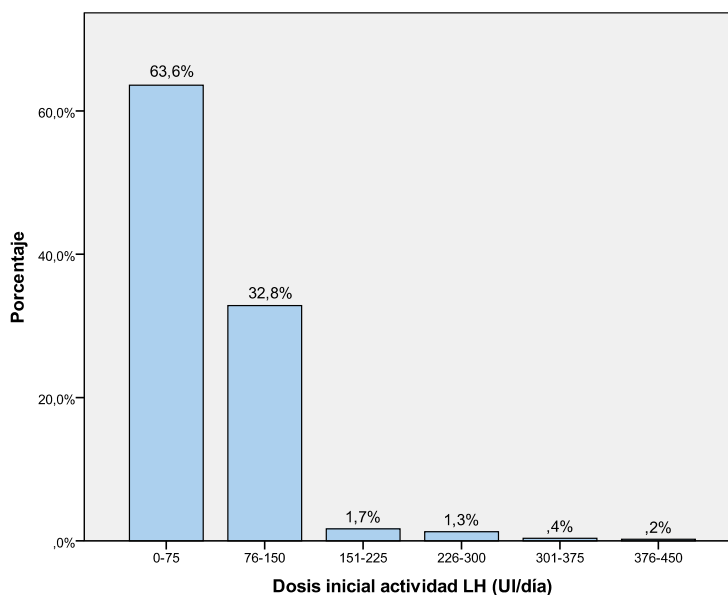


Figura 12: Distribución de ciclos por dosis inicial de actividad LH

La dosis de actividad LH más frecuentemente administrada fue menor o igual a 75 UI/día, que fue la recibida por casi dos tercios de las pacientes tratadas con esta actividad hormonal (figura 12).

6.1.2.7. Consumo de actividad FSH

La cantidad total de FSH administrada a lo largo de la estimulación varió entre 375 y 7525 UI, con una media de 2335 UI y una DE de 1076 UI.

El 59,5 % de las estimulaciones requirió dosis acumuladas de actividad FSH comprendidas entre 1000 y 2999 UI (figura 13). En el 25 % de los ciclos, el consumo total de actividad FSH superó las 3000 UI.

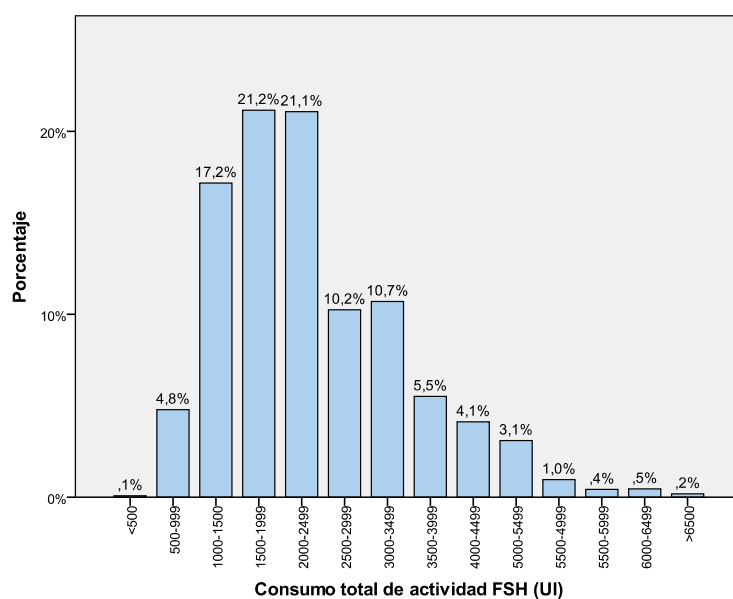


Figura 13: Distribución de ciclos por consumo de actividad FSH

6.1.2.8. Consumo de actividad LH

El consumo total de actividad LH estuvo comprendido entre 75 y 6187 UI, con una media de 885,3 UI (DE: 556,2) y una mediana de 750 UI (IIC: 525 UI; 1200 UI) (tabla 2).

6.1.2.9. Día de inicio de antagonista GnRH

En la totalidad de los ciclos bajo protocolo de antagonista GnRH, la primera dosis se administró con criterio flexible, es decir, en función de la respuesta ovárica a la estimulación (figura 14).

En el 52% de los ciclos se detectaron criterios para la administración de la primera dosis de antagonista en el 5º día de estimulación, mientras que se el uso de antagonista se inició en 6º día en el 20% de las estimulaciones. Los ciclos que precisaron administración del antagonista antes del 5º día o después del 6º fueron, respectivamente, el 7% y el 21% del total.

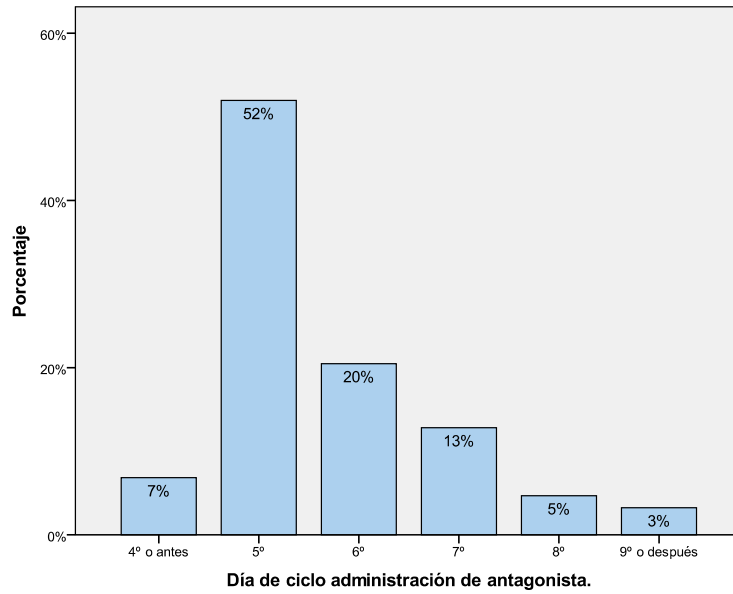


Figura 14: Distribución de ciclos por protocolo de análogo GnRH empleado

6.1.2.10. Duración del tratamiento con antagonista GnRH

La duración promedio del tratamiento con antagonistas fue de 3,6 días (DE: 1,9 días). Como se aprecia en la figura 12, el número de ciclos que recibieron antagonista durante 4 días (percentil 50) \pm 1 día fue del 74,4% (figura 15).

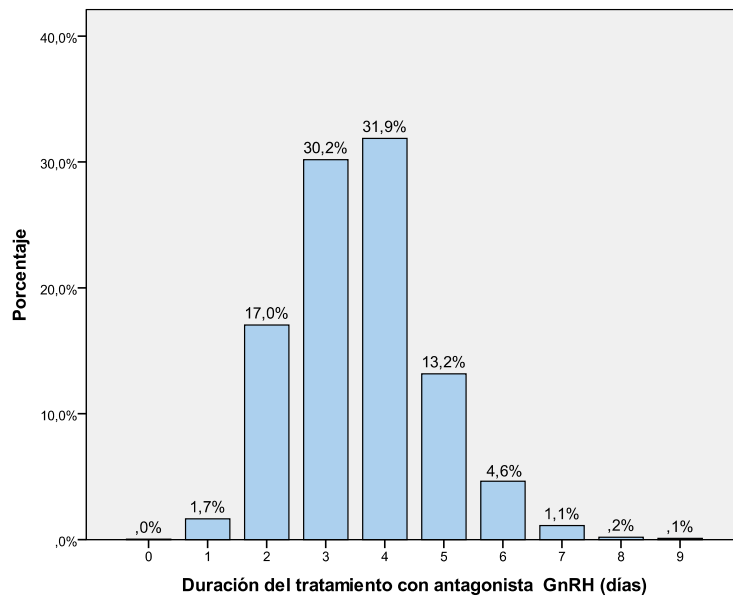


Figura 15: Distribución de ciclos por duración del tratamiento con antagonista GnRH

6.1.2.11. Duración de la estimulación ovárica

La estimulación tuvo duraciones comprendidas entre 4 y 27 días, con un valor promedio de 8,3 días (DE: 1,7) y una mediana de 8 días (IIC: 7; 9). Sólo un 11,2% de las estimulaciones se prolongaron durante más de 10 días (figura 16).

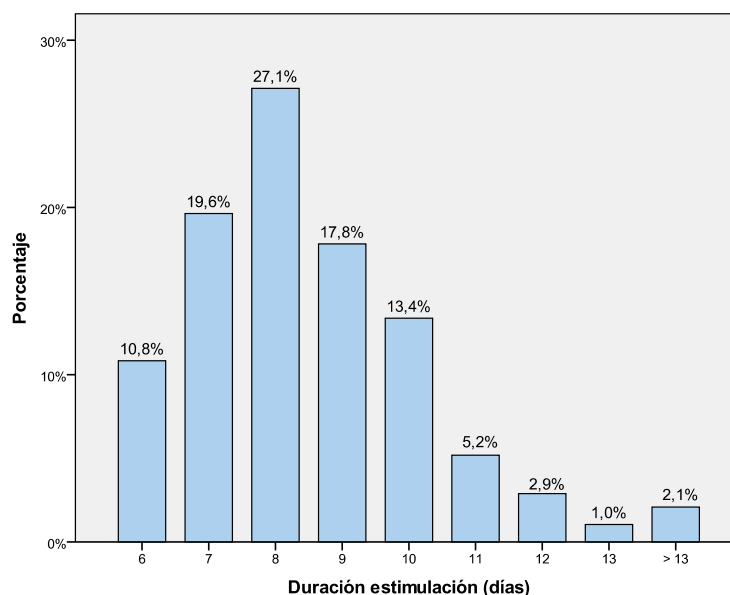


Figura 16: Distribución de ciclos por duración de la estimulación ovárica

6.1.2.12. Estradiol sérico al final de la estimulación

La concentración media de estradiol sérico en el día de la HCG fue de 1849,9 pg/mL (DE: 1008,3 pg/mL), y su mediana de 1623 pg/mL (IIC: 1120; 2342 pg/mL) (tabla 3).

Tabla 3:
Resultados de la estimulación ovárica y de la técnica de fecundación

	Media	DE	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Estradiol sérico final (pg/mL)	1849,9	1008,3	216	7184	1120	1623	2342
Progesterona sérica final (ng/mL)*	0,76	0,66	0,03	27,2	0,48	0,7	0,94
Folículos > 10 mm	9,2	4,2	1	32	6	9	12
Folículos > 15 mm	6,6	3,1	0	20	4	6	9
Folículos > 17 mm	4,5	2,3	0	16	3	4	6
Ovocitos totales	7,1	4,5	1	29	4	6	10
Ovocitos metafase II	5,1	3,3	1	21	3	4	7
REM seminal (millones esp)	27,6	29,7	0	855	6	22	42,7
Embriones evolutivos en día +2	4,3	2,9	1	23	2	4	6
Embriones evolutivos en día de TE	4,2	2,9	1	23	2	3	6
Embriones A-B en día de TE	2,7	2,3	0	16	1	2	4
Embriones criopreservados	0,8	1,7	0	13	0	0	1

Casi la mitad de las pacientes recibió la acción HCG con niveles de estradiol sérico comprendidos entre 1000 y 2000 pg/mL. En el 12,6% de los ciclos el estradiol sérico final superó los 3000 pg/mL (figura 17).

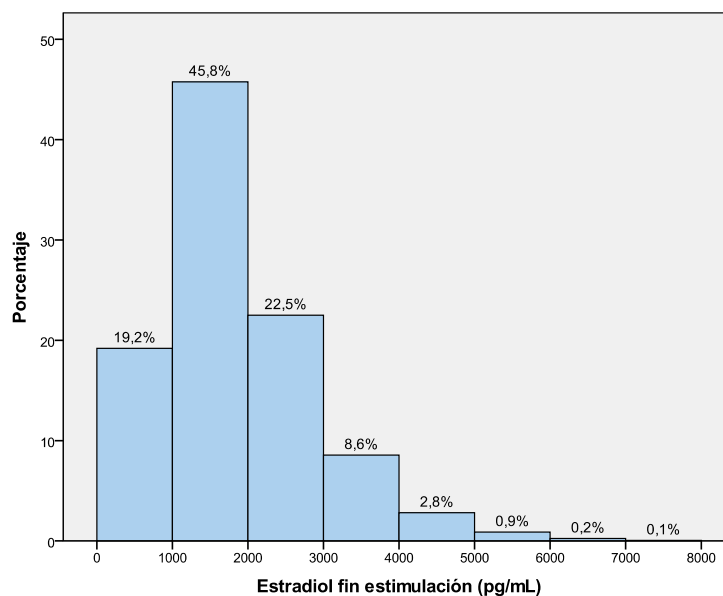


Figura 17: Distribución de ciclos por concentración sérica de estradiol en día de HCG

6.1.2.13. Progesterona sérica al final de la estimulación

La media de la progesterona sérica en el día de la HCG fue 0,76 ng/mL (DE: 0,66 ng/mL), próxima a su mediana (0,7 ng/mL; IIC: 0,48; 0,94 ng/mL) (tabla 3).

La distribución de valores de la progesterona sérica final se resume en la figura 18. Los valores comprendidos entre 0 y 1 ng/mL representaron el 77,4% de los ciclos. Entre 1 y 2 ng/mL de progesterona sérica final quedó comprendido otro 21,2% de las observaciones, de forma que el 98,6 % de las determinaciones de progesterona presentó valores inferiores a 2 ng/mL.

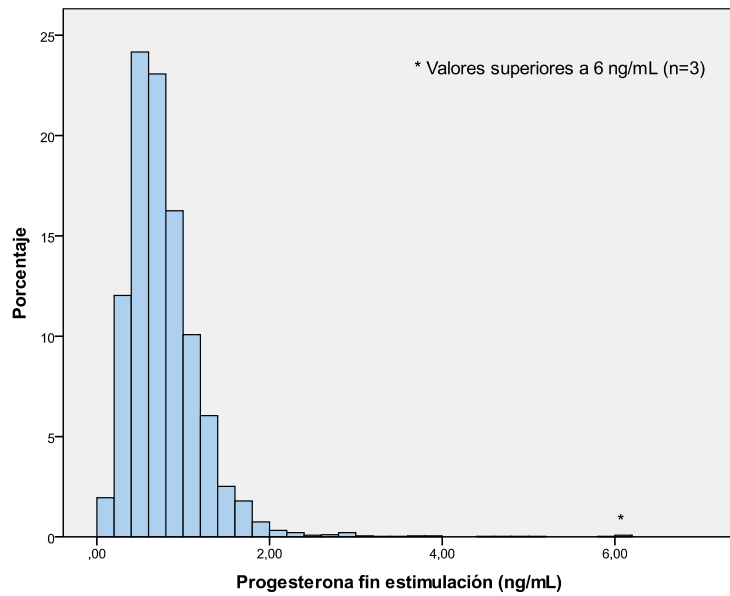


Figura 18: Distribución de ciclos por concentración sérica de progesterona en día de HCG

6.1.2.14. Folículos ováricos en crecimiento

Las distribuciones del número de folículos visibles en ambos ovarios en el día de la HCG en diferentes estratos de tamaño se resumen en la tabla 3 y en las figuras 19 a 21. El número medio de folículos con diámetro superior a 17 mm en el día de administración de HCG fue de 4,4 (DE: 2,3), muy cercano al valor de la mediana (4 folículos). La distribución de folículos en cada estrato de crecimiento se resume en la figura 19.

El número de folículos mayores de 10, 15 y 17 mm visibles en el día de HCG se representa en las figura 19. Los ciclos con número de folículos mayores de 15 mm comprendido ente 5 y 12 representaron el 66,3% de los casos analizados. En el 42 % de los ciclos se objetivó un número de folículos mayores de 17 mm comprendidos entre 5 y 12 mm en el día de la administración de HCG. En el 55,5% de los ciclos se disponía de menos de 5 folículos mayores de 15 mm en el día de administración de HCG.

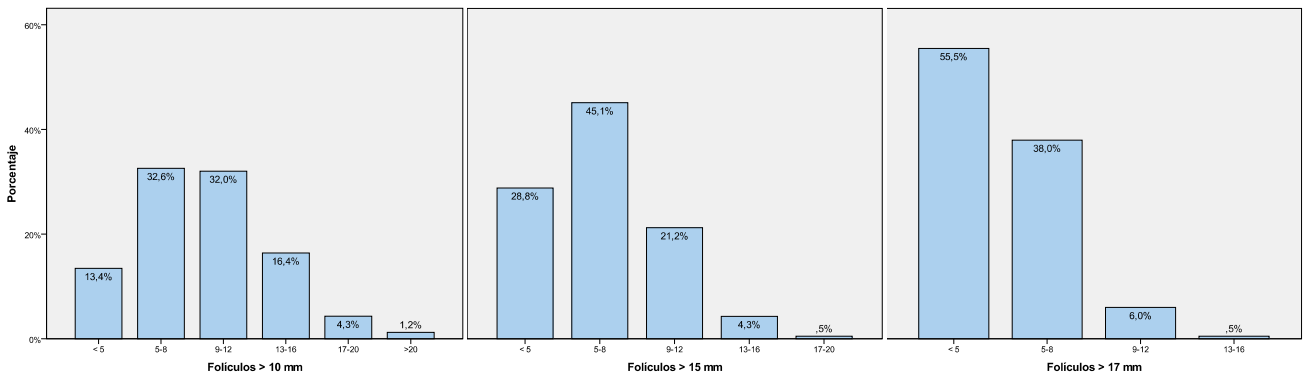


Figura 19: Distribución de ciclos por número y tamaño de folículos visibles en día de HCG

6.1.2.15. Ovocitos totales obtenidos

La media de ovocitos obtenidos fue 7,1 (DE: 4,5 ovocitos). Sólo se extrajeron más de 20 ovocitos en el 25% de las pacientes (tabla 3). La figura 19 resume la distribución del número de ovocitos obtenidos. En el 51,0% de los ciclos se logró un número total de ovocitos comprendido entre 5 y 15.

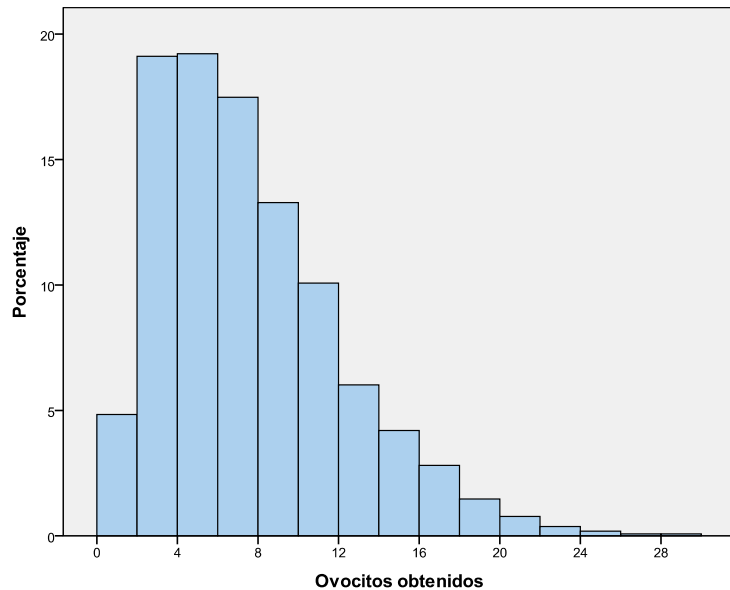


Figura 19: Distribución de ciclos por número de ovocitos totales obtenidos

6.1.2.16. Ovocitos maduros obtenidos

El número medio de ovocitos obtenidos en MII, referido sólo a los ciclos de ICSI –en los que se puede constatar adecuadamente su estadio de madurez nuclear– fue de 5,1 (DE: 3,3 ovocitos en metafase II). En el 50 % de los ciclos se contó con menos de 4 ovocitos maduros (percentil 50). Los ciclos en los que se recuperaron entre 5 y 15 ovocitos maduros representaron el 47,7% del total. Sólo un en 1% de los ciclos se obtuvieron más de 15 ovocitos maduros (figura 20).

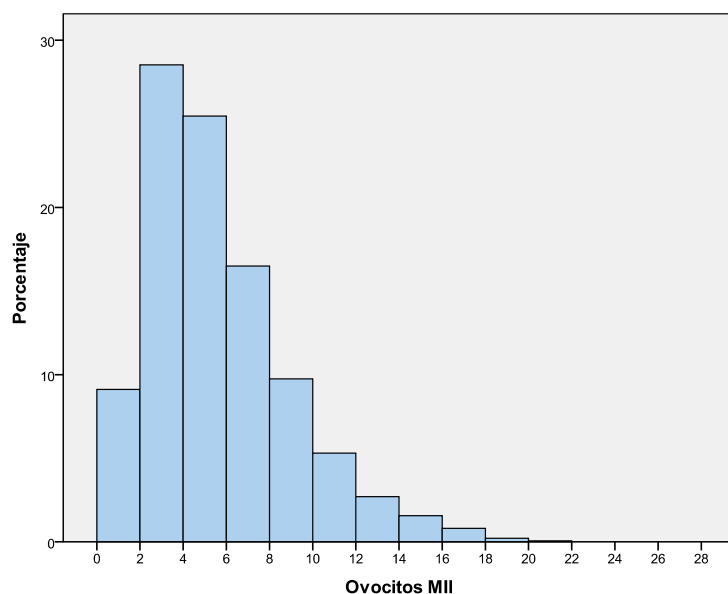


Figura 20: Distribución de ciclos por número de ovocitos maduros obtenidos

6.1.2.17. Origen de los espermatozoides

Los espermatozoides utilizados en el procedimiento de fecundación procedieron del procesamiento de eyaculados en el 91,8% de los ciclos, de biopsias testiculares en el 0,7% de los casos y en el 7,5% de donante de banco. La frecuencia global de uso de espermatozoides previamente preservados fue del 12,9%.

6.1.2.18. Recuperación de espermatozoides móviles

La recuperación final de espermatozoides móviles progresivos obtenida mediante el procesamiento seminal se resume en la tabla 3. El rango de valores varió entre 0 y 855 millones de espermatozoides, con una media de 27,6 (DE: 29,7) y una mediana de 22 millones (IIC: 6; 42,7 millones). El subgrupo de casos en los que la indicación principal fue el factor masculino, la REM media fue 17,8 millones (DE: 21,5) y la mediana 9,7 millones (IIC: 2; 27,2).

6.1.2.19. Técnica de fecundación

El procedimiento de fecundación aplicado fue la ICSI en el 90,3% de los ciclos. Se utilizó la FIV convencional en el 2,7% de los ciclos, y procedimiento mixto en el 7% restante (tabla 3; figura 21).

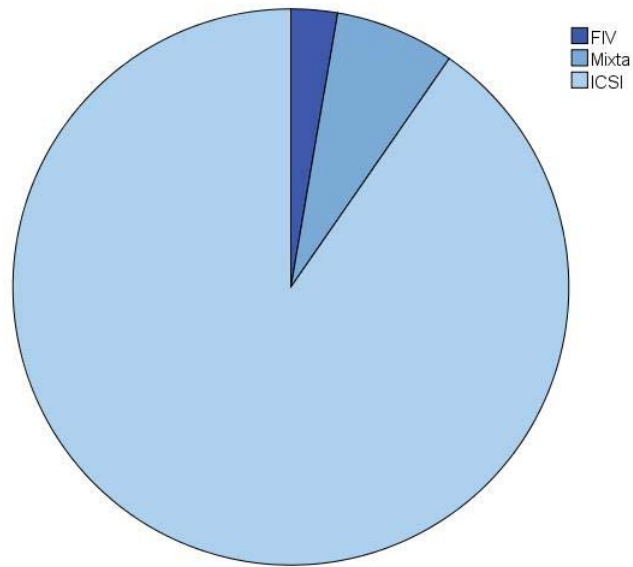


Figura 21: Distribución de ciclos por técnica de fecundación

6.1.2.20. Frecuencia de fecundación normal

Se observó fecundación normal en el 81,3% de los ovocitos maduros microinyectados en los ciclos de ICSI (tabla 3).

6.1.2.21. Embriones evolutivos en día +2

El número medio de embriones evolutivos en día +2 cultivo fue 4,3 (DE: 2,9 embriones) (tabla 3). Los percentiles 25, 50 y 75 de la distribución fueron 2, 4 y 6 embriones respectivamente (figura 22).

