

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

ENSAYO CLÍNICO ALEATORIZADO PARA CONOCER LA CORRELACIÓN ENTRE
EL NIVEL DE PROGESTERONA TISULAR Y SÉRICA RESPONSABLE DE LA
RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL PARA LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA

DOCTORADO EN PEDIATRÍA GINECOLOGIA I OBSTETRÍCIA

Universitat Autònoma de Barcelona

Director : Dr. Miguel Ángel Checa Vizcaíno

Tutor : Dr. Carlos Rodrigo Gonzalo de Liria

Doctoranda Margalida E Sastre i Cuadri

Barcelona, agosto 2023

Agradecimientos

A la meva família

Gràcies a tothom que m'ha escoltat, m'ha sentit queixar-me i m'ajudat a seguir endavant

Als meus pares, per escoltar, enraonar, tornar a escoltar i facilitar-me les coses sempre....

Al Mau per la santa paciència de creure amb mi, ajudar-me, aguantar el meu estrés, escoltar-me, consolar-me, jiji centrar-me i estimar-me i per tot!!!

A n'Àlícia, Olívia i en Max, gràcies per ajudar a fer-ho tan fàcil, malgrat la conciliació impossible.

A en MA que sempre hi ha estat i que m'ha donat el temps necessari per crear una família i fer el doctorat

Als meus germans i cunyades, perquè sempre estan incondicionals, i a nen Ramses que m'ha facilitat entendre coses bàsiques de la biologia i de la vida...

Als companys de feina, a na Mireia que li hi he plorat moltíssim, i m'ha fet gaudir de pensar i de la estadística, a na Mar, a na Manoli, màxim suport impossible ... a la família del Mar, a la família Hospitalet, a la Carme Deiros per estar en el moment precís. i a tots aquells que sempre m'han escoltat i ajudat amb un bon sonriure...

Als sevillanos, al David, a na Claudia, que ha viscut amb mi les coses bones i les no tan bones i m'ha facilitat tot el que han pogut.,

A totes les persones que m'han acompanyat, s'han interessat i m'han escoltat ...

I com deia el meu padrí mai se sap on és la sort! Gràcies al Patricio, als Agüero Mariño per els seus dibuixos i els seu art.

In extremis al meu cosí Llorenç que va arreglar el meu ordinador perquè pogués depositar.

Jo vaig començar que era resident amb ganes de aprendre i entendre i acabo mare de tres fills meravellosos amb les mateixes ganes però amb més històries que contar

GRÀCIES

Sitting on top of the word

May 1933 was **a glorious month** for a young Willard Myron Allen (1904-1993)

For the first time, the newly minted physician not only became a father but successfully crystallized the corpus luteum hormone, progesterone -in his words

...

"My friends gave me double congratulations and I was sitting on top of the word"

Toward the end of his scientific career, Willard Myron Allen authored a brief career retrospective, entitled 'Recollections of My Life with Progesterone' (Allen 1974). Within the concluding paragraph, Allen wrote:

'These were golden years for both of us (referring to Allen and Corner). For a few fleeting years progesterone was ours. My story ends on a happy note; there are still unsolved problems relating to progesterone'. Written many decades ago, the concluding line is prescient as it is understated.

ÍNDICE DEL CONTENIDO DEL ESTUDIO

1.RESUMEN ESTUDIO	7
Introducción.....	7
Material y métodos.....	7
Resultados	7
Discusión y conclusiones.....	7
2. ABSTRACT.....	8
3.ABREVIATURAS.....	9
4.INTRODUCCIÓN.....	13
Ciclo menstrual.	13
Importancia de la Progesterona	16
Principal papel de la Progesterona	17
Papel de la Progesterona durante el ciclo menstrual.....	17
Papel de la Progesterona durante la implantación	24
Importancia de la Progesterona durante las TRA.....	29
Otras funciones de la Progesterona en el organismo	32
Endometrio y receptividad endometrial	32
Anatomía y fisiología del endometrio.....	32
Definición de la ventana de implantación endometrial (VDI)	36
Receptividad endometrial	39
Estudio genético del endometrio: Marcadores de receptividad endometrial.....	39
Marcadores histológicos	40
Marcadores moleculares.....	41
MicroRNA	41
Marcadores “ómicos”	41
Estudio de receptividad: Test de receptividad endometrial actuales.....	43
Estudio del tejido endometrial	50
5.CONTEXTO CIENTÍFICO: IMPORTANCIA.....	52
6.HIPÓTESIS DEL ESTUDIO.....	56
7.OBJETIVO PRINCIPAL.....	57
Objetivos secundarios.....	57
8.METODOLOGÍA: MATERIAL Y MÉTODOS.....	58

Diseño del estudio.....	58
Población de estudio, criterios de inclusión/exclusión	58
Procedimiento del estudio y esquema.....	62
Reclutamiento de las pacientes	65
Variables del estudio	66
Medicación del estudio.....	68
Análisis de las muestras	69
Análisis de los resultados	76
Análisis estadístico.....	78
Herramientas estadísticas	78
Aspectos éticos y de confidencialidad	81
Financiación	82
9.RESULTADOS.....	83
Análisis descriptivo	83
Características basales	83
Descriptivo del endometrio durante la evolución del estudio.....	84
Descriptivo de los parámetros bioquímicos durante la evolución del estudio.....	86
Evolución de la Progesterona tisular durante el protocolo del estudio.....	88
Descriptivo de la ventana de implantación endometrial	88
Análisis comparativo según el grupo de randomización	90
Características basales	90
Línea endometrial en la fase proliferativa y día 5 de Progesterona	90
Patrón hormonal sérico durante la fase proliferativa y día 5 de Progesterona	91
Relación entre la progesterona sérica y la progesterona tisular	94
Ventana de implantación endometrial: receptividad endometrial	96
Relación entre la línea endometrial y la receptividad endometrial.....	96
Relación entre la Progesterona sérica y la receptividad endometrial.....	99
Relación entre la Progesterona tisular y la receptividad endometrial.....	101
Distribución gráfica de la Progesterona tisular en relación con la sérica con la receptividad endometrial.....	105
Valor de la Progesterona sérica en función de la receptividad endometrial	108
Valor de la Progesterona tisular en función de la receptividad endometrial	111
Estudio multivariante: relación entre la Progesterona tisular y la sérica en relación con la ventana de implantación.	113
Análisis de las curvas Roc: relación de la Progesterona sérica y la ventana de implantación.	117
Análisis de las curvas roc: relación de la Progesterona tisular y la ventana de implantación.	118
.....	118
10.DISCUSIÓN.....	119
11. PRESPECTIVAS Y APLICABILIDAD	130
12.CONCLUSIONES.....	132
13. BIBLIOGRAFÍA.....	133

14.ANEXOS.....	151
ANEXO I: Aceptación del proyecto de investigación por parte del CEIC PSMAR	151
ANEXO II: Hoja informativa y consentimiento informado.....	154
ANEXO III Procesamiento del RNA para la técnica transcriptómica	159
ANEXO IV: Kit Elisa para procesar la Progesterona tisular del endometrio	164

1.RESUMEN ESTUDIO

INTRODUCCIÓN

La Progesterona, es una hormona imprescindible para la regulación del ciclo menstrual y sus fluctuaciones pueden modificar el objetivo del ciclo menstrual que es la gestación, a pesar de la importancia de la Progesterona no tenemos estudios donde detallen los niveles estándares durante el proceso, es por eso por lo que creemos necesario determinar los niveles durante el proceso de preparación endometrial y relacionarlo con el momento de la receptividad del endometrio.

El objetivo del estudio es valorar si la Progesterona tisular (Pt) y sérica (Ps) se relaciona con la ventana de implantación (VDI) como un biomarcador.

MATERIAL Y MÉTODOS

Realizamos un ensayo clínico cruzado prospectivo randomizado desde abril hasta noviembre 2022. Participaron 22 pacientes sometidas a un ciclo de prueba de THS donde se aleatorizó para realizar una biopsia de endometrio en el día 3.5 (DP3.5) de tratamiento con Progesterona, día 5 (DP5) y día 6.5(DP6.5) y se estudió la Pt y la receptividad endometrial.

RESULTADOS

Se realizaron un total de 44 biopsias de endometrio. La media de edad de las pacientes fue de 36.45 +/- 3.95 años.

Evidenciamos una relación lineal entre la Pt y la VDI solo el DP3.5 (p 0.04), el resto de los días no existe una relación lineal, DP5 (p 0.23) y el DP6.5 (p 0.77).

Identificamos el rango de Pt en pacientes receptivas, DP5 donde el 80% son receptivas entre (180-80 ngP4/ml) y determinamos el punto de corte 120 ngP4/ml con una sensibilidad de 67% y especificidad 40%.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El resultado del estudio pone de manifiesto la importancia de la Progesterona en la receptividad endometrial pero no demuestra su utilidad como biomarcador de la receptividad endometrial.

No identificamos diferencias significativas entre la Progesterona sérica, tisular y la línea endometrial para distinguir entre los diferentes estados de receptividad, pero si categorizamos por grupos de receptividad se puede distinguir de manera significativa el estado post receptivo.

En el análisis multivariante se identifica una asociación entre la Progesterona tisular y la sérica al inicio de la ventana de implantación, en ese momento, la Progesterona tisular depende de la Progesterona sérica un 94%. Por lo que creemos que la asociación entre progesteronas existe y que es determinante al inicio del tratamiento.

2. ABSTRACT

INTRODUCTION

Progesterone is an essential hormone for the regulation of the menstrual cycle, and its fluctuations can impact the goal of the cycle, which is gestation. Despite its importance, there is a lack of detailed studies on standard progesterone levels during the process. Therefore, it is necessary to determine these levels during the endometrial preparation process and correlate them with endometrial receptivity.

The objective of this study is to assess whether tissue Progesterone (Pt) and serum Progesterone (Ps) are related to the window of implantation (VDI) as a biomarker.

MATERIALS AND METHODS

A prospective randomized crossover clinical trial was conducted from April to November 2022. Twenty-two patients undergoing a trial of hormone replacement therapy (THS) were enrolled. They were randomized to undergo endometrial biopsies on day 3.5 (DP3.5) of progesterone treatment, day 5 (DP5), and day 6.5 (DP6.5). The Pt and endometrial receptivity were studied.

RESULTS

A total of 44 endometrial biopsies were performed, and the mean age of the patients was 36.45 +/- 3.95 years. The study revealed a linear relationship between Pt and VDI only on DP3.5 (p 0.04), while no linear relationship was observed on DP5 (p 0.23) and DP6.5 (p 0.77).

The study identified the Pt range in receptive patients on DP5, where 80% of them exhibited receptivity between (180-80 ngP4/ml), and a cutoff point of 120 ngP4/ml was determined with a sensitivity of 67% and specificity of 40%.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The study's results highlight the importance of progesterone in endometrial receptivity but do not demonstrate its utility as a biomarker for endometrial receptivity.

While there were no significant differences between serum progesterone, tissue progesterone, and endometrial lining in distinguishing between different receptivity states, categorizing patients by receptivity groups did allow for a significant distinction of the post-receptive state.

The multivariate analysis identified an association between tissue progesterone and serum progesterone at the beginning of the window of implantation, indicating that tissue progesterone depends on serum progesterone by 94% at that moment. Thus, the study suggests that there is an association between progesterones and that it is crucial at the beginning of treatment.

3.ABREVIATURAS

FIV	Fecundación in vitro
ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
VDI	Ventana de implantación
FRI	Fallo recurrente de implantación
HCG	Gonadotropina coriónica humana
P4	Progesterona
Pt	Progesterona tisular
Ps	Progesterona sérica
E	Estradiol
D	Día
D2	Día 2 del ciclo
D8	Día 8 del ciclo
DP3.5	Día 3.5 tras iniciar progesterona en el estudio
DP5	Día 5 tras iniciar progesterona en el estudio
DP6.5	Día 6.5 iniciar progesterona en el estudio
LH	Hormona luteinizante
FSH	Hormona foliculoestimulante

RT-q PCR	Reacción cadena polimerasa a tiempo real
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
TRA	Técnicas reproducción asistida
THS	Tratamiento hormonal substituido
TEC bajo THS	Transferencia embriones congelados tras Terapia hormonal sustituida
CT	Células de la Teca
CG	Células de la Granulosa
CL	Cuerpo Lúteo
RFA	Recuento folículos antrales
CRD	Cuaderno de recogida de datos
DGP	Diagnóstico preimplantacional
LE	Línea endometrial
TEC	Transferencia embriones congelados
hCG	Gonadotropina coriónica humana
LIF	Factor inhibidor de la leucemia
IL-1 β	Interleucina-1 beta, factores de crecimiento similares a factores de crecimiento epidérmico
COX-2	Ciclooxigenasa-2

PGE2	Prostaglandina E2,
CSF-1,	Factor 1 estimulante de colonias
NOTCH1	Receptor 1 Notch,
OPN	Osteopontina
MUC-1	Mucina 1
MMP	Metaloproteinasas
EGFL7	Dominio 7 similar al factor de crecimiento epidérmico
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
PA	Activador del plasminógeno,
Células c / d TCR positivas activadas	Células del timo con receptores de célula T es el proceso en el cual los timocitos cuyos RCT que se unen con una baja afinidad a las moléculas del SPH expresadas sobre las células epiteliales, son rescatadas de la muerte celular programada y estimuladas a sobrevivir.
PK-B	Proteína quinasa B

TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
TIMPs	Inhibidor tisular de metaloproteinasas
qRT-PCR	PCR cuantitativa o PCR a tiempo real
EREG	Epirregulina,
PAI-1	Inhibidor-1 del activador del plasminógeno
AREG	Anfiregulina,
uNK	<i>Células natural killer uterinas</i>
PR	Receptor de progesterona, PR -A y PR-B.
MEC	Matriz extracelular
ETV	Trofoblasto extravelloso
Sistema FASL/FAS	Sistema apoptosis linfocitos periféricos
LPS	Soporte de la fase lútea (luteal phase support)
iLPS	Soporte de la fase lútea individualizado
R	Receptivo
Pre-R	Pre receptivo
Post-R	Post receptivo

4.INTRODUCCIÓN

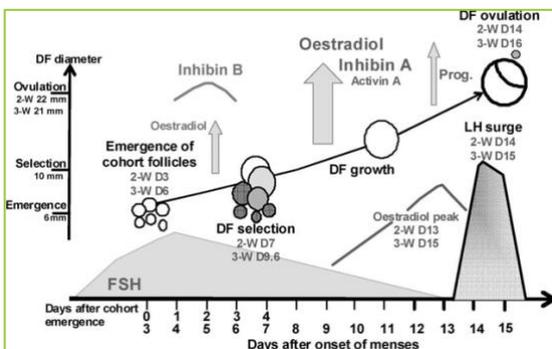
CICLO MENSTRUAL.

El ciclo menstrual, también conocido como ciclo endometrial, es el periodo comprendido entre el primer sangrado menstrual y el inicio de la menstruación del siguiente ciclo. Durante este tiempo, además, se produce la maduración del ovocito, la ovulación y su llegada al útero, fertilizado o no (Figura 1). La duración media en humanos es de 28 días, estando la mayoría de ellos entre 25 y 30 días (1). Casi todas estas variaciones se deben a modificaciones en la duración de la fase proliferativa del ciclo menstrual.

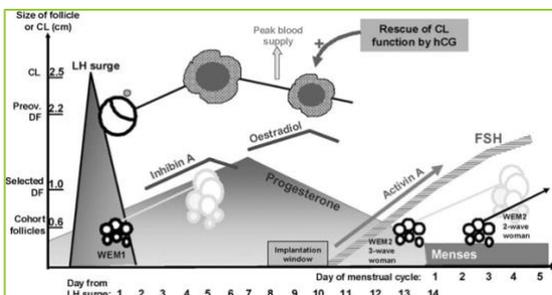
El ciclo menstrual está definido por el ciclo ovárico como respuesta a las hormonas esteroideas. La retroalimentación negativa del ovario sobre la secreción de gonadotropinas es muy potente en los primeros años de vida, siendo mínima después de la menopausia(2) **Figura 1.**

Figura 1 Ciclo menstrual

Descripción del ciclo menstrual (3)



Descripción fase proliferativa, fase lútea, producción folículo dominante (FD) y el cuerpo lúteo (CL)



M. Mihm et al. / Animal Reproduction Science 124 (2011) 229–236

Consta de dos fases: la fase proliferativa seguida de la fase secretora. La fase proliferativa comienza con la menstruación y termina con la ovulación. La principal característica de este periodo es el desarrollo de los folículos ováricos. La duración de la fase secretora es de 14 días en la mayoría de las mujeres. Durante esta fase el folículo ovulatorio se transforma en cuerpo lúteo e inicia la secreción de progesterona, cuya principal función es preparar al endometrio para que responda a los estrógenos y se pueda producir una correcta implantación del óvulo fecundado.