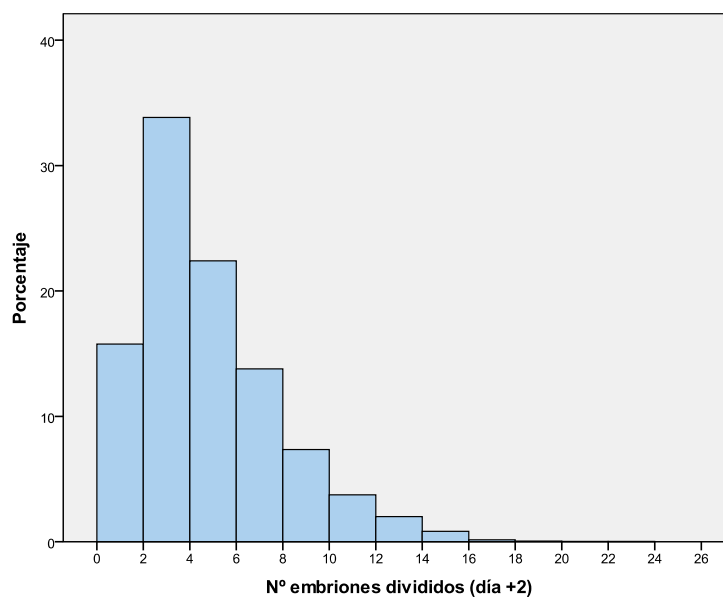


Figura 22: Número de embriones en división en segundo día de cultivo

6.1.2.22. Embriones evolutivos en día de transferencia embrionaria

La distribución de ciclos según el número embriones en división disponibles en el día de la transferencia embrionaria se resume en al tabla 3. La media fue de 4,2 embriones (D: 2,9) y la mediana 3 embriones (IIC: 2; 6). El 75% de las pacientes dispusieron de 4 o menos embriones evolutivos en el día de la transferencia (figura 23).

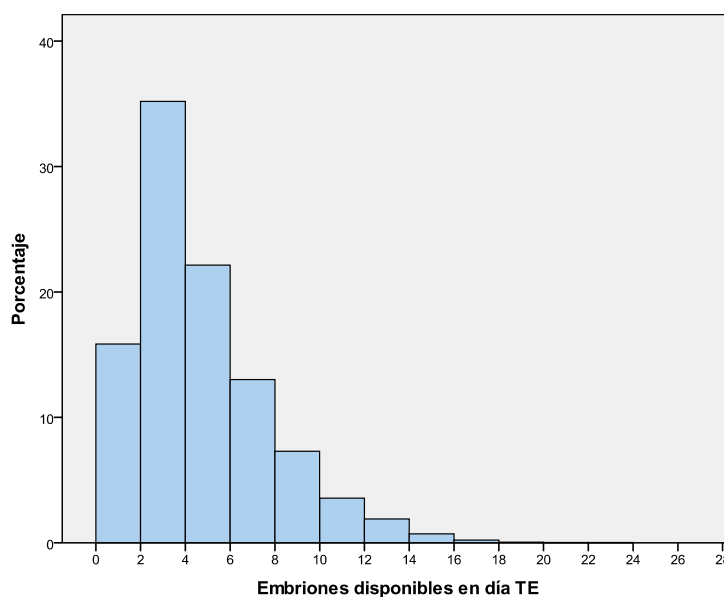


Figura 23: Número de embriones evolutivos en el día de la transferencia

6.1.2.23. Embriones A-B disponibles en día de transferencia embrionaria

Se dispuso al menos un embrión tipo A-B en el 88,6% de los ciclos (n=3313). Considerando la totalidad de los ciclos, la media de embriones A-B disponibles fue 2,7 (DE: 2,3 embriones) (tabla 3).

En el 24,3% de los ciclos se contaba con un embrión tipo A-B, en un 23,6% con dos y en un 13,6% con tres ciclos. En el 27% de los ciclos objeto de estudio se disponía de 4 o más embriones tipo A-B (figura 24).

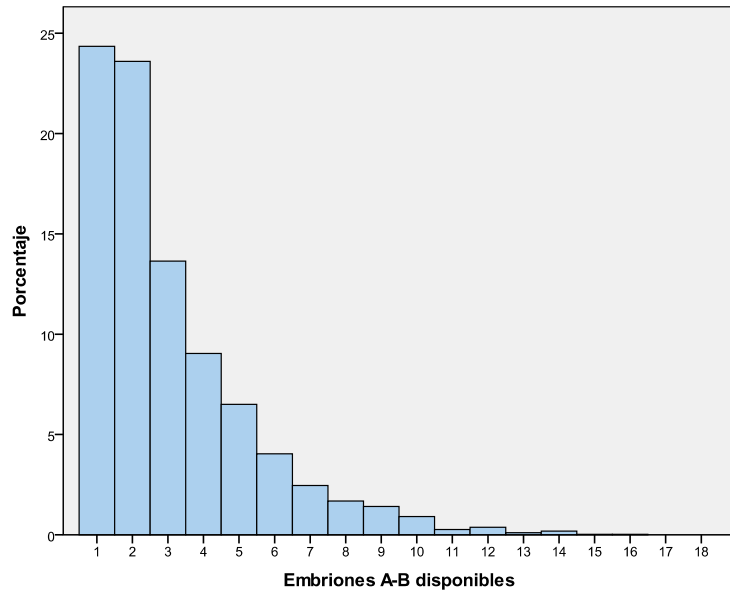


Figura 24: Número de embriones de tipo A-B disponibles en el día de la transferencia

6.1.2.24. Día de transferencia embrionaria

Los embriones fueron transferidos predominantemente en el tercer día de desarrollo (n=2620; 70,0%). El resto de las transferencias embrionarias fueron realizadas en día +3 (n=1121; 30%).

6.1.2.25. Embriones transferidos

Se transfirió una media de 2 embriones (DE: 0,59 embriones).

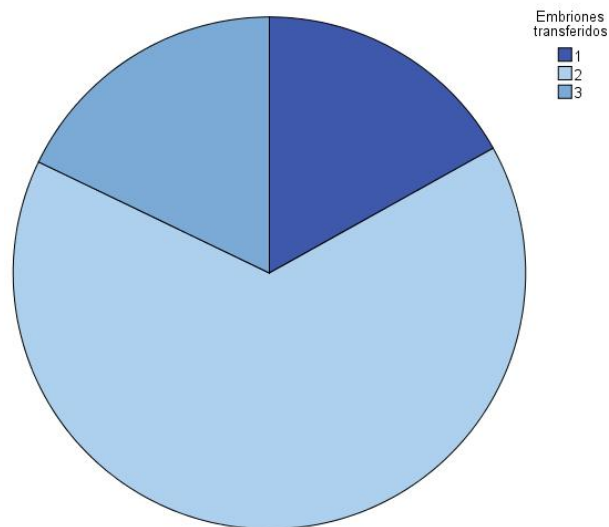


Figura 25: Distribución porcentual de ciclos por número de embriones transferidos

La transferencia de un embrión representó un 16,9% de los ciclos (n= 632), la de dos embriones se realizó en el 62,2% de los casos (n=2441) y la de tres embriones en el 17,9% (n=668) (figura 25). De las 632 transferencias de embrión único realizadas, sólo el 7,5% (n=48) tuvieron carácter electivo

6.1.2.26. Embriones A-B transferidos

Se transfirieron embriones tipo A-B en el 87,8% de los ciclos. En más de la mitad de los ciclos (52,9%), la paciente recibió la transferencia de dos embriones tipo A-B (figura 26).

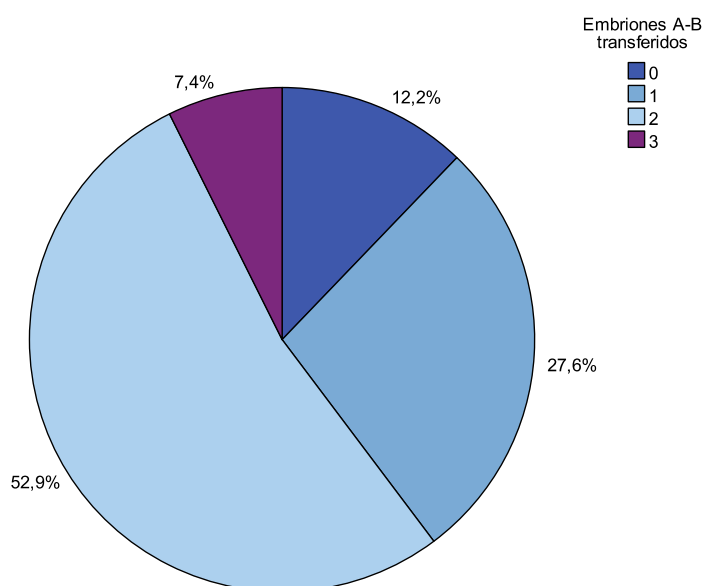


Figura 26: Distribución porcentual de ciclos por número de embriones A-B transferidos

6.1.2.27. Dificultad para la transferencia embrionaria

La transferencia fue considerada dificultosa en el 3,5% de los ciclos (n=128).

6.1.2.28. Criopreservación embrionaria

Se realizó criopreservación de embriones evolutivos restantes en el 26,2% de los ciclos (n=974). Se preservó una media de 0,8 embriones (DE: 1,7).

Las frecuencias de ciclos con preservación por número de embriones preservados se representan en la figura 27.

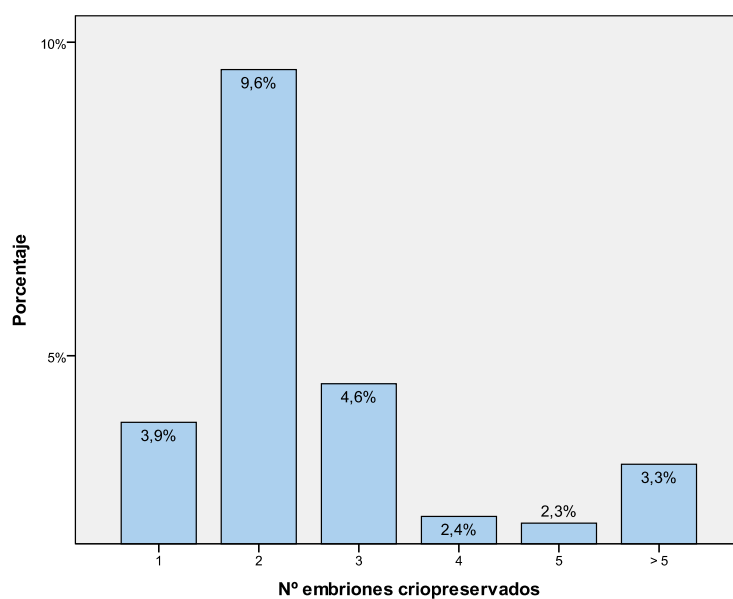


Figura 27: Frecuencia de ciclos con preservación embrionaria por número de embriones preservados

Se preservó un único embrión en el 3,9% de los ciclos, dos embriones en el 9,6% y tres o más en el 12,7%.

6.1.3. Resultados terapéuticos

6.1.3.1. Frecuencia de implantación embrionaria

La frecuencia global de implantación embrionaria fue del 21,3% (1600 sacos intrauterinos/7518 embriones transferidos) (tabla 4).

Tabla 4:
Resultados gestacionales por ciclo iniciado

	n	%
Implantación embrionaria (sacos intrauterinos/embriones transferidos)	1600/7518	21,3
Gestación bioquímica (sin saco visible)	223	6,0
Gestación clínica intrauterina por transferencia	1259	33,7
Nacido vivo por transferencia	906	24,2
Evolución de la gestación		
Aborto	241	18,7
Gestación ectópica	26	2,0
Nacido vivo	906	70,5
Desconocida	112	8,7

6.1.3.2. Gestación bioquímica (sin saco gestacional visible)

La positividad de la prueba analítica de gestación sin evidencia de gestación intrauterina ni ectópica se produjo en el 6% de los ciclos (n=223) (tabla 4)

6.1.3.3. Gestación clínica

La frecuencia global de gestación clínica por transferencia fue 33,7% (n=1259) (tabla 4). El 62,7% de las gestaciones fueron únicas, y el 19,9% gemelares. Las gestaciones múltiples de alto grado totalizaron el 1,2% restante de las gestaciones (17 triples y una cuádruple) (figura 28).

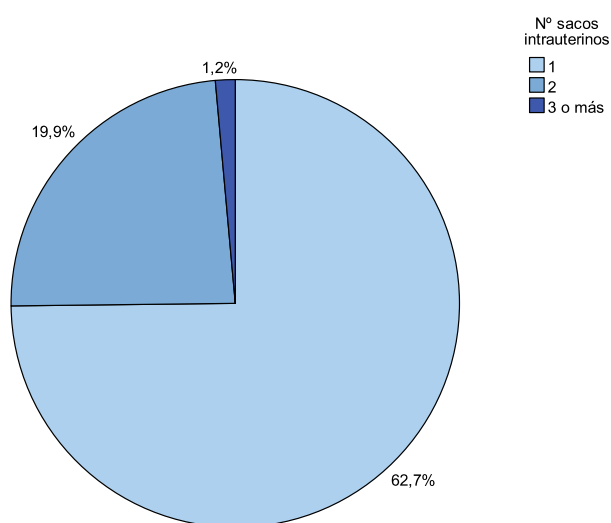


Figura 28: Frecuencia de ciclos con preservación embrionaria por número de embriones preservados

6.1.3.4. Nacido vivo

Se obtuvieron 896 nacimientos de recién nacidos vivos, lo que representa una frecuencia de nacido vivo por ciclo con transferencia fue de 23,9% (896 nacimientos), y el 70,5% de las gestaciones clínicas obtenidas.

6.1.3.5. Gestación no evolutiva

El 18,7% de las gestaciones clínicas finalizaron en aborto precoz o tardío (n=241). Se diagnosticaron 26 gestaciones ectópicas, que suponen el 2,0% de las gestaciones clínicas y el 7 % de los ciclos con resultado conocido (tabla 4).

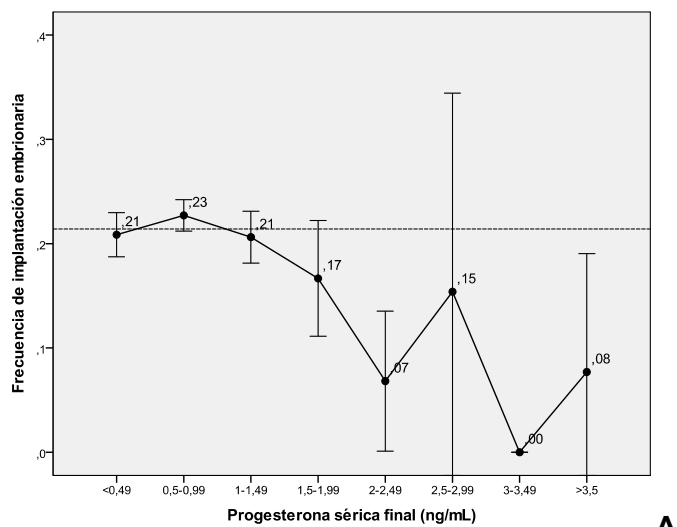
6.2. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN

6.2.1. ASOCIACIÓN ENTRE PROGESTERONA SÉRICA FINAL Y VARIABLES DE RESULTADO

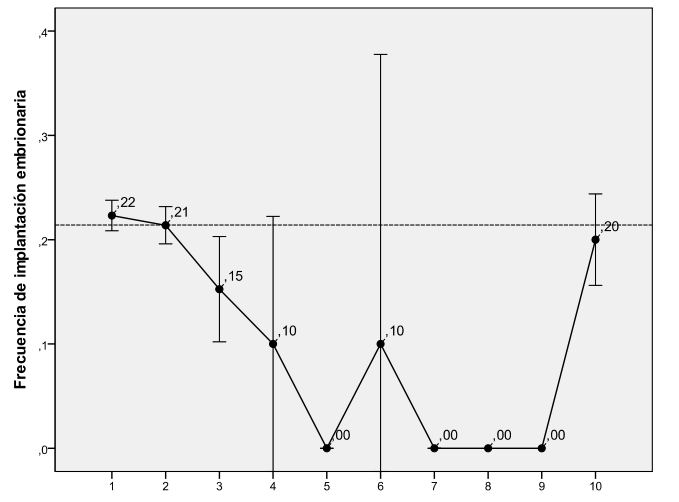
6.2.1.1. Asociación entre progesterona sérica final e implantación embrionaria

Aunque la frecuencia de implantación es en realidad una variable cuantitativa discreta – ya que adopta valores de 0,33, 0,5, 0,66 y 1–, su asociación con la progesterona sérica final puede ser estudiada mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman, que no muestra una correlación significativa ($-0,017$; $p=0,15$).

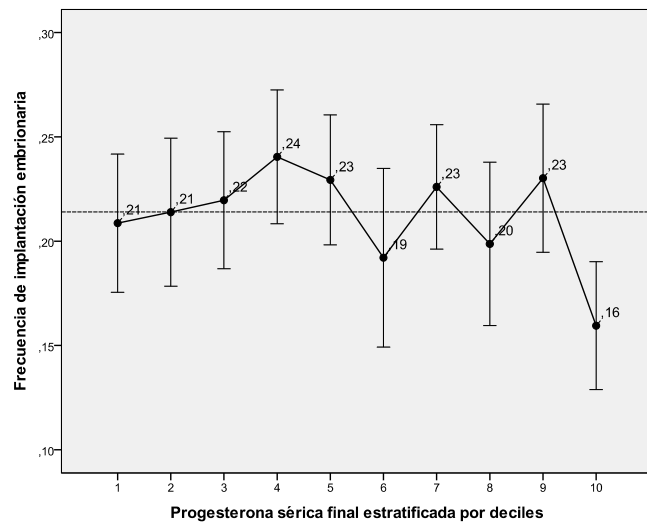
Con el fin de explorar una posible asociación no lineal, la frecuencia de implantación por estratos del nivel de progesterona ha sido estimada estratificando la distribución de progesterona sérica final con arreglo a tres criterios: división en intervalos con amplitud de 0,5 ng/mL, por múltiplos de la mediana y por deciles (figura 29).



A



B



C

Figura 29: Frecuencia de implantación embrionaria según estratos de progesterona: intervalos de amplitud fija (A), estratificada por múltiplos de la mediana (B) y por deciles (C). (Barras de error: IC 95%; la línea de puntos expresa el valor de la mediana))

Los puntos de dicotomización de la distribución de progesterona seleccionados tras el análisis de la frecuencias de implantación definidas por los distintos criterios de estratificación se resumen en la tabla 5.

Tabla 5:
Asociación y magnitud de efecto de la progesterona sérica final sobre la frecuencia de implantación embrionaria según diferentes criterios de dicotomización

Origen	Valor (ng/mL)	Nº expuestos	Implantación (%)		DAR (%)	p*	IC 95 %
			Exp	No Exp			
Estratos 0,5	1,0	843	19,3	22,1	-2,8	0.029	-5,3; -0,3
Estratos 0,5	1,5	177	14,4	21,8	-7,4	0.001	-11,8; -3,0
1 MoMs	0,7	1670	20,4	22,2	-1,9	0.078	-4,1; 2,0
3 MoMs	2,1	47	9,6	21,6	-12,0	<0.001	-18,5; -5,6
4 MoMs	2,8	22	6,8	21,6	-14,7	0.001	-22,6; -6,9
Percentil 50	0,7	1670	20,4	22,2	-1,9	0.078	-4,1; 2,0
Percentil 80	0,91	988	19,6	22,1	-2,5	0.032	-5,0; -0,2
Percentil 90	1,26	369	16,0	22,0	-6,0	<0.001	-9,3; -2,7
Percentil 91	1,3	297	16,6	21,8	-5,3	0.005	-9,0; -1,7
Percentil 92	1,31	283	15,7	21,9	-6,2	0.001	-9,9; -2,5
Percentil 93	1,35	258	15,2	21,9	-6,7	0.001	-10,5; -2,8
Percentil 94	1,4	216	14,7	21,7	-7,1	0.001	-11,2; -3,0
Percentil 95	1,47	186	14	21,8	-7,9	<0.001	-12,1; -3,6
Percentil 96	1,57	148	11,8	21,8	-10,0	0.001	-14,4; -5,7
Percentil 97	1,65	112	9,8	21,8	-12,0	0.001	-16,4; -7,6
Percentil 98	1,80	71	7,7	21,7	-14,0	0.001	-19,1; -8,8

* Valor p T-test

En la tabla 5 se aprecia claramente una asociación inversa entre la elevación de la progesterona y la tasa de implantación. En el análisis por estratos observamos que la diferencia de riesgos es significativa en niveles de progesterona superiores a 1ng/mL. Si estratificamos por deciles comprobamos que dicotomizando por el percentil 80, es decir en niveles superiores de 0,91 ng/mL, estas diferencias continúan siendo significativas.

Se comprueba que a medida que se aumentan los niveles de progesterona se incrementan las diferencias de riesgo, incrementándose los intervalos de confianza debido al descenso progresivo en el número de observaciones. Desde un punto de visto clínico y con el fin de diferenciar el valor de progesterona sérica a partir del cual las diferencias son estadísticamente significativas y clínicamente relevantes, cuando la progesterona sérica se dicotmiza en 1,26 ng/mL, la pérdida de la frecuencia de implantación es de 6 puntos porcentuales con una intervalo de confianza que se aleja del valor neutro (figura 30).

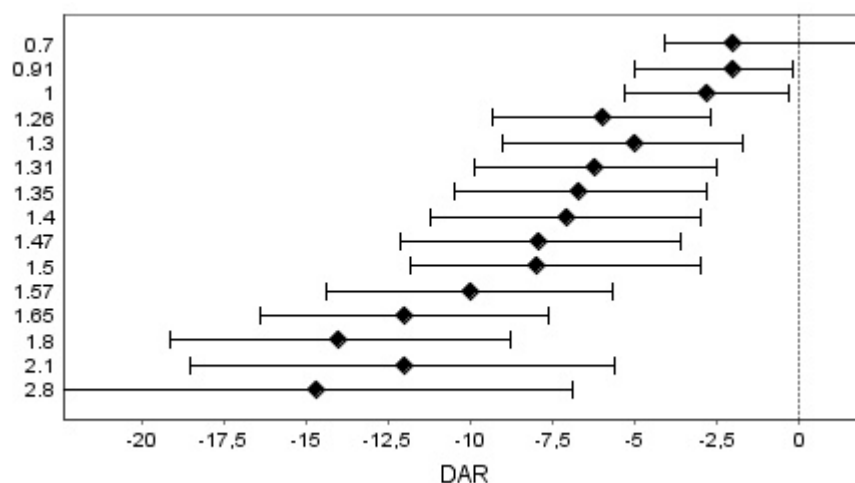
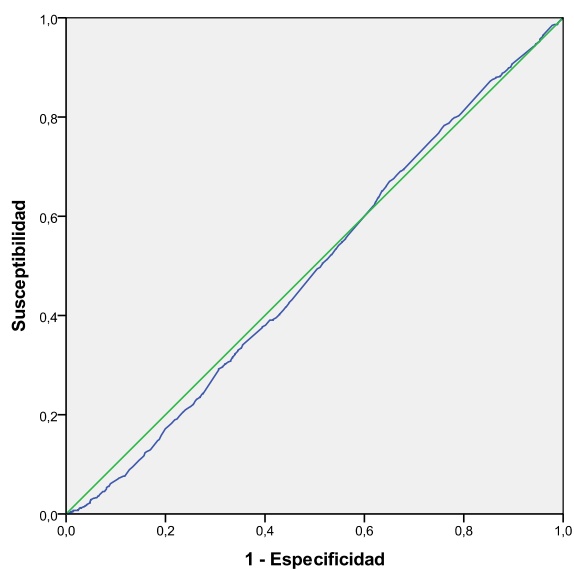


Figura 30: Diferencia absoluta de riesgos de la tasa de implantación según diferentes puntos de corte en la distribución de progesterona sérica final (ng/mL)

6.2.1.2. Asociación entre progesterona sérica final y gestación clínica

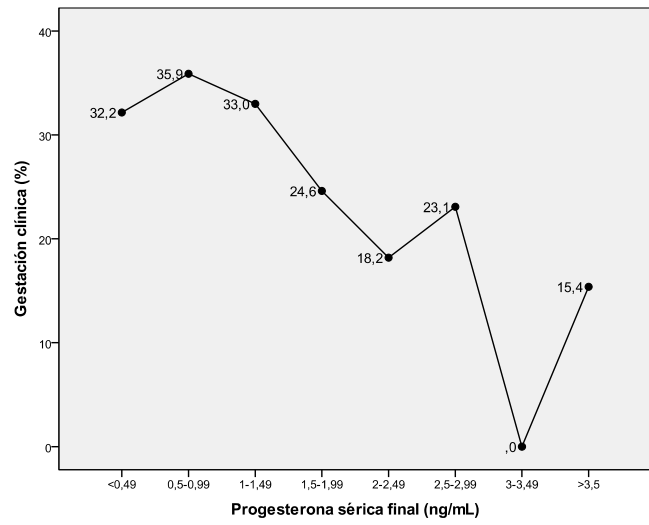
La comparación no paramétrica de las distribuciones de progesterona sérica final entre ciclos con y sin gestación clínica no halló diferencia significativa (rangos promedio: 1843,8 vs 1875,8; $p=0,38$). En términos de capacidad predictiva, el área bajo la curva ROC fue igualmente no sugestiva de asociación (0,49; IC 95%: 0,57; 0,51; $p=0,38$) (figura 31).