Las dos principales hormonas esteroideas secretadas por los ovarios son estradiol, en la fase folicular y la progesterona en la fase lútea. Sin embargo, el papel de cada uno no se limita a ciertas etapas del ciclo menstrual, y son importantes reguladores de la secreción de gonadotropinas en todo el ciclo. Por ejemplo, la progesterona, aunque en baja concentración, también está presente en la circulación durante la fase folicular del ciclo y un papel endocrino fisiológico importante durante el ciclo menstrual(4) **Figura 2.**

Figura 2: Patrón genético ciclo menstrual

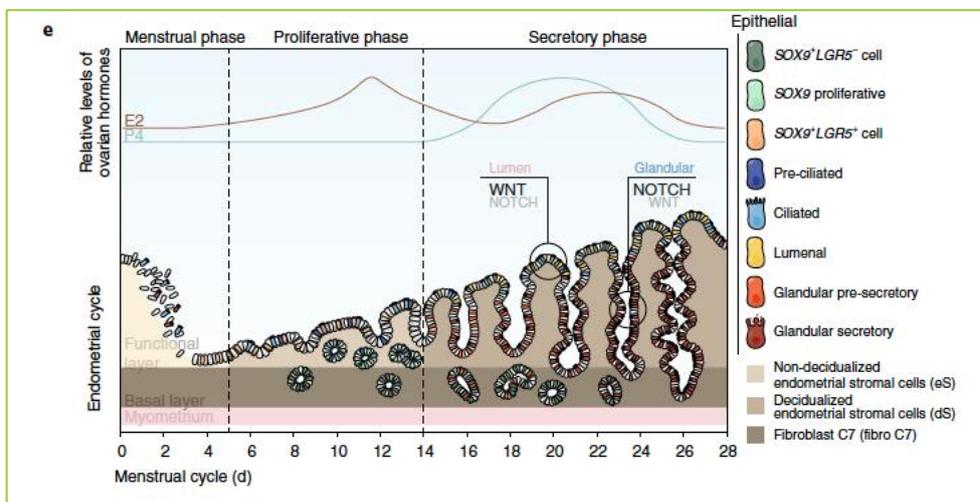


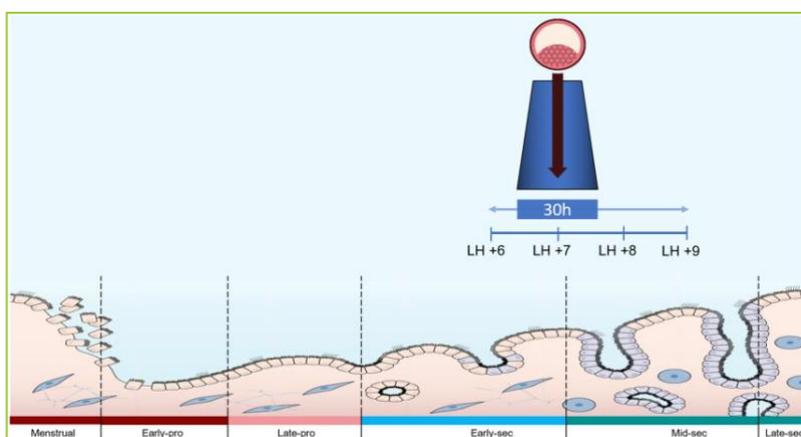
FIGURA 2 *Nature genetics* | vol 53 | December 2021 | 1698–1711 | [www.nature.com/naturegenetics1698-1711\(5\)](http://www.nature.com/naturegenetics1698-1711(5))

El endometrio humano experimenta cambios periódicos durante el ciclo menstrual en respuesta a hormonas esteroideas.

La finalidad de todos estos cambios es alcanzar la receptividad endometrial y facilitar la implantación embrionaria. El periodo en el que el endometrio es receptivo se denomina ventana de implantación (VDI) (6)(7)(8).

La VDI se define como el período autolimitado durante el cual el medio uterino es favorable para la aceptación del blastocisto para la implantación. Suele coincidir con el día 20 al 24 de un ciclo menstrual regular (es decir, entre el día 7 y el día 11 después del aumento de LH: LH+7–LH+11) (9) sin embargo, la duración óptima de la VDI es restringidamente corta y solo dura aproximadamente 24–48 h en humanos (10)(9) **Figura 3.**

Figura 3 : Ventana de implantación endometrial



Human Reproduction Open, Vol.00, No.0, pp. 1–11, 2021

FIGURA 3 Diagrama que representa la duración y el momento de la ventana de implantación (VDI). (11) La VDI dura aproximadamente 30– 36 horas y, dependiendo de la paciente, ocurre entre LH+6 y LH+9 en ciclos naturales o entre P+4 y P+7 en ciclos substituido en TRA.(12)

En cualquier otro periodo del ciclo menstrual el endometrio no es receptivo y la implantación embrionaria no puede ocurrir con éxito (13). Durante la VDI el epitelio endometrial adquiere un estado dependiente de hormonas esteroideas producidas a nivel ovárico que permiten la adhesión del blastocisto (14).

En ciclos naturales el endometrio es controlado por las hormonas esteroideas ováricas, estradiol y progesterona mediante su unión a receptores de alta afinidad, desencadenando una cascada de señales que alteran la expresión génica endometrial (15).

De esta manera se producen una serie de cambios morfológicos, estructurales y bioquímicos que preparan al endometrio para la implantación embrionaria.

En los ciclos de reproducción asistida, donde se utiliza un ciclo substituido para la transferencia embrionaria que evita la ovulación y por tanto la producción del cuerpo lúteo. Los beneficios de la suplementación con progesterona en la fase lútea ya han sido probados, y los datos sobre los beneficios de la suplementación adicional con estradiol aún necesitan una mejor evaluación para que pueda aplicarse con seguridad (16,17). Recientemente se ha sugerido que los beneficios de esta suplementación adicional son más evidentes cuando se aplican después del uso de protocolos de inhibición ovárica con antagonista de GnRH (18), por lo que todavía se necesitan estudios para poder valorar la suplementación estandarizada de estradiol, a excepción de los protocolos donde no se produzca de manera endógena cuerpo lúteo (19).

IMPORTANCIA DE LA PROGESTERONA

La Progesterona, también conocida como P4 o pregn-4-en-3,20-diona, es una hormona esteroide C-21 involucrada en el ciclo menstrual femenino, el embarazo (promueve la gestación) y la embriogénesis, tanto en los seres humanos como en otras especies.

La Progesterona pertenece a una clase de hormonas llamadas progestágenos y es el principal progestágeno humano de origen natural. Sus fuentes principales son el ovario (cuerpo lúteo) y la placenta, aunque también puede sintetizarse en las glándulas adrenales y en el hígado.

Cuatro grupos a mediados de la década de 1930, casi simultáneamente, se involucraron en el aislamiento de la progesterona (20). Inicialmente en 1933 Allen (21), juntamente con su profesor Corner, describió la progesterona, y posteriormente, Butenandt en 1934 aisló la progesterona, estableció su estructura y la sintetizó (22). En 1943, Russel Marker, trabajando en México, pudo sintetizar (23,24) libras de progesterona utilizando la planta Dioscorea como material de partida. Esto abrió el campo a los procedimientos sintéticos a gran escala (20)(25).

Durante muchos años, debido a la biodisponibilidad oral limitada, la vía

intramuscular de administración de progesterona fue la más común. En 1980, una forma oral micronizada de progesterona suspendida en aceite estuvo disponible en Francia. Además de la administración de progesterona por vía oral e intramuscular, también se administra por vía vaginal desde hace más de 20 años (26), por implante (27), por vía subcutánea (28) y por vía rectal (24). La entrega transdérmica de progesterona también ha sido investigada (26).

PRINCIPAL PAPEL DE LA PROGESTERONA

La Progesterona es una hormona con efectos sobre las vías reproductivas femeninas, glándula mamaria, sistema nervioso central e hipófisis.

La principal función de la Progesterona es la función reproductiva, es promover la diferenciación secretora en el endometrio después de la ovulación y durante la fase lútea (29). Estos cambios tienen como objetivo preparar el útero para la implantación del óvulo fecundado. Además de este efecto sobre el endometrio, la progesterona disminuye la fuerza y la frecuencia de las contracciones uterinas para evitar la expulsión del embrión recién implantado y mantiene un entorno inactivo para el desarrollo fetal (30). Además, influye en la actividad del sistema inmunitario intrauterino a través de la regulación de la producción de mediadores inflamatorios a partir de las células T. Esta acción de la progesterona también ayuda a mantener el embarazo al aumentar la protección inmunológica contra cualquier amenaza microbiana potencial (31) (32).

PAPEL DE LA PROGESTERONA DURANTE EL CICLO MENSTRUAL

La Progesterona se libera en el cuerpo lúteo ovárico durante la segunda parte del ciclo menstrual (fase lútea), deteniendo los cambios endometriales inducidos por los estrógenos (acción anti estrogénica) y estimulando los cambios madurativos, preparándolo así para la implantación del embrión y mantenimiento del embarazo (acción gestágena), al disminuir la contractilidad uterina. Mediante la regulación inhibe la secreción de la gonadotropina lúteo estimulante (LH). La declinación brusca de progesterona hacia el final del ciclo determina la aparición de la menstruación. Asimismo, regula la producción de la mucosidad

endocervical y los cambios mamarios durante el ciclo. La progesterona natural no tiene acción androgénica pero sí antialdosterona.

La Progesterona es la hormona principal en la fase lútea. Desempeña un papel fundamental en la preparación del útero para un posible embarazo, y en mantenerlo (33).

ÓRGANO DIANA DE LA PROGESTERONA: ÚTERO (ENDOMETRIO, MIOMETRIO, CÉRVIX UTERINO)

En estudios in vivo con ratones, antes de la implantación del embrión en el ratón, la proliferación del epitelio luminal del endometrio se produce en respuesta a la elevación de los niveles de estrógeno peri ovulatorio (34,35). Después de la ovulación, la fecundación y el desarrollo progresivo del cigoto a la etapa de blastocisto activa sus dos distintos linajes celulares (la masa celular interna y el trofocotodermo externo), y van creciendo los niveles de progesterona sistémica endógena y la secretada por el cuerpo lúteo ovárico producido durante la ovulación, provocando la proliferación de células del estroma endometrial, que se potencia por un pequeño pico en la implantación de los niveles de estrógeno. Paralelamente, la progesterona suprime la proliferación inducida por estrógenos del epitelio endometrial, que resulta en la transición del epitelio de proliferativo a un estado diferencial para volverse temporalmente permisivo a adhesión e invasión embrionaria. En respuesta al embrión apego ('la reacción de apego'), las células estromales fibroblásticas subyacentes se someten a una extensa proliferación y diferenciación dependiente de progesterona para convertirse en células deciduales epitelioides poligonales, un proceso de transformación denominado decidualización. Como resultado de la decidualización endometrial en el epitelio luminal, las células experimentan entosis en el sitio de implantación, lo que permite que las células trofoblásticas del blastocisto rompan la lámina basal subyacente e invadan el tejido estromal decidualizado del endometrio(21).

La decidualización impulsada por la progesterona se acompaña por la angiogénesis y la entrada de leucocitos, tales como *células natural killer uterinas* (uNK) y monocitos. Además, los estudios moleculares proporcionan consistencia para confirmar la asociación para la inducción de progesterona de la interleucina (15) (y su receptor) en las células del estroma endometrial como una representación esencial para la señal en la diferenciación de células uNK inmaduras a células maduras (36,37).

La dependencia de la receptividad uterina y de la decidualización de la progesterona representa uno de los momentos reproductivos más cruciales para que se ejecuten los cambios celulares necesario para conseguir una interfase fetoplacentaria exitosa (44). Las acciones de la progesterona en los tejidos uterinos (endometrio, miometrio y cuello uterino) están mediadas por los efectos combinados de dos isoformas del receptor de progesterona (PR), denominadas PR-A y PR-B.

Ambos receptores funcionan principalmente como factores de transcripción activados por ligandos. La acción de la Progesterona sobre los tejidos uterinos está determinada cualitativa y cuantitativamente por los niveles relativos y las actividades transcripcionales de PR-A y PR-B. La actividad transcripcional de las isoformas de PR se ve afectada por co-reguladores transcripcionales específicos y por modificaciones postraduccionales de PR que afectan la orientación del promotor génico. En este contexto, la expresión y función temporal y específica de células apropiadas de PR-A y PR-B son críticas para la función uterina normal (38) (**Figura 4**).

Figura 4: Señalización molecular decidualización

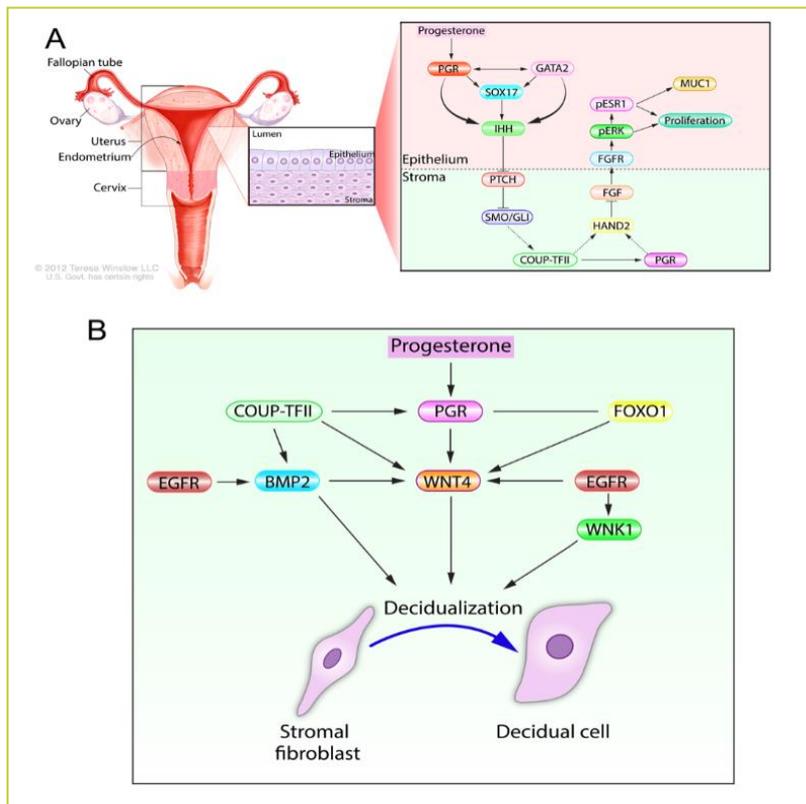


Figura 4 Una propensión a la complejidad: señalización molecular requerida para la receptividad y decidua uterina dependiente de progesterona. (A) La vía de señalización progesterona-PGR-IHH-COUP-TFII, que abarca los compartimentos celulares epiteliales y estromales del endometrio, controla la actividad de ESR1 en el epitelio endometrial. Dicho control de ESR1 es necesario para la diferenciación epitelial y el desarrollo del endometrio receptivo para la implantación del embrión. Para mayor claridad, otras señales (es decir, Msx 1 y 2), que son importantes para la receptividad uterina, no se incluyen en este esquema. (B) Una selección de vías de señalización inducidas por progesterona requeridas para la decidua de células del estroma endometrial durante el período de peri-implantación. Adaptado con permiso en forma modificada de Wu et al. (2018). *Downloaded from Bioscientifica.com at 11/27/2022 04:31:36PM via free access*

La Progesterona afecta a las células en cada uno de los tipos de tejidos funcionales del útero (endometrio, miometrio, cérvix uterino), y PR-A y PR-B son detectables en células epiteliales y estromales/deciduales en el endometrio (39), células de músculo liso en el miometrio (40) y fibroblastos del estroma en el cuello uterino (41). Los efectos de la progesterona en estas células están mediados por su interacción con receptores de progesterona (PR) específicos, y sus acciones pleiotrópicas se deben a variaciones específicas del tipo celular en la señalización de PR.

La etiología de las patologías uterinas, incluidas la endometriosis, el leiomioma,

el cáncer de endometrio, el cáncer de cuello uterino y la pérdida recurrente del embarazo, se ha asociado con una señalización aberrante de PR. En consecuencia, las terapias dirigidas a corregir problemas con la señalización de progesterona mediada por PR son prometedoras para el tratamiento de múltiples trastornos uterinos (38).

El endometrio es un tejido uterino extraordinariamente dinámico que exhibe cambios drásticos dependientes de hormonas esteroides en su morfología y función durante el ciclo menstrual y durante el embarazo. Está compuesta por células estromales y epiteliales dispuestas en dos zonas morfológica y funcionalmente distintas: la basal interna, compuesta principalmente por células estromales, y la funcional externa, que contiene células estromales y epiteliales. La progesterona ejerce efectos específicos sobre las células epiteliales y estromales del endometrio. Durante la fase folicular preovulatoria, la zona funcional externa se espesa en respuesta a los estrógenos (principalmente estradiol) por la proliferación de células epiteliales y estromales. La proliferación celular es inhibida por la progesterona durante la fase lútea post-ovulatoria y se produce un cambio morfológico y funcional para establecer un epitelio endometrial secretor glandular y un estroma vascular propicio para la implantación del blastocisto y el establecimiento del embarazo. En las células del estroma endometrial, la progesterona aumenta la proliferación durante la fase folicular y durante la fase peri-implantación (38).

El miometrio y el cuello uterino también experimentan cambios en respuesta a los estrógenos y la progesterona durante el ciclo menstrual, aunque menos dinámicos en comparación con los del endometrio.

El miometrio, que forma la mayor parte del útero, está compuesto por células de músculo liso miometrial dispuestas en haces entrelazados orientados al azar. La Progesterona y el Estrógeno promueven el crecimiento miometrial principalmente al estimular la hiperplasia y la hipertrofia de las células miometriales. Después de la menopausia, el miometrio se vuelve atrófico y el tamaño del útero se reduce a aproximadamente la mitad de su tamaño. Las células miometriales contienen PR-A y PR-B durante todo el ciclo menstrual y durante el embarazo. La Progesterona afecta la actividad contráctil de las

células miometriales. Durante la fase proliferativa dominada por estrógenos, las ondas peristálticas de las contracciones miometriales aumentan gradualmente en frecuencia e intensidad y, en el momento de la ovulación, la dirección de las ondas es predominantemente desde el cuello uterino hasta el fondo (42,43). Las ondas disminuyen durante la fase secretora post-ovulatoria dominada por Progesterona, presumiblemente debido a las acciones relajantes de la Progesterona, y las contracciones aumentan en asociación con la disminución de los niveles de progesterona al final de la fase secretora y durante la menstruación. Estos efectos están mediados por los PR nucleares ya que la administración del antagonista de PR nuclear, Mifepristona, aumenta las contracciones uterinas durante la fase secretora (44)(45). Asimismo, durante el embarazo, los PR nucleares expresados por las células miometriales median las acciones relajantes de la Progesterona y la inhibición de esta actividad por el tratamiento con la Mifepristona aumenta la contractilidad y la excitabilidad miometriales y, en la mayoría de los casos, induce el trabajo de parto y el parto (46). Se cree que la disminución de la Progesterona en el embarazo humano está mediada por una mayor expresión de PR-A, posiblemente debido a una metilación alterada de la región promotora de PR-A (47), lo que lleva a un cambio en la relación PR-A: PR -B a la dominancia PR-A, que se cree que inhibe las acciones progestacionales mediadas por PR-B (48). La retirada o interrupción de las acciones de progesterona mediadas por PR generalmente conduce al vaciado uterino, es decir, medición o parto, que implica un aumento de la contractilidad del miometrio y la inflamación a nivel tisular PR en la fisiopatología uterina, dentro del endometrio, el miometrio (49) y el cuello uterino (50).

El cuello uterino está compuesto de fibroblastos del estroma y células epiteliales escamosas y se puede dividir en tres compartimentos anatómicamente distintos: (i) el exocérnix que se proyecta hacia la vagina y está revestido por epitelio escamoso estratificado grueso, (ii) el endocérnix que forma el revestimiento del canal cervical y comprende una sola capa de células epiteliales secretoras de moco cilíndricas que forman surcos y túneles profundos; y el estroma que comprende la mayor parte del cuello uterino y está compuesto por fibroblastos cervicales que producen una matriz extracelular

(MEC) colágena resistente (51).

Los PR se localizan en el núcleo de los fibroblastos estromales y las células epiteliales escamosas basales, pero están ausentes en las células epiteliales escamosas intermedias y superficiales(52) . Durante la fase proliferativa del ciclo menstrual, el epitelio endocervical, en respuesta a los estrógenos, produce una mucosidad fina y acuosa que favorece el paso de los espermatozoides al útero. Por el contrario, durante la fase secretora, la Progesterona promueve la producción de un moco cervical viscoso, que forma un tapón que restringe el paso de los espermatozoides y los microorganismos de la vagina. El estrógeno ablanda el estroma cervical al afectar la síntesis y descomposición del colágeno y promover la absorción de agua. Por el contrario, la Progesterona, especialmente durante el embarazo, promueve el cierre cervical al aumentar la producción de colágeno y la rigidez, estos efectos están mediados por PR que, en respuesta a la Progesterona, modulan la expresión de genes cuyos productos promueven la síntesis de colágeno e inhiben su descomposición (53,54)(55–58). La Progesterona también antagoniza la expresión de colagenasa inducida por estrógenos (57,58) e inhibe la síntesis de hialuronato en fibroblastos endocervicales humanos (59,60).

La Progesterona tiene un papel fundamental en la relajación muscular una vez conseguido el objetivo de la gestación, para facilitar la implantación; o en la contracción muscular, cuando no se ha conseguido la gestación y se produce la menstruación preparando el endometrio para un nuevo ciclo menstrual.

PAPEL DE LA PROGESTERONA DURANTE LA IMPLANTACIÓN

La comunicación hormonal entre el hipotálamo, la hipófisis, el ovario y el útero regula el ciclo reproductivo femenino para proporcionar ovocitos fecundables y un entorno favorable para la implantación del embrión y el crecimiento fetal. En el ovario se produce una secuencia recurrente de desarrollo celular, diferenciación, supervivencia y muerte celular, más conocida como foliculogénesis, ovulación, luteinización y luteólisis a lo largo de la vida fértil de la hembra. Ivell R et al describe la transformación de las células de la teca (TC) y de la granulosa (GC) productoras de hormonas del folículo ovárico durante la formación, el rescate o la regresión del cuerpo lúteo (CL) (61) (62,63).

La Progesterona es una hormona esteroide que se produce a partir del cuerpo lúteo de los ovarios y de la placenta. La principal función de la Progesterona es promover la secreción y diferenciación en el endometrio del útero. Para mantener el embarazo, al inhibir las contracciones uterinas, la Progesterona realiza sus acciones activando los receptores nucleares de Progesterona clásicos que afectan a los genes transcripción y por la activación no clásica de la superficie celular receptores de membrana que explican las acciones rápidas de Progesterona (32).

La Progesterona es crítica para el establecimiento y el mantenimiento de embarazo, tanto por sus efectos endocrinos como inmunológicos. Las acciones de la Progesterona están mediadas por la progesterona intracelular, receptores; A y B. y a través de una proteína llamada factor de bloqueo inducido por P4 (PIBF), induce la producción de citoquinas dominantes TH2, que media los efectos inmunológicos de la Progesterona. La Progesterona juega un papel en el útero con la localización de las células NK y regula al alza la expresión del gen HLA-G, el ligando para varios receptores inhibidores de NK. Estos hallazgos indican la importancia de una inmunomodulación dependiente de progesterona en tolerancia materna del feto, a pesar de que las vías y los patrones no estén bien establecidas, ni se conozcan todos los receptores implicados (62).

El efecto de Progesterona en el sistema inmunológico, con la excepción de los leucocitos humanos (HLA)-C, complejo polimórfico mayor de histocompatibilidad (MHC) no se expresa en el trofoblasto humano, y esto crea una situación inmunológica única. Aunque los macrófagos deciduales y las células dendríticas pueden presentar antígenos fetales tanto a los CD4+ deciduales como a Células CD8+, estos antígenos presentados por trofoblastos son poco probable que sean reconocidos de una manera restringida por MHC.

En la decidua, hay un aumento significativo número de células c / d TCR positivas activadas (63,64). Como la mayoría de las células T c/d son capaces de reconocer antígenos extraños sin restricción MHC, podrían ser candidatos para "ver" los antígenos presentados por el trofoblasto.

En sangre periférica de gestantes sanas, el número de células T c / d está significativamente aumentado, y casi todos expresan nPR, sugiriendo una activación previa. Estas células pueden ser de origen decidual, que, después de la activación por el trofoblasto los antígenos presentados, aparecen en la circulación periférica (65).

Las células T expresan los PR y al unirse a Progesterona, producen un mediador llamado PIBF (66) En muestras de orina de mujeres embarazadas sanas, concentración de PIBF continuamente aumenta hasta la semana 37 de gestación, seguida de una lenta disminución hasta el término. En embarazos que terminan en aborto espontáneo o parto prematuro, en orina los niveles de PIBF no aumentan durante el embarazo (62).

El efecto de la Progesterona sobre el sistema inmunológico de las embarazadas podría estar parcialmente mediadas por receptores (67–70).

Hallazgos recientes sugieren que Progesterona podría actuar directamente a través de receptores de Progesterona específicos de membrana para suprimir la activación de células T durante el embarazo. (71) Después reconocimiento de antígenos fetales, c/d materno activado (62).

La Progesterona es indispensable para crear un entorno endometrial adecuado para la implantación, y también para el mantenimiento del embarazo. El éxito del embarazo depende de una respuesta inmunitaria materna adecuada al feto. Junto con sus efectos endocrinos.

La Progesterona actúa como un "inmuno esteroide", contribuyendo al establecimiento de un medio inmunitario protector del embarazo. La progesterona juega un papel en la localización uterina células NK y regula al alza la expresión del gen HLA-G, el ligando inhibidor y activador de NK receptores.

A altas concentraciones, la progesterona es un potente inductor de tipo Th2. citocinas, así como la producción de LIF y M-CSF por parte de las células T. Una proteína llamada progesterona inducida factor de bloqueo (PIBF), mediante la inducción de una producción de citoquinas Th2-dominante media los efectos inmunológicos de la progesterona. PIBF se une a un nuevo tipo de receptor de IL-4 y da señales a través de la vía Jak/STAT, para inducir una serie de genes, que no solo afectan la respuesta inmune, pero también podría desempeñar un papel en la invasión del trofoblasto (72) (**Figura 5**).

Figura 5 implantación blastocisto

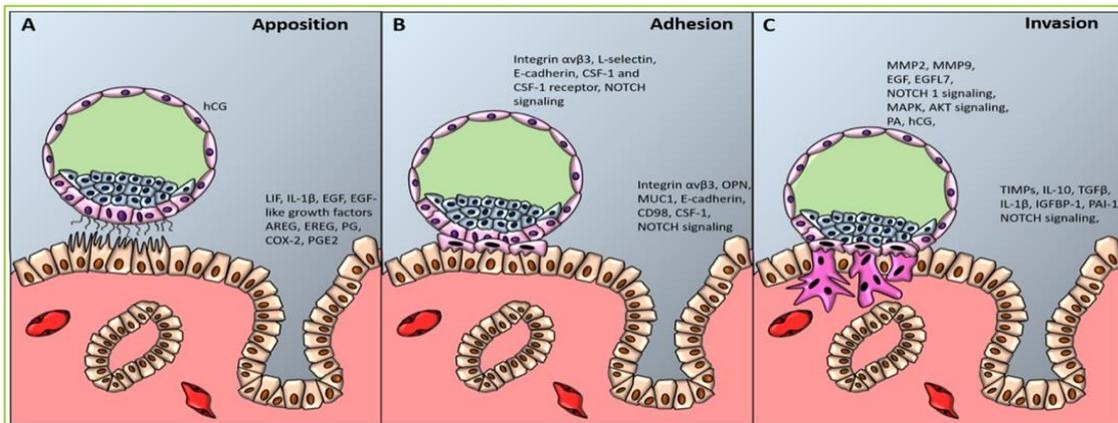


Figura 5 Aposición, adhesión e invasión de blastocistos. El diagrama muestra un blastocisto en etapa de pre-implantación (A, B) e invasor (C) (alrededor de 9 a 10 días después de la concepción) y los procesos y factores necesarios para la receptividad uterina y la aposición del blastocisto (A), adhesión (B) e invasión (C). hCG denota gonadotropina coriónica humana, factor inhibidor de la leucemia LIF, IL-1 β interleucina-1 beta, factores de crecimiento similares a factores de crecimiento epidérmico, AREG anfiregulina, EREG efiregulina, PG progesterona, COX-2 ciclooxygenasa-2, PGE2 prostaglandina E2, factor 1 estimulante de colonias CSF-1, receptor 1 NOTCH1 Notch, osteopontina OPN, mucina 1 MUC-1, metaloproteinasas MMP, dominio 7 similar al factor de crecimiento epidérmico EGFL7, proteína quinasa activada por mitógeno MAPK, proteína quinasa B AKT, PA activador del plasminógeno, factor de crecimiento transformante beta TGF β , inhibidor tisular de metaloproteinasas TIMPs, inhibidor-1 del activador del plasminógeno PAI-1. *Int. J. Mol. Sci.*2020,21,23; Doi: 10.3390/ijms21010023www.mdpi.com/journal/ijms (190) (178)

Aunque el papel fundamental de la Progesterona como vértice regulador hormonal de la biología preimplantacional uterina está bien establecido, nuestra comprensión fundamental de los mecanismos de señalización mediados por receptores nucleares mediante los cuales la Progesterona ejerce su acción en el endometrio está en auge como estudio. Sin duda, los esfuerzos en curso para identificar la clave mediadores moleculares y modificadores de la progesterona uterina acción proporcionará una visión mecanicista más profunda en los primeros establecimiento del embarazo y descubrir nuevas moléculas señales que pueden ser utilizadas en nuevos y más eficientes soluciones clínicas para abordar el fracaso preimplantacional, complicaciones gestacionales que ocurren en trimestres posteriores, y alteraciones reproductivas comunes derivadas de respuesta defectuosa a la Progesterona (21).

El embarazo se caracteriza por una leve inmunosupresión sistémica e inflamación. Tradicionalmente, la interfaz fetomaterna se comparó con una interacción injerto-huésped. Cada vez es más evidente que el embarazo es ahora una interacción reguladora codependiente entre la madre y el feto en desarrollo. La placenta produce y secreta activamente varios factores inmunomoduladores para evitar el rechazo del feto por parte del sistema inmunitario materno innato y adaptativo. De hecho, el reconocimiento inmunológico materno del feto se produce durante los embarazos sin complicaciones, y las células CD8CT activadas están presentes en la interfaz materno-fetal. La apoptosis es inducida en estas células por las células EVT que expresan FASL. La tolerancia inmunológica en la interfaz materno-fetal requiere una estrecha regulación temporal entre las redes inmunitarias y vasculares, que involucran múltiples mecanismos. Estos mecanismos realizan un acto de equilibrio para regular la invasión del trofoblasto. De hecho, la angiogénesis y la invasión del trofoblasto son procesos inmunológicamente activos; en lugar de "escapar" del reconocimiento materno, el feto aprovecha los mecanismos de vigilancia inmunológica materna para facilitar la supervivencia y el crecimiento (73).

IMPORTANCIA DE LA PROGESTERONA DURANTE LAS TRA

La Progesterona, tiene un papel crucial durante la fase lútea para conseguir la implantación del embrión a partir de cambios tanto en el endometrio, como a nivel molecular, como inmunológicamente para conseguir una tolerancia fetomaterna (33) .

Durante la TRA suele haber un déficit de fase lútea porque se inhibe la luteogénesis en muchos tratamientos y no se produce cuerpo lúteo por lo que es necesario complementar esta fase crítica para conseguir el objetivo, no sólo para la implantación sino también para el mantenimiento del propio embarazo. Entre todas las opciones disponibles, la administración exógena de progestágenos es la más utilizada, ya que han demostrado su eficacia y seguridad.(33). Aun así, permanece bajo discusión cuál sería la vía óptima de administración, el tipo, la dosis y la duración del tratamiento con progesterona (13).

Por lo tanto, para optimizar las TRA donde se inhibe la formación del cuerpo lúteo se debe realizar soporte de la fase lútea (luteal phase support, o LPS) que se puede realizar mediante. la gonadotropina coriónica humana (hCG), la gonadotropina, los agonistas de la hormona liberadora de hormonas (GnRH) o el estradiol también se pueden usar para promover el mantenimiento del embarazo, al igual como la Progesterona exógena (74) .

La Progesterona exógena puede administrarse por vía vaginal, oral, rectal, por vía subcutánea o intramuscular. Según una encuesta internacional realizada en 2014, la progesterona vaginal es la administración más utilizada (75). Existen preparados de progestágenos tanto naturales como sintéticos.

La evolución y la constante actualización de las TRA permite el estudio y la optimización del uso de la Progesterona como soporte y tratamiento para mejorar los resultados.

Se tiene evidencia y mucha información del perfil endocrino de la fase folicular y su valor predictivo para el resultado del tratamiento durante la estimulación ovárica controlada. En cambio, el perfil endocrino de la fase lútea de la estimulación ovárica rara vez se controla, aunque se sabe que la estimulación ovárica interfiere de múltiples formas en la fase lútea(76). Después de la estimulación ovárica con gonadotropinas, las concentraciones suprafisiológicas de progesterona y estradiol en la fase lútea interrumpen la secreción hipofisaria de LH provocando la muerte del cuerpo lúteo, hemorragia por privación y baja probabilidad de embarazo. El soporte con progesterona es, por lo tanto, vital para cubrir la ventana desde la desaparición de la HCG exógena hasta el aumento de la HCG endógena del blastocisto implantado. Aun así, la evidencia acerca de los niveles óptimos de Progesterona en el momento adecuado de la implantación es limitada, y son necesarios más estudios para poder correlacionar estos datos (13).

La creciente utilización de los agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina para desencadenar la ovulación, así como el uso generalizado de ciclos artificiales para la transferencia de embriones congelados, descongelados o donados ha renovado el interés en la fase lútea en mujeres sometidas a TRA.

El fenómeno del "defecto de la fase lútea" ahora se entiende como un continuo: hay menos deterioro con una estimulación más suave que con estimulación ovárica más intensa y menos deterioro después de la estimulación ovárica controlada y la ovulación con gonadotropina coriónica humana que después del agonista de la hormona liberadora de gonadotropina que desencadena la ovulación, esta última asociada con luteólisis rápida.

Por lo tanto, la intensidad del soporte de la fase lútea necesaria para lograr resultados óptimos depende del grado de defecto de la fase lútea encontrado en diferentes protocolos de tratamiento.

En última instancia, la fase lútea de un ciclo artificial en el que se suprime la ovulación, por lo tanto, el cuerpo lúteo está ausente y el establecimiento de la receptividad endometrial depende completamente de la progesterona exógena orquestada a la administración de esteroides sexuales, es la situación de

prueba de fuego para el estudio de la eficacia de diferentes preparaciones de apoyo a la fase lútea, dosis, regímenes y vías de la Progesterona (77).

Recapitulando, La producción y secreción de progesterona por el cuerpo lúteo es esencial para un endometrio adecuado. Si no se produce cuerpo lúteo, la transformación del endometrio secretor a decidualizado para la implantación se debe realizar de manera exógena con la administración de progesterona y estradiol.