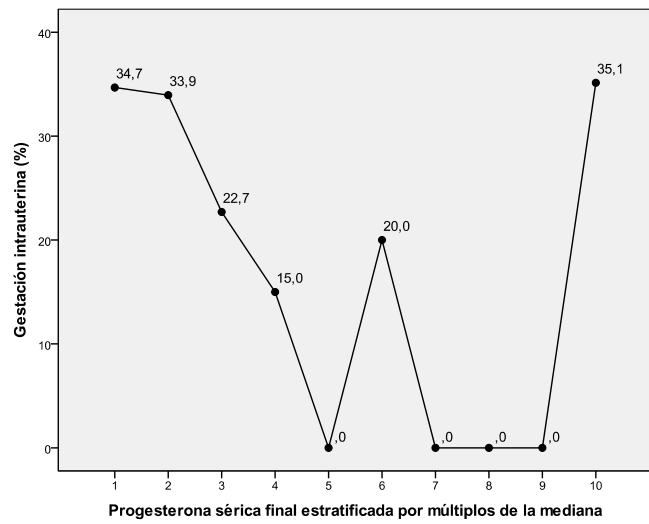
Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Figura 31: Curva ROC de evaluación de progesterona sérica final como predictor de gestación clínica

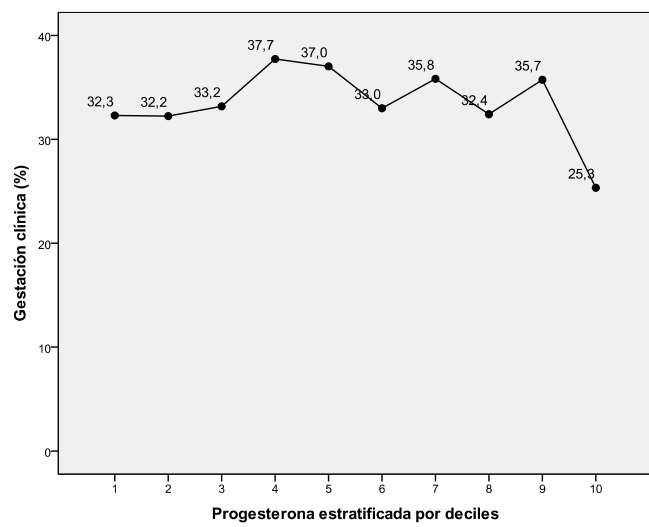
La posible existencia de una asociación no lineal entre la progesterona sérica final y el resultado gestacional ha sido explorada mediante análisis de intervalos. Con este fin, la distribución de progesterona sérica final se ha estratificado aplicando tres mencionados con anterioridad. (figura 32).



A



B



C

Figura 32: Frecuencia relativa de gestación clínica por estratos de progesterona: intervalos de amplitud fija (A), estratificada por múltiplos de la mediana (B) y por deciles (C).

La valoración cualitativa de las frecuencias de gestación por intervalos ha determinado la selección de posibles puntos de dicotomización:

- En la estratificación por intervalos de 0,5 ng/mL de progesterona se aprecia un descenso de la frecuencia de gestación a partir de valores de progesterona sérica 1 y de 2 ng/mL.
- La estratificación por múltiplos de la mediana, caracterizada por fluctuaciones más intensas de la frecuencia de gestación entre estratos, muestra una tendencia al descenso de la frecuencia de gestación a partir de 3 múltiplos de la mediana (2,1 ng/mL).
- La estratificación por deciles muestra una reducción aparente de la frecuencia de gestación a partir de valores de progesterona sérica comprendidos en el décimo decil (> 1,25 ng/mL). Con el fin de determinar si algún punto de la distribución de valores de progesterona comprendido entre el percentil 90 y el 100 discrimina más adecuadamente la frecuencia de gestación, se ha repetido el análisis de frecuencia por intervalos percentilares dentro del 10º decil (figura 33):

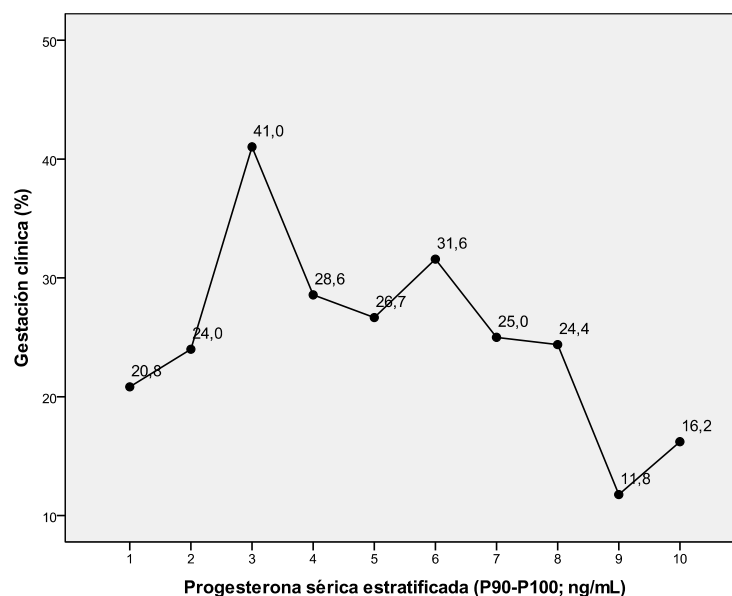


Figura 33: Frecuencia relativa de gestación clínica por estratos de progesterona comprendidos entre percentiles 90 y 100

La frecuencia de gestación dentro de cada estrato percentilar no muestra una tendencia evolutiva definida, por lo que se han realizado dicotomizaciones exploratorias utilizando como puntos de corte los percentiles 91 a 98.

La tabla 6 resume los resultados de las pruebas estadísticas de comparación de proporciones y las estimaciones de riesgo relativo para gestación clínica determinadas por las estratificaciones propuestas.

Tabla 6:
Asociación y magnitud de efecto de la progesterona sérica final sobre la frecuencia de gestación clínica según diferentes criterios de dicotomización

Origen	Valor (ng/mL)	Nº expuestos	Gestación (%)		DAR (%)	p*	RR	IC 95 %
			Exp	No Exp				
Estratos 0,5	1,5	177	22,6	34,3	-11,7	0,01	0,65	0,49; 0,86
Estratos 0,5	2	47	19,1	34,0	-14,9	0,02	0,56	0,31; 1,01
2 MoMs	1,4	216	22,7	34,9	-12,2	<0,001	0,65	0,51; 0,84
3 MoMs	2,1	47	19,1	33,9	-14,8	0,02	0,56	0,31; 1,01
Percentil 90	1,26	369	25,3	34,7	-9,4	<0,001	0,73	0,61; 0,88
Percentil 91	1,30	297	25,9	34,4	-8,5	0,002	0,75	0,61; 0,91
Percentil 92	1,31	283	24,7	34,5	-9,8	<0,001	0,71	0,58; 0,88
Percentil 93	1,35	258	23,6	34,5	-10,9	<0,001	0,68	0,54; 0,85
Percentil 94	1,4	216	22,7	34,9	-12,2	<0,001	0,65	0,51; 0,84
Percentil 95	1,47	186	22,0	34,4	-12,4	<0,001	0,63	0,48; 0,84
Percentil 96	1,57	148	19,6	34,3	-15,3	<0,001	0,57	0,41; 0,79
Percentil 97	1,65	112	17,9	34,3	-16,4	<0,001	0,52	0,35; 0,77
Percentil 98	1,81	71	14,1	34,1	-20,0	<0,001	0,41	0,23; 0,73

* Valor p de la prueba Chi²

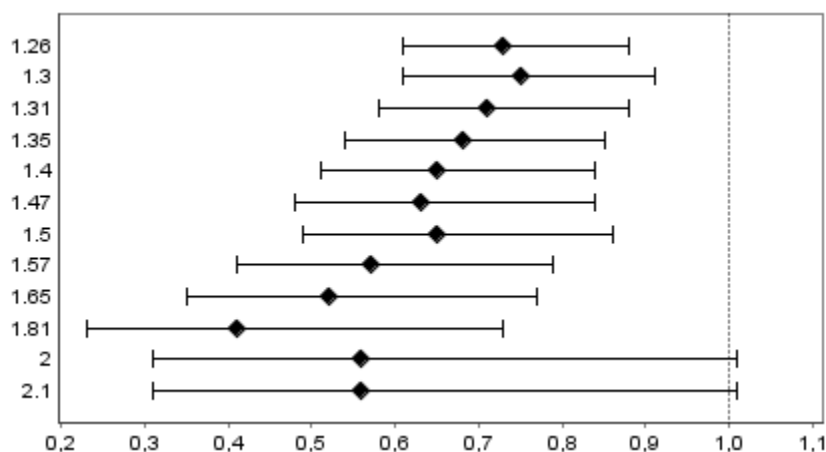


Figura 34: Riesgos relativos de gestación clínica según diferentes puntos de corte en la distribución de progesterona sérica final (ng/mL)

La figura 34 muestra las estimaciones de riesgo relativo de gestación obtenidas por medio de cada valor dicotómico, con sus correspondientes intervalos de confianza.

Puede apreciarse cómo los RR obtenidos utilizando como puntos de corte los valores 1,4 ng/mL (percentil 94 y doble de la mediana de la distribución), 1,47 ng/mL (percentil 95) y 1,5 ng/mL son muy similares, así como la amplitud de sus intervalos de confianza al 95%.

A pesar de la similitud en la magnitud de efecto y en la precisión de la estimación, la selección como punto de corte de 1,4 determinaría la existencia de 216 expuestos a elevación precoz de progesterona (6% de frecuencia), mientras que la elección de 1,47 y 1,5 ng/dL para definir este evento generaría 186 y 177 expuestos respectivamente, con frecuencias de exposición del 4,7% y del 4,9%.

6.2.1.3. Asociación entre progesterona sérica final y nacido vivo

Comparando las distribuciones de progesterona sérica final entre los ciclos que produjeron nacido vivo y los que no, el valor de p de la prueba de rangos es elevado (rangos promedio: 2711 vs 906; $p=0,453$), por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula de no asociación. La curva ROC delimita un área bajo la curva cuyo IC 95% comprende el valor neutro (0,492; IC 95%: 0,47; 0,51; $p=0,453$) (figura 35).

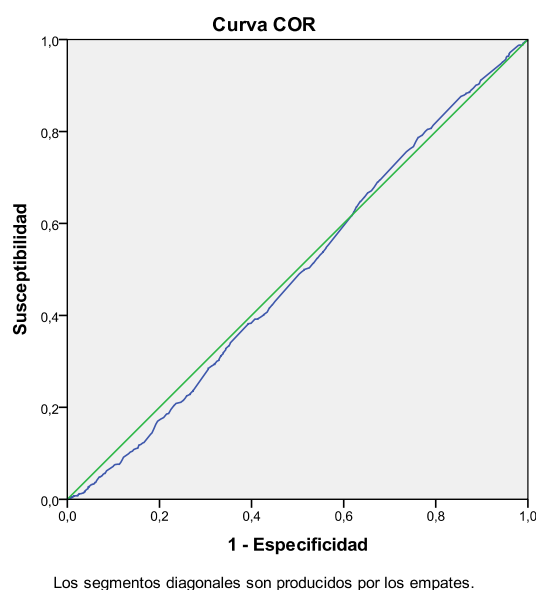
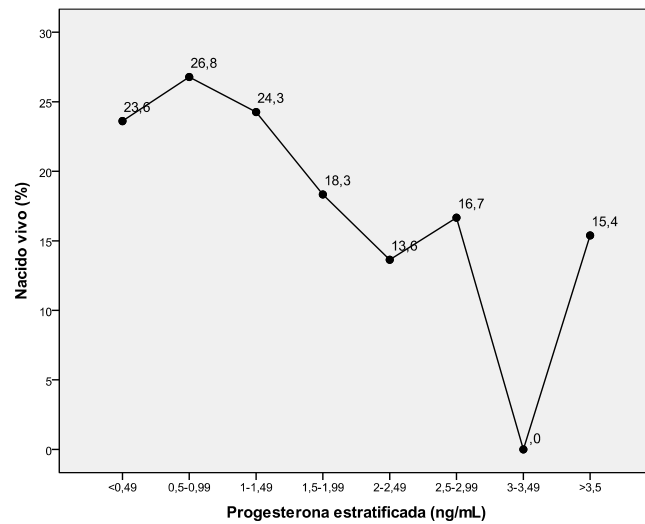
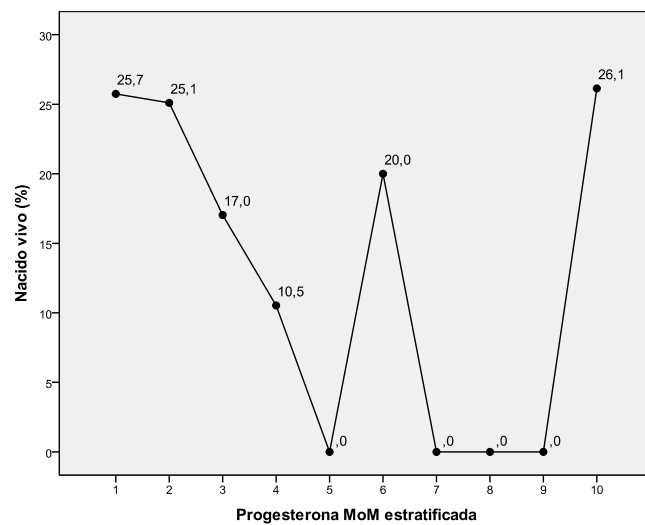


Figura 35: Curva ROC de evaluación de progesterona sérica final como predictor de nacido vivo

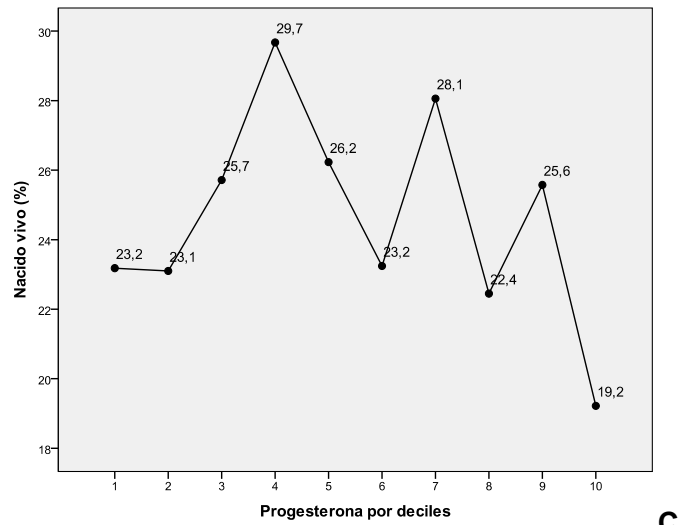
Para aplicar nuevamente el análisis de intervalos, la distribución de progesterona sérica final se ha estratificado aplicando los tres criterios mencionados con anterioridad (división en intervalos con amplitud de 0,5 ng/mL, por múltiplos de la mediana y por deciles), tras lo cual se ha estimado la frecuencia de nacido vivo por estrato (Figura 36).



A



B



C

Figura 36: Frecuencia relativa de nacido vivo por estratos de progesterona: intervalos de amplitud fija (A), estratificada por múltiplos de la mediana (B) y por deciles (C).

Seleccionamos los diversos puntos de dicotomización en función de la valoración cualitativa de la frecuencia relativa de nacido vivo:

- Por medio de la estratificación por intervalos de 0,5 ng/mL de progesterona, se aprecia un descenso de la frecuencia de nacido vivo a partir de valores de progesterona sérica 1,5 y de 2 ng/mL.
- Se aprecia también, sin tener en cuenta los valores extremos de la distribución de MoMs, que la frecuencia de nacido se reduce a partir del tercer o del cuarto estrato, que corresponden a 2, 3 y 4 veces el valor de la mediana.
- La estratificación por deciles muestra una reducción de la frecuencia de nacido vivo a partir de valores de progesterona sérica comprendidos en el décimo decil (> 1,25 ng/mL). De forma análoga a la empleada con la variable ‘gestación clínica’ se han estimado las frecuencias de nacido vivo por los estratos comprendidos ente el P90 y el 100 (figura 37):

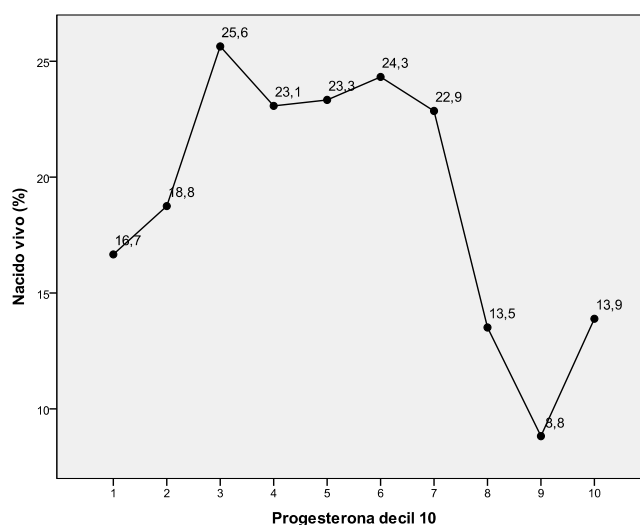


Figura 37: Frecuencia relativa de gestación clínica por estratos de progesterona comprendidos entre percentiles 90 y 100

Se aprecia cómo, dentro del 10º decil, la frecuencia de nacido vivo decae a partir del estrato 8, que corresponde al percentil 97 (1,66 ng/mL). Por tanto, procede contrastar las proporciones de nacido vivo usando como puntos de corte el P90 (1,26 ng/mL) y el P97 (1,66 ng/mL) de la distribución de progesterona.

La tabla 7 resume los resultados de las pruebas estadísticas de comparación de proporciones y las estimaciones de riesgo relativo para nacido vivo determinadas por las estratificaciones propuestas.

Tabla 7:
Asociación y magnitud de efecto de la progesterona sérica final sobre la frecuencia de nacido vivo según diferentes criterios de dicotomización

Origen	Valor (ng/mL)	Nº expuestos	Nacido (%)		DAR (%)	p*	RR	IC 95 %
			Exp	No Exp				
Estratos 0,5	1,5	170	17,1	25,4	-8,3	0,007	0,67	0,47; 0,93
Estratos 0,5	2	46	15,2	25,2	-10	0,079	0,6	0,3; 1,19
2 MoMs	1,4	209	17,7	25,5	-7,8	0,006	0,69	0,51; 0,93
3 MoMs	2,1	46	15,2	25,2	-10	0,07	0,6	0,3; 1,2
4 MoMs	2,8	22	13,6	21,5	-11,5	0,16	0,54	0,18; 1,55
Percentil 90	1,26	357	19,3	25,7	-6,4	0,004	0,75	0,6; 0,94
Percentil 97	1,65	103	11,7	25,4	-13,7	0,001	0,46	0,27; 0,78

* Valor p de la prueba Chi²

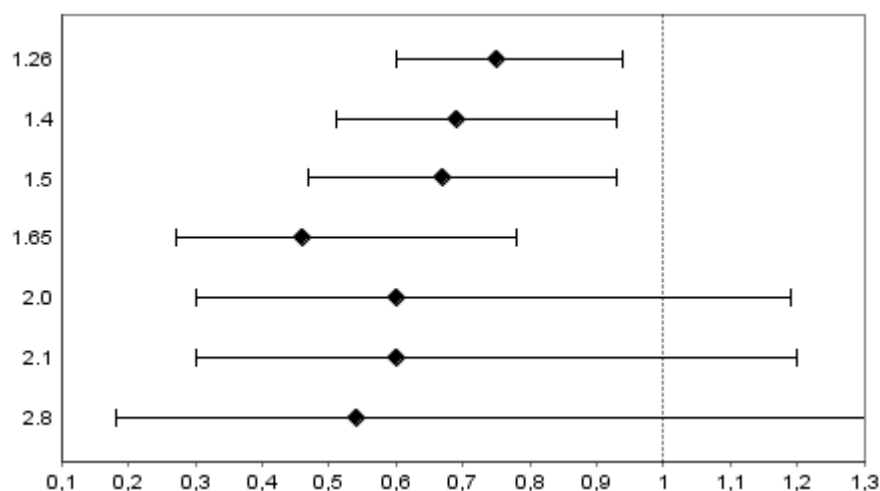


Figura 38: Riesgos relativos de nacido vivo según diferentes puntos de corte en la distribución de progesterona sérica final (ng/mL)

La figura 38 muestra que la magnitud del efecto de la EPP sobre la frecuencia de nacido vivo es relativamente estable entre valores comprendidos entre 1,26 y 1,5 (RR: 0,67-0,75), para incrementarse hasta un RR de 0,46 a partir de niveles de progesterona de 1,65 ng/mL, sin incremento sustancial de la amplitud de los intervalos de confianza.

6.2.1.4. Asociación entre progesterona sérica final y aborto

De igual forma que hemos procedido con las anteriores variables resultado, se ha realiza una comparación de distribuciones de progesterona mediante una U de Mann Whitney, que, según nuestros datos, no permite descartar la hipótesis nula de no asociación ($p=0,270$). Al determinar la curva ROC, no se aprecia capacidad de predicción significativa, ya que su trazado se superpone a la diagonal (0,494; IC 95%: 0,45; 0,54; $p=0,787$) (figura 39).