Existe evidencia de que las concentraciones de Progesterona pueden variar en función el peso corporal, la edad, la hora de la muestra de sangre y la deficiencia progesterona de base, así como la importancia de las concentraciones séricas de progesterona antes transferencia de embriones congelados (TEC) y ser determinante en el éxito de la TRA (78) . Por lo que en la actualidad se está investigando en conseguir un soporte individualizado de la fase lútea para tener en cuenta todas las variables.

Del mismo grupo de investigadores, existe un estudio prospectivo donde su objetivo es proporcionar una evaluación personalizada de la estrategia para el tratamiento de reemplazo de Progesterona en pacientes sometidas TEC con nivel sérico de Progesterona bajo el día anterior a la transferencia. Sus resultados sugieren un umbral mínimo de Progesterona para mejorar los resultados reproductivos en TEC bajo THS con progesterona vaginal, que, si detectado, se puede superar en la mayoría de los casos mediante la adición de un diario inyección subcutánea. Tal beneficio podría ser proporcionado no sólo por el diferentes vías de administración de Progesterona para garantizar una exposición adecuada a Progesterona para las pacientes, sino también teniendo en cuenta la "ventana de oportunidad" relacionada a la adición de Progesterona antes de la transferencia de embriones (79).

Sin duda, se necesitan más estudios prospectivos para confirmar si el iLPS es una alternativa eficaz para mejorar los resultados para estas pacientes.

OTRAS FUNCIONES DE LA PROGESTERONA EN EL ORGANISMO

A lo largo de los años, la Progesterona se ha estudiado o utilizado para una variedad de indicaciones que incluyen la reproducción asistida, la amenaza aborto y el aborto habitual, la prevención del parto prematuro, la insuficiencia progestacional, el sangrado uterino disfuncional, el síndrome premenstrual, la dismenorrea, la endometriosis, los síntomas vasomotores de la menopausia, metabolismo óseo, para la prevención de la hiperplasia endometrial, como hormonoterapia en la menopáusica, y otros, por su múltiples acciones en diferentes órganos y su acción moduladora (en función de la circunstancia) a nivel de las células estromales fibroblásticas, epiteliales y musculares(25) (38) (21).

ENDOMETRIO Y RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL

El endometrio humano es la capa interna de la cavidad uterina. Está muy regulado hormonalmente y experimenta severos cambios periódicos que son la base del ciclo menstrual en humanos y en primates superiores. En el resto de los mamíferos se produce un ciclo menstrual, que es el tiempo transcurrido entre dos ovulaciones. Las principales diferencias en los ciclos estrales es que el endometrio no se desprende, sino que se reabsorbe, y, además, no están regulados hormonalmente (80).

Los cambios cíclicos producidos en los seres humanos van encaminados a la consecución de un estado receptivo endometrial, requisito para la implantación embrionaria y el desarrollo de la gestación (81). Para que se produzca con éxito la implantación, además, es necesario un diálogo molecular entre el embrión en estado de blastocisto y el endometrio receptivo (23).

ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL ENDOMETRIO

El endometrio humano es una mucosa compleja formada por dos capas principales: una capa basal o germinal que perdura ciclo tras ciclo y llamada capa basalis, y una capa funcional superficial transitoria, conocida como capa functionalis, que es eliminada y regenerada mensualmente (82).Sus

componentes tisulares están formados por un epitelio superficial de revestimiento y por componentes glandulares en el tejido estromal, que se encuentra densamente irrigado por vasos sanguíneos. Además, existen otros tipos celulares como células endoteliales o células inmunes residentes.

El epitelio luminal es cilíndrico simple, estando constituido tanto por células ciliadas como no ciliadas, incrementando su número durante la fase proliferativa del ciclo menstrual. Este aumento en la proporción de células no ciliadas y células ciliadas asciende de 30:1 a 15:1 en esta fase, con un gran descenso a los 20 días de hasta 50:1 (83) (84). A mitad del ciclo endometrial las uniones oclusivas entre estas células son más numerosas que al final del mismo, sugiriendo una disminución de estas durante la implantación embrionaria(85). Además, la ratio y la distribución de desmosomas también se encuentran disminuidos durante este mismo periodo (86).

Una de las funciones de este epitelio es la defensa frente a patógenos externos, aunque su función principal es permitir la implantación embrionaria. En él, se establece el primer contacto con el blastocisto, y se diferencia considerablemente durante la fase receptiva para facilitar la unión del embrión y que tenga lugar la implantación (86)(87)(88)(89)**Figura 6.**

Figura 6: Histología del endometrio

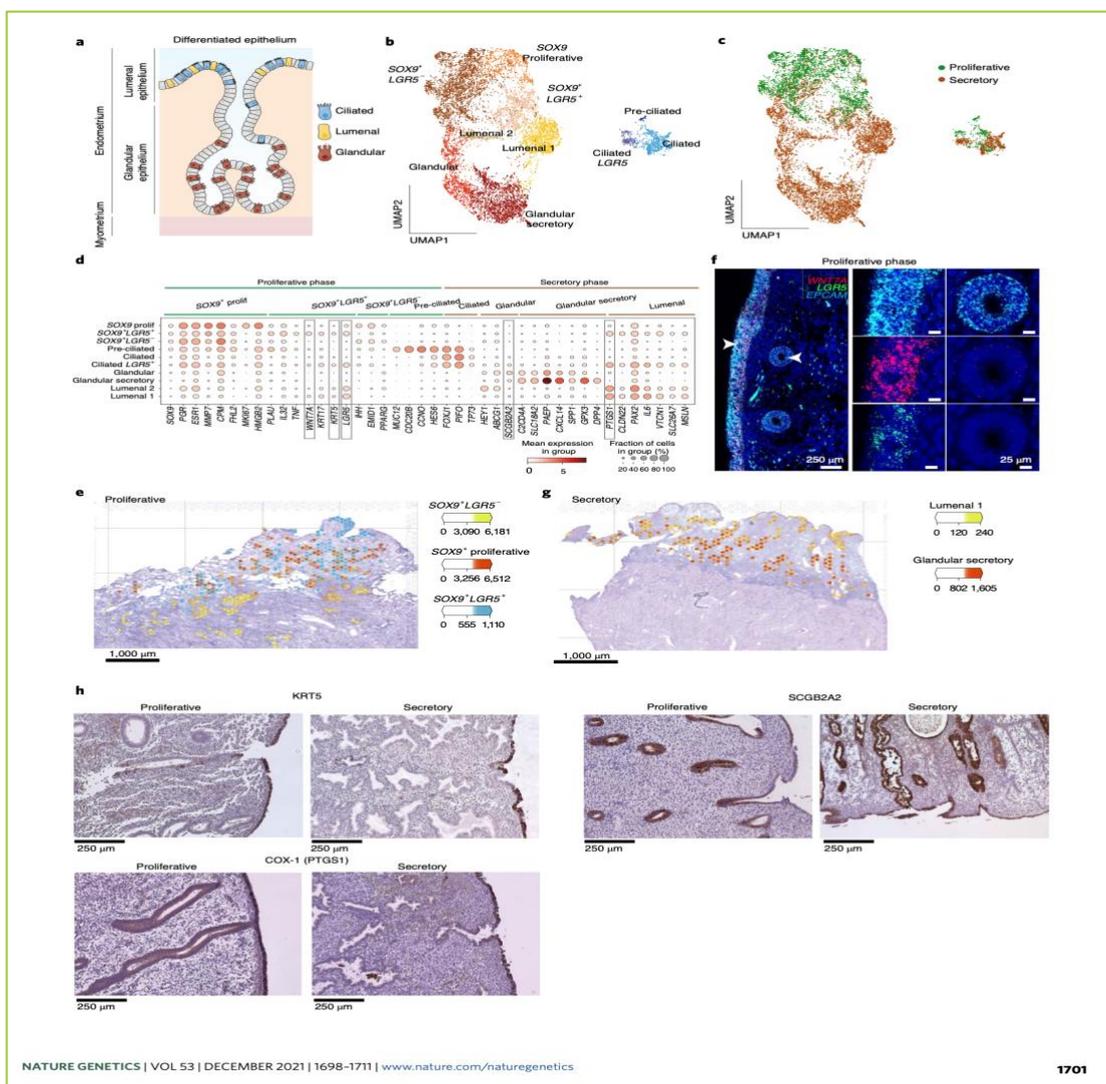


FIGURA 6: Ilustración esquemática de los diferentes endometrios durante el ciclo menstrual a partir de muestras de la histología endometrio (5).

El epitelio glandular durante la fase proliferativa está recubierto de microvellosidades cuyo número va aumentando progresivamente con el desarrollo del ciclo. Además, las células presentan uniones laterales de membrana, desmosomas y uniones ocluyentes (87). Existen numerosos ribosomas y polisomas en el interior celular durante esta fase, encontrándose disminuidos en su parte basal al final del ciclo (88).

El aparato secretor celular, incluyendo el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático liso, está pobremente desarrollado, sin embargo, al comienzo de la fase secretora empiezan a segregarse moléculas complejas que parecen tener una gran importancia para el trofoblasto (89) Una característica propia de la fase secretora temprana es la visualización de mitocondrias "gigantes". Su origen es debido a la fusión y reorganización de mitocondrias normales y pequeñas, que responden a la acción de la progesterona en el DNA (90).

El estroma endometrial es un tejido conectivo formado por células y una matriz extracelular compleja con componentes fibrilares. Su principal componente celular son las células estromales, de tipo fibroblasto, responsables de la producción de la mayor parte de la matriz extracelular (91) Éstas experimentan cambios morfológicos a lo largo del ciclo menstrual que están 30 correlacionados con su proliferación, diferenciación y maduración (92)(93). Las uniones entre las células estromales son de tipo gap (94) mientras que entre las células epiteliales y estromales existe un mayor contacto entre ellas debido a la mayor complejidad de las proyecciones epiteliales en la lámina densa (95).

Durante la fase secretora debido a la acción de la progesterona, los estrógenos y del adenosin monofosfato cíclico (cAMP), las células estromales se diferencian en células decidualizadas, proceso que dura, al menos, 10 días (96). En humanos la decidualización se produce cada ciclo independientemente de si se produce o no embarazo. Las células decidualizadas segregan hormonas, factores de crecimiento y citoquinas como la prolactina (PRL) (97) o el factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGFBP-1) (98) siendo estos dos últimos utilizados como marcadores de decidualización.

Estos factores segregados favorecen la implantación embrionaria, remodelan la matriz extracelular y protegen del daño oxidativo (99)(100).

En cada ciclo menstrual debido al crecimiento y diferenciación celular, así como a los factores secretados por estas células, se produce un nuevo sistema de irrigación sanguínea por angiogénesis y un reordenamiento vascular(101) La expresión de factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial

vascular (VEGF) o la angiopoyetina (ANGPT), están relacionados con la angiogénesis y el remodelado de vasos sanguíneos en el endometrio, estando regulados por hormonas esteroideas, por células estromales decidualizadas y por células del sistema inmunitario (102)(103)(104).

La población de células inmunitarias en el endometrio es muy diversa, encontrándose entre ellas linfocitos T, macrófagos, neutrófilos y mastocitos (105). Cada tipo celular del sistema inmunitario tiene funciones indispensables para que se produzca una correcta implantación embrionaria y no haya rechazo. Los linfocitos T representan el 40-60% de la población leucocitaria del endometrio, jugando un papel crucial en la inmunosupresión para posibilitar la tolerancia al feto (106). Los linfocitos granulados, sin embargo, están relacionados con la invasión del trofoblasto y con la secreción del factor de crecimiento transformante (TGF) (107). Las funciones de los macrófagos son diversas, contribuyendo a la matriz extracelular, regeneración del tejido y producción de proteasas y citoquinas para la limpieza del endometrio de restos celulares tras la menstruación (108).

DEFINICIÓN DE LA VENTANA DE IMPLANTACIÓN ENDOMETRIAL (VDI)

El endometrio humano sufre cambios dinámicos en múltiples niveles a lo largo del ciclo menstrual en respuesta a las hormonas ováricas y secreciones paracrinas. Después de la ovulación, el endometrio transita de una morfología proliferativa a una secretora y culmina en un período espacial y temporalmente restringido; la VDI se define como el período autolimitado cuando el medio uterino es favorable para la aceptación del blastocisto para la implantación. Suele coincidir con el día 20 al 24 de un ciclo menstrual regular (es decir, entre el día 7 y el día 11 después del Aumento de LH: LH+7–LH+11) (9) sin embargo, la duración óptima de la VDI es restringidamente corta y solo dura aproximadamente 24–48 h en humanos (10)(9).

Permite la receptividad endometrial el endometrio para proporcionar un entorno óptimo para el desarrollo del embrión y formación de placenta(109)

Durante este período, tanto el epitelio uterino como el estroma experimentan alteraciones orquestadas por muchos factores diferentes, como los esteroides hormonas, citocinas y quimiocinas, moléculas de adhesión, inmune células, factores de crecimiento y transcripción (110) .

Las hormonas esteroideas derivadas del colesterol, estrógeno y Progesterona son cruciales para el establecimiento de la receptividad endometrial. Estradiol induce la proliferación endometrial y reclutamiento de receptores Progesterona antes a la exposición Progesterona son pasos esenciales para lograr la receptividad endometrial (111) (112) . Progesterona se produce en el CL y se considera un factor crítico elemento para el mantenimiento temprano del embarazo (113) (114) Por un lado, Progesterona dirige el epitelio luminal (LE) a un estado que promoverá la adhesión e invasión embrionaria al disminuir las uniones estrechas (115). Por otro lado, Progesterona actúa sobre el epitelio glandular para producir tejido uterino líquido que contiene factores importantes para la supervivencia del embrión y comunicación con la placenta (116). Mientras tanto, la señalización del receptor Progesterona impulsa la decidualización en las células del estroma endometrial para mantener embarazo (117) **Figura 7.**

Figura 7: Efectos de la Progesterona

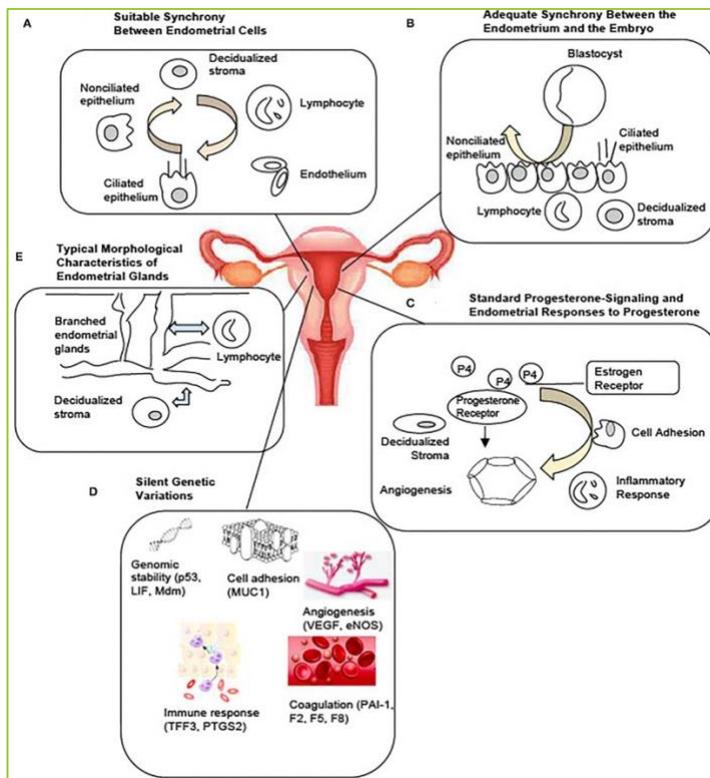


Figura 7 Ilustración esquemática de los efectos Progesterona en el mantenimiento del embarazo.(117)

RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL

Se conoce como receptividad endometrial al proceso biológico que permite al revestimiento uterino, el endometrio, alcanzar unas características histológicas, celulares y moleculares óptimas para la implantación del embrión. Para que la implantación embrionaria tenga éxito se necesita un endometrio receptivo, un embrión funcional en estadio de blastocisto y un diálogo molecular entre los tejidos maternos y embrionarios(118).

ESTUDIO GENÉTICO DEL ENDOMETRIO: MARCADORES DE RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL

Los marcadores de receptividad endometrial son aquellos parámetros que nos permiten identificar y distinguir un endometrio receptivo de uno no receptivo. Permiten clasificar el endometrio en las distintas fases del ciclo endometrial y diferenciar si el endometrio se encuentra apto o no para la implantación embrionaria (119). Los marcadores de receptividad endometrial pueden ser clasificados a partir del método de obtención utilizado. Existen marcadores histológicos, moleculares, microRNAs (miRNA) y marcadores “ómicos” (120)(121) (122) **Figura 8.**

Figura 8: Expresión genética endometrial

MARCADORES HISTOLÓGICOS

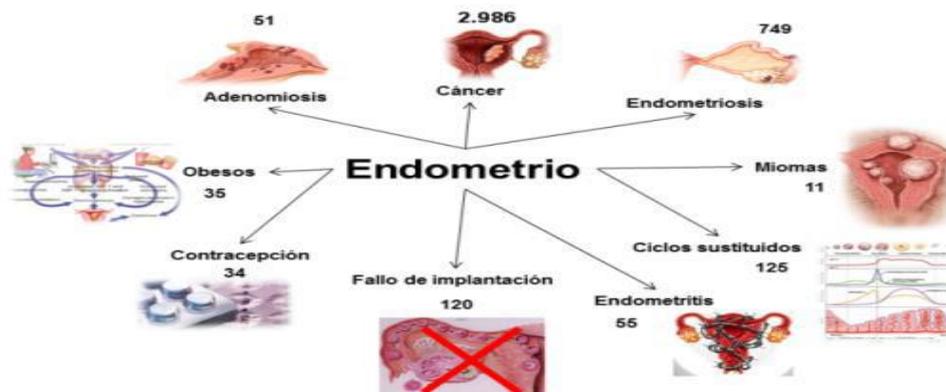


Figura. 8 publicaciones de análisis de expresión genética endometrial. Los términos relacionados con expresión genética en el endometrio que aparecen son: cáncer, endometriosis, miomas, ciclos estimulados, endometritis, fallos de implantación, contracepción, obesos y adenomiosis. De las 5.266 publicaciones de expresión genética en el endometrio, 361 fueron llevadas a cabo con microarrays, un 7% del total.

Los primeros sistemas de evaluación endometrial fueron desarrollados en los años 50 por Noyes y colaboradores. Estos marcadores han sido utilizados rutinariamente durante más de 50 años en las clínicas de reproducción asistida (123)(124). Describen diferentes características histológicas a lo largo del ciclo menstrual, permitiendo datar el endometrio durante la fase lútea. Estos criterios histológicos están basados en el grado de mitosis glandular, la pseudo-estratificación del núcleo, las vacuolas basales, la secreción celular, el edema estromal, la reacción pseudodecidual, las mitosis del compartimento estromal y la infiltración leucocitaria(124).

En ensayos aleatorios controlados se ha comprobado que no pueden predecir el estatus de receptividad endometrial con exactitud (125)(126). El Comité de Práctica de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (*American Society for Reproductive Medicine, ASRM*) desaconseja el uso de biopsias endometriales para el dataje endometrial, basándose en los resultados de ensayos clínicos aleatorios, prospectivos y ciegos, ya que no permite distinguir entre mujeres fértiles e infértiles y, además, es ineficaz para el diagnóstico o tratamiento del déficit de la fase lútea (127). Sin embargo, se propusieron como

marcadores morfológicos de receptividad endometrial, además, de la presencia de protuberancias globulares en la superficie de la membrana apical de células epiteliales endometriales, conocidas como pinópodos o uterodomas (128)(129). No obstante, existe cierta controversia sobre su relevancia como marcador para datar el tejido endometrial y para su uso clínico (130)(131)

MARCADORES MOLECULARES

Debido a la falta de precisión del dataje endometrial mediante marcadores histológicos, en la década de los 90 y principios del siglo XXI, se realizó en el campo de la investigación una búsqueda exhaustiva de marcadores moleculares que permitieran conocer el estatus de receptividad endometrial. Algunas de estas moléculas (58) como interleuquinas (132)(133).

Desafortunadamente, el endometrio humano es un sistema excesivamente complejo como para poder ser descrito con precisión por la presencia o ausencia de una sola molécula. Debido a esta dificultad en reflejar la biología celular endometrial a partir de una sola molécula, el uso de paneles de marcadores ha ido incrementándose en los últimos años (134).

MICRORNA

Los miRNA son pequeñas moléculas de RNA (de 21 a 25 nucleótidos) no codificantes que fueron descubiertas en 1993 (135).

Estos MiRNA han sido utilizados en la investigación de nuevos marcadores de enfermedades como cáncer de pulmón (136) alzhéimer (137), diabetes (138) o enfermedades del corazón (139). Durante los últimos años se han desarrollado estudios que evalúan su papel en la receptividad endometrial, tanto en ciclos naturales como ciclos estimulados, encontrándose distintos perfiles de expresión entre endometrios receptivos y no receptivos (140) (141) o en las distintas fases del ciclo endometrial (142) La búsqueda de marcadores de miRNAs también se ha utilizado en situaciones patológicas de la reproducción como en pacientes con endometriosis (143) o fallo de implantación (144).

MARCADORES “ÓMICOS”

La finalización del Proyecto Genoma Humano en el año 2003(145) (146) desembocó en un gran avance tecnológico, lo que permitió el nacimiento de las

denominadas ciencias “ómicas”. En la última década se ha producido un incremento significativo del número de estudios “ómicos” en el endometrio.

Las ramas de la ciencia de las “ómicas” más relevantes son:

- **Genómica:** estudia los genomas y los genes que contienen. En medicina reproductiva se han realizado numerosos estudios de asociación del genoma completo para asociar determinados polimorfismos de nucleótido único con la expresión génica (147).
- **Transcriptómica o Genómica Funcional:** estudia el análisis de la expresión génica global. Es la “ómica” más empleada en esta área, por ejemplo, en estudios de búsqueda de marcadores de receptividad endometrial a través de secuenciación masiva NGS (148).
- **Metabolómica o Metabonómica:** indaga en estudio, a gran escala, de los metabolitos ante una condición fisiológica o patológica concreta. La lipidómica, rama de la metabolómica referente a lípidos, es, en el endometrio, un método no invasivo para el estudio de los lípidos en el fluido endometrial (149).
- **Proteómica:** estudia la colección de proteínas. Un ejemplo de ello es el patrón proteico endometrial anómalo observado en mujeres obesas y con sobrepeso que tienen fallo de implantación(150).
- **Bioinformática:** ciencia no agraciada con el sufijo “ómico” que permite, por medio de nuevos desarrollos matemáticos, analizar los datos generados en el resto de las “ómicas”. Sin ella, la interpretación de los resultados conllevaría unos gastos de tiempo y personal inasumibles.

ESTUDIO DE RECEPTIVIDAD: TEST DE RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL ACTUALES

Hasta ahora, la falta de métodos útiles de evaluación endometrial en la clínica ha hecho que fuera raramente evaluado en la pareja infértil o antes de un ciclo de reproducción asistida. Sin embargo, en las últimas dos décadas se han desarrollado diversas pruebas de evaluación del estatus endometrial. Actualmente, hay cuatro pruebas que evalúan la receptividad endometrial: E-Tegrity que evalúa los patrones de expresión de la β -3 integrina (151,152); EL endometrial function test (EFT) que utiliza dos marcadores, la ciclina glandular e y el p27 (153) y la técnica del array de receptividad endometrial (ERA) que lleva a cabo un análisis de la expresión de 238 genes por medio de un microarray a la carta de expresión génica (154).

Y el utilizado en nuestro estudio, MiFERT&i, de laboratorio SINAIE que es un test que se compone de test de receptividad endometrial, estudio del estado inmunológico del endometrio y estudio del microbioma. La nueva prueba ER Map®/ER Grade® puede predecir el estado de receptividad endometrial mediante RT-qPCR usando un nuevo panel de genes implicados en la proliferación endometrial y la respuesta inmune materna asociada a la implantación embrionaria.

En 2017, el equipo liderado por Dr. Horcajadas, de la Universidad Pablo Olavide, definieron un nuevo sistema para la evaluación de la receptividad endometrial humana basado en el análisis de la expresión de genes relacionados con la proliferación endometrial y la respuesta inmunológica asociada con la implantación embrionaria. Utilizamos una plataforma RT-qPCR de alto rendimiento para la medición precisa y confiable de la expresión génica en muestras endometriales y la identificación de perfiles transcriptómicos específicos (155).

La correcta identificación y predicción del período de la receptividad endometrial es esencial para maximizar la eficacia de los tratamientos de reproducción.

La mayoría de los análisis transcriptómicos globales del endometrio que se han realizado hasta la fecha, utilizan una fuente no seleccionada de genes implicados específicamente con el tejido endometrial ni tampoco con genes relacionados con el proceso de adquisición de receptividad endometrial. El

equipo del Dr. Horcajadas se planteó para elaborar la nueva técnica una selección de genes, específicamente descritos para ser expresados en el endometrio durante la VDI e involucrados en el proceso de la implantación embrionaria, porque su estrategia era definir con precisión la firma transcriptómica del endometrio receptivo y también a desarrollar una herramienta de diagnóstico fiable para la receptividad endometrial.

Este grupo planteó que, entre los procesos estudiados durante la implantación, la proliferación endometrial y la respuesta inmune, son parte esencial para la preparación del endometrio y la implantación embrionaria, por lo que, una selección de genes involucrados en esos procesos podría proporcionar interesantes resultados sobre el proceso de la receptividad endometrial y tener repercusión clínica (156)(157).

Para los análisis transcriptómicos endometriales globales, este grupo utilizó la técnica de microarrays de expresión génica pero debido a su rango-dinámico limitado plantearon validar la técnica mediante RT-qPCR (158) .

PARA ENTENDER MEJOR LA TÉCNICA UTILIZADA EN NUESTRO ESTUDIO DE TRANSCRIPTÓMICA:

PCR CUANTITATIVA EN MICROFLUIDOS

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR de sus siglas en inglés) fue desarrollada a principios de los años 80 por Kary Mullis(159).Esta técnica permite obtener millones de copias de fragmentos específicos de DNA en unas pocas horas. Debido a que no se trataba de una técnica cuantificable, se realizaron una serie de modificaciones para el desarrollo de lo que se conoce como PCR cuantitativa o PCR a tiempo real (qRT-PCR de sus siglas en inglés). Con la PCR cuantitativa se detecta a tiempo real la amplificación del DNAC de interés. Primero se aísla el RNA total de las muestras de interés, y se realiza una transcripción reversa del RNAm para obtener cDNA. Para llevar a cabo la reacción se unen unas sondas (oligonucleótidos) complementarias al cDNA y la polimerasa va añadiendo nucleótidos a la cadena. Se pueden utilizar dos tipos de moléculas para la emisión y cuantificación de la fluorescencia, estas son las sondas Taq Man y el fluoróforo SYBR Green. Nos centraremos en este último por ser el que se ha utilizado en este proyecto. El SYBR Green es

un fluoróforo que se une de manera inespecífica a cadenas dobles de DNA, cuantas más cadenas dobles de DNA, más cantidad de SYBR Green se unirá y la cantidad de fluorescencia que se emitirá será mayor de forma proporcional. Al unirse de manera inespecífica se pueden detectar productos inespecíficos y dímeros de oligonucleótidos (122).

Para solucionar esto hay que realizar un diseño muy cuidadoso de los oligonucleótidos y optimizar las reacciones de PCR. Además, al finalizar los ciclos se realiza una curva de desnaturalización o disociación para comprobar que solamente se ha unido a un fragmento. Al ser una PCR cuantitativa por ciclos, la cantidad de fluorescencia emitida en cada ciclo será mayor siendo proporcional al número de moléculas de RNAm iniciales. La cuantificación que se realiza es relativa, ya que se compara el nivel de expresión de un gen de interés en diferentes situaciones después de normalizar los datos con uno o más genes constitutivos que no varían su expresión en las condiciones experimentales. Al utilizar estos genes constitutivos podemos saber si las diferencias en la cantidad de fluorescencia son debidas a cambios en la expresión génica o a que se partió de una cantidad de RNAm inicial distinta.

El sistema de PCR cuantitativa en microfluidos combina la tecnología de los microarrays con la técnica PCR a tiempo real. Antes de realizar las reacciones de PCR cuantitativa, se realiza una amplificación selectiva de nuestros genes de interés para que haya una gran cantidad inicial de cDNA y se alcance en unos pocos ciclos el umbral de fluorescencia.

El soporte físico donde se depositan y combina las muestras y oligonucleótidos se denomina arrays dinámicos IFC, y su formato es de 48x48 o de 96x96 (48 muestras y 48 pares de oligonucleótidos, o 96 muestras y 96 pares de oligonucleótidos).

En un solo experimento se realizan 2.304 o 9.216 reacciones de PCR a tiempo real por array, por lo que el gasto de reactivos y de tiempo se reduce de una manera considerable.

Se ha demostrado que RT-q PCR tiene la dinámica más amplia rango, los límites de cuantificación más bajos y los resultados menos sesgados y por lo tanto, se considera el método estándar de oro para el análisis de la expresión génica. En este contexto, creemos que el uso de RT-q PCR puede ser una técnica más robusta y fiable para el análisis de la expresión de genes relevantes para el proceso de receptividad endometrial y, además, para el desarrollo de herramientas de diagnóstico basadas en la identificación de firmas específicas asociadas con diferentes estados endometriales (155).

El grupo de Horcajadas definió un nuevo sistema para evaluar la receptividad del endometrio humano basada en el análisis de la expresión de genes relacionados con la proliferación endometrial y la respuesta inmunológica asociada con implantación embrionaria. Utilizaron un RT-q PCR de alto rendimiento plataforma para la medición precisa y fiable de la expresión génica en muestras de endometrio e identificación del perfil transcriptómico específico.

Las principales características distintivas fue la descripción del análisis de expresión de un nuevo panel de genes capaces de determinar el estado de receptividad de un endometrio. A diferencia de estudios previos destinados a desarrollar herramientas para evaluación de la receptividad endometrial(160,161) optaron por realizar una selección de genes que participan en los procesos biológicos que tienen lugar en el endometrio durante la VDI y que están relacionados con la preparación endometrial para implantación embrionaria.

Tras la selección realizada con base en la literatura, para poder decidir el panel de genes, encontraron una sobrerrepresentación de procesos muy relevantes para el fenómeno de la adquisición de la receptividad endometrial, pero dentro de este grupo de genes, encontramos un subconjunto de 85 especialmente interesantes ya que mostraron diferencias significativas en la expresión entre los proliferativos y fases secretoras (155).

El análisis de los genes Ontology GO* revelaron componentes celulares ,procesos biológicos y funciones moleculares relacionadas con la célula señalización y respuesta, organización extracelular, división y proliferación celular, actividad inmunológica, proliferación vascular e implantación embrionaria.

GENE ONTOLOGY * (HERRAMIENTA QUE SE UTILIZÓ PARA EL DISEÑO)

El Gene Ontology es una iniciativa bioinformática para dotar de un vocabulario a los genes y los productos de estos. Utiliza un lenguaje adaptado para que los datos puedan ser leídos por los ordenadores, y hacerlo de una manera homogénea para todas las especies.

La ontología es una rama de la metafísica que estudia lo que hay, por lo que las ontologías se tratan de representaciones de hechos o relaciones detectables. La terminología empleada en biología respecto a los genes y sus productos no es universal, y puede ser específica de una especie, área de estudio o incluso de un grupo de investigación en particular.

Esto, crea dificultad a la hora de comunicar los resultados obtenidos en una investigación científica. El proyecto de GO ofrece una ontología de términos definidos que representan a los genes y sus productos. Esta ontología se encarga de tres ámbitos, componentes celulares , funciones moleculares y proceso biológicos.

Curiosamente, una sobrerrepresentación de procesos que involucran vesículas y también se encontraron exosomas. Estos términos coinciden con los anteriores procesos descritos que se sabe que ocurren en el momento de la implantación.

Remodelación de la matriz celular y aumento de la permeabilidad vascular y la angiogénesis en el sitio de implantación son uno de los primeros requisitos previos para implantación de embriones(162) .También intensa comunicación a través de la señalización celular entre el embrión y las células endometriales ha sido descrita como parte de la diafonía embrio-endometrial esencial para implantación embrionaria adecuada que implica, en algunos casos, extracelular vesículas/exosomas (163).Además, las respuestas inmunitarias se han demostrado que desempeña un papel importante en las primeras etapas del embarazo (157,164).