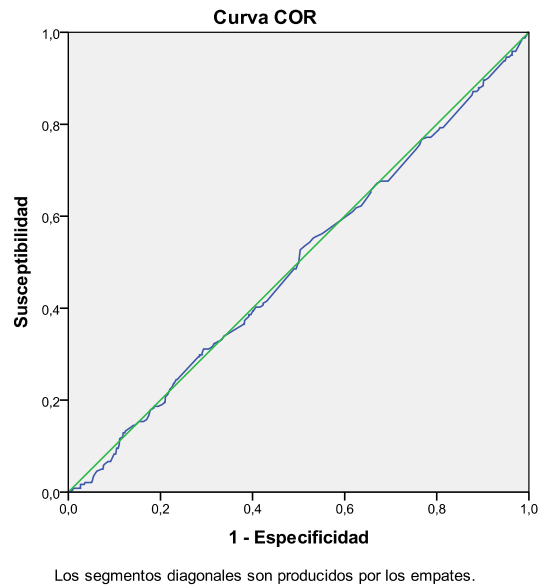
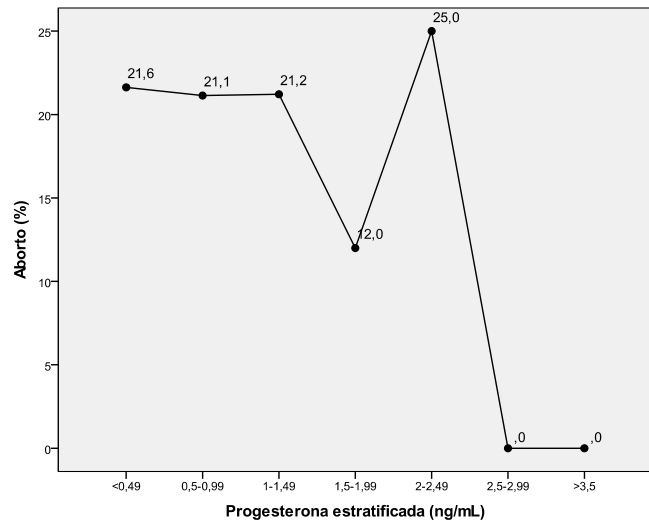


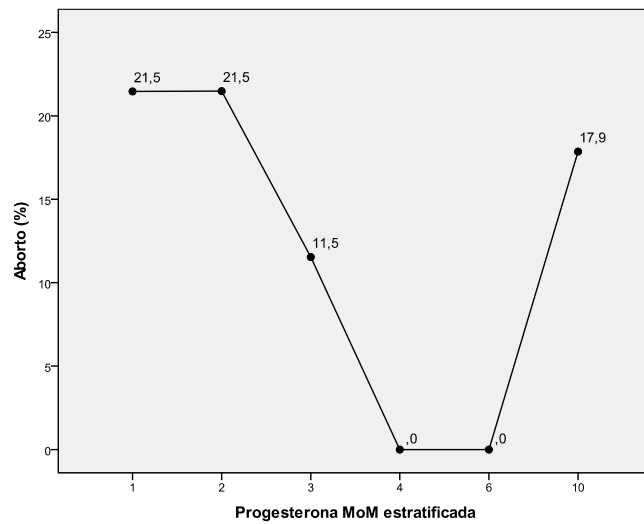
Figura 39: Curva ROC de evaluación de progesterona sérica final como predictor de aborto

Siguiendo la metodología aplicada con otras variables sin asociación lineal con la progesterona sérica, hemos estratificado ésta según los criterios anteriormente expuestos:

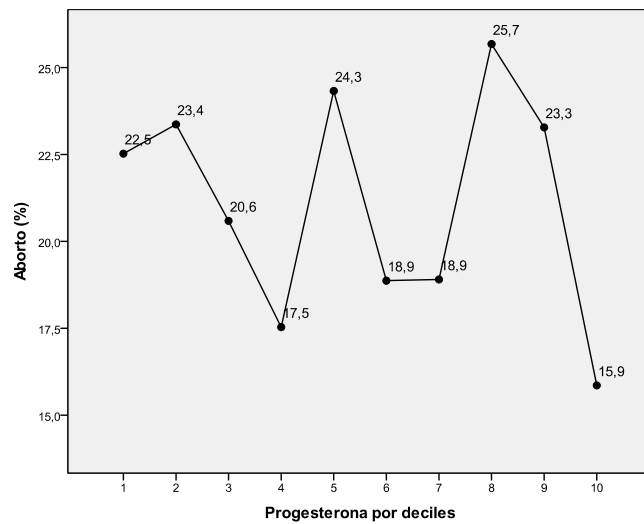
- En la estratificación por intervalos de 0,5 ng/mL de progesterona, se aprecia un descenso de la frecuencia de aborto con valores de progesterona sérica por encima 1,5 ng/mL .
- En la estratificación por múltiplos de la mediana, se observa un descenso de la frecuencia de aborto por encima 3 MoMs, por lo que usaremos este valor (2,1 ng) para el análisis dicotómico.
- La estratificación por deciles no muestra tendencia definida respecto a la frecuencia de aborto a medida que incrementa la concentración de progesterina. No obstante, dicotomizamos la progesterona usando como punto de corte el percentil 90 (Figura 40).



A



B



C

Figura 40: Frecuencia relativa de aborto por estratos de progesterona: intervalos de amplitud fija (A), estratificada por múltiplos de la mediana (B) y por deciles (C).

Al realizar los contrastes de proporciones dicotomizando por los valores mencionados en la estratificación, observamos que las frecuencias de aborto observadas, por cierto en contra de hipótesis, no alcanzan la significación estadística (tabla 8).

Tabla 8:
Asociación y magnitud de efecto de la progesterona sérica final sobre la frecuencia aborto según diferentes criterios de dicotomización

Origen	Valor (ng/mL)	Nº expuestos	Aborto (%)		DAR (%)	p*	RR	IC 95 %
			Exp	No Exp				
Estratos 0,5	1,5	33	12,1	21,3	-9,2	0,144	0,57	0,23; 1,44
3 MoMs	2,1	8	12,5	21,1	-8,6	0,473	0,59	0,95; 3,72
Percentil 90	1,26	82	15,9	21,4	-5,5	0,146	0,74	0,44; 1,24

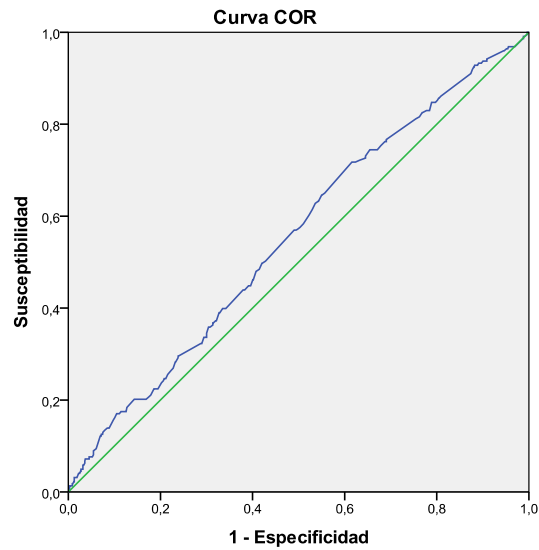
* Valor p de la prueba Chi²

6.2.1.5. Asociación entre progesterona sérica final y gestación bioquímica.

Para estudiar la asociación de la EPP con la detención precoz de la gestación, hemos comenzado por la comparación de las distribuciones de progesterona sérica entre ciclos con gestación subclínica o bioquímica (interrumpida antes de la detección ecográfica del saco gestacional) y los ciclos que dieron lugar a una gestación con saco visible. Este contraste proporcionó un valor p de la prueba de rangos compatible con asociación significativa.

La comparación de distribuciones de progesterona considerando los ciclos con gestación mediante una U de Mann-Whitney el valor p de este contraste resultó bajo (0,009), por lo que asumimos que las distribuciones son diferentes, y que las progesteronas de los ciclos con test de gestación positiva que no progresan hasta gestación clínica son significativamente más elevadas que las de los ciclos en las que sí se aprecia finalmente saco gestacional.

Al realizar una curva ROC, el área bajo la curva (AUC) se asocia a un valor p de 0,009 y su IC 95% no incluye el valor neutro 0,5. No obstante, a pesar de la asociación, la capacidad de predicción de la progesterona sobre la probabilidad de gestación bioquímica es escasa, asumiendo una distribución lineal (0,56; IC 95%: 0,51; 0,60; p=0,009) (Figura 41).

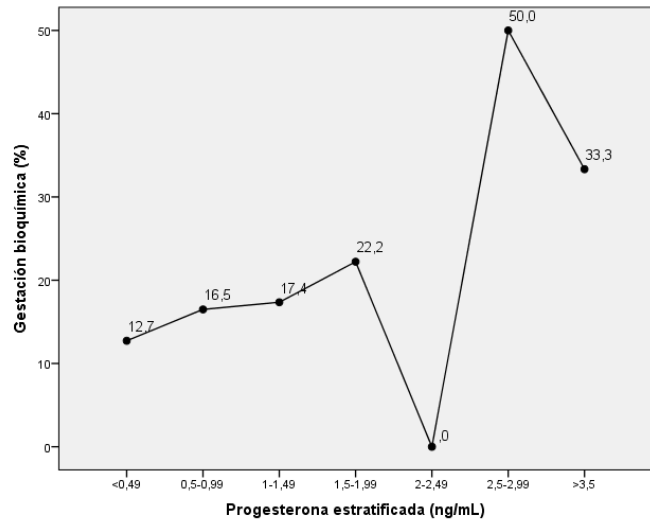


Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

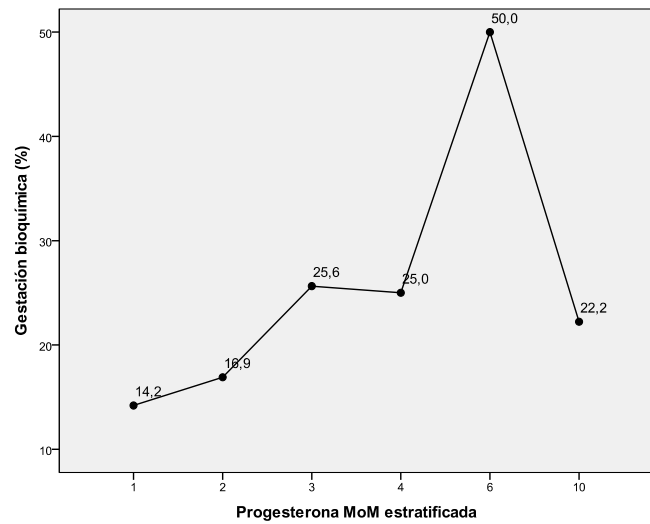
Figura 41: Curva ROC de evaluación de progesterona sérica final como predictor de gestación bioquímica

Recurrimos a la estratificación por intervalos de la progesterona para explorar la asociación no lineal de esta con la presencia de gestación bioquímica.

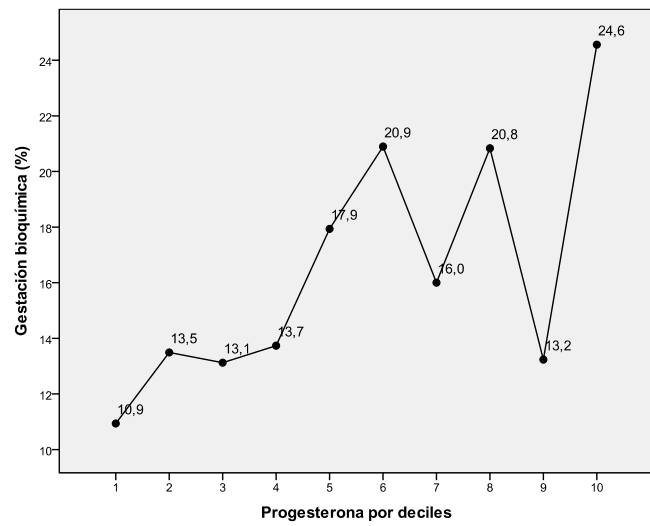
- En la estratificación por intervalos de 0,5 ng/mL de progesterona, se aprecia un incremento progresivo de la frecuencia de gestación bioquímica a medida que se incrementa la progesterona, siendo más acusado a partir de los estratos que corresponden a valores de progesterona por encima 1,5 y 2,5 ng/mL.
- En la estratificación por múltiplos de la mediana, A partir de valores de progesterona iguales o superiores a dos y tres veces la mediana (2,1 ng/mL) la frecuencia de gestación bioquímica parece incrementarse.
- En la estratificación por deciles, la observación del gráfico de frecuencias sugiere que la frecuencia de gestación bioquímica podría incrementarse a partir del 4º decil (Por encima del percentil 41), es decir, a un valor de progesterona sérica de 0,61 ng/mL (Figura 42).



A



B



C

Figura 42: Frecuencia relativa de aborto por estratos de progesterona: intervalos de amplitud fija (A), estratificada por múltiplos de la mediana (B) y por deciles (C).

La tabla 9 resume los resultados de las pruebas estadísticas de comparación de proporciones y las estimaciones de riesgo relativo para gestación bioquímica determinadas por las estratificaciones realizadas.

Tabla 9:
Asociación y magnitud de efecto de la progesterona sérica final sobre la frecuencia de gestación bioquímica según diferentes criterios de dicotomización

Origen	Valor (ng/mL)	Nº expuestos	Gestación (%)		DAR (%)	p*	RR	IC 95 %
			Exp	No Exp				
Estratos 0,5	1	290	18,3	15,4	2,9	0,13	1,18	0,89; 1,57
Estratos 0,5	1,5	48	22,9	15,7	7,2	0,13	1,45	0,85; 2,48
Estratos 0,5	2	12	25,0	15,9	9,1	0,29	1,57	0,28; 4,52
Estratos 0,5	2,5	7	42,9	15,8	27,1	0,08	2,7	1,14; 6,42
1 MoMs	0,7	614	18,2	14,2	4	0,02	1,28	1,01; 1,63
2 MoMs	1,4	62	25,8	15,5	5,3	0,029	1,66	1,07; 2,58
3 MoMs	2,1	12	25,0	15,9	9,1	0,29	1,57	0,58; 4,2
Percentil 40	0,61	789	18,3	13,0	5,3	0,005	1,4	1,09; 1,83

* Valor p de la prueba Chi²

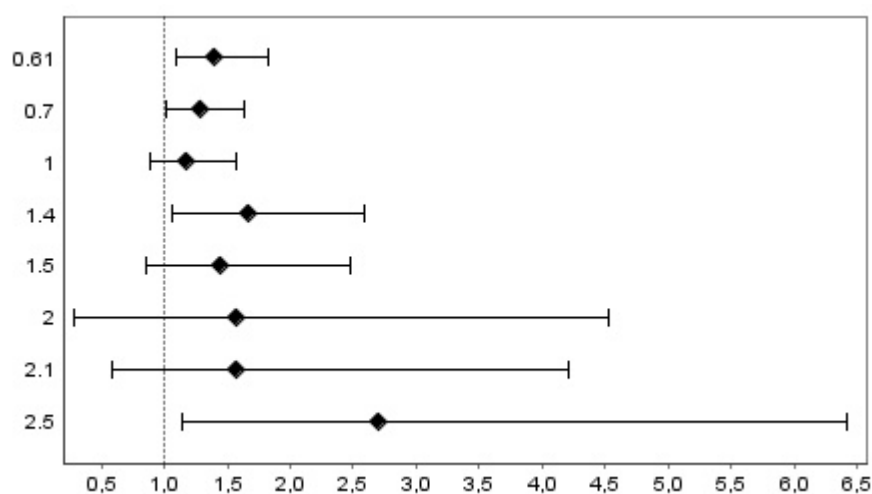


Figura 42: Riesgos relativos de nacido vivo según diferentes puntos de corte en la distribución de progesterona sérica final (ng/mL)

Según la estimación de magnitud de efecto por intervalo de progesterona sérica, podríamos adoptar como adecuadas dos estratificaciones diferentes (0,61 y 1,4 ng). La primera determina la clasificación de 749 ciclos como expuestos, mientras que según la segunda serían sólo 62, lo que se traduce en la magnitud de los intervalos de confianza (Figura 42).

6.2.2. ASOCIACIÓN ENTRE COVARIABLES Y NACIDO VIVO

Analizaremos la asociación de las covariables con la variable principal de resultado, nacido vivo, como paso previo al análisis bi y multivariado. La descripción de resultados se ha sistematizado en tres bloques para cada variable de resultado:

- Características basales de la paciente y antecedentes del proceso de esterilidad.
- Características de la estimulación ovárica
- Resultados de la estimulación ovárica y de la técnica de la FIV.

En la tabla 10 se resume los resultados relacionados con las covariables que hacen referencia a las características basales de las pacientes y los antecedentes del proceso de esterilidad.

La exploración de asociación con la **edad de la paciente** muestra frecuencias persistentes entorno 32%, comenzando a descender por encima de los 35 años. Al estratificar en <35 años, entre 35 y 39 años y > 39 años, las frecuencias de nacido son de 31,4%, 26,4% y 10,4% respectivamente. Se decide dicotomizar en 35, 37 y 40 años en base a la distribución de las frecuencias de la muestra y a criterios clínicos referenciados en la literatura. Los resultados muestran que por encima de los 35 y los 39 años la frecuencia de nacido vivo disminuye de forma significativa, pero es en 37 años donde el RR muestra mayor magnitud, con el IC más estrecho (RR: 1,49; IC95%: 0,42; 0,56; $p < 0,001$).

La frecuencia de nacido por los estadios de **Obesidad** de la OMS muestra los siguientes resultados: 25,2% para bajo peso, 24,7% en nomopeso, 20,5% en sobrepeso, 29,9% en obesidad tipo I, 16,7% en obesidad tipo II y 25% para obesidad tipo III. No se han encontrado diferencias significativas al estratificar por los diferentes intervalos (tabla 10).

Con respecto al **consumo de tabaco** no se encuentra asociación con la frecuencia de nacido. Tanto si dicotomizamos entre fumar o no fumar, ni tampoco desde un punto de vista cuantitativo, teniendo en cuenta la cantidad de cigarrillos consumidos (Tabla 10).

El recuento de folículos antrales (RFA) muestra una relación inversa entre el y la frecuencia de nacido. El análisis de la distribución ha identificado dos puntos de claro descenso de la frecuencia de implantación (menos de 9 y menos de 12 folículos). Estratificando el RFA en menos de 9, 9-12 y más de 12 folículos, se han observado frecuencias de nacido de 21,2%, 31,1% y 33,6% respectivamente. Dicotomizando por ambos valores se observa que la reducción de la frecuencia de nacido es más acusada

por debajo de 9 folículos con un intervalo de confianza más estrecho (RR: 0,65; IC95%: 0,54; 0,79; $p < 0,001$), si bien ambos valores son estadísticamente significativos.

La exploración de la **FSH basal** muestra una frecuencia relativamente estable de nacido, con una tendencia a decaer en estratos con FSH > de 10 y de 12 UI/L. Al dicotomizar por ambos puntos de corte, encontramos significación, pero es cuando la FSH > 12 UI/L, cuando la magnitud del efecto es mayor (RR: 0,65; IC95%: 0,49; 0,86; $p = 0,001$).

Tabla 10:

Asociación y magnitud de efecto de covariables relacionadas con características basales de las pacientes y antecedentes del proceso de esterilidad sobre nacido vivo

Covariable	Estratos	Nacido (%)		DAR (%)	p*	RR	IC 95 %
		CR	CB				
Edad (años)	>35 vs ≤35	19,6	31,4	-11,8	<0,001	0,62	0,55; 0,70
	>37 vs ≤37	15,0	30,7	-15,7	<0,001	0,49	0,42; 0,56
	>39 vs ≤39	7,7	27,5	-19,8	<0,001	0,28	0,20; 0,39
IMC (kg/m ²)	<18,5 vs ≥18,5	24,3	25,4	-1,1	0,423	0,95	0,70; 1,31
	≥25 vs <25	22,8	24,8	-2,0	0,183	0,92	0,77; 1,09
	≥30 vs <30	28,2	24,2	4,0	0,167	1,17	0,88; 1,55
	≥35 vs <35	20	24,4	-4,4	0,408	0,82	0,37; 1,80
	≥40 vs <40	25	24,3	0,7	0,616	1,03	0,31; 3,42
Fumadora	si vs no	25,7	24,9	0,8	0,335	1,03	0,90; 1,18
Nº Cigarros/día	>10 vs ≤10	26,2	24,9	1,3	0,297	1,05	0,89; 1,25
	>20 vs ≤20	23,6	25,1	-1,5	0,371	0,94	0,71; 1,25
RFA	< 9 vs ≥9	21,2	32,3	-11,1	<0,001	0,65	0,54; 0,79
	< 12 vs ≥12	25,7	33,6	-7,9	0,002	0,76	0,64; 0,91
FSH basal (UI/L)	≥12 vs <12	16,9	25,7	-8,8	0,001	0,65	0,49; 0,86
	>10 vs ≤10	20,7	25,8	-5,1	0,006	0,80	0,67; 0,96
Tipo de esterilidad	1ª vs 2ª	25,3	24,1	1,2	0,284	1,05	0,90; 1,22
Duración de la esterilidad (años)	>2 vs ≤2	22,8	28,1	-5,3	<0,001	0,81	0,72; 0,91
	>4 vs ≤4	16,3	26	-9,7	<0,001	0,62	0,47; 0,82
Indicación (edad/baja reserva)	sí vs no	16,0	27,2	-11,2	<0,001	0,59	0,49; 0,71
Ciclos previos FIV	>2 vs ≤2	21,1	25,4	-4,3	0,045	0,83	0,66; 1,03
Ciclos previos CT	≥2 vs <2	24,6	32,8	-8,2	0,007	0,75	0,61; 0,92

* Valor p de la prueba Chi²
CR: Condición de riesgo, CB: Condición Basal

El tipo de esterilidad (primaria vs secundaria) no presentó asociación con la frecuencia de nacido (tabla 10).

La frecuencia de nacido vivo muestra un descenso por encima del segundo año evolución **de la esterilidad**, nuevamente decae de forma evidente por encima del 4º año. Las dicotomizaciones por el 2º y 4º año proporcionan diferencias de frecuencias de nacido significativas y clínicamente relevantes (-5,3% y -9,7% respectivamente), si bien es partir del 4º año donde el contraste presenta un IC 95% más amplio (tabla 10), por lo que asumiremos como punto de corte, el segundo año.

Con respecto a la **indicación del tratamiento** y su asociación con nacido, la baja reserva funcional y el factor etario, son las que tienen peor pronóstico (tabla 10).

En lo que respecta a los **ciclos previos de FIV**, solo en aquellos tratamientos con antecedentes de haberse realizado más de dos ciclos muestran un descenso de la frecuencia de nacido vivo, sin embargo a pesar de que el valor es significativo ($p < 0,005$), el IC incluye la unidad (RR: 0,83 IC95%: 0,66; 1,03; $p = 0,045$). Respecto a los antecedentes de **ciclos previos de criotransferencia** la asociación se da cuando se han realizado dos o más tratamientos (RR: 0,75 IC95%: 0,61; 0,92; $p = 0,007$).

Pasaremos a analizar la asociación y magnitud de efecto de las covariables relacionadas con la estimulación ovárica sobre nacido vivo. Dichos resultados se resumen en la tabla 11.

Para explorar la asociación de **progesterona basal** con la frecuencia de nacido vivo, se estratificó la variable en estratos. Solamente en el último estrato progesterona basal $> 2,0$ ng/mL, se apreció una disminución aparente de la frecuencia. Al dicotomizar por ese estrato no se encontró asociación. La dicotomización por otros estratos, como la mediana, u otros puntos de corte basados en los resultados con otras variables secundarias, tampoco mostraron asociación (tabla 11).

El tipo de agonista de la GnRH no se asoció con la frecuencia de nacido vivo (RR: 0,94 IC95%: 0,80; 1,10; $p = 0,227$).

Los tratamientos en los que se usó **anticonceptivo hormonal previo** presentaron una pérdida de 5,2% menos de posibilidades de embarazo. Dichas diferencias resultaron estadísticamente significativas (RR: 0,81 IC95%: 0,73; 0,91; $p < 0,001$).

Las frecuencias de nacido en función del **tipo de gonadotropina** fueron: 25,2% en caso de usar FSHr, 18,3% corresponde a HMG, 28,6% en caso de gonadotropina urinaria y 33,3% en caso de utilizar un tratamiento combinado de FSHr y HMG. La distribución de frecuencias muestra como casi el 98% de los ciclos se realizaron con FSHr, por lo que en el contraste la única comparación posible es con HMG, no encontrando diferencias estadísticamente significativas (tabla 11).

Los ciclos con **actividad LH**, existe una pérdida de frecuencia de nacido vivo de 6%, dicha diferencia resulta estadísticamente significativa (RR: 0,80 IC95%: 0,72; 0,90; $p < 0,001$).

La **dosis inicial de FSH**, se estratificó en tres estratos clínicos: < 150 UI (dosis bajas), entre 150 y 299 UI (dosis medias) y ≥ 300 UI (dosis altas). Las frecuencias de nacido por estrato se correspondieron con 35,2%, 30,1% y 20,4% respectivamente. Al dicotomizar por dosis bajas y altas, fue en 300 UI donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas con una mayor magnitud de asociación (RR: 0,63 IC95%: 0,54; 0,74; $p < 0,001$).

La **dosis de inicio de LH**, se dicotomizó en 75 UI, debido a que la mayor parte de los ciclos en los que se administró LH se pautaron dosis de inicio de 75UI (63,4%) o de 150UI (32,8%). En el análisis de asociación se objetivó que en aquellos tratamientos con dosis inicial de LH mayor de 75 UI la frecuencia de nacido vivo disminuyó un 10,5%, siendo diferencia que resulta estadísticamente significativa (RR: 0,63 IC95%: 0,54; 0,73; $p < 0,001$).

En la exploración de la asociación con el **consumo de actividad FSH total**, ésta se estratificó en estratos de 500 pg/mL. Las frecuencias asociadas mostraron un descenso que se hace más acusada a partir de 2500 pg/mL. Se exploran otros puntos de corte como la mediana (2100 UI) y 1500UI, en base a los resultados de la distribución. El punto de corte donde se establece una asociación mayor es 2500UI, con una reducción de 10,4% en la frecuencia de nacido vivo (RR: 0,64 IC95%: 0,56; 0,73; $p < 0,001$). Los otros contrastes realizados (1500UI y 2100 UI) mostraron también las diferencias resultaron significativas (tabla 11).

Con respecto al **consumo de LH**, de cara a la exploración de la asociación, se estratificó en estratos de 500 UI. La frecuencia de nacido presenta una caída destacable, en el primer estrato (> 500 UI) seguida de un descenso mantenido hasta el 5º estrato (> 2000 UI). La dicotomización por la mediana, 750 UI, y por 500UI en base a los resultados de la

muestra, nos sugieren 500UI como el punto de corte más adecuado (RR: 0,63 IC95%: 0,54; 0,73; $p < 0,001$).

Tabla 11:

Asociación y magnitud de efecto de covariables relacionadas con la estimulación ovárica sobre nacido vivo

Covariable	Estratos	Nacido (%)		DAR (%)	p*	RR	IC 95 %
		CR	CB				
Progesterona Basal (ng/mL)	>2 vs ≤2	20,4	26,6	-6,2	0,599	0,75	0,13; 4,34
	>1,6 vs ≤1,6	41,7	26,5	15,2	0,192	1,57	0,80; 3,08
Análogo GnRH	Agonista vs antagonista	23,7	25,3	-1,6	0,227	0,94	0,80; 1,10
Uso de AHO previo	Si vs No	22,5	27,7	-5,2	<0,001	0,81	0,73; 0,91
Tipo FSH	HMG vs FSHr	18,3	25,2	-6,9	0,143	0,73	0,43; 1,25
Uso actividad LH	si vs no	22,4	28,4	-6,0	<0,001	0,80	0,72; 0,90
Dosis inicial FSH (UI)	≥300 vs <300	17,5	27,6	-10,1	<0,001	0,63	0,54; 0,74
	≥150 vs <150	24,1	29,1	-5	0,004	0,83	0,72; 0,95
Dosis inicial LH (UI)	≤75 vs >75	17,5	27,8	-10,3	<0,001	0,63	0,54; 0,73
Consumo FSH (UI)	≥2500 vs <2500	18,4	28,8	-10,4	<0,001	0,64	0,56; 0,73
	≥2100 vs <2100	21	29,7	-8,7	<0,001	0,71	0,63; 0,79
	≥1500 vs <1500	23,3	31,5	-8,2	<0,001	0,74	0,65; 0,84
Consumo LH (UI)	≥500 vs <500	19,2	30,8	-11,6	<0,001	0,63	0,54; 0,73
	≥750 vs <750	18,0	28,9	-10,9	<0,001	0,63	0,55; 0,71
Día inicio antagonista	>5 vs ≤5	20,8	28,3	-7,5	<0,001	0,73	0,62; 0,87
	>6 vs ≤6	21,8	26,4	-4,6	0,028	0,82	0,68; 1,01
	>8 vs ≤8	14,3	25,5	-11,2	0,034	0,56	0,29; 1,07
Días antagonista	>5 vs ≤5	20,7	25,4	-4,7	0,123	0,82	0,57; 1,13
Días estimulación	>8 vs ≤8	23,3	28,8	-5,5	<0,001	0,81	0,72; 0,91
	>9 vs ≤9	22	27,2	-5,2	<0,001	0,81	0,72; 0,91
Estradiol final (pg/mL)	<500 vs 500	9,4	25,4	-15	<0,001	0,37	0,19; 0,72
Folículos > 10 mm	<9 vs ≥9	20,0	29,0	-9	<0,001	0,69	0,57; 0,84
Folículos > 15 mm	<6 vs ≥6	21,8	29,7	-7,9	<0,001	0,73	0,62; 0,87
Folículos > 17 mm	<5 vs ≥5	22,8	29,2	-6,4	0,002	0,78	0,69; 0,91
Ovocitos totales	<5 vs ≥5	17,2	27,5	-10,3	<0,001	0,62	0,53; 0,73
	>15 vs ≤15	29,4	24,8	4,6	0,080	1,19	0,95; 1,47

	>18 vs ≤18	24,4	25,1	-0,7	0,504	0,97	0,65; 1,44
Ovocitos metafase II	<5 vs ≥5	18,5	28,6	-10,1	<0,001	0,65	0,57; 0,74
	>15 vs ≤15	24,2	25,1	-0,9	0,459	0,96	0,70; 1,33
	>18 vs ≤18	35,3	25,0	10,0	0,237	1,41	0,74; 2,69

* Valor p de la prueba Chi²

CR: Condición de riesgo, CB: Condición Basal

La distribución de frecuencias con respecto al día de **inicio del antagonista** muestra unas cifras de nacido, estables entre el 4º y el 5º día cercanas al 28%. Disminuye hasta un 21% entre el 6º y el 8º día y aproximándose al 14% entre 9º y 10º día. Se dicotomizó por el 5º, 8º y del 6º; este último con sentido clínico, La dicotomización por encima del 5º día tiene el mayor equilibrio entre el mayor riesgo relativo con el intervalo más estrecho (RR: 0,73 IC95%: 0,62; 0,87; p<0,001). En lo que respecta la cantidad de antagonista administrada, no se dio asociación (tabla 11).

La exploración de la asociación del **número de días de estimulación** sobre la variable resultado, deja ver un descenso de la frecuencia de nacido entre el 7º y el 10º día de estimulación, mostrándose irregular por encima del 10º día. Al dicotomizar en 7, 8 y 9 días, se aprecian diferencias significativas, en frecuencia de nacido vivo (-5,2%) en los ciclos con más de 8 días de estimulación (RR: 0,81 IC95%: 0,72; 0,91; p<0,001), resultando también significativas, y con una magnitud similar, a partir del 9º día (tabla 11).

Con el fin de buscar la asociación entre el **estradiol al final del ciclo** y la frecuencia de nacido vivo, se estratifica éste en estratos de 500 pg/mL. La frecuencia de nacido muestra un descenso evidente por debajo de 500 pg/mL. La estratificación en éste valor muestra que en aquellos tratamientos con el estradiol < 500 pg/mL, existe una pérdida de un 15% de frecuencia de nacido vivo (RR: 0,37 IC95% 0,19; 0,72; p<0,001).

A continuación se explora la asociación entre el número de folículos el día de la HCG y la frecuencia de nacido. En lo que respecta al **número de folículos mayores de 10 mm** la distribución de frecuencias muestra como por debajo de 9 folículos existe un descenso evidente en la frecuencia de nacido vivo. La dicotomización mostró diferencias estadísticamente significativas en aquellos tratamientos con menos de 9 folículos (RR: 0,69 IC95% 0,57; 0,84; p<0,001). Con respecto a los **folículos mayores de 15 mm**, la mediana 6 es el valor que presenta una mayor magnitud de asociación, con una diferencia de riesgos de -7,9% en aquellos ciclos con menos de 6 folículos (RR: 0,73 IC95% 0,62; 0,87; p<0,001). El análisis de asociación del **número folículos mayores de 17 mm** muestra el punto de corte en menos de 5 folículos, con una pérdida de

frecuencia de nacido de 6,7%, con respecto a los ciclos con 5 o más (RR: 0,78 IC95% 0,69; 0,91; p=0,002).

Con respecto al **número de ovocitos**, tanto e número de **ovocitos totales**, como el número de **ovocitos metafase II** mostraron asociación con la variable nacido. En ambos casos el punto de corte más apropiado se consideró en cuatro ovocitos (tabla 11).

En ambos casos, se analizó la posible influencia sobre nacido, del número de ovocitos en estratos superiores, 15 y 18 como puntos de corte referenciados e la literatura, no encontrando diferencias estadísticamente significativas (tabla 11).

En la tabla 12 se resume la asociación y magnitud de efecto de las covariables relacionadas con la fecundación y la transferencia embrionaria sobre nacido vivo.

Todos los parámetros seminales analizados no mostraron asociación con la variable resultado (Tabla12).

La frecuencia de nacido vivo en función de **la técnica de fecundación** empleada fue: 25,3% en caso de FIV, 30,3% para la técnica mixta (FIV/ICSI) y 24,6% en caso de ICSI. Los tratamientos con FIV mixta presentaron diferencias significativas pero la magnitud del efecto fue débil ya que el límite del IC se aproxima al valor neutro (tabla 12).

Para explorar la asociación de la **frecuencia de fecundación normal** con Nacido vivo, se ha dicotomizó la variable por la mediana 85,6% y por 80%, con un sentido clínico. En ninguno de los casos se asoció con la variable resultado (tabla 18).

Tabla 12:

Asociación y magnitud de efecto de covariables relacionadas con la fecundación y la transferencia embrionaria sobre nacido vivo

Covariable	Estratos	Nacido (%)		DAR (%)	p*	RR	IC 95 %
		CR	CB				
Origen espermatozoides	Congelado	23,2	25,3	-2,1	0,165	0,92	0,77; 1,09
	TESE	22,6	25,1	-2,5	0,468	0,89	0,45; 1,80
	Donante	26,5	24,9	1,6	0,308	1,06	0,86; 1,31
REM (millones)	REM < 1 mill	23,6	25,1	-1,5	0,284	0,94	0,77; 1,14
Técnica FIV	ICSI vs Resto	24,6	28,9	-4,3	0,048	0,85	0,72; 1,02
	FIV vs Resto	25,3	25,0	0,3	0,521	1,01	0,71; 1,43

	Mixta vs Resto	30,3	24,7	-5,6	0,003	1,23	1,01; 1,50
Fecundación normal (%)	<80 vs ≥80	23,7	26,0	-2,3	0,066	0,91	0,81; 1,03
	<85 vs ≥85	24,9	25,4	-0,5	0,377	0,98	0,88; 1,10
Embriones evolutivos (día +2)	<3 vs ≥3	17,3	29,0	-11,3	<0,001	0,60	0,52; 0,69
	<5 vs ≥5	21,3	31,2	-9,9	<0,001	0,68	0,61; 0,76
	<9 vs ≥9	24	34	-10,0	<0,001	0,71	0,61; 0,83
Embriones evolutivos (día de TE)	<3 vs ≥3	17,5	29	-11,5	<0,001	0,60	0,53; 0,69
	<5 vs ≥5	21,3	31,5	-10,2	<0,001	0,68	0,61; 0,76
Embriones A-B (día de TE)	<1 vs ≥1	12,8	26,7	-13,9	<0,001	0,45	0,37; 0,62
	<2 vs ≥2	17,8	29,2	-11,4	<0,001	0,61	0,53; 0,69
	<3 vs ≥3	20,4	31,9	-11,5	<0,001	0,64	0,57; 0,72
Embriones transferidos	1 vs 2-3	13,7	27,5	-13,8	<0,001	0,48	0,39; 0,60
	3 vs 1-2	24,2	25,2	-1,0	0,316	0,96	0,83; 1,12
	2 vs 3	24,8	24,2	0,6	0,019	1,17	1,01; 1,36
Embriones A-B transferidos	<1 vs ≥1	12,9	26,7	-13,8	<0,001	0,48	0,38; 0,62
Día de la TE	día 2 vs día 3	23,6	28,5	-4,9	0,001	0,83	0,74; 0,93
Dificultad TE	si vs no	10,0	25,5	-15,5	<0,001	0,39	0,22; 0,69
Embriones criopreservados	si vs no	35,6	21,4	14,2	<0,001	1,67	1,49; 1,87

* Valor p de la prueba Chi²

CR: Condición de riesgo, CB: Condición Basal

Con respecto al **número de embriones evolutivos en día 2**, la exploración de la muestra, sugiere que por debajo de 9, 5 (mediana) y 3 embriones la tasa de nacido vivo se reduce. Al dicotomizar por estos valores, en los ciclos con menos de tres embriones la frecuencia de nacido vivo se redujo en 11,3% (RR: 0,71 IC95% 0,61; 0,83; p<0,001) (tabla 12).

Con respecto al **número de embriones evolutivos el día de la transferencia**, aquellos con menos de tres embriones disponibles mostraron un 11,5% menos de frecuencia de nacido vivo (RR: 0,60 IC95% 0,53; 0,69; p<0,001). Al estratificar en 5 embriones, las diferencias riesgo también fueron significativas (tabla 12).

Con respecto a la calidad de los **embriones AB disponibles el día de la transferencia**, existe una pérdida de 13,9% de nacido cuando no disponemos de embriones de calidad

comparado cuando disponemos de al menos 1 (RR: 0,45 IC95% 0,37; 0,62; $p < 0,001$). Como muestra la tabla 12, la diferencia de riesgos cuando comparamos disponer de al menos 1 embrión de calidad con 2 y más y cuando disponemos de 2 embriones de calidad comparado con más de 2, está próxima al 11,4% en ambos casos, diferencias que resultan estadísticamente significativas para ambos contrastes.

La frecuencia de nacido vivo en función del número de **embriones transferidos** fue de 13,3 cuando se transfirió un embrión, 28,4% cuando se transfirieron 2 y 24,2% cuando se transfirieron 3 embriones. La transferencia de 1 embrión, comparado con la de 2 ó 3 embriones muestra una pérdida frecuencia de nacido vivo de 13,8%, diferencia que resultó estadísticamente significativa. Paradójicamente la transferencia de tres embriones no incrementó la frecuencia de nacido cuando se comparó con el resto de las transferencias, ni cuando se comparó con la transferencia de dos embriones (tabla 12).

6.2.2.1. Asociación entre covariables y progesterona

Con el fin de determinar la necesidad de análisis de interacción y confusión, se analiza la asociación de las covariables con la variable de exposición. La tabla 13 resume los resultados de la asociación de las covariables relacionadas con las características basales de las pacientes y antecedentes del proceso de esterilidad con la progesterona final.

La **edad de las paciente** presenta una asociación estadísticamente significativa con la variable explicativa (Rho: -0,12; $p < 0,001$). La progesterona muestra una asociación inversa con la edad. Al estratificar la variable edad en los estratos clínicos habituales (< 35 años, entre 35 y 39 años y > 39 años) se aprecia un descenso de los medianas; 0,73 ng/mL en <35 años, 0,68 ng/mL entre los 35 y los 39 años y 0,59 ng/mL en > de 39 años. Al dicotomizar en 37 años, nos da el punto de corte con la mayor diferencia de riesgos (tabla 13).

Con respecto al **consumo de tabaco**, la progesterona muestra una asociación significativa (Rho: 0,11; $p < 0,001$). En la exploración estratificada del número de cigarrillos se objetiva que a partir de 15 cigarrillos día el consumo de progesterona se incrementa de forma llamativa. Al dicotomizar por 10, 15 y 20 cigarrillos/día, el punto de corte con una mayor diferencia de medias, con un intervalo más estrecho se revela en 20 cigarrillos /día. Existen también asociación entre el hábito tabáquico y la progesterona sérica (0,84 vs 0,75ng/mL; $p = 0,001$) (tabla 13).

Con respecto a las covariables relacionadas con la reserva ovárica basal, el **recuento de folículos antrales (RFA)**, muestra correlación (Rho: 0,083; p=0,001). Al estratificar en estratos clínicos, RFA \leq 8, RFA entre 9 y 19 y RFA > 20, las progesteronas medias, muestran un descenso por debajo de 9 folículos antrales, 0,63, 0,70 y 0,71 ng/mL. Al dicotomizar en 9 folículos las diferencias resultan estadísticamente significativas (0,63 vs 0,70 ng/mL; p<0,001).

La duración de la esterilidad muestra una asociación significativa con la progesterona sérica si bien la magnitud parece escasa (Rho: 0,068; p<0,001). En la estratificación por años de esterilidad, se objetiva un descenso en los niveles medios de progesterona sérica que corresponde al primer año. Al estratificar en el primer año el contraste muestra una diferencia de medias estadísticamente significativa comparado con el grupo de más de 1 año de evolución (0,79 vs 0,71; p<0,001).

La **FSH basal** se analizó dicotomizando por FSH >12 y > 10 UI/L, valores que se consideran clínicamente relevante y que refleja sospecha de baja reserva ovárica. La diferencia de medias fue estadísticamente significativa (0,67 vs 0,78; p=0,012) para FSH >12 UI/L y para FSH >10 UI/L (0,70 vs 0,78 ng/mL; p=0,017), seleccionando el punto de corte en FSH > 12 UI/L, por tener una diferencia mayor de medias con IC más estrecho.

El análisis de la indicación dicotomizando en **baja reserva y edad**, apunta en la dirección de los contrastes de las covariables relacionadas con la baja reserva, es decir en aquellas pacientes con indicación de edad y baja reserva, la progesterona se encuentra reducida (0,64 vs 0,78; p<0,001).

Los **ciclos previos de FIV**, se asocian de forma significativa con la progesterona (Rho: -0,053; p<0,001), en la exploración de la muestra aquellos tratamientos con más de dos ciclos previos, la progesterona tiende al descenso. Sin embargo en el contraste las diferencias de medias que se encuentran no resultan significativas. Al repetir las pruebas de asociación por otros puntos de corte; \geq 1, >1 ciclo o >4, las diferencias encontradas no tampoco alcanzaron significación (tabla 13). En lo que respecta a los **ciclos previos de criotransferencia** no se encuentra asociación (Rho: -0,26; p=0,117).

999Tabla 13:

Asociación y magnitud de efecto de covariables relacionadas con características basales de las pacientes y antecedentes del proceso de esterilidad sobre progesterona final

Covariable	Estratos	progesterona (ng/mL)		Diferencia medias	p*	IC 95 %
		CR	CB			
Edad (años)	>37 vs ≤37	0,67	0,79	-0,12	<0,001	-0,18; -0,07
Fumadora	si vs no	0,84	0,75	0,09	0,001	0,04; 1,39
Nº Cigarros/día	>20 vs ≤20	0,99	0,76	0,24	<0,001	0,14; 0,34
RFA	< 9 vs ≥9	0,63	0,70	-0,07	<0,001	-0,11; -0,03
FSH basal (UI/L)	≥12 vs <12	0,67	0,78	-0,10	0,012	-0,15; -0,06
	>10 vs ≤10	0,70	0,78	-0,07	0,017	-0,13; -0,01
Duración de la esterilidad (años)	>5 vs ≤5	0,79	0,71	0,08	<0,001	0,04; 0,12
Indicación (edad/baja reserva)	si vs no	0,64	0,78	-0,16	<0,001	-0,20; -0,12
Ciclos previos FIV	≥2 vs <2	0,69	0,77	-0,08	0,198	-0,19; 0,04

* Valor p de la prueba T-Student
CR: Condición de riesgo, CB: Condición Basal

La tabla 14 resume los resultados de la asociación entre las covariables relacionadas con la estimulación ovárica y la progesterona.

Existe una correlación entre la **progesterona basal** y la final (Rho: 0,473 p<0,001). El análisis de las frecuencias de nacido vivo en la distribución sugiere una asociación con tendencia lineal. Al dicotomizar la progesterona final en aquellos valores que han demostrado asociación con las variables resultado analizadas (implantación, gestación clínica y nacido vivo) por sus puntos de corte de 1,26, 1,5 y 1,66 ng/mL respectivamente. El area bajo la curva ROC fue 0,75 (IC95%: 0,71; 0,78; p<0,001) en 1,26 ng/mL (implantación), 0,74 (IC95%: 0,69; 0,78; p<0,001) en el caso de 1,5 ng/mL (gestación clínica) y 0,74 (IC95%: 0,69; 0,79; p<0,001) en 1,66 ng/mL (nacido vivo), .

Con respecto a las covariables asociadas con el tipo de tratamiento realizado la tabla 14 muestra los principales resultados de la asociación con progesterona.

Con respecto al **análogo de la GnRH**, el uso de agonista se asoció con una progesterona media significativamente más elevada que los antagonistas. (0,82 vs 0,75; p=0,03). Mientras que la actividad **de actividad LH**, tanto recombinante como urinaria, se asoció con una progesterona media más baja (0,70 vs 0,84; p<0,001).

La **dosis inicial de actividad FSH** se correlacionó con la elevación de la progesterona (Rho: 0,205 $p < 0,001$). Las progesteronas medias de la estratificación en < 150 UI, 150-299 UI y ≥ 300 UI fueron 0,67 ng/mL, 0,71 ng/mL y 0,82 ng/mL, respectivamente. La dicotomización en 300 UI muestra una diferencia de medias de 0,11 mg/mL, en las pacientes tratadas con 300 o más UI de FSH. Dicha diferencia resultó estadísticamente significativa (0,82 vs 0,71 ng/mL; $p < 0,001$).

El **consumo total de FSH** también se asoció con la progesterona final (Rho: 0,24 $p < 0,001$). La estratificación efectuada señala el posible punto de corte en 1500UI. La dicotomización y el posterior contraste muestra una diferencia de medias de 0,21 mg/mL, a favor del grupo con más de 1500 UI FSH consumidas (0,81 vs 0,60 ng/mL; $p < 0,001$).

Para el análisis de asociación **con el consumo de LH**, la exploración mostró que a partir de 2000 UI de LH consumidas, se incrementaban las progesteronas medias. La dicotomización en este punto encontró diferencias significativas (0,97 vs 0,74; $p = 0,029$).

La **duración de la estimulación** se asoció de forma significativa con la progesterona final (Rho: 0,146 $p < 0,001$). En la exploración de la distribución, aquellos ciclos con más 8 días de estimulación mostraron progesteronas medias significativamente más elevadas (0,81 vs 0,67 ng/mL; $p < 0,001$). El día de inicio del antagonista no se asoció con la elevación de la progesterona, pero si el número de días que se administró el antagonista (Rho: 0,198; $p < 0,001$). En la exploración de la distribución se objetiva un incremento de la progesterona hasta el día 3º de administración, permaneciendo posteriormente con niveles estables. La dicotomización por este valor muestra diferencias estadísticamente significativas (0,78 vs 0,67 ng/mL; $p < 0,001$).

El **estradiol final** también se asocia con la progesterona el día de la HCG, existe una correlación entre ambas variable (Rho: 0,435; $p < 0,001$). En la exploración de la muestra la tendencia sugiere una relación lineal. La dicotomización por la mediana, encuentra diferencias estadísticamente significativas (0,92 vs 0,62 ng/mL; $p < 0,001$).

Tabla 14:

Asociación y magnitud de efecto de covariables relacionadas con la estimulación ovárica sobre progesterona

Covariable	Estratos	progesterona (ng/mL)		Diferencia medias	p*	IC 95 %
		CR	CB			
Análogo GnRH	agonista vs antagonista	0,82	0,75	0,07	0,030	0,01; 0,12

Uso actividad LH	si vs no	0,70	0,84	-0,14	<0,001	-0,18; -0,09
Dosis inicial FSH (UI)	≥300 vs <300	0,82	0,71	0,11	<0,001	0,07; 0,15
Consumo FSH (UI)	≥1500 vs <1500	0,81	0,60	0,21	<0,001	0,16; 0,26
Consumo LH (UI)	≥2000 vs <2000	0,97	0,74	0,23	0,029	0,02; 0,43
Días antagonista	≥4 vs <4	0,83	0,67	0,16	<0,001	0,11; 0,21
Días estimulación	< 9 vs ≥9	0,81	0,67	0,14	<0,001	0,10; 0,18
Estradiol final (pg/mL)	≥1624 vs <1624	0,92	0,62	0,30	<0,001	0,25; 0,34
Folículos > 10 mm	≥9 vs <9	0,79	0,68	0,11	<0,001	0,06; 0,17
Folículos > 15 mm	≥7 vs <7	0,77	0,66	0,11	<0,001	0,06; 0,15
Folículos > 17 mm	≥4 vs <4	0,78	0,67	0,11	<0,001	0,07; 0,14
Ovocitos totales	<5 vs ≥5	0,59	0,82	-0,24	<0,001	-0,27; -0,20
	≥18 vs <18	1,06	0,76	0,30	<0,001	0,18; 0,42
Ovocitos metafase II	<7 vs ≥7	0,61	0,91	-0,22	<0,001	-0,27; -0,18
	≥13 vs <13	0,98	0,76	0,22	<0,001	0,13; 0,31

* Valor p de la prueba T-Student
CR: Condición de riesgo, CB: Condición Basal

Con respecto al número de folículos, se asociaron con la progesterona final los **folículos mayores de 10 mm** (Rho: 0,302 p<0,001), el número de **El número de folículos mayores de 15 mm** (Rho: 0,292 p<0,001) y el **número de folículos mayores de 17 mm**. (Rho: 0,292 p<0,001). La exploración de la distribución de frecuencias, en todos los tamaños foliculares, muestra una tendencia lineal al aumento de progesterona con el incremento de los folículos. En base a que no hay un punto de corte claro en la distribución, se han seleccionado los diferentes puntos de corte dicotomizando por la mediana (≥ 9 folículos mayores de 10 mm, ≥7 folículos mayores de 15 mm, ≥ 5 folículos mayores de 17 mm), siendo las diferencias estadísticamente significativas en las tres variables analizadas (tabla 14).