El Análisis de componentes principales PCA, una herramienta de reducción de dimensiones que se puede utilizar para reducir un gran conjunto de variables a un pequeño conjunto que todavía contiene la mayor parte de la información en el conjunto grande, reveló que un subconjunto de 40 de los 85 diferencialmente genes expresados, llamados genes ER Map®/ER Grade®, podrían diferenciar con precisión entre LH + 2 y LH + 7. Estos genes, , permiten una clasificación 100 % correcta de las muestras endometriales de los donantes a estos dos grupos de estatus. El ER Map®/ER **Figura 9.**

FIGURA 9: EXPRESIÓN GENÉTICA VDI

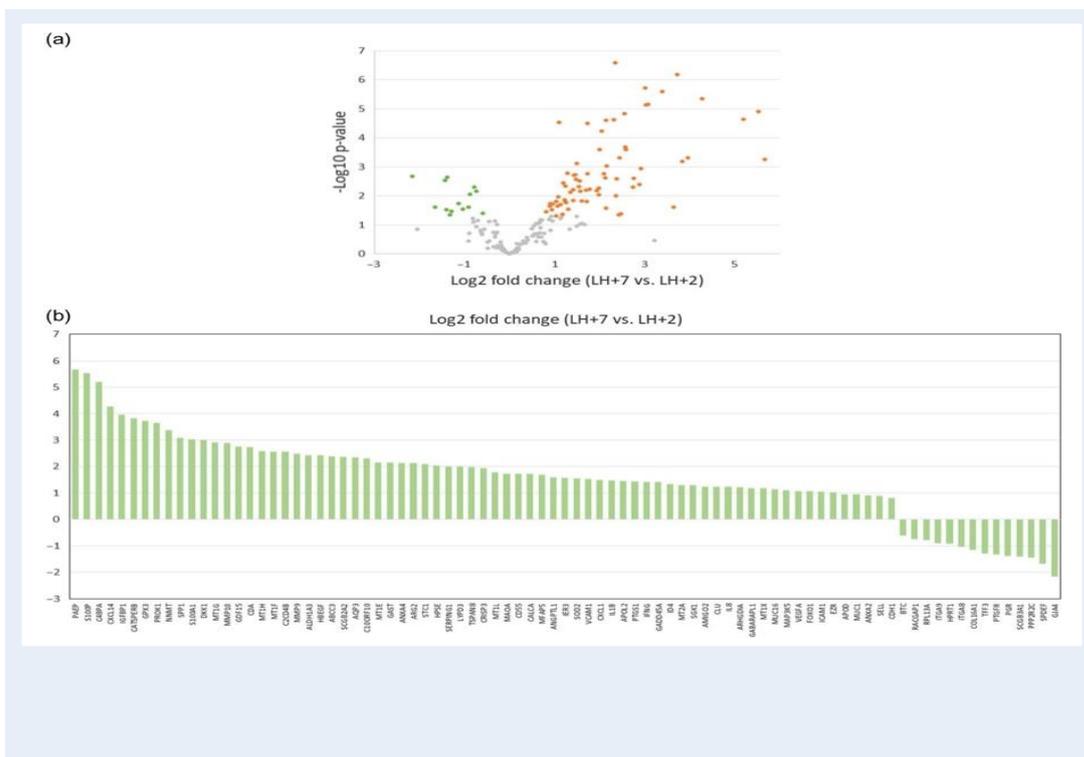


Figura 9 Genes expresados diferencialmente en LH + 2 y LH + 7. (a) Gráfica de volcán de las diferencias de expresión génica para los 184 genes WOI en los días LH + 2 y LH + 7 de los ciclos menstruales de sujetos fértiles. El cambio log₂ veces se traza en el eje x y el valor P negativo log₁₀ se traza en el eje y. Los puntos verdes representan sondas génicas con valor P < 0,05 mediante prueba t pareada y cambio de pliegue regulado a la baja (log₂FC < -0,5). Los puntos naranjas representan sondas génicas con valor P < 0,05 mediante prueba t pareada y cambio de pliegue regulado al alza (log₂FC > 0,5). (b) Gráfico de barras que muestra los cambios log₂ veces de los 85 ARNm expresados diferencialmente (prueba t pareada, P < 0,05) en LH + 7 frente a LH + 2. Hubo 71 ARNm regulados al alza y 14 ARNm regulados a la baja en LH + 7 en comparación con LH + 2.(155)

El panel de genes Grade® también puede evaluar el estado de receptividad de las muestras de pacientes infértiles obtenidos en la fase secretora, clasificando muestras en: 'receptivo', esto significa que la VDI coincide con el día en que se tomó la biopsia; "pre-receptivo", lo que significa que el endometrio aún no ha alcanzado su VDI o 'post-receptivo', es decir, este endometrio ya pasó su VDI.

ESTUDIO DEL TEJIDO ENDOMETRIAL

El endometrio es un tejido adulto único que, en ausencia de embarazo o enfermedad, sufre una descomposición cíclica y vuelve a crecer aproximadamente 400 veces durante la vida reproductiva de una mujer. Las posibilidades de éxito reproductivo durante cada ciclo dependen de las respuestas apropiadas y específicas de las células a los esteroides, incluida la expresión de metaloproteinasas de matriz (MMP). La regulación normal de las MMP endometriales en respuesta a estrógenos o progesterona requiere interacciones adicionales específicas de células mediadas por varios factores de crecimiento y citocinas. Durante la maduración del endometrio, la progesterona, el ácido retinoico y el TGF-beta actúan de forma cooperativa, proporcionando un notable equilibrio biológico para regular la expresión de las MMP en el endometrio altamente sensible a los esteroides. La exploración de las acciones reguladoras de los factores de crecimiento y las citoquinas producidos localmente en los miembros de la familia MMP y sus inhibidores permitirá una mejor comprensión de la fisiología única del endometrio humano bajo la influencia de la Progesterona (165).

La Progesterona, es una hormona imprescindible para la correcta regulación del ciclo menstrual y sus fluctuaciones pueden modificar el objetivo principal del ciclo menstrual que es la gestación, a pesar de la importancia de la progesterona no tenemos estudios donde detallen los niveles estándares de la progesterona durante todo el proceso , es por eso que creemos necesario determinar unos niveles durante el proceso de preparación endometrial en pacientes sin factores de riesgo y relacionarlo con el momento de receptividad del endometrio.

De la escasa bibliografía que tenemos, encontramos un estudio de 1978 donde el objetivo era valorar los niveles de progesterona y estradiol en pacientes que estaban con anticonceptivos con las que no tomaban.

Se estudiaron un total de 134 mujeres, 75 de las cuales usaban anticonceptivos con esteroides cíclicos (etinilestradiol, 0,05 mg más Norgestrel, 0,5 mg) y 59 de las cuales tenían ciclos ovulatorios normales. Mediante técnicas de radioinmunoensayo se realizaron determinaciones simultáneas de estrógenos

totales (TE) y progesterona (P) tanto en plasma como en endometrio y de FSH y LH en plasma, abarcando todos los días de los ciclos pseudomenstrual y menstrual verdadero.

Los resultados esperados eran que las mujeres que ovulaban mostraran un pico de ET plasmática a mitad del ciclo y un aumento de la P plasmática posteriormente, mientras que no esperaban cambios en las pacientes usuarias de anticonceptivos.

Se analizaron las correlaciones de las concentraciones endometriales de TE y P con las concentraciones plasmáticas de FSH y LH. y en 13 de las 75 mujeres tratadas con anticonceptivos se identificaron elevaciones de las concentraciones de P endometrial, no esperable al estar tratadas con anticonceptivos por lo que no se pudo correlacionar de la manera que esperaban (166).

Previamente se habían estudiado pacientes usuarias de anticonceptivos para ver si el efecto inhibitorio en el eje hipotálamo hipofisario era completo monitorizando las hormonas sin éxito, ya que no conseguían una supresión completa a pesar de que sí cumplían su función de anticoncepción

Durante la vida reproductiva de una mujer, las hormonas como la progesterona y el estradiol puede cambiar patrones de producción ovárica, dirigir un patrón predecible de crecimiento endometrial y producir la maduración el endometrio y si paralelamente se produce la maduración de ovocitos, ovulación, fertilización, facilitar el transporte del embrión y su implantación (165).

No existe información científica descrita de la monitorización de la progesterona tisular durante la preparación del endometrio por eso queremos describir la técnica utilizada para obtenerla (167).

5.CONTEXTO CIENTÍFICO: IMPORTANCIA

La medicina personalizada en la actualidad tiene el objetivo de conseguir los mejores resultados adaptándose a las necesidades de cada paciente.

La medicina personalizada también se ha extendido en el ámbito de la Medicina Reproductiva. Desde hace años, las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) buscan personalizar los tratamientos de estimulación controlada ovárica según las características de cada paciente a fin de optimizar los resultados reproductivos. Asimismo, han mejorado las técnicas de selección de los espermatozoides (ICSI), de la misma manera que se ha conseguido mejoras en la calidad ovocitaria y su congelación-descongelación gracias a la vitrificación. Todo ello ha permitido combinar diferentes estrategias durante el proceso de FIV a fin de incrementar las tasas de éxito reproductivo para la paciente. La tendencia no es homogenizar los tratamientos sino lo contrario, personalizar, estudiar con mayor profundidad las diferencias entre pacientes mediante marcadores clínicos o biológicos que nos permitan seleccionar la estrategia que nos ofrezca mayor potencial reproductivo (77).

Durante años los esfuerzos se han centrado en aumentar los ovocitos recuperados tras la estimulación ovárica controlada (EOC), mejorar la calidad ovocitaria, e incrementar la tasa de fertilización gracias a la mejor selección del espermatozoide más cualificado para ese propósito. De igual manera, la vitrificación de embriones ha permitido diferir las transferencias embrionarias a fin de evitar los efectos indeseados derivados del síndrome de hiperestimulación, tanto las complicaciones médicas maternas como un empeoramiento en las tasas de implantación embrionaria derivada de la mala preparación del endometrio fue hasta el 2010 (13,168,169) cuando se empezó a investigar de manera significativa el papel del endometrio en la implantación embrionaria.

Sabemos que el éxito de la implantación endometrial depende de la perfecta sincronía entre el embrión en estadio de blastocisto y la receptividad endometrial, que ocurre en un momento determinado y limitado en el tiempo. La ventana de implantación (VDI) es el momento específico donde el endometrio está receptivo a la implantación embrionaria y clásicamente ocurre

a los 8 a 10 días después de la ovulación en un ciclo natural y está activo y funcional durante 2-3 días como máximo (169).

En 2013, en *Fertility and Sterility*, se destaca la necesidad de métodos para diagnosticar objetivamente la receptividad endometrial como un factor que contribuye a la infertilidad en pacientes femeninas. La identificación correcta de la ventana de implantación adecuada en un paciente determinado, mediante el uso de biomarcadores de receptividad endometrial, puede ayudar a prevenir la insuficiencia reproductiva resultante de una sincronización incorrecta de la VDI en el endometrio (170).

A pesar de que existe un mayor conocimiento sobre el papel del endometrio durante el proceso de implantación embrionaria todavía no se ha descrito ningún marcador biológico específico que determine el estado de la receptividad endometrial (171) Existen indicios, además, de que una mayor proporción de pacientes con fallos de implantación con embriones euploides tienen un desplazamiento de la VDI, por lo que un marcador biológico para detectar la VDI sería útil para evitar el desplazamiento.

Según los estudios publicados, hasta un 25% de los fallos de implantación son de causa endometrial, y por tanto cabe pensar que optimizando la receptividad endometrial mejoraría el éxito reproductivo (76) .

Existen distintas causas que se asocian a fallos recurrentes de implantación (FRI). Por un lado, destacan aquellas patologías que distorsionan la cavidad endometrial (hiperplasia endometrial, miomas uterinos, sinequias, endometritis o pólipos endometriales), que ocurre entre el 18-27% de los casos. Asimismo, destaca el hidrosálpinx que podría actuar como tóxico directo sobre el endometrio, así como empeorar la calidad embrionaria, factores relacionados con estilos de vida, así como las trombofilias ya sean hereditarias o adquiridas (168).

Todas estas causas se pueden corregir médicamente, pero la necesidad de conseguir una sincronización perfecta entre el endometrio y el embrión persiste, y todavía no se ha descrito ningún marcador biológico que lo determine.

Por ese motivo, en 2011 empezaron a aparecer métodos de estudio con aplicación clínica. Uno de estos métodos es el perfil transcriptómico a partir de una muestra de tejido endometrial porque se ha demostrado, como ocurre con la mayoría de los tejidos del organismo, que los cambios fisiológicos que tienen lugar en el endometrio se producen como consecuencia de una transcripción diferencial de genes. En el transcurso del ciclo menstrual, existen ciertos genes regulados por hormonas que se encuentran expresados al alza o a la baja, y por tanto, la abundancia relativa y la composición de los transcritos génicos en un momento determinado proporcionan una firma transcriptómica específica. De esta forma, al estudiar la firma transcriptómica de una biopsia endometrial, es posible estimar de forma precisa el momento fisiológico de la ventana de implantación de la paciente.

Como se explicó anteriormente, no existe un marcador biológico único, parámetro analítico, que cuantifique el momento adecuado de la ventana de implantación. Y esta situación se empeora sobre todo si hay fallos de implantación recurrentes, donde se han visto limitaciones de la prueba ERA para mejorar la tasa de embarazo (172).

Se conoce que la progesterona y la gonadotropina coriónica humana ayudan al endometrio en el momento de la implantación en los tratamientos de reproducción asistida. El perfil endocrinológico de la fase folicular y su valor predictivo para el resultado del tratamiento durante la estimulación ovárica controlada está bien establecido. En cambio, el perfil endocrinológico de la fase lútea tras la estimulación ovárica rara vez se controla, aun sabiendo que la estimulación ovárica interfiere de múltiples formas con la fase lútea. (173) Después de la estimulación ovárica con gonadotropinas, las concentraciones suprafisiológicas de progesterona y estradiol en la fase lútea interrumpen la secreción hipofisaria de LH provocando la muerte del cuerpo lúteo, hemorragia por deprivación y baja probabilidad de embarazo. El soporte de progesterona es, por lo tanto, vital para cubrir la ventana desde la

desaparición de la HCG exógena hasta el aumento de la HCG endógena del blastocisto implantado, por lo que necesitamos más estudios para conocer y poder correlacionar la progesterona y sus niveles óptimos en el momento adecuado de la implantación (169).

Sabemos que en pacientes con transferencia de embrión euploide fallida, el 22,5% tienen la VDI desplazada al realizarse el test ERA .Y que tras el diagnóstico, personalizemos el tratamiento y el tiempo de Progesterona las tasas de embarazo puede llegar a mejorar de un 54.2% a un 73.3% (174).

De hecho, el concepto inicial de los test de transcripción genética era estudiar la causa de los fallos de implantación recurrentes (RIF) , en el 2013 se realizó un estudio donde se evidenció que el 25,9% de los pacientes con RIF presentaban . una VDI desplazada mientras que solo el 12% de las pacientes controles (175).

En 2021 se publicaron resultados de receptividad, a partir de un estudio prospectivo con la técnica ERA, donde se evidenció un 40,5% de pacientes con resultado receptivo (176).

La heterogeneidad de resultados planteó la necesidad de analizar los niveles de progesterona tanto sérica como tisular como un factor determinante para constatar la apertura de la ventana de implantación y así tener datos reales del porcentaje de receptividad de las pacientes.

Los niveles de progesterona tisular pueden ser un buen marcador para delimitar la ventana de implantación y permitir una mejor sincronía con la transferencia embrionaria en mujeres sometidas a fecundación in vitro. Así como puede ser útil conocer la correlación entre la hormona sérica y tisular para ver la repercusión real de los tratamiento de soporte en la fase lútea de progesterona y poder ver así cómo se pueden personalizar para mejorar el resultado final .

6.HIPÓTESIS DEL ESTUDIO

El nivel de Progesterona tisular es un buen marcador para determinar la ventana de implantación.

La VDI puede relacionarse con un rango de concentraciones de Progesterona tisular. De este modo el paso del endometrio de fase pre-receptiva a receptiva o post receptiva puede estar controlado por los niveles de Progesterona acumulada en el tejido endometrial.

A su vez, identificar la correlación entre los niveles de Progesterona sérica y la concentración de Progesterona tisular acumulada que permitiría tener un método no invasivo para optimizar la preparación endometrial.

7.OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo principal del trabajo de investigación es valorar la utilidad de la Progesterona como biomarcador de la receptividad endometrial.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Correlacionar los niveles de Progesterona en el tejido endometrial con cada una de las fases de receptividad de la VDI dada por el patrón genómico.
- Estudiar la relación existente entre los niveles de Progesterona sérica y tisular.
- Evaluar el valor de Progesterona sérica como marcador no invasivo para el estudio y manejo de la VDI y así optimizar la transferencia embrionaria.
- Evaluar el valor de la línea endometrial como marcador no invasivo para el estudio y manejo de la VDI y así optimizar la transferencia embrionaria.

8.METODOLOGÍA: MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Ensayo clínico cruzado prospectivo randomizado con pacientes con deseo genésico.

Se considera realizar estudio cruzado para evitar el sesgo de selección de los controles y mantener equilibradas las variables de confusión que puedan existir.

POBLACIÓN DE ESTUDIO, CRITERIOS DE INCLUSIÓN/EXCLUSIÓN

Se propone formar parte del estudio a pacientes mayores de 18 años, que estén en estudio y/o tratamiento con técnicas de reproducción asistida.

Como criterios de inclusión se considerarán:

- Mujer premenopáusica, de >18
- Frotis cervical (Papanicolaou) en los 3 años previos a la inclusión en el estudio.
- Valor del índice de masa corporal entre 12 y 30, ambos inclusive.
- Confirmación de ausencia de embarazo con prueba de β -HCG (orina o plasma).
- Voluntad de ajustarse al protocolo durante toda la duración del estudio.
- Haber dado el consentimiento informado antes de cualquier procedimiento relacionado con el estudio que no forme parte de la asistencia médica habitual.
- Ausencia de patología endocavitaria (miomas submucosos, pólipos).

Como criterios de exclusión se considerarán:

- Pacientes con diagnóstico previo de fallo de implantación y/o abortos de repetición, variables (definidos por la presencia de > 2 abortos espontáneos y/o 2 FIVs fallidas), así como pacientes que hayan realizado diagnóstico genético.
- Positividad conocida para los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), hepatitis C o B (VHC/VHB) de la candidata o de su pareja.
- Enfermedades sistémicas de importancia clínica, tumores hipotalámicos o hipofisarios, cáncer de ovario, útero o mama; anomalías hormonales y/o patología médica, bioquímica, hematológica, que a juicio del investigador pueda interferir con el tratamiento con gonadotropinas.
- Hemorragia ginecológica no filiada.
- Cualquier contraindicación para quedarse embarazada o para llevar el embarazo a término.
- Alergia conocida a preparados de gonadotropinas o a alguno de sus excipientes.
- Drogodependencia o historia de abuso de medicamentos o de alcohol en los 5 años previos.
- Inclusión previa en este estudio o participación simultánea en un ensayo clínico con medicamentos.
- No querer o no poder ajustarse al protocolo del estudio.
- Alteración en el endometrio conocido previamente, hiperplasia endometrial simple y/o compleja.

Se excluirán del estudio aquellas candidatas que presenten algún criterio.

A todas las pacientes que cumplan los criterios de inclusión se les propondrá realizar un ciclo de preparación endometrial sustitutivo, como si fuera para una transferencia embrionaria, excepto, que en este ciclo evaluaremos los niveles de progesterona tisular y plasmática durante la ventana de implantación endometrial.

Se dividirá de manera aleatoria en dos grupos tras la primera parte del tratamiento, inicio de la fase lútea (momento que la progesterona tiene el papel principal) y se formarán dos grupos, a los cuales se le realizarán dos biopsias endometriales a cada grupo.