Existe una asociación entre el **número de ovocitos** y la progesterona final (Rho: 0,32; p<0,001). Las progesteronas medias finales en función de la estratificación por respuesta ovárica (baja respuesta < 5 ovocitos, normo respuesta entre 6 y 17 ovocitos y alta respuesta ≥ 18 ovocitos obtenidos) fueron de 0,62 ng/mL para las pacientes con baja respuesta, 0,83 ng/mL para normorespuesta y 1,07 ng/mL para las pacientes con respuesta elevada. La dicotomización en función de la respuesta ovárica revela diferencias estadísticamente significativas, tanto cuando se dicotomiza por baja

respuesta (0,59 vs 0,82 ng/mL; $p < 0,001$), como en alta respuesta (1,06 vs 0,76 ng/mL; $p < 0,001$).

El **número de ovocitos maduros** también muestra correlación con la progesterona sérica final (Rho: 0,30; $p < 0,001$). En la exploración existe un descenso de la caída media de la progesterona por debajo de 7 ovocitos, con un incremento de la misma por encima de 13 ovocitos metafase II. El contraste, dicotomizando por los puntos de corte mencionados fue significativo en ambos casos (tabla 14).

Por último en la tabla 15, se muestra el resumen de los resultados del análisis de asociación entre las covariables relacionadas con la fecundación y la transferencia embrionaria sobre la variable explicativa.

Con respecto a la **técnica de fecundación**, los tratamientos en los que se aplicó ICSI como técnica de fecundación tuvieron progesteronas medias más bajas comparadas con el grupo donde se utilizó tanto la técnica mixta de fecundación como FIV (0,75 vs. 0,93 ng/mL; $p < 0,001$).

La **frecuencia de fecundación** mostró una correlación inversa con la progesterona final (Rho: -0,11; $p < 0,001$) Al dicotomizar por la mediana 85% y por lo que se considera el umbral de una fecundación normal (80%), el análisis nos da diferencias estadísticamente significativas con progesteronas más elevadas en los grupos con menos probabilidad de fecundación, siendo la mediana, 85%, el valor con mayor diferencia de medias y con un intervalo de confianza más estrecho (tabla 15).

Los **embriones divididos** se asociaron con la progesterona sérica (Rho: 0,25; $p < 0,001$). La media de progesterona sérica se incrementa a medida que aumentan el número de embriones, con descenso de la media de ésta en los estratos con mayor número de embriones. Al dicotomizar por la mediana ($>$ de 4 embriones divididos en día 2) y $>$ 15 embriones evolutivos, solamente cuando se dicotomiza por la media se objetivan diferencias significativas. Los **embriones evolutivos el día de la transferencia**, mostraron una asociación similar con la progesterona (Rho: 0,25; $p < 0,001$), la dicotomización por la mediana mostró también diferencias significativas.

En lo que respecta a los embriones de calidad A-B el día de la transferencia, disponer o no embriones de calidad no mostró significación, pero si el número de embriones AB disponibles. Dicotomizando por la mediana (más de 3 embriones AB disponibles) las diferencias de medias mostraron diferencias significativas (tabla 15).

El número de **embriones transferidos** mostró asociación con la progesterona. En aquellos ciclos en los que se transfirió 1 embrión, la diferencia de las medias fue mayor, comparado, cuando se transfirieron tres o dos embriones (tabla 15).

Tabla 15:

Asociación y magnitud de efecto de covariables relacionadas con la fecundación y la transferencia embrionaria sobre progesterona

Covariable	Estratos	progesterona (ng/mL)		Diferencia medias	p*	IC 95 %
		C.R	C.B			
Técnica FIV	ICSI vs Resto	0,75	0,93	-0,17	<0,001	0,72; 1,02
Fecundación normal (%)	<85 vs ≥85	0,81	0,72	0,09	<0,001	0,05; 0,14
	<80 vs ≥80	0,79	0,75	0,05	0,031	0,01; 0,09
Embriones evolutivos (día +2)	<5 vs ≥5	0,74	0,87	-0,17	<0,001	-0,22; -0,13
	>15 vs ≤15	0,88	0,77	0,11	0,47	-0,18; 0,40
Embriones evolutivos (día de TE)	<4 vs ≥4	0,68	0,85	-0,18	<0,001	-0,22; -0,13
Embriones A-B (día de TE)	<4 vs ≥4	0,68	0,86	-0,18	<0,001	-0,22; -0,13
	<1 vs ≥1	0,74	0,77	-0,03	0,320	-0,10; 0,03
	≥12 vs <12	0,94	0,77	0,18	0,166	-0,07; 0,43
Embriones transferidos	1 vs 2-3	0,62	0,80	-0,18	<0,001	-0,24; -0,12
	3 vs 1-2	0,85	0,75	-0,10	<0,001	0,05; 0,16
	2 vs 3	0,78	0,74	0,04	0,05	0,00; 0,009
Embriones A-B transferidos	<1 vs ≥1	0,76	0,77	-0,01	0,695	-0,08; 0,05
Día de la TE	+2 vs +3	0,74	0,84	-0,11	<0,001	-0,15; 0,06
Dificultad TE	si vs no	0,83	0,76	0,07	0,277	-0,05; 0,19
Embriones criopreservados	no vs si	0,74	0,84	-0,10	<0,001	-0,14; -0,05

* Valor p de la prueba T-Student

CR: Condición de riesgo, CB: Condición Basal

El número de **embriones transferidos** mostró asociación con la progesterona sérica (Rho: 0,18; p<0,001). En aquellos ciclos en los que se transfirió 1 embrión, la diferencia de las medias fue mayor, comparado, cuando se transfirieron dos o tres embriones (tabla 15). En lo que respecta a calidad embrionaria, no transferir embriones de calidad AB vs transferir al menos 1, no se asoció a efecto sobre la progesterona. De la misma manera la **dificultad de la transferencia**. Por el contrario **transferir en día 3** (0,84 vs 0,76

ng/mL; $p < 0,001$) como la **congelación embrionaria** (0,84 vs 0,74 ng/mL; $p < 0,001$) se asociaron con progesteronas significativamente más elevadas.

6.3. ANÁLISIS UNIVARIADO ENTRE PROGESTERONA SÉRICA FINAL Y NACIDO VIVO.

Tabla 16:
Análisis Univariado del efecto de la elevación de la progesterona sobre la frecuencia de nacido vivo

Covariable	progesterona (ng/mL)		Diferencia Medias/ Diferencia Proporciones	p*	IC 95 %
	>1,66 (n=112)	≤1,66 (n=3629)			
Edad (años)	35,1	35,9	-8,5	0,023	-1,6; 0,1
IMC (kg/m ²)	22,7	22,6	0,1	0,727	-0,6; 0,8
Fumadora (%)	28,6	21,3	7,3	0,046	1,0; 1,8
Nº Cigarros/día	11,9	10,4	1,6	0,329	-1,6; 4,7
RFA	11,1	10,8	0,3	0,730	-1,5; 2,1
FSH basal (UI/L)	7,4	7,7	-0,3	0,314	-0,9; 0,2
Esterilidad Primaria (%)	87,5	82,3	5,2	0,096	1,0; 1,14
Duración de la esterilidad (años)	2,6	2,4	0,2	0,207	-0,2; 0,5
Indicación (edad/baja reserva) (%)	10,7	19,0	-8,3	0,014	0,33; 0,97
Ciclos previos FIV	1,2	1,1	-0,07	0,538	-0,3; 0,2
Ciclos previos CT	0,26	0,21	0,05	0,545	-0,08; 0,172
Progesterona Basal (ng/mL)	0,853	0,466	0,387	0,036	0,03; 0,748
Agonista GnRH (%)	16,1	15	1,1	0,420	0,70; 1,65
Uso de AHO previo (%)	55,4	49,8	5,6	0,142	0,94; 1,34
Tipo FSH	97,3	98	-0,7	0,400	0,96; 1,02
Uso actividad LH	42,0	52,7	-10,7	0,016	0,64; 0,99
Dosis inicial FSH (UI)	303,3	275,8	27,5	0,003	9,3; 45,7
Dosis inicial LH (UI)	79,7	77,6	2,1	0,731	-9,9; 14,1
Consumo FSH (UI)	2736,4	2323,4	412,9	<0,001	210,9; 615,0
Consumo LH (UI)	919,4	884,3	35,1	0,631	-110,0; 80,2
Día inicio antagonista	5,6	5,7	-0,1	0,463	-0,4; 0,2
Días antagonista	4,3	3,6	0,7	<0,001	0,5; 0,9
Días estimulación	9,0	8,4	0,6	0,001	0,24; 0,90
Estradiol final (pg/mL)	2793,5	1820,8	972,6	<0,001	709,6; 1235,8
Folículos > 10 mm	11,2	9,2	2,0	<0,001	1,1; 2,8
Folículos > 15 mm	8,6	6,6	2,0	<0,001	1,4; 2,7
Folículos > 17 mm	6,0	4,5	1,5	<0,001	1,0; 2,1
Ovocitos totales	9,9	7,0	2,9	<0,001	1,9; 3,9
Ovocitos metafase II	7,8	5,6	2,4	<0,001	1,7; 3,1
REM (<1 millon) (%)	12,7	10,5	2,5	0,279	0,72; 2,0
Técnica FIV (ICSI) (%)	83,0	90,6	-7,6	0,010	0,84; 1,00
Fecundación normal (%)	75,3	80,6	-5,4	0,010	-9,4; -13,0
Embriones evolutivos (día +2)	5,6	4,3	1,3	<0,001	0,64; 1,93

Embriones evolutivos (día de TE)	5,8	4,2	1,6	<0,001	0,9; 2,3
Embriones A-B (día de TE)	3,8	2,7	1,1	0,001	0,5; 1,7
Embriones transferidos	2,1	2,0	0,1	0,004	0,05; 0,28
Embriones A-B transferidos	1,7	1,6	0,1	0,024	0,02; 0,29
Día de la TE (Día 2) (%)	67,9	70,1	-2,2	0,338	0,85; 1,10
Dificultad TE	9,8	2,8	7	<0,001	1,95; 6,39
Embriones criopreservados	33	25,8	7,2	0,057	0,97; 1,68
NACIDO VIVO	12,1	25,4	-13,3	0,001	0,45; 0,80

*Valor p T-Student o prueba Chi²

La selección del punto de corte de progesterona en 1,65 se mostró como el más relevante debido a presentar el mayor RR, sin incrementos relevantes en la amplitud del intervalo (RR: 0,46 IC95%: 0,27; 0,78; p=0,001). La figura 38, muestra el análisis exploratorio de los RR, de los otros puntos de corte analizados.

La valoración de asociación de efecto de las covariables con la variable de exposición estratificada, en 1,66 ng/mL nos va a va a permitir seleccionar a aquellas que por tener una asociación significativa con la progesterona puedan estar generando una interacción o confusión sobre nacido vivo (tabla 16).

6.4. ANÁLISIS BIVARIADO ENTRE PROGESTERONA SÉRICA FINAL Y NACIDO VIVO.

El análisis bivariado de las covariables que tenían asociación con la variable resultado no mostró interacción ni confusión con la progesterona (tabla 17).

Tabla 17:
Análisis bivariado del efecto de la progesterona sobre la probabilidad de nacido vivo según covariables asociadas

Variable	Estratos	RR crudo (IC 95 %)	p*	RR ajustado (IC 95 %)
Edad (años)	<37 vs ≥37	0,48	0,13	0,44
Indicación: edad-baja reserva (%)	si vs no	0,42	0,13	0,39
Uso de actividad LH	si vs no	0,42	0,48	0,40
Dosis inicial FSH	≥300 vs <300	0,42	0,41	0,42
Consumo FSH	≥2500 vs <2500	0,42	0,97	0,40
Días antagonista GnRH**	>5 vs ≤5		0,27	
Estradiol final **	<500 vs ≥500		0,83	
Folículos > 10 mm	<9 vs ≥9	0,42	0,27	0,42
Folículos > 15 mm **	<6 vs ≥6		0,06	
Folículos > 17 mm	<5 vs ≥5	0,42	0,17	0,42

Ovocitos totales	<5 vs ≥5	0,42	0,51	0,42
	>18 vs ≤ 18	0,42	0,98	0,42
Ovocitos MII	<5 vs ≥5	0,42	0,98	0,42
Técnica FIV (ICSI vs resto)	si vs no	0,41	0,23	0,42
Fecundación normal (%)	<80 vs ≥80	0,42	0,08	0,47
Embriones evolutivos día 2	<3 vs ≥3	0,41	0,25	0,38
Embriones evolutivos TE	<3 vs ≥3	0,41	0,30	0,38
Embriones A-B en día de TE**	<1 vs ≥1		0,58	
Embriones transferidos**	1vs 2-3		0,48	
Embriones A-B transferidos**	<1 vs ≥1		0,52	
TE difícil**	si vs no		0,43	
Criopreservación embrionaria	si vs no	0,41	0,27	0,37

* Valor p de la prueba estadística de interacción.

**No calculable por la existencia de frecuencias de 0 en las tablas de contingencia estratificadas.

6.5. ANÁLISIS MULTIVARIADO ENTRE PROGESTERONA SÉRICA FINAL Y NACIDO VIVO.

Mediante una regresión logística binaria, se han realizado sucesivos modelos multivariados con finalidad explicativa.

Tabla 18:
Análisis multivariado del efecto de la progesterona sobre la probabilidad de gestación según covariables asociadas

	-2LL	B	p	Exp B (OR)	IC 95%	CIA
Modelo con la variable explicativa principal						
<i>Progesterona</i>	4060	-0,9	0,002	0,4	0,22; 0,62	4058
Modelos con covariables asociadas						
<i>Progesterona, Edad, RFA, FSH(inicio), LH(consumo), Baja Resp, Alta Resp, embriones(d+2), Embriones transfer, Embriones AB-transfer, Transferidos, Día-transferencia, Congelación</i>	1072	1	0,094	0,27	0,06; 1,25	-1046
<i>Progesterona, Edad, FSH(inicio), LH(consumo), Ovocitos, embriones(d+2), Embriones AB-transfer, Transferidos, Día-transferencia, Congelación</i>	2586	1	0,007	0,37	0,18; 0,77	-2576
<i>Progesterona, Edad, FSH(inicio), embriones(d+2), Embriones AB-transfer, Transferidos, Día-transferencia, Congelación</i>	3808	1	<0,001	0,34	0,19; 0,61	-3790

El mejor modelo explicativo con un número menor de (-2LL) es el que incorpora las variables, edad, dosis de inicio de FSH, embriones de calidad transferidos, día de la transferencia y congelación embrionaria (tabla 19).

Tabla 19:
Covariables asociadas al modelo explicativo

	B	gl	p	Exp B (OR)	IC95%	
					Inferior	Superior
Progesterona	-1,085	1	<0,001	0,338	0,187	0,612
Edad	-0,782	1	<0,001	0,457	0,381	0,549
FSH inicial	-0,371	1	<0,001	0,690	0,589	0,809
Transferencia	-0,614	1	<0,001	0,541	0,419	0,700
Transferencia AB	-0,699	1	<0,001	0,497	0,368	0,672
Congelación	-0,384	1	<0,001	0,681	0,572	0,810
Constante	8,087	1	<0,001	3250,93		

5. DISCUSIÓN

El presente estudio constituye una aproximación analítica, a través de un diseño longitudinal de cohortes, a la evaluación de la asociación causal entre la exposición endometrial a niveles elevados de progesterona sérica durante la estimulación ovárica del desarrollo folicular múltiple para FIV-TE y la efectividad de este tratamiento.

El resultado más relevante del mismo es que la elevación de progesterona sérica determina un descenso significativo, y de magnitud notable, en la probabilidad de nacido vivo. Dicha asociación causal se mantiene al realizar un ajuste por covariables con capacidad para determinar el pronóstico, es decir, es independiente del efecto de las mismas. Nuestro estudio ha realizado, como se argumentará más adelante, una evaluación exhaustiva del posible efecto confusor o modificador de un número elevado de variables relacionadas con las características basales de la paciente, las de la estimulación ovárica, y las del rendimiento del proceso terapéutico.

En segundo lugar, los resultados del estudio ponen de manifiesto que la asociación de la progesterona sérica en el día de la administración de HCG y el resultado gestacional, no sigue un patrón lineal de proporcionalidad dosis-respuesta. Nuestras observaciones, en la línea de las de otros estudios primarios similares (Bosch 2011; Venetis 2015) sugieren un efecto dicotómico, que supone que la frecuencia de gestación se mantiene sustancialmente estable en la mayor parte de la distribución de valores de progesterona sérica final, para decaer tan sólo a partir de valores extremos. La repercusión más clara de este hecho es que la frecuencia de elevaciones críticas de progesterona, entendiendo por tales las que tienen repercusión sobre la frecuencia de implantación, gestación y nacido vivo, es baja, y en consecuencia, el número de ciclos afectado por los efectos adversos de la EPP parece escaso.

El interés por estimar un umbral de progesterona capaz de producir disregulación de la ventana endometrial de implantación ha generado numerosas publicaciones, que han descrito valores críticos comprendidos en un rango relativamente amplio (Venetis 2013), y cuya magnitud e interpretación siendo objeto de controversia. Es indudable que el uso de puntos de corte en las distribuciones de la concentración de progesterona sérica

resulta útil para generar reglas de orientación de la conducta clínica, y en concreto para optar entre la transferencia de los embriones en el ciclo de estimulación o su criopreservación y transferencia diferida. La mencionada morfología bifásica de la distribución de frecuencias de gestación por estrato de progesterona parece ideal para la selección de un punto de corte asociado al incremento de efecto de la progesterona, y con éste, al descenso de los indicadores de la efectividad de la FIV-TE.

Nuestro estudio ha identificado niveles umbral de progesterona sérica específicos –y distintos– para cada una de las variables de resultado (implantación, gestación clínica y nacido vivo), que en todos los casos son distales al percentil 90 de cada una de las distribuciones de valores de progesterona, y que, en el caso de la variable principal de resultado, proporciona un rendimiento explicativo y predictivo adecuado. Aun asumiendo que el enfoque dicotómico tiene evidentes ventajas para el análisis de asociación, para la estimación de la magnitud del efecto de la EPP, y, en especial, para su manejo en la práctica clínica, la identificación de dichos umbrales representa, en el presente estudio, una elección razonada entre las diversas opciones con respaldo estadístico. Como se ha descrito en el análisis de asociación, la reducción del rendimiento terapéutico a partir de umbral de progesterona es en realidad, para la mayor parte de las variables de resultado, un acusado descenso de la efectividad observado entre valores muy próximos de progesterona sérica. Es decir, el efecto de la EPP podría resultar mejor estimado a través de un rango estrecho de niveles de progesterona que por medio de un único valor crítico.

Otro aspecto de interés derivado del presente análisis, y que será objeto de discusión, es el peso de las covariables relacionadas con la respuesta ovárica y con el rendimiento de la misma, en términos de ovocitos, embriones y embriones de calidad obtenidos como potenciales confusores o modificadores de efecto. En concreto, varios estudios han sugerido que el efecto nocivo de la EPP sobre la receptividad endometrial y sobre el resultado del ciclo podría verse compensado, en el subgrupo de pacientes con mejor pronóstico gestacional –hiperrespondedoras, pacientes jóvenes con embriones de alta calidad–, por el efecto favorable de la abundancia de ovocitos, embriones y embriones de buena calidad (Griesinger). Nuestros resultados, como los de otros autores, indican que el efecto de la progesterona no reconoce interacciones con estas variables, y se registra en todos los estratos de pronóstico con una magnitud similar.

Nuestro estudio ha aspirado a un control de fuentes potenciales de sesgo que supera, en nuestro conocimiento, a la mayoría de los estudios publicados al respecto. El carácter retrospectivo del estudio no permite excluir la posibilidad de la actuación de covariables no identificadas o de interacciones complejas sobre la relación entre progesterona y

nacido vivo, aunque el estudio ha pretendido considerar en el inicio del análisis una amplia mayoría de las características basales, de parámetros relacionados con la estimulación ovárica y de indicadores de efectividad de laboratorio susceptibles de implicación en la relación causal que se evalúa. Además, las covariables incluidas en el análisis multivariado no han sido seleccionadas tan sólo por su asociación con concentración final de progesterona y con a la obtención de nacido vivo, sino que se han sometido a un proceso de análisis bivariado con el fin de identificar rigurosamente todas las susceptibles de generar interacción y confusión, y asegurar su inclusión en los modelos de análisis multivariado. Como ha señalado Venetis, la aproximación al estudio de asociación independiente de la EPP por medio de análisis bi y multivariado reduce el riesgo de interpretación errónea de los resultados.

Con respecto a los factores de riesgo y protectores para la EPP, dos de las variables más estudiadas son adición de LH, que se ha invocado como un factor protector, así como el número de ovocitos obtenidos, que presenta relación directa con la EPP. Las observaciones de la presente cohorte se orientan en este mismo sentido. En este sentido, hemos analizado adicionalmente la progesterona basal determinada en el día de inicio de la estimulación, y antes de la administración de la primera dosis de actividad FSH. Los niveles de progesterona basal han presentado una fuerte correlación con la progesterona en el día de la HCG, y han mostrado además capacidad predictiva sobre la EPP por encima del nivel escogido como dicotomización para nacido vivo.

Características basales y de la estimulación ovárica

Las pacientes de la cohorte presentaron una distribución etaria comparable a la de la población general de FIV, con una edad media cercana a 35 años; además, un 25% de las mismas presentaba edades superiores a 39 años, y cerca de un 20% de los ciclos se realizaron en pacientes de 40 o más años. Este dato es concordante con los resultados relacionados con los estimadores de reserva ovárica, cuyos valores promedio son también cercanos a los descritos para la población general (10 folículos antrales; 7,7 UI/L de FSH basal). El resto de las características relacionadas con la evolución del proceso, como duración de la esterilidad, carácter primario o secundario, frecuencia factores causales, y antecedentes de tratamientos previos, son las habituales en los estudios comparables al presente (Bosch, Venetis 2013, Venetis 2015), y reflejan el perfil habitual de la paciente tratada mediante FIV en condiciones de práctica clínica habitual.

La progesterona basal, medida antes del inicio de la estimulación, resultó inferior a 0,5 ng/mL en casi dos terceras partes de las pacientes. Sin embargo, en un 7% de los ciclos, la estimulación se inició a pesar de la detección de valores basales superiores a 1,5

ng/mL. Esta práctica se concentra en las estimulaciones menos recientes de la cohorte, en periodos en los que el estado del conocimiento acerca de la relevancia de la EPP no estaba consolidada.

En relación con el perfil farmacológico de las estimulaciones, la cohorte analizada se caracteriza por un claro predominio de los ciclos en los que se aplicó el protocolo de antagonistas GnRH de inicio flexible, hecho que también reafirma la comparabilidad de los tratamientos incluidos en la cohorte con el uso clínico actual, y va en favor de su validez externa. Con respecto al origen de la actividad FSH, la práctica totalidad de los ciclos recibió estimulación con FSHr, combinada con LHr en más del 70% de los mismos. El uso de HMG y FSHu resultó excepcional, lo que ha limitado la potencia de los análisis de asociación entre tipo de actividad FSH y elevación de progesterona.

La dosis de actividad FSH más habitualmente utilizada durante la estimulación estuvo comprendida entre 150 y 240 UI/L, aunque las pacientes tratadas con dosis de 300 UI/día o superiores representaron la mitad de las incluidas en la cohorte. Este hecho puede resultar coherente con el perfil etario de la cohorte analizada, así como con la distribución del recuento basal de folículos antrales observada. La aplicación de dosis superiores a las dosis-techo actuales se ha de interpretar considerando la duración del periodo de acumulación de observaciones, y que los ciclos de estimulación más antiguos que han sido objeto de observación datan de hace doce años. El consumo global de FSH se distribuyó en torno a una media de 2335 UI/L, y en un 25% de los ciclos, el consumo superó las 3000 UI, es decir, fue el propio de las necesidades de actividad gonadotrópica de pacientes con baja respuesta a la estimulación.

La actividad LH procedió de LHr en cerca del 75% de las pacientes, y de HMG en el 25% restante de los ciclos con adición de esta actividad. La administración de dosis acumuladas elevadas de LH, que superaron las 1200 UI en el 25% de los ciclos, está también en relación con la administración de dosis altas de LH en pacientes con baja reserva ovárica estimada y edad avanzada.

El rendimiento final de los ciclos de la cohorte resulta comparable al de la población general tratada con FIV y con las mismas características etarias: se obtuvieron promedios de 7 ovocitos, 5 ovocitos en metafase II, 4 embriones evolutivos y tres embriones de calidad A-B. La frecuencia de preservación embrionaria resultó sin embargo inferior a la habitual (26,2% de los ciclos), considerando el número medio de embriones de calidad A-B.

La progesterona sérica final observada presentó una distribución cercana a la típica de normalidad, y su incremento global casi duplicó los valores basales observados. Este incremento relativo es ligeramente superior al descrito por estudios análogos (Venetis 2015). Más del 98% de los valores de progesterona final estuvieron comprendidos entre 0,1 y 2 ng/mL, lo que concuerda con observaciones previas que han descrito un patrón de dispersión similar (63).

La transferencia embrionaria estándar en las pacientes de la cohorte fue la de dos embriones, que se efectuó en cerca de las dos terceras partes de las pacientes. La transferencia de embriones A y/o B fue posible en el 87,8% de los ciclos, que constituye una frecuencia notablemente mayor que la descrita por otros estudios (24)

Resultados gestacionales globales

La frecuencia de implantación embrionaria global observada fue 21,3%, que está en relación con la frecuencia de transferencia de tres embriones (17,9% de los ciclos). Las frecuencias de gestación clínica intrauterina y de nacido vivo por transferencia del 33,7% y del 24,2% respectivamente. El porcentaje de gestaciones de evolución desconocida fue del 8,7%, que supera ligeramente el máximo deseable para la variable de resultado de un estudio analítico longitudinal retrospectivo (5%).

Análisis de asociación entre progesterona e implantación embrionaria

La concentración sérica final de progesterona se ha asociado de forma significativa a la probabilidad de implantación embrionaria a partir de niveles de 1 ng/mL, generando una reducción de la probabilidad de gestación que se ha incrementado desde una diferencia de riesgos comprendida entre -2,8% y -15%. A partir de niveles de 1,26 ng/mL de progesterona sérica, la diferencia en frecuencia de gestación entre pacientes expuestas y no expuestas a EPP asciende a -6,0%, manteniéndose los límites del intervalo de confianza alejados del valor neutro (IC 95%: -9,3; -2,7). Nuestro análisis coincide con estudios similares, como el de Li aunque este autor describe una mayor reducción significativa de la frecuencia de implantación embrionaria del 11 % a partir de niveles de progesterona sérica final de 2,5 ng/mL (21,9% vs 32,9%; $p < 0,001$) (108). El estudio de Najak, uno de los de más reciente publicación, también ha hallado una reducción de la frecuencia de implantación asociada a incremento de la progesterona, aunque la determinación de progesterona considerada fue la del día de la extracción de ovocitos, y, por otra parte, el concepto de frecuencia de implantación que estos autores evalúan es la proporción de ciclos con prueba analítica de gestación positiva en el día 14^o postransferencia, y no el cociente entre los sacos gestacionales intrauterinos y el número de embriones transferidos (77). Aunque nuestro estudio no ha abordado el análisis de

causalidad de la EPP por tratarse de una variable de resultado secundaria, otros estudios observacionales han concluido la asociación causal entre EPP y disminución del porcentaje de embriones implantados (115, 120, 122).

Análisis de asociación entre progesterona y gestación clínica

Los hallazgos sobre el patrón de asociación entre EPP y frecuencia de gestación clínica son análogos a los descritos para la frecuencia de implantación; se ha observado una asociación sin tendencia lineal, y un descenso abrupto de la frecuencia de gestación a partir de valores muy distales de la distribución, como el percentil 90, o 2 múltiplos de la mediana. Según nuestros datos, la diferencia en frecuencia de gestación alcanza el 10% (RR: 0,68; IC 95%: 0,54; 0,85) a partir del percentil 93 de la distribución. Los datos sugieren también un incremento progresivo de la diferencia de proporciones de gestación clínica desde dicho valor, que corresponde a 1,35 ng/mL, hasta valores superiores a 2,1 ng/mL. El metaanálisis de Venetis concluye el efecto de la EPP obedece muy probablemente a un modelo no lineal, según el cual, el efecto adverso de la EPP sobre la frecuencia de gestación sería perceptible a partir de valores de progesterona bajos (del orden de 0,8-1,1 ng/mL) aunque se haría más intenso a partir de concentraciones de 1,21,3 ng/mL. La evolución decreciente de los RR de gestación a partir de niveles de 1,31 ng/mL observada en nuestra cohorte es coherente con las observaciones previas (Venetis 2013).

Análisis de asociación entre progesterona y gestación clínica

La asociación entre la progesterona y la frecuencia de nacido vivo sólo puede ponerse de manifiesto, al igual que en el caso de las variables secundarias de resultado, cuando se aplican procedimientos que no parten de una asunción de linealidad. La relación cuantitativa entre la EPP y la pérdida de efectividad de la FIV en términos de nacido vivo obedece una vez más a un modelo dicotómico, en el que sólo cabe identificar un efecto relevante y estadísticamente significativo ante valores distales al percentil 90 (Shufaro 2015). En nuestro estudio, el valor umbral de progesterona que presentó mejor equilibrio entre la magnitud del RR y la amplitud su IC 95% fue 1,65 ng/mL, aunque a partir de valores de 1,26 (percentil 90) el efecto resulta apreciable y significativo. Venetis propone el uso de un punto de corte de 1,5 ng/mL para la estratificación de la progesterona para su análisis de asociación con gestación y nacido vivo, aunque esta decisión se fundamenta en el predominio de este valor en la literatura, y no en un criterio de análisis específico realizado sobre la distribución de sus datos. Las frecuencias de nacido vivo por intervalos de concentración de progesterona observadas en nuestro estudio generaron RRs de gestación de entre 1,26 y 1,5, que se redujeron a RRs menores de

0,5 a partir de niveles de progesterona de 1,65 ng/mL (percentil 97), sin aumento de la amplitud de los intervalos de confianza. La comparación adecuada del punto de corte más eficiente para la estimación del efecto de la EPP sobre la frecuencia de nacido vivo debería contrastar las diferencias entre valores estandarizados (percentiles, múltiplos de la mediana), y no entre valores crudos, mucho más susceptibles de ser afectados por fuentes de heterogeneidad. Por desgracia, la mayoría de los estudios que han analizado el efecto de la EPP sobre la probabilidad de nacido vivo no aportan el equivalente estandarizado de los valores de corte propuestos.

Análisis de asociación entre progesterona y aborto/gestación bioquímica

La progesterona sérica final no se asoció a la frecuencia de aborto, de forma similar a los resultados obtenidos por otros autores en estudios de cohorte de menor tamaño muestral (Martínez 2004). Nuestro análisis ha añadido la técnica de análisis por intervalos a la estimación del área bajo la curva ROC, sin que se haya obtenido indicio de asociación.

Por el contrario, la detención precoz de la gestación (antes de su visualización ecográfica), denominada habitualmente gestación bioquímica, mostró una asociación significativa aunque de magnitud discreta con la EPP. La curva ROC delimitó un área de 0,56 (IC 95%: 0,51; 0,60; $p=0,009$), es decir, una capacidad predictiva de detención precoz de la gestación muy limitada. No hemos hallado estimaciones directas de la asociación entre progesterona e interrupción de la gestación en fase preclínica

Asociación entre covariables y nacido vivo

La frecuencia de nacido vivo se relaciona, según nuestros datos, con variables asociadas al pronóstico de efectividad de la FIV-TE: edad favorable (menor de 35, de 37 y de 39 años, recuento basal de folículos antrales no escaso (mayor de 9 y mayor de 12), FSH basal no elevada (menor de 10 y menor de 12 UI/L), duración de la esterilidad (menor de dos y menor de cuatro años) y número de tratamientos previos (131).

La progesterona basal y el tipo de análogo de la GnRH utilizado no mostraron asociación con la frecuencia de nacido vivo, mientras que sí se observó para el uso de anticonceptivo hormonal previo a la estimulación (RR: 0,81; IC 95%: 0,73; 0,91; $p<0,001$), aunque la asociación independiente de dichas variables y de la frecuencia de nacido ha sido sometida más adelante a pruebas de análisis multivariado.

La frecuencia de nacido vivo se asoció de forma inversa y esperable con la dosis inicial y con el consumo final de FSH, puesto que las dosis elevadas de actividad FSH se usan más frecuentemente en pacientes con baja reserva ovárica y peor pronóstico gestacional. En las pacientes que recibieron dosis de actividad FSH de 300 UI/día o más, se registró un considerable descenso de la frecuencia de nacido vivo (RR: 0,63; IC 95%: 0,54; 0,74). La asociación inversa entre el uso de LH y menor frecuencia de gestación puede entenderse en el mismo sentido, ya que su uso, predominantemente en forma de LHR, se concentra en pacientes de edad avanzada. El día de inicio del antagonista GnRH y la duración del tratamiento de estimulación son otros dos factores relacionados con la calidad de la respuesta ovárica a la estimulación, y su asociación con la probabilidad de nacido vivo ha sido suficientemente establecida.

En cuanto a las variables de rendimiento de la estimulación ovárica, el número de folículos totales y maduros, así como el número de ovocitos totales y en metafase II determinaron diferencias significativas en la probabilidad de nacido vivo. Análogamente, el número de embriones evolutivos, de embriones de calidad, de embriones transferidos y de embriones de calidad transferidos se relacionaron significativamente con la probabilidad de obtener nacido vivo, como cabría esperar.

Asociación entre covariables y progesterona

La edad de la paciente se asoció a diferencias en la distribución de progesterona, de forma que las pacientes más jóvenes presentan progesteronas significativamente más elevadas, asociación que puede estar mediada por la mayor respuesta a la estimulación ovárica esperable en estas pacientes (33, 63, 75, 80, 132-134)

Otra variable con asociación relevante con la EPP fue el recuento basal de folículos antrales, de forma que las pacientes con menos de 9 folículos, en las que cabe esperar una menor respuesta a la estimulación, presentan valores más bajos de progesterona sérica final. Otro de los estimadores de reserva ovárica ampliamente utilizados, la FSH basal, determinó diferencias significativas en la proporción de gestaciones al comparar pacientes con niveles normales (< 10-12 UI/L) con pacientes con FSH elevada, que presentaron menores valores promedio de progesterona. Igualmente, la indicación del ciclo de FIV-TE por baja reserva y/o edad avanzada mostró asociación en sentido análogo al resto de las variables asociadas a reserva ovárica (135).

Se ha detectado una potente relación entre la progesterona basal y la correspondiente al final de la estimulación, de forma que la primera permite incluso la estimación del riesgo de EPP por encima del umbral crítico adoptado en nuestro estudio (1,66 ng/mL) con una notable validez (Área bajo la curva ROC: 0,74; IC 95%: 0,69; 0,79; $p < 0,001$). Esta

asociación, como han sugerido los estudios de Corti y Papaleo(86, 119), puede constituirse en el principal estimador del riesgo de EPP superior al umbral de seguridad, con un valor predictivo superior incluso a la dosis de FSHr administrada o al nivel de estradiol. Este parámetro, determinado antes del inicio de la estimulación, podría resultar especialmente útil para la adopción de medidas preventivas precoces.

Los ciclos en los que se utilizó antagonista GnRH y aquéllos en los que se añadió actividad LH presentaron promedios de progesterona significativamente más bajos que los ciclos de agonista y los que se estimularon exclusivamente con actividad FSH. El primer hallazgo es coherente con los resultados descritos por la mayor parte de los estudios (16, 57, 63). El efecto protector de la acción LH sobre la EPP ha sido ya descrito por varios autores, y corroborado por el metaanálisis de Hugues (57, 82, 90). Conviene tener presente que en la cohorte estudiada se dio un franco predominio del uso de LHR como fuente de LH, lo que haría aconsejable la comparación de este hallazgo con los de autores que hayan utilizado el mismo origen de LH. A pesar de ello, los resultados obtenidos se orientan en la línea de los descritos por el metanálisis de Hugues (57).

El incremento de la duración de la estimulación por encima de 8 días, así como los niveles de estradiol sérico superior a 1624 pg/mL (mediana de la distribución) han mosyrado asociación con la EPP. En concreto, el estradiol final está fuertemente correlacionado con la concentración de progesterona al término de la estimulación, y dicha correlación reconoce, excepcionalmente, una tendencia líneal directa. Se ha afirmado que la relación entre la producción de estradiol y progesterona obedecería al efecto de una causa común que justificaría ambas producciones, y que estaría en relación con la magnitud de la reserva ovárica o con la intensidad de las estimulaciones (24, 33). En la misma línea, el número total de folículos reclutados, y el de intermedios y maduros, guarda una clara correlación con la producción de progesterona y su concentración al finalizar el ciclo.

La variable clínica que mejor expresa la intensidad de la respuesta ovárica a la estimulación es para la mayoría de los autores el número de ovocitos obtenidos (2). Nuestros datos han hallado diferencias en los niveles medios de progesterona al comparar las pacientes por nivel de respuesta a la estimulación, de forma que se han observado diferencias significativas entre respuestas normales y bajas, así como entre normales y elevadas, y por tanto son similares a los descritos con anterioridad (63, 65, 102).

El número de embriones disponibles en el día de la transferencia, así como la calidad de los mismos, el número de transferidos y su calidad han presentado asociación con la progesterona, cuya media se incrementa de forma no lineal a medida que se incrementa el número de embriones. La naturaleza de esta asociación resulta clara, y expresa una relación derivada con la magnitud de la respuesta y con el número de ovocitos.

El análisis bivariado del efecto de la EPP sobre la probabilidad de nacido vivo en función del posible efecto de las covariables consideradas no reveló interacción ni confusión generada por ninguna de ellas. En particular, el efecto de la EPP se mantuvo en todos los estratos de respuesta a la estimulación, y en los subgrupos de pacientes con y sin actividad LH. La intensidad de este efecto en cada estrato no difirió lo suficiente como para asumir la existencia de interacciones. La transferencia de embriones de calidad, el número de los mismos, y el número total de embriones de cualquier calidad transferidos tampoco ejercieron efectos de confusión ni interacción detectables, lo que no se hizo necesario estimar puntos de corte en la concentración de progesterona específicos para cada estrato.

El análisis multivariado realizado con finalidad explicativa ha identificado la EPP ($>1,66$ ng/mL) como variable asociada de forma independiente a la probabilidad de nacido vivo, junto con la edad (> 37 años), la dosis inicial de FSH (> 300 UI/día), el número de embriones transferidos (<2), la calidad de los embriones transferidos (al menos un A-B) y la existencia de embriones para vitrificar. El número de ovocitos y el uso de actividad LH, así como la progesterona basal, el tipo de análogo empleado y el estradiol del final de la estimulación no fueron identificadas por el análisis multivariado como factores explicativos independientes, como parecía apuntar el análisis bivariado. Esta técnica de análisis resulta el mejor instrumento para ajustar el efecto individualizado de cada variable explicativa; dicho ajuste produce un descenso del valor de la OR de un 15% respecto al obtenido sin ajustar.

Fortalezas y limitaciones del estudio

El diseño de cohortes, adoptado por el estudio, es el más adecuado para evaluar una asociación causal a través de un enfoque observacional. El contraste unilateral de la una diferencia de nacido vivo de al menos un 10%, con una probable ratio entre expuestos y no expuestos de 5/95 determinó la necesidad de contar con una muestra de al menos 3500 pacientes, que tras corrección por pérdidas estimadas ascendió a 3675 observaciones. La muestra analizada consta de 3781 ciclos de tratamiento, y permitió realizar contrastes estadísticos con una potencia mínima del 80% respecto al objetivo principal.

Otra de las virtudes del estudio es el elevado número de covariables relevantes consideradas, con el objeto de mejorar el control de sesgos respecto a estudios similares previamente publicados. Mediante técnicas de análisis multivariado, se ha analizado las variables que contribuyen con la progesterona a explicar la variabilidad del evento 'nacido vivo', empleando un procedimiento de selección de las variables candidatas a formar parte del modelo explicativo final mediante estimación objetiva de su contribución a la cocausalidad.

Los ciclos de tratamiento que han constituido el material de observación han sido realizados a lo largo de todo el periodo de retrospectión en un único centro asistencial, lo que reduce las fuentes de heterogeneidad. Por otro lado, al no tratarse de un subanálisis de un estudio prospectivo de intervención, el perfil de las pacientes se asemeja más a las características de la población general asistida.

La selección de la concentración final de progesterona sérica en el día de la HCG fue posible, por la existencia de datos al respecto en la inmensa mayoría de los ciclos. Su consistencia fue valorada a priori como alta, considerando que todas las determinaciones fueron realizadas en el mismo centro, y a través de sistemas de análisis automatizado que emplean sistemas de reactivos con parámetros de sensibilidad y reproducibilidad adecuados para la práctica clínica.

En relación con la variable de resultado, la elección de la frecuencia de nacido vivo pretende estimar el impacto de la EPP sobre la variable de resultado con más importancia clínica.

Las limitaciones del estudio que se juzgan más relevantes son las relacionadas con su carácter retrospectivo, con la posibilidad de que el control de sesgos pudiera haber sido mejorado, y con las pérdidas de información relativas a los datos del estudio.

Por otro lado, las condiciones de práctica clínica en las que se ha desarrollado la aplicación de los tratamientos objeto de análisis han limitado la frecuencia de observaciones relativas a ciertas categorías, como los ciclos con transferencia de blastocistos (56 durante el periodo de estudio) o el escaso uso de ciertos preparados hormonales, que no han podido ser objeto de análisis específicos.

La relación coste/efectividad de la determinación de la progesterona sérica al final de la estimulación no ha sido objetivo del presente estudio. No obstante, la selección de un del percentil 97 en la distribución de progesterona como punto de corte crítico tendrá como

consecuencia que la frecuencia de la exposición será, por definición, del 3%. Considerando que el NNH estimado por el estudio está entre 7 y 8 (inverso de diferencia de probabilidades de 0,13), por cada 1000 ciclos de FIV-TE realizados sólo 30 resultarían expuestos a progesterona elevada en rango nocivo, por lo que el efecto global sería la pérdida de 4 nacidos vivos.

6. **CONCLUSIONES**

- La elevación precoz de la progesterona durante la estimulación ovárica en ciclos de FIV-TE reduce la frecuencia de nacido vivo, y se asocia a menor frecuencia de nacido vivo, gestación clínica e implantación embrionaria, según una relación que no guarda una proporcionalidad dosis/respuesta de patrón lineal.
- La elevación precoz de la progesterona no se asocia a mayor frecuencia de aborto espontáneo.
- La edad de las pacientes, el número de ovocitos obtenido mediante la estimulación, y la exposición a preparados con acción LH durante la misma no modifican el efecto de la elevación precoz de progesterona sobre la frecuencia de nacido vivo.
- El efecto de la elevación precoz de progesterona sobre la probabilidad de nacido vivo es independiente del ejercicio por la edad de la paciente, la dosis de FSH utilizada, el número de embriones transferidos, la calidad de los mismos y de la existencia de embriones para criopreservar.

7. **BIBLIOGRAFÍA**

1. Schoolcraft W, Sinton E, Schlenker T, Huynh D, Hamilton F, Meldrum DR. Lower pregnancy rate with premature luteinization during pituitary suppression with leuprolide acetate. *Fertil Steril*. 1991;55(3):563-6.
2. Al-Azemi M, Kyrou D, Kolibianakis EM, Humaidan P, Van Vaerenbergh I, Devroey P, et al. Elevated progesterone during ovarian stimulation for IVF. *Reproductive biomedicine online*. 2012;24(4):381-8.
3. Hofmann GE, Bentzien F, Bergh PA, Garrisi GJ, Williams MC, Guzman I, et al. PREMATURE LUTEINIZATION IN CONTROLLED OVARIAN HYPERSTIMULATION HAS NO ADVERSE EFFECT ON OOCYTE AND EMBRYO QUALITY. *Fertil Steril*. 1993;60(4):675-9.
4. Ubaldi F, Smitz J, Wisanto A, Joris H, Schiettecatte J, Derde MP, et al. Oocyte and embryo quality as well as pregnancy rate in intracytoplasmic sperm injection are not affected by high follicular phase serum progesterone. *Human Reproduction*. 1995;10(12):3091-6.
5. Olivennes F, Belaisch-Allart J, Empeiraire JC, Dechaud H, Alvarez S, Moreau L, et al. Prospective, randomized, controlled study of in vitro fertilization-embryo transfer with a single dose of a luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) antagonist (cetorelix) or a depot formula of an LH-RH agonist (triptorelin). *Fertil Steril*. 2000;73(2):314-20.
6. Bosch E, Valencia I, Escudero E, Crespo J, Simon C, Remohi J, et al. Premature luteinization during gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles and its relationship with in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 2003;80(6):1444-9.
7. Hofmann GE, Khoury J, Johnson CA, Thie J, Scott RT. Premature luteinization during controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization-embryo transfer has no impact on pregnancy outcome. *Fertil Steril*. 1996;66(6):980-6.
8. Legro RS, Ary BA, Paulson RJ, Stanczyk FZ, Sauer MV. PREMATURE LUTEINIZATION AS DETECTED BY ELEVATED SERUM PROGESTERONE IS ASSOCIATED WITH A HIGHER PREGNANCY RATE IN DONOR OOCYTE IN-VITRO FERTILIZATION. *Human Reproduction*. 1993;8(9):1506-11.
9. Venetis CA, Kolibianakis EM, Papanikolaou E, Bontis J, Devroey P, Tarlatzis BC. 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*. 2007;13(4):343-55.
10. Albano C, Felberbaum RE, Smitz J, Riethmuller-Winzen H, Engel J, Diedrich K, et al. Ovarian stimulation with HMG: results of a prospective randomized phase III European study comparing the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-antagonist cetorelix and the LHRH-agonist buserelin. *European Cetorelix Study Group. Hum Reprod*. 2000;15(3):526-31.
11. Messinis IE, Vanakara P, Zavos A, Verikouki C, Georgoulas P, Dafopoulos K. Failure of the GnRH antagonist ganirelix to block the positive feedback effect of exogenous estrogen in normal women. *Fertil Steril*. 2010;94(4):1554-6.
12. Pelinck MJ, Vogel NE, Arts EG, Simons AH, Heineman MJ, Hoek A. Cumulative pregnancy rates after a maximum of nine cycles of modified natural cycle IVF and analysis of patient drop-out: a cohort study. *Hum Reprod*. 2007;22(9):2463-70.
13. Edelstein MC, Seltman HJ, Cox BJ, Robinson SM, Shaw RA, Muasher SJ. 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*. 1990;54(5):853-7.
14. Silverberg KM, Burns WN, Olive DL, Riehl RM, Schenken RS. SERUM PROGESTERONE LEVELS PREDICT SUCCESS OF INVITRO FERTILIZATION EMBRYO TRANSFER IN PATIENTS STIMULATED WITH LEUPROLIDE ACETATE AND HUMAN MENOPAUSAL GONADOTROPINS. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1991;73(4):797-803.
15. Ubaldi F, Albano C, Peukert M, Riethmuller-Winzen H, Camus M, Smitz J, et al. Subtle progesterone rise after the administration of the gonadotrophin-releasing hormone antagonist cetorelix in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Hum Reprod*. 1996;11(7):1405-7.
16. Bosch E, Labarta E, Crespo J, Simon C, Remohi 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.
17. Givens CR, Schriock ED, Dandekar PV, Martin MC. ELEVATED SERUM PROGESTERONE LEVELS ON THE DAY OF HUMAN CHORIONIC-GONADOTROPIN ADMINISTRATION DO

- NOT PREDICT OUTCOME IN ASSISTED REPRODUCTION CYCLES. *Fertil Steril*. 1994;62(5):1011-7.
18. Labarta E, Martinez-Conejero JA, Alama P, Horcajadas JA, Pellicer A, Simon C, et al. Endometrial receptivity is affected in women with high circulating progesterone levels at the end of the follicular phase: a functional genomics analysis. *Hum Reprod*. 2011;26(7):1813-25.
 19. Van Vaerenbergh I, Fatemi HM, Blockeel C, Van Lommel L, In't Veld P, Schuit F, et al. Progesterone rise on HCG day in GnRH antagonist/rFSH stimulated cycles affects endometrial gene expression. *Reproductive biomedicine online*. 2011;22(3):263-71.
 20. Fatemi HM, Van Vaerenbergh I. Significance of premature progesterone rise in IVF. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2015;27(3):242-8.
 21. Fleming R. Progesterone elevation on the day of hCG: methodological issues. *Hum Reprod Update*. 2008;14(4):391-2.
 22. Coucke W, Devleeschouwer N, Libeer JC, Schiettecatte J, Martin M, Smits J. Accuracy and reproducibility of automated estradiol-17beta and progesterone assays using native serum samples: results obtained in the Belgian external assessment scheme. *Hum Reprod*. 2007;22(12):3204-9.
 23. Patton PE, Lim JY, Hickok LR, Kettel LM, Larson JM, Pau KY. Precision of progesterone measurements with the use of automated immunoassay analyzers and the impact on clinical decisions for in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2014;101(6):1629-36.
 24. Sonigo C, Dray G, Roche C, Cedrin-Durnerin I, Hugues JN. Impact of high serum progesterone during the late follicular phase on IVF outcome. *Reproductive biomedicine online*. 2014;29(2):177-86.
 25. Hoff JD, Quigley ME, Yen SS. Hormonal dynamics at midcycle: a reevaluation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1983;57(4):792-6.
 26. Couzinet B, Brailly S, Bouchard P, Schaison G. Progesterone stimulates luteinizing hormone secretion by acting directly on the pituitary. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1992;74(2):374-8.
 27. Micevych P, Sinchak K. Estradiol regulation of progesterone synthesis in the brain. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;290(1-2):44-50.
 28. Fukuda S, Orisaka M, Tajima K, Hattori K, Kotsuji F. Luteinizing hormone-induced Akt phosphorylation and androgen production are modulated by MAP Kinase in bovine theca cells. *J Ovarian Res*. 2009;2(1):17.
 29. Fleming R, Jenkins J. The source and implications of progesterone rise during the follicular phase of assisted reproduction cycles. *Reproductive biomedicine online*. 2010;21(4):446-9.
 30. Andersen CY, Ezcurra D. Human steroidogenesis: implications for controlled ovarian stimulation with exogenous gonadotropins. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2014;12:128.
 31. Schneyer AL, Fujiwara T, Fox J, Welt CK, Adams J, Messerlian GM, et al. Dynamic changes in the intrafollicular inhibin/activin/follistatin axis during human follicular development: relationship to circulating hormone concentrations. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000;85(9):3319-30.
 32. Functional morphology of the human ovary. Lancaster: MTP; 1981.
 33. Kyrrou D, Al-Azemi M, Papanikolaou EG, Donoso P, Tziomalos K, Devroey P, et al. The relationship of premature progesterone rise with serum estradiol levels and number of follicles in GnRH antagonist/recombinant FSH-stimulated cycles. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2012;162(2):165-8.
 34. Smyth CD, Miro F, Whitelaw PF, Howles CM, Hillier SG. Ovarian thecal/interstitial androgen synthesis is enhanced by a follicle-stimulating hormone-stimulated paracrine mechanism. *Endocrinology*. 1993;133(4):1532-8.
 35. Nahum R, Thong KJ, Hillier SG. Metabolic regulation of androgen production by human thecal cells in vitro. *Hum Reprod*. 1995;10(1):75-81.
 36. deMoura MD, Choi D, Adashi EY, Payne DW. Insulin-like growth factor-I-mediated amplification of follicle-stimulating hormone-supported progesterone accumulation by cultured rat granulosa cells: enhancement of steroidogenic enzyme activity and expression. *Biol Reprod*. 1997;56(4):946-53.
 37. Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev*. 2004;25(6):947-70.
 38. Laborde N, Carril M, Cheviakoff S, Croxatto HD, Pedroza E, Rosner JM. The secretion of progesterone during the periovulatory period in women with certified ovulation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1976;43(5):1157-63.
 39. Conti M. Specificity of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signal in granulosa cell function. *Biol Reprod*. 2002;67(6):1653-61.
 40. Tonetta SA, diZerega GS. Intraovarian regulation of follicular maturation. *Endocr Rev*. 1989;10(2):205-29.