Primer grupo, realizará biopsia endometrio en el día 3,5 post inicio de tratamiento con progesterona para conocer el nivel de progesterona tisular y plasmática y poder categorizar como pre-receptivo en la ventana de implantación endometrial y se repetirá el día 5 el mismo procedimiento para comparar y categorizar el periodo receptivo de la VDI. Momento a priori idóneo para la receptividad endometrial para la transferencia embrionaria.

Segundo grupo, realizará biopsia endometrio en el día 5 post inicio de tratamiento con progesterona para conocer el nivel de progesterona tisular y plasmática y poder categorizar como receptivo en la ventana de implantación endometrial y se repetirá el día 6,5 el mismo procedimiento para comparar y categorizar el periodo post-receptivo de la VDI.

En ambos grupos estudiaremos mediante la prueba transcriptómica que permite valorar mediante un panel de 48 genes la identificación específica del perfil transcriptómico de la receptividad endometrial.

La aleatorización de pacientes en los grupos se hará por bloques para asegurar un balance periódico al número de sujetos asignados a cada grupo de estudio (1: 1).

Asimismo, una persona asignada del equipo, que no está involucrada en la toma de decisiones ni actuaciones médicas procederá a la randomización, proceso que se realiza mediante secuenciación aleatoria por bloques, con Microsoft Excel (2013).

Para la preparación endometrial recibirá:

- Estradiol oral 6mg/día desde el día 2 de ciclo menstrual.
Tras 8-10 días de tratamiento se realizará ecografía transvaginal para medir el grosor y calidad endometrial, y si supera el grosor de 6 - 7mm se realizará una primera determinación en sangre de estrógenos y progesterona.
- Se añadirá Progesterona 200mg/8h vía vaginal cuando el grosor endometrial se encuentre entre 8 y 14mm.

En el momento de iniciar tratamiento con progesterona se asignará de forma aleatoria por bloques permutados, la paciente a un grupo:

Grupo 1. Se realizará biopsia de endometrio y analítica hormonal el día 3.5 y el día 5 tras inicio de la Progesterona

Grupo 2. Se realizará biopsia de endometrio y analítica hormonal el día 5 y el día 6.5 tras inicio de la Progesterona.

Procedimiento para la toma de muestra de biopsia endometrial:

Se introduce un espejo de forma análoga a cuando se realiza una citología de cribado. Posteriormente se introduce una cánula semirrígida a través del canal cervical, hasta sobrepasar el orificio cervical interno. En este momento se realiza la toma de muestra de tejido endometrial para estudio. Es un procedimiento que se realiza sin anestesia.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO Y ESQUEMA

Selección de pacientes Criterios de inclusión/ exclusión Datos demográficos Primera visita consentimiento informado Exploración física

Para la preparación endometrial recibirá:

- 1) Estradiol oral 6mg/día desde el día 2 de ciclo menstrual.
- 2) Tras 8-10 días de tratamiento se realizará ecografía transvaginal para medir el grosor y calidad endometrial, y si supera el grosor de 6-7mm se realizará una primera determinación en sangre de estrógenos y progesterona.
- 3) Se añadirá Progesterona 200mg/8h vía vaginal cuando el grosor endometrial se encuentre entre 8 y 14mm.

Aleatorización

GRUPO 1 BX
ENDOMETRIO PRE-
RECEPTIVO

3,5 DÍA post inicio PG

GRUPO 2

BXENDOMETRIO
RECEPTIVO

5 DÍA post inicio Pg.

GRUPO 1
BX ENDOMETRIO
RECEPTIVO

5 DÍA post inicio Pg.

GRUPO 2
BXENDOMETRIO

POST- RECEPTIVO

6,5 DÍA post inicio P<g

HOJA DE SEGUIMIENTO DE LAS PACIENTES

Procedimientos	Visitas							
	Selección	Bas al	DÍA 2	DÍA 8-10	Aleatorización	DÍA P3,5†	DÍA P5	DÍA P6,5
Cl paciente	x							
Criterios de selección	x							
Historia clínica	x							
Medicación concomitante	x							
Exploración física		X						
Ecografía transvaginal: grosor endometrial		X	x	x	x	x	x	X
Aleatorización a partir fase lútea D14 o LE >6 mm					x			

Estudio transcriptómico						x	x	x
Progesterona sérica			x		x	x	x	X
Estradiol sérico			x		x	x	x	X
Progesterona tisular Kit Elisa detección P						x	x	X

† Según el grupo al que hayan sido asignado: a) Grupo 1 en día 3.5 y 5 desde el inicio de progesterona, b) Grupo 2 en día 5 y 6.5 desde el inicio de progesterona

RECLUTAMIENTO DE LAS PACIENTES

El estudio se realizará de acuerdo con los principios éticos que se derivan de la Declaración de Helsinki (Fortaleza, Brasil, octubre de 2013). Además, el estudio se realizará de acuerdo con el protocolo, buena práctica clínica (BPC) de acuerdo con las directrices de la conferencia internacional sobre armonización (ICH) y los requisitos normativos para las instituciones participantes.

El estudio se realizará según un protocolo revisado por el CEIC Parc Salut Mar **CEIm 2021/9717**. Se considera que los beneficios del estudio están en proporción con los riesgos; y se respetarán los derechos y el bienestar de los sujetos.

Ver anexo I: proyecto de investigación CEIC PSMAR: confirmación aceptación

Retirada de pacientes

Se propondrá formar parte del proyecto a mujeres que cumplan los criterios de inclusión/exclusión. En ese momento se les entregará la hoja informativa y se procederá la firma del consentimiento informado, previamente aprobado por el CEIC.

Los sujetos pueden retirar su consentimiento para su participación en cualquier momento sin perjuicio. Adicionalmente, el investigador puede retirar a un sujeto si, según la opinión clínica del investigador, está en el mejor interés del sujeto o si el sujeto no puede cumplir con los requisitos del protocolo. Asimismo, el promotor también puede interrumpir el protocolo si se detecta una incidencia inaceptable de acontecimientos adversos, si la inclusión de pacientes es inadecuada o si la recogida de datos es inadecuada o imprecisa.

VARIABLES DEL ESTUDIO

Definición de las variables del estudio

Las variables de interés a recoger en las pacientes incluidas para el estudio son

Variables demográficas

- Datos demográficos: edad, peso y talla.
- Historia médica: incluyendo constantes vitales, exploración física, tensión arterial, pulso y antecedentes médicos.
- Medicación actual: se registrará en el Cuaderno de Recogida de Datos (CRD) cualquier medicación que la paciente esté recibiendo en el momento de su inclusión en el estudio.
- Antecedentes obstétricos y ginecológicos
 - Variables relacionadas con los antecedentes reproductivos:
 - Exploración ginecológica:
Ecografía transvaginal: Se registrarán las dimensiones uterinas en 3 ejes, así como el grosor endometrial. Se valorarán posibles alteraciones en la morfología uterina y se descartará patología anexiales. Durante el estudio, hay que descartar pacientes con hipoplasia endometrial <6mm o hiperplasia endometrial > 12mm)

Variable principal del estudio:

Todas las variables de estudio se determinarán a nivel basal, o en día 2 de ciclo (D2); b) en día 8 de ciclo (D8); c) en día 3,5 tras el inicio de Progesterona (DP3.5); d) en día 5 tras el inicio de progesterona (DP5); e) y en día 6,5 tras el inicio de Progesterona (DP6.5).

La variable principal es la Progesterona, que se estudiará a nivel tisular y sérico que se determinará mediante la muestra de endometrio utilizando un kit ELISA.

Se utilizarán los niveles de la Progesterona tisular normalizada (miligramo de progesterona por gramo de tejido endometrial).

Para conocer el nivel de Progesterona sérico (ng/ml) que se determinará los días específicos mediante quimioluminiscencia.

Ver ANEXO IV : kit Elisa para procesar progesterona tisular del endometrio)

Variables secundarias:

Para conocer el nivel de Estradiol tisular plasmática (pg/mL) que se determinará los días D2, D8-10 y tras la administración progesterona día D+P 3,5 y D+P5 vs día P+D 5 y P+D 6,5 mediante quimioluminiscencia.

Para determinar la Antimulleriana plasmática se realizará D2 mediante quimioluminiscencia.

Hormonas	Técnica	Unidades	Valores de referencia
Progesterona	Quimioluminiscencia	ng/mL	<i>Fase Folicular</i> 0.057-0.316 <i>Fase</i> <i>Ovulación</i> 0.121-12.05 <i>Fase lútea</i> 1.841-24.01 <i>Postmenopausia</i> <0.05-0.127
17-beta estradiol	Quimioluminiscencia	pg/mL	Fase Folicular 50-59.8 Pico ovulatorio 111-148 Fase lútea 89.1-114 Postmenopausia <7.97
Hormona antimulleriana (HAM)	Técnica de ELISA	ng/mL	Rango detección 0.01-23 ng/mL imprecisión <5%

Para conocer el grosor de la línea endometrial que se determinará los días D2,(día basal) D8-10 (tras haber iniciado el tratamiento, o haber conseguido una línea endometrial mayor de 6 mm) y tras la administración progesterona día D+P 3,5 y D+P5 vs día P+D 5 y P+D 6,5 mediante un ecógrafo vía transvaginal.

MEDICACIÓN DEL ESTUDIO

La medicación para tomar serán dos hormonas, Estradiol y Progesterona, como terapia hormonal substitutiva, que provocan un efecto transitorio en el endometrio, tejido del interior de útero, que nos ayudará a conocer la receptividad endometrial. Terapia hormonal substitutiva se realizará mediante: Estradiol oral 6mg/día desde Día 2 del ciclo y Progesterona vaginal 200mg/8h a partir del día 14 del ciclo. Utilizaremos la terminología según la última versión de terminología internacionalmente consensuada (5,177).

En el estudio utilizamos Progyluton ® y Progeffik ® como tratamiento para las pacientes Progyluton® (Bayer) son comprimidos orales de Valerato de Estradiol 2mg y de Norgestrel 0,5 mg, las pacientes se tomaban solo las pastillas blancas que contenían Valerato de Estradiol tres veces al día durante el todo el protocolo del estudio.

(https://cima.aemps.es/cima/dochtml/p/53201/Prospecto_53201.html)

Como progesterona las pacientes utilizaban Progeffik ® (EFFIK) son capsulas blandas de 100mg de Progesterona que nuestras pacientes utilizaban 2 capsulas blandas cada 8 horas

(https://cima.aemps.es/cima/dochtml/p/60879/Prospecto_60879.html)

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Estudio del tejido endometrial: se utiliza la prueba transcriptómica que permite valorar mediante un panel de 48 genes la identificación específica del perfil transcriptómico y mediante un kit ELISA se medirá el nivel de progesterona en el tejido del endometrio.

Del estudio de transcriptoma obtendremos la expresión de los genes individuales y mediante el algoritmo clasificador, el estatus de la ventana de implantación. El transcriptoma nos permite por un lado fechar la receptividad y por otro conocer las implicaciones moleculares en cada estadio. Esta prueba se realiza sobre ARN extraído de la biopsia de endometrio. El nivel de expresión de los genes clave relacionados con la receptividad endometrial se analiza utilizando la metodología de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa y mediante un algoritmo clasificador establecer el estado receptivo de la muestra

Se pueden analizar mediante herramientas bioinformáticas utilizando programas estadísticos: Foldchange, DAVID, STRING.

El nivel de la progesterona en el tejido endometrial realizaremos dos kit de Elisa para valorar correctamente la variabilidad de cada muestra realizando un promedio y homogenizando más los resultados por la falta es estudios previos sobre los niveles tisulares del a progesterona en el endometrio.

GESTIÓN DE DATOS Y DE MUESTRAS

Tras la recolección de las biopsias endometriales, éstas fueron depositadas inmediatamente en criotubos con 1ml de RNAlater (un estabilizador y protector del RNA) y guardadas a 4°C durante al menos 4 h (para permitir a la solución de RNAlater penetrar por todo el tejido).

Las muestras se remitían, vía mensajero, al laboratorio que está situado en Sevilla, SINA E y se almacenaban a -20°C hasta su procesamiento con el test MiFERT&i. El RNA total fue extraído mediante el RNeasy mini kit (Qiagen, London, UK), siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, las biopsias endometriales fueron homogenizadas utilizando 30mg de tejido en 600 µl de tampón de lisis con perlas de vidrio (Sigma Aldrich Corp., St Louis, MO) en el homogeneizador de muestras Ribolyser (Bio-Rad Laboratories, Madrid, España) durante 45 segundos a una intensidad de 6,5. Se pasaron las muestras lisadas a tubos nuevos y se centrifugaron durante 3 min a 16.000xg. Los sobrenadantes fueron transferidos a nuevos tubos eppendorfs de 1,5ml y se mezclaron con 600 µl de etanol al 70% (v/v) en agua DEPC. Las muestras se pasaron a través de las mini columnas RNeasy que estaban en los tubos de colección de 2 ml y se centrifugaron durante 15 segundos a 8.000xg descartándose los sobrenadantes. Se añadió 700µl de tampón RWI a las mini columnas RNeasy y se volvió a centrifugar durante 15 segundos a 8.000xg descartándose el sobrenadante. Se realizó un primer lavado añadiéndose 500µL de tampón RPE a las mini columnas RNeasy, se centrifugaron durante 15 segundos a 8.000xg y se desechó el sobrenadante. El segundo lavado con el mismo tampón se realizó durante 2 min a 8.000xg desechando el sobrenadante tras la centrifugación. Las columnas de RNeasy se colocaron en los tubos colectores de 1,5 ml. A las muestras, ya sobre hielo, se le añadieron de 30–50µl de agua libre de RNasas directamente a la membrana de las columnas y se centrifugó durante 1 min a 8.000xg para diluir el RNA total. La pureza y concentración del RNA total se confirmó por el mismo método previamente mencionado.

EXTRACCIÓN DE RNA PARA EL ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO

La extracción del RNA total de las biopsias fue realizada mediante el kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Manchester, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, con ayuda de un bisturí y unas pinzas de metal, se introducen unos 30 mg del total del tejido en tubos Eppendorf ya preparados con 600 µl de buffer de lisis y 6 µl de 13-mercaptoetanol. Es aconsejable quitar el exceso de RNA later del tejido antes de introducirlo en el tubo Eppendorf. A continuación, se añaden unas pocas perlas de vidrio (Sigma Aldrich, Misuri, Estados Unidos) para favorecer la homogenización en el FastPrep Ribolyser (Laboratorios Bio-Rad, Madrid, España), durante 45 segundos a una intensidad de 6,5 m/s. Una vez homogeneizado el tejido, pasar el sobrenadante a un nuevo Eppendorf, con cuidado de no coger las perlas de vidrio del pellet y centrifugar a máxima potencia (21300 g) durante 3 minutos. Transferir de nuevo el sobrenadante resultante a un nuevo tubo al que se añaden 600 µl de etanol al 70% (v/v) en agua DEPC para eliminar las moléculas no nucleotídicas. Homogeneizar la mezcla con la pipeta e ir pasando el contenido a través de la mini columna RNeasy del kit comercial. Usar centrifugaciones cortas (15 segundos) a 8000 g para favorecer el flujo por la columna, e ir descartando el sobrenadante. Repetir el proceso anterior con 700 µl de tampón RW1 para eliminar los restos celulares, junto a dos lavados con 500 µl del tampón RPE para quitar las sales no deseadas, siendo el último de 2 minutos en lugar de 15 segundos.

A continuación, diluir el RNA total con 40 µl de agua libre de RNAsas, centrifugando a 8000 g durante 1 minuto. Es sumamente importante usar RNasa zip y hielo en todo el proceso de extracción, para evitar la degradación del RNA. El siguiente paso es la medición de la concentración y pureza del RNA, para la cual se empleó el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). Por último, se ajustó la concentración de cada muestra en el rango de 70-250 ng/µl, usando agua libre de RNAsas como diluyente.

Adjuntamos anexo III para explicar el procesamiento RNA para la

técnica transcriptómica (122).

Técnica Elisa para procesar la progesterona tisular

Es un procedimiento rápido y sencillo de los más utilizado en investigación y diagnóstico para la monitorización; existencia o no de la proteína y su nivel para poder cuantificarla (178).

La sustancia analizada debe ser de naturaleza proteica, como son las hormonas como la progesterona

ELISAs (*ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY*)

El ELISA es un método utilizado para detectar cuantitativamente un antígeno en una muestra. Un antígeno es cualquier sustancia extraña que provoca una respuesta del sistema inmunitario en forma de anticuerpos. La diversidad de antígenos potenciales es enorme, por lo que los ELISA se utilizan en muchas áreas de investigación y pruebas para detectar y cuantificar antígenos en una amplia variedad de tipos de muestra. Con los ELISA se pueden analizar sustancias específicas de interés en lisados celulares, muestras de sangre, fluidos corporales, alimentos y más.

Existen cuatro tipos principales de ELISA: directo, indirecto, competitivo y tipo sándwich.

El ELISA empleado en esta tesis para la detección de progesterona en tejido endometrial es de tipo competitivo (Progesterone competitive ELISA kit, Invitrogen), aunque incluye algunas modificaciones a este diseño general. Se trata de un ensayo diseñado para cuantificar el nivel de progesterona en distintos tipos de muestras biológicas, con independencia de la especie de origen.