41. Jeppesen JV, Kristensen SG, Nielsen ME, Humaidan P, Dal Canto M, Fadini R, et al. LH-receptor gene expression in human granulosa and cumulus cells from antral and preovulatory follicles. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(8):E1524-31.
42. Lindeberg M, Carlstrom K, Ritvos O, Hovatta O. Gonadotrophin stimulation of non-luteinized granulosa cells increases steroid production and the expression of enzymes involved in estrogen and progesterone synthesis. *Hum Reprod*. 2007;22(2):401-6.
43. Yong EL, Hillier SG, Turner M, Baird DT, Ng SC, Bongso A, et al. Differential regulation of cholesterol side-chain cleavage (P450scc) and aromatase (P450arom) enzyme mRNA expression by gonadotrophins and cyclic AMP in human granulosa cells. *J Mol Endocrinol*. 1994;12(2):239-49.
44. Tsang BK, Ainsworth L, Downey BR, Marcus GJ. Differential production of steroids by dispersed granulosa and theca interna cells from developing preovulatory follicles of pigs. *J Reprod Fertil*. 1985;74(2):459-71.
45. Halasz M, Szekeres-Bartho J. The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion. *J Reprod Immunol*. 2013;97(1):43-50.
46. Gellersen B, Fernandes MS, Brosens JJ. Non-genomic progesterone actions in female reproduction. *Hum Reprod Update*. 2009;15(1):119-38.
47. Boonyaratanakornkit V, Bi Y, Rudd M, Edwards DP. The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids*. 2008;73(9-10):922-8.
48. Boonyaratanakornkit V, Scott MP, Ribon V, Sherman L, Anderson SM, Maller JL, et al. Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol Cell*. 2001;8(2):269-80.
49. Thomas P. Characteristics of membrane progesterin receptor alpha (mPRalpha) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progesterin actions. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2008;29(2):292-312.
50. Large MJ, DeMayo FJ. The regulation of embryo implantation and endometrial decidualization by progesterone receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;358(2):155-65.
51. Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2004;2:59.
52. Norwitz ER, Snegovskikh V, Schatz F, Foyouzi N, Rahman M, Buchwalder L, et al. Progesterin inhibits and thrombin stimulates the plasminogen activator/inhibitor system in term decidual stromal cells: implications for parturition. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2007;196(4):382 e1-8.
53. Filicori M, Cognigni GE, Taraborrelli S, Spettoli D, Ciampaglia W, de Fatis CT, et al. Luteinizing hormone activity supplementation enhances follicle-stimulating hormone efficacy and improves ovulation induction outcome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84(8):2659-63.
54. Howles CM, Loumaye E, Giroud D, Luyet G. Multiple follicular development and ovarian steroidogenesis following subcutaneous administration of a highly purified urinary FSH preparation in pituitary desensitized women undergoing IVF: a multicentre European phase III study. *Hum Reprod*. 1994;9(3):424-30.
55. Beckers NG, Laven JS, Eijkemans MJ, Fauser BC. Follicular and luteal phase characteristics following early cessation of gonadotrophin-releasing hormone agonist during ovarian stimulation for in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 2000;15(1):43-9.
56. Ubaldi F, Camus M, Smits J, Bennink HC, VanSteirteghem A, Devroey P. 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*. 1996;66(2):275-80.
57. Hugues JN. Impact of 'LH activity' supplementation on serum progesterone levels during controlled ovarian stimulation: a systematic review. *Hum Reprod*. 2012;27(1):232-43.
58. Cedrin-Durnerin I, Bulwa S, Herve F, Martin-Pont B, Uzan M, Hugues JN. The hormonal flare-up following gonadotrophin-releasing hormone agonist administration is influenced by a progestogen pretreatment. *Hum Reprod*. 1996;11(9):1859-63.
59. Fanchin R, Righini C, Olivennes F, deZiegler D, Selva J, Frydman R. Premature progesterone elevation does not alter oocyte quality in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1996;65(6):1178-83.
60. Melo MA, Meseguer M, Garrido N, Bosch E, Pellicer A, Remohi J. The significance of premature luteinization in an oocyte-donation programme. *Hum Reprod*. 2006;21(6):1503-7.
61. Polotsky AJ, Daif JL, Jindal S, Lieman HJ, Santoro N, Pal L. Serum progesterone on the day of human chorionic gonadotropin administration predicts clinical pregnancy of sibling frozen embryos. *Fertil Steril*. 2009;92(6):1880-5.

62. Silverberg KM, Martin M, Olive DL, Burns WN, Schenken RS. Elevated serum progesterone levels on the day of human chorionic gonadotropin administration in in vitro fertilization cycles do not adversely affect embryo quality. *Fertil Steril.* 1994;61(3):508-13.
63. Venetis CA, Kolibianakis EM, Bosdou JK, Tarlatzis BC. Progesterone elevation and probability of pregnancy after IVF: a systematic review and meta-analysis of over 60 000 cycles. *Hum Reprod Update.* 2013;19(5):433-57.
64. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update.* 2006;12(6):731-46.
65. Kolibianakis EM, Venetis CA, Bontis J, Tarlatzis BC. Significantly Lower Pregnancy Rates in the Presence of Progesterone Elevation in Patients Treated with GnRH Antagonists and Gonadotrophins: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Current Pharmaceutical Biotechnology.* 2012;13(3):464-70.
66. Van Vaerenbergh I, Van Lommel L, Ghislain V, In't Veld P, Schuit F, Fatemi HM, et al. In GnRH antagonist/rec-FSH stimulated cycles, advanced endometrial maturation on the day of oocyte retrieval correlates with altered gene expression. *Hum Reprod.* 2009;24(5):1085-91.
67. Li R, Qiao J, Wang L, Li L, Zhen X, Liu P, et al. MicroRNA array and microarray evaluation of endometrial receptivity in patients with high serum progesterone levels on the day of hCG administration. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E.* 2011;9:29.
68. Haouzi D, Bissonnette L, Gala A, Assou S, Entezami F, Perrochia H, et al. Endometrial receptivity profile in patients with premature progesterone elevation on the day of HCG administration. *Biomed Res Int.* 2014;2014:951937.
69. Chen X, Jin X, Liu L, Man CW, Huang J, Wang CC, et al. Differential expression of vascular endothelial growth factor angiogenic factors in different endometrial compartments in women who have an elevated progesterone level before oocyte retrieval, during in vitro fertilization-embryo transfer treatment. *Fertil Steril.* 2015;104(4):1030-6.
70. Bustillo M, Stern JJ, Coulam CB. Serum progesterone at the time of human chorionic gonadotrophin does not predict pregnancy in in-vitro fertilization and embryo transfer. *Human Reproduction.* 1995;10(11):2862-7.
71. Urman B, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, Isiklar A, Balaban B. Elevated serum progesterone level on the day of human chorionic gonadotropin administration does not adversely affect implantation rates after intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer. *Fertil Steril.* 1999;72(6):975-9.
72. Fanchin R, de Ziegler D, Taieb J, Hazout A, Frydman R. Premature elevation of plasma progesterone alters pregnancy rates of in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril.* 1993;59(5):1090-4.
73. Hamori M, Stuckensen JA, Rumpf D, Kniewald T, Kniewald A, Kurz CS. Premature luteinization of follicles during ovarian stimulation for in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1987;2(8):639-43.
74. de Ziegler D, Fanchin R, de Moustier B, Bulletti C. The hormonal control of endometrial receptivity: estrogen (E2) and progesterone. *J Reprod Immunol.* 1998;39(1-2):149-66.
75. 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. *Fertil Steril.* 2013;100(6):1622-8 e1-3.
76. Hill MJ, Royster GDt, Healy MW, Richter KS, Levy G, DeCherney AH, et al. Are good patient and embryo characteristics protective against the negative effect of elevated progesterone level on the day of oocyte maturation? *Fertil Steril.* 2015;103(6):1477-84 e5.
77. Nayak S, Ochalski ME, Fu B, Wakim KM, Chu TJ, Dong X, et al. Progesterone level at oocyte retrieval predicts in vitro fertilization success in a short-antagonist protocol: a prospective cohort study. *Fertil Steril.* 2014;101(3):676-82.
78. Huang B, Li Z, Zhu L, Hu D, Liu Q, Zhu G, et al. Progesterone elevation on the day of HCG administration may affect rescue ICSI. *Reproductive biomedicine online.* 2014;29(1):88-93.
79. Santos-Ribeiro S, Polyzos NP, Haentjens P, Smits J, Camus M, Tournaye H, et al. Live birth rates after IVF are reduced by both low and high progesterone levels on the day of human chorionic gonadotrophin administration. *Hum Reprod.* 2014;29(8):1698-705.
80. Venetis CA, Kolibianakis EM, Bosdou JK, Lainas GT, Sfountouris IA, Tarlatzis BC, et al. 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.* 2015;30(3):684-91.
81. Bosch E, Escudero E, Crespo J, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Serum luteinizing hormone in patients undergoing ovarian stimulation with gonadotropin-releasing hormone antagonists and recombinant follicle-stimulating hormone and its relationship with cycle outcome. *Fertil Steril.* 2005;84(5):1529-32.

82. Hugues JN, Masse-Laroche E, Reboul-Marty J, Boiko O, Meynant C, Cedrin-Durnerin I. Impact of endogenous luteinizing hormone serum levels on progesterone elevation on the day of human chorionic gonadotropin administration. *Fertil Steril*. 2011;96(3):600-4.
83. Kolibianakis EM, Zikopoulos K, Smitz J, Camus M, Tournaye H, Van Steirteghem AC, et al. Elevated progesterone at initiation of stimulation is associated with a lower ongoing pregnancy rate after IVF using GnRH antagonists. *Hum Reprod*. 2004;19(7):1525-9.
84. Blockeel C, Baumgarten M, De Vos M, Verheyen G, Devroey P. Administration of GnRH antagonists in case of elevated progesterone at initiation of the cycle: a prospective cohort study. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;12(3):423-8.
85. Hamdine O, Macklon NS, Eijkemans MJ, Laven JS, Cohlen BJ, Verhoeff A, et al. Elevated early follicular progesterone levels and in vitro fertilization outcomes: a prospective intervention study and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2014;102(2):448-54 e1.
86. Papaleo E, Corti L, Vanni VS, Pagliardini L, Ottolina J, De Michele F, et al. Basal progesterone level as the main determinant of progesterone elevation on the day of hCG triggering in controlled ovarian stimulation cycles. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2014;290(1):169-76.
87. Fatemi HM, Popovic-Todorovic B. Implantation in assisted reproduction: a look at endometrial receptivity. *Reproductive biomedicine online*. 2013;27(5):530-8.
88. Out HJ, Rutherford A, Fleming R, Tay CC, Trew G, Ledger W, et al. A randomized, double-blind, multicentre clinical trial comparing starting doses of 150 and 200 IU of recombinant FSH in women treated with the GnRH antagonist ganirelix for assisted reproduction. *Hum Reprod*. 2004;19(1):90-5.
89. Andersen CY, Westergaard LG, van Wely M. FSH isoform composition of commercial gonadotrophin preparations: a neglected aspect? *Reproductive biomedicine online*. 2004;9(2):231-6.
90. Smitz J, Wolfenson C, Chappel S, Ruman J. Follicle-Stimulating Hormone: A Review of Form and Function in the Treatment of Infertility. *Reprod Sci*. 2015.
91. Smitz J, Andersen AN, Devroey P, Arce JC, Group M. Endocrine profile in serum and follicular fluid differs after ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH in IVF patients. *Hum Reprod*. 2007;22(3):676-87.
92. Andersen AN, Devroey P, Arce JC. Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing IVF: a randomized assessor-blind controlled trial. *Hum Reprod*. 2006;21(12):3217-27.
93. Devroey P, Pellicer A, Nyboe Andersen A, Arce JC, Menopur in Gn RHACwSETTG. A randomized assessor-blind trial comparing highly purified hMG and recombinant FSH in a GnRH antagonist cycle with compulsory single-blastocyst transfer. *Fertil Steril*. 2012;97(3):561-71.
94. Thuesen LL, Loft A, Egeberg AN, Smitz J, Petersen JH, Andersen AN. A randomized controlled dose-response pilot study of addition of hCG to recombinant FSH during controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Hum Reprod*. 2012;27(10):3074-84.
95. Thuesen LL, Smitz J, Loft A, Nyboe Andersen A. Endocrine effects of hCG supplementation to recombinant FSH throughout controlled ovarian stimulation for IVF: a dose-response study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;79(5):708-15.
96. Thuesen LL, Andersen AN, Loft A, Smitz J. Intrafollicular endocrine milieu after addition of hCG to recombinant FSH during controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(2):517-26.
97. Requena A, Cruz M, Ruiz FJ, Garcia-Velasco JA. Endocrine profile following stimulation with recombinant follicle stimulating hormone and luteinizing hormone versus highly purified human menopausal gonadotropin. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2014;12:10.
98. Werner MD, Forman EJ, Hong KH, Franasiak JM, Molinaro TA, Scott RT, Jr. 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*. 2014;102(5):1312-7.
99. Papanikolaou EG, Pados G, Grimbizis G, Bili E, Kyriazi L, Polyzos NP, et al. GnRH-agonist versus GnRH-antagonist IVF cycles: is the reproductive outcome affected by the incidence of progesterone elevation on the day of HCG triggering? A randomized prospective study. *Hum Reprod*. 2012;27(6):1822-8.
100. Kyrou D, Popovic-Todorovic B, Fatemi HM, Bourgain C, Haentjens P, Van Landuyt L, et al. Does the estradiol level on the day of human chorionic gonadotrophin administration have an impact on pregnancy rates in patients treated with rec-FSH/GnRH antagonist? *Hum Reprod*. 2009;24(11):2902-9.

101. Al-Azemi M, Kyrou D, Papanikolaou EG, Polyzos NP, Devroey P, Fatemi HM. The relationship between premature Progesterone rise with serum Estradiol levels and number of follicles in GnRH antagonist/rec-FSH stimulated cycles. *Human Reproduction*. 2011;26:1324-15.
102. Xu B, Li Z, Zhang H, Jin L, Li Y, Ai J, et al. 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*. 2012;97(6):1321-7 e1-4.
103. Bosch E. Does progesterone elevation compromise pregnancy rates in high responders? Insufficient evidence to draw a conclusion. *Fertil Steril*. 2014;101(1):e3-4.
104. Bu Z, Zhao F, Wang K, Guo Y, Su Y, Zhai J, et al. 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*. 2014;9(6):e100011.
105. Fatemi HM, Doody K, Griesinger G, Witjes H, Mannaerts B. High ovarian response does not jeopardize ongoing pregnancy rates and increases cumulative pregnancy rates in a GnRH-antagonist protocol. *Hum Reprod*. 2013;28(2):442-52.
106. Andersen CY, Andersen K. Improving the luteal phase after ovarian stimulation: reviewing new options. *Reproductive biomedicine online*. 2014;28(5):552-9.
107. Singh N, Kaur SD, Malik N, Malhotra N, Vanamail P. Do increased levels of progesterone and progesterone/estradiol ratio on the day of human chorionic gonadotropin affects pregnancy outcome in long agonist protocol in fresh in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles? *J Hum Reprod Sci*. 2015;8(2):80-5.
108. Li PF, Zhu H, Tan L, Zhao DM, Ma LY, Xiang YG, et al. Effects of high progesterone on outcomes of in vitro fertilization-embryo transfer in patients with different ovarian responses. *Syst Biol Reprod Med*. 2015;61(3):161-7.
109. Younis JS, Haddad S, Matilsky M, Ben-Ami M. Premature luteinization: could it be an early manifestation of low ovarian reserve? *Fertil Steril*. 1998;69(3):461-5.
110. Kyrou D, Kolibianakis EM, Fatemi HM, Camus M, Tournaye H, Tarlatzis BC, et al. High exposure to progesterone between the end of menstruation and the day of triggering final oocyte maturation is associated with a decreased probability of pregnancy in patients treated by in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2011;96(4):884-8.
111. Huang CC, Lien YR, Chen HF, Chen MJ, Shieh CJ, Yao YL, et al. The duration of pre-ovulatory serum progesterone elevation before hCG administration affects the outcome of IVF/ICSI cycles. *Hum Reprod*. 2012;27(7):2036-45.
112. Lee VC, Li RH, Chai J, Yeung TW, Yeung WS, Ho PC, et al. Effect of preovulatory progesterone elevation and duration of progesterone elevation on the pregnancy rate of frozen-thawed embryo transfer in natural cycles. *Fertil Steril*. 2014;101(5):1288-93.
113. Dai W, Bu ZQ, Wang LL, Sun YP. The relationship between the changes in the level of progesterone and the outcome of in vitro fertilization-embryo transfer. *Syst Biol Reprod Med*. 2015:1-10.
114. Kyrou D, Kolibianakis EM, Fatemi HM, Tarlatzis BC, Tournaye H, Devroey P. Is earlier administration of human chorionic gonadotropin (hCG) associated with the probability of pregnancy in cycles stimulated with recombinant follicle-stimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonists? A prospective randomized trial. *Fertil Steril*. 2011;96(5):1112-5.
115. Chen Y, Zhang Y, Hu M, Liu X, Qi H. Timing of human chorionic gonadotropin (hCG) hormone administration in IVF/ICSI protocols using GnRH agonist or antagonists: a systematic review and meta-analysis. *Gynecol Endocrinol*. 2014;30(6):431-7.
116. Elgindy EA. Progesterone level and progesterone/estradiol ratio on the day of hCG administration: detrimental cutoff levels and new treatment strategy. *Fertil Steril*. 2011;95(5):1639-44.
117. Papanikolaou EG, Kolibianakis EM, Pozzobon C, Tank P, Tournaye H, Bourgain C, et al. 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*. 2009;91(3):949-52.
118. Ochsenkuhn R, Arzberger A, von Schonfeldt V, Gallwas J, Rogenhofer N, Crispin A, et al. Subtle progesterone rise on the day of human chorionic gonadotropin administration is associated with lower live birth rates in women undergoing assisted reproductive technology: a retrospective study with 2,555 fresh embryo transfers. *Fertil Steril*. 2012;98(2):347-54.
119. Corti L, Papaleo E, Pagliardini L, Rabellotti E, Molgora M, La Marca A, et al. 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. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2013;171(1):73-7.
120. Yang S, Pang T, Li R, Yang R, Zhen X, Chen X, et al. 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*. 2015;31(5):355-8.
121. Cetinkaya ES, Berker B, Aytac R, Atabekoglu C, Sonmezer M, Ozmen B. The value of the progesterone-to-estradiol ratio on the day of hCG administration in predicting ongoing pregnancy and live birth rates in normoresponders undergoing GnRH antagonist cycles. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2013;170(2):452-7.
 122. Liu L, Zhao L, Li TC, Zhu H, Lin X, Jin X, et al. Comparison of progesterone measurement on day of, and day after, HCG administration in IVF-embryo transfer cycles. *Reproductive biomedicine online*. 2015;30(2):157-65.
 123. Shufaro Y, Sapir O, Oron G, Ben Haroush A, Garor R, Pinkas H, et al. Progesterone-to-follicle index is better correlated with in vitro fertilization cycle outcome than blood progesterone level. *Fertil Steril*. 2015;103(3):669-74 e3.
 124. Practice Committee of American Society for Reproductive M. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2012;98(2):302-7.
 125. Practice Committee of the American Society for Reproductive M. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2015;103(3):e18-25.
 126. World Health Organization DoRH, Research. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed 2010.
 127. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(11):4237-45.
 128. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L, et al. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod*. 2011;26(7):1616-24.
 129. ASEBIR Cdt. Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Embriones tempranos y Blastocistos Humanos. 2ª ed. Madrid 2008.
 130. Farquharson RG, Jauniaux E, Exalto N, Azziz R, Carmina E, Dewailly D, et al. Updated and revised nomenclature for description of early pregnancy events Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria The regulation of embryo implantation and endometrial decidualization by progesterone receptor signaling. *Hum Reprod*. 20. England United States Ireland: 2011. Published by Elsevier Ireland Ltd.; 2005. p. 3008-11.
 131. van Loendersloot LL, van Wely M, Repping S, Bossuyt PM, van der Veen F. Individualized decision-making in IVF: calculating the chances of pregnancy. *Hum Reprod*. 2013;28(11):2972-80.
 132. Valencia I, Bosch E, Simon C, Troncoso C, Remohi J, Pellicer A. Progesterone elevation during GnRH antagonists cycles in IVF adversely affects pregnancy and implantation rates. *Fertil Steril*. 2002;78(3):S148-S.
 133. Andersen CY, Bungum L, Nyboe Andersen A, Humaidan P. Preovulatory progesterone concentration associates significantly to follicle number and LH concentration but not to pregnancy rate. *Reproductive biomedicine online*. 2011;23(2):187-95.
 134. Huang R, Fang C, Xu S, Yi Y, Liang X. Premature progesterone rise negatively correlated with live birth rate in IVF cycles with GnRH agonist: an analysis of 2,566 cycles. *Fertil Steril*. 2012;98(3):664-70 e2.
 135. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril*. 2011;96(2):344-8.