Para la cuantificación fue necesaria la elaboración de una curva estándar, con concentraciones de progesterona conocidas, en la que se interpolaron las absorbancias obtenidas en las muestras, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las placas se adquieren ya sensibilizadas con un anticuerpo desarrollado en cabra frente a la IgG de ratón. Entre los componentes del kit se incluye un anticuerpo de captura sin marcar específico de la progesterona desarrollado en ratón, antígeno (progesterona) marcado con peroxidasa, su substrato, así como

los *buffers* necesarios. La competición entre el antígeno presente en las muestras con este marcado con peroxidasa, dará como resultado un porcentaje de reducción en la transformación del substrato en producto, que corresponde a la cantidad de progesterona presente en la muestra de endometrio .

ELISA sándwich

En el ELISA tipo sándwich se usan dos anticuerpos específicos de dos epítomos diferentes presentes en el antígeno diana. El anticuerpo de captura se une al fondo del pocillo de la microplaca uniéndose a uno de los epítomos del antígeno. El anticuerpo de detección se une a un epítomo diferente del antígeno y está conjugado a una enzima que permite su detección. Si el anticuerpo de detección no está conjugado, entonces se necesita un anticuerpo de detección secundario conjugado con una enzima, como en el caso del ELISA indirecto.

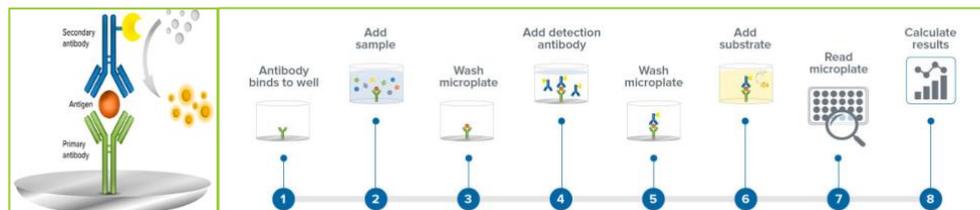


Figura 11 En la ilustración se muestran los pasos para un ensayo de ELISA tipo sándwich típico

Adjuntamos Anexo IV donde se explica el kit comercial para poder procesar la Progesterona tisular

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Los resultados crudos de la RT-PCR son revelados por la plataforma *Biomark HD* de Fluidigm en formato .bml. Para analizarlos es necesario instalar el software "Biomark & EP1 Software" (Fluidigm, San Francisco). En este software es posible estudiar de forma preliminar los resultados a través de representaciones gráficas que muestran la curva de melting para cada reacción de amplificación. Es necesario, en primer lugar, comprobar los resultados de estas gráficas para cada muestra y gen, tanto de forma individual, como global, para poder detectar los posibles errores. Este software permite exportar los datos en formato csv. De todos los valores que nos proporciona la plataforma, seleccionamos el nombre de la muestra, el nombre del gen y el valor de Ct de la PCR (número de ciclos necesarios para llegar al umbral de fluorescencia detectado para el lector). Estos valores son ordenados y normalizados en función de la expresión media de los genes housekeeping.

El software *Prism version 8* es una herramienta muy útil para el análisis elemental de los datos. Esta plataforma te ofrece generar una gran variedad de gráficos a la vez que te permite crear análisis estadísticos de forma clara y sencilla. Otra herramienta más potente y compleja para el análisis bioinformático de los datos es *Rstudio version 3.3.3*. Con esta plataforma se realiza un Heatmap o mapa de calor con el conjunto de valores de Ct. El Heatmap es un gráfico que representa el nivel de expresión génica en función de la intensidad de una escala de colores y en base a esta intensidad realiza una reordenación de las muestras.

Por otro lado, se lleva a cabo un análisis de componentes principales (PCA, de sus siglas en inglés) a través de la plataforma *IBM SPSS Statistics versión.25.0*. En primer lugar, se realiza un análisis discriminante, una técnica de análisis multivariante de dependencia que estudia la relación entre las variables y agrupa las muestras en función de aquellas variables que permiten alcanzar la mejor clasificación posible. Además, esta plataforma te permite realizar análisis factorial de interdependencias, que sirve para reducir

el número de variables totales a aquellas que explican el mayor porcentaje de la varianza total del estudio, perdiendo la mínima cantidad posible de información.

Por otro lado, para identificar los genes expresados diferencialmente, se calcula el Fold-Change (FC) de cada gen para determinar la tasa de cambios de expresión transcriptómica durante el tratamiento (expresión pos-tratamiento, expresión pre-tratamiento) y se representan en forma logarítmica mediante un gráfico de barras, a través de la plataforma *Prism*. Este parámetro podría definirse como el número de veces que el nivel de sobre-expresión o represión de estos genes varia.

Por último, se realiza un análisis funcional, para determinar las principales rutas biológicas implicadas con relación al objetivo del estudio. El software *RStudio* permite realizar un enriquecimiento funcional de todos estos genes a través del paquete topGO. Este análisis realiza la prueba de Fisher para todos los casos y proporciona la ontología genética más significativa para el conjunto de genes proporcionados. Adicionalmente, se utiliza la plataforma *STRING* (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) *version 11.0*, una herramienta capaz de representar las conexiones entre los genes y las interacciones proteína-proteína, para proporcionar así una evaluación global de los resultados.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS

ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN INCLUIDA

Se realiza un análisis descriptivo de la población estudio, que incluye la edad, el IMC, los niveles de AMH así como la presencia de antecedentes médico-quirúrgicos de interés. Asimismo se describen la línea endometrial y los parámetros bioquímicos, que incluyen el Estradiol y la Progesterona séricos en los siguientes momentos del ciclo.

También se analizan los niveles de Progesterona tisular y la receptividad endometrial en las distintas ventanas tras el inicio del tratamiento con Progesterona. Se utilizarán los niveles de la Progesterona tisular normalizada (miligramo de progesterona por gramo de tejido endometrial)

Para las variables numéricas se comprueba la normalidad mediante el estudio de Shapiro-Wilk y Skewness-Kurtosis (estableciendo la normalidad para valores de $p > 0.05$). Las variables numéricas normales se expresan en media \pm desviación estándar (DE), las numéricas que no siguen una distribución normal con la mediana (percentil 5, percentil 95), y las variables categóricas con número (porcentaje).

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE GRUPOS DE RANDOMIZACIÓN

Se realiza un estudio comparativo que incluye todas las variables para comparar la homogeneidad entre los grupos en los que se analiza la Progesterona tisular y ventana de implantación en DP3.5 en comparación con DP6.5 y valorar si existe alguna variable para la cual la población ha sido randomizada de forma asimétrica.

En dicho estudio comparativo, las variables numéricas normales se analizarán mediante la t-student, y las variables numéricas no normales mediante la prueba de la U de Mann-Whitney o suma de los rangos de Wilcoxon. Las variables categóricas se analizarán mediante la prueba χ^2 , y se realizará un análisis post-hoc de los residuales ajustados para comparar diferencias entre subgrupos (expresado en z).

RELACIÓN ENTRE LA PROGESTERONA TISULAR Y SÉRICA

Se realiza un análisis de correlación Pearson entre la progesterona tisular y la sérica en las distintas ventanas de implantación (DP3.5, DP5, DP6.5).

Se evalúa una posible relación lineal mediante la prueba de correlación de Spearman, y posteriormente una prueba de regresión lineal. En caso de no existir relación lineal entre ambas variables se evaluarán relaciones no lineales mediante pruebas de regresión no paramétricas, en concreto la estimación de Spline-B cúbico.

Se representará de forma gráfica la relación entre ambas variables en las distintas ventanas de implantación mediante los marginales de cada modelo de regresión no paramétrica.

RELACIÓN ENTRE LA LÍNEA ENDOMETRIAL, LA PROGESTERONA SÉRICA Y LA TISULAR CON RESPECTO A LA RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL

Asimismo, se evalúa la relación que tienen la línea endometrial, la progesterona sérica y la tisular con respecto a la receptividad endometrial.

Primero se evalúa si existen diferencias significativas en cada una de las variables según la receptividad endometrial mediante la prueba de Kruskal Wallis. Posteriormente se realiza una regresión no paramétrica mediante la estimación de Spline-B cúbico para evaluar una posible relación entre subgrupos para cada variable. Se evaluará tanto la línea endometrial, como la progesterona sérica y la progesterona tisular entre endometrio receptivo vs pre-receptivo, receptivo vs post-receptivo, pre-receptivo vs post-receptivo.

La significación estadística se establece para $p < 0.05$. Los análisis post-hoc de residuales ajustados se expresan con la z. Residuales ajustados superiores a ± 1.96 se consideran valores más extremos de lo que se esperaría si la hipótesis nula de independencia fuera cierta, y por tanto se considerarán estadísticamente significativos.

Se realiza un análisis para evaluar la capacidad tanto de la Progesterona sérica como la Progesterona tisular para discriminar un endometrio receptivo de un no receptivo (ya sea pre o post receptivo), mediante la curva ROC. Los resultados del análisis se expresan con el área bajo la curva y la p de significación.

Asimismo, se realiza un análisis de regresión multivariante para evaluar cómo se puede prever el nivel de la progesterona tisular a partir de la progesterona sérica en función de la receptividad endometrial.

El análisis estadístico se llevará a cabo utilizando el paquete informático STATA versión 17, 2022.

ASPECTOS ÉTICOS Y DE CONFIDENCIALIDAD

Este estudio se llevará a cabo de conformidad con el Reglamento General de Protección de Datos 2016/679 y la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales. Solo los médicos e investigadores colaboradores relacionados con el proyecto accederán a los datos con fines académicos/ de investigación y médicos, utilizando bases de datos disociadas e identificando en una base de datos separada a cada paciente con su número de historia clínica (únicamente enlazable a datos de identificación de la paciente mediante acceso a historia clínica electrónica en el Hospital). Se recogerán los datos clínicos de las pacientes de forma prospectiva, a partir de la historia clínica y los derivados de las visitas de control (en el caso de realizarla con modalidad telemática la información quedará transcrita en la historia clínica electrónica). Los datos del estudio deben ser verificables con los datos fuente, lo que necesita el acceso a todos los registros originales, informes de laboratorio y registros de sujetos. La confidencialidad de los datos y la identidad de los pacientes se mantendrá durante el estudio y tras la finalización del mismo mediante protección disociada reversible. Solo tendrá acceso a estos registros confidenciales el investigador principal y el personal autorizado del estudio. Los datos se guardarán en una carpeta protegida dentro de la unidad "G:/" de la red de ordenadores del hospital. Ningún dato utilizado en el análisis y posterior divulgación de los resultados del estudio contendrá referencia identificable alguna referente a los nombres de pacientes. Una vez finalizado el estudio se comunicarán los resultados a las autoridades competentes, de forma conveniente, de acuerdo con la legislación local. Se prevé publicación de los resultados en revistas científicas internacionales del ámbito de la ginecología.

Este estudio se llevará a cabo de conformidad con el Reglamento General de Protección de Datos 2016/679 y la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales.

Los datos del estudio deben ser verificables con los datos fuente, lo que necesita el acceso a todos los registros originales, informes de laboratorio y registros de sujetos. La confidencialidad de los datos y la identidad de los pacientes se mantendrá durante el estudio y tras la finalización del mismo. Solo

tendrá acceso a estos registros confidenciales el investigador principal y el personal autorizado del estudio.

Ningún dato utilizado en el análisis y posterior divulgación de los resultados del estudio contendrá referencia identificable alguna referente a los nombres de pacientes.

Una vez finalizado el estudio se comunicarán los resultados a las autoridades competentes, de forma conveniente, de acuerdo con la legislación local.

FINANCIACIÓN

Las pacientes no recibieron ninguna compensación económica por participar en este estudio. Son pacientes que cumplen los requisitos reclutados el Parc Salut Mar y la clínica Fertty. Asimismo, su participación le supuso tener información genética de cuál es el mejor momento para la implantación endometrial de su embrión, gracias al estudio genético, el test transcriptómico que se financia desde la empresa del Kit del estudio genético PRONACERA.

9.RESULTADOS

ANÁLISIS DESCRIPTIVO

Se reclutaron 26 mujeres para el estudio, 22 pacientes firmaron el consentimiento informado y finalizaron el estudio 4 pacientes no llegaron a firmar el consentimiento tras la explicación del estudio y por la necesidad de realizar 2 biopsias de endometrio.

A continuación, vamos a describir las características basales de las pacientes incluidas en el estudio de manera individual y al final las mostramos en la **tabla número 1**.

CARACTERÍSTICAS BASALES

EDAD

La media de edad de las pacientes es de 36.45 +/- 3.95 años Al categorizar la edad por grupos, se observa que el 31.82% tienen menos de 35 años, mientras que el 36.36% tienen entre 35 y < 38 años, un 13.63% entre 38 y < 40 años y hasta un 18.18% tiene una edad \geq 40 años.

IMC

Las pacientes incluidas en el estudio tienen un IMC medio de 23.21(17.93,33.35) kg/m² .

Categorizando la población según los grupos definidos por la WHO, un 72.73% tienen normo peso, y un 9.09% bajo peso, mientras que un 4.55 y 13.64% de pacientes tienen sobrepeso y obesidad grado I, respectivamente.

AMH

Las pacientes incluidas en el estudio tienen un nivel Hormona Antimulleriana de 1.15(0.32,4.24) ng/ml.

ANTECEDENTES MÉDICO-QUIRÚRGICOS

El 50% de las pacientes del estudio no tienen antecedentes médico-quirúrgicos significativos. El 18.2% de las pacientes del estudio tienen patología tubárica, que incluye como principales patologías el hidrosálpinx y la gestación ectópica.

El 18.2% de las pacientes tenían antecedentes de patología uterina.

El 13.6% de las pacientes tenían patología médica asociada, que en 75% de los casos era hipotiroidismo. En las pacientes con hipotiroidismo , solo una paciente presentaba Obesidad tipo 1 con síndrome metabólico que correspondía al 25% de las pacientes.

Ninguna de nuestras pacientes había realizado ninguna técnica de reproducción previa ni había sufrido abortos.

LÍNEA ENDOMETRIAL A NIVEL BASAL

En las pacientes incluidas en el estudio el día 2 del ciclo tienen como media 3.97 (2.5, 7) milímetros de línea endometrial.

NIVELES PLASMÁTICOS BASALES

En las pacientes incluidas en el estudio el día 2 del ciclo tienen como media 42.1(14.9,79.2) pg/ml de Estradiol sérico.

En las pacientes incluidas en el estudio el día 2 del ciclo tienen como media 0.446 ng/m. (0.07,0.94) del nivel de Progesterona sérica.

A continuación, describimos el resumen de las características basales de las pacientes del estudio, en la **Tabla 1**

TABLA 1: CARACTERÍSTICAS BASALES DE LA POBLACIÓN

Características basales	Media+/-DS Mediana(p5,p95) n(%)
N	22
Edad	36.45(3.94)
IMC	23.21(17.93,33.34)
- <i>Bajo peso</i>	7(31.82)
- <i>Normo peso</i>	13(59.1)
- <i>Sobrepeso</i>	1(4.54)
- <i>Obesidad</i>	
AHM	1.15(0.32,4.24)
Antecedentes de interés	
- <i>Factor tubárico</i>	4(18.2)
- <i>Patología uterina</i>	4(18.2)
- <i>Patología médica</i>	3 (13.64)
Niveles plasmáticos a nivel basal	
- <i>LE basal</i>	3.97 (2.5, 7)
- <i>E basal</i>	42.1(14.9,79.18)
- <i>Ps basal</i>	0.45 (0.07,0.94)

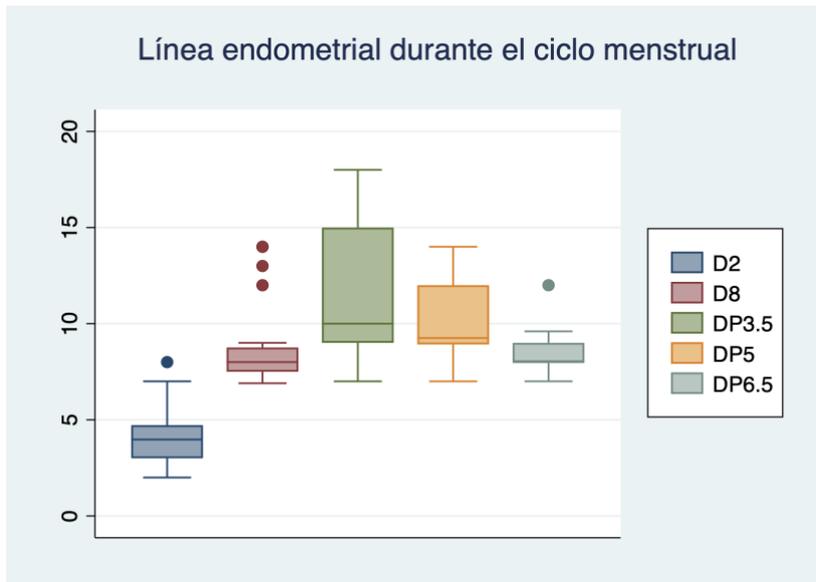
DESCRIPTIVO DEL ENDOMETRIO DURANTE LA EVOLUCIÓN DEL ESTUDIO.

EVOLUCIÓN DE LA LÍNEA ENDOMETRIAL DURANTE EL PROTOCOLO DEL ESTUDIO

Se realiza una representación gráfica de la evolución de la línea endometrial durante el estudio.

La evolución de la línea endometrial no es lineal durante el estudio, se observa como la línea endometrial va creciendo durante la fase folicular hasta que llega a un máximo en el día 3.5 y en la fase secretora se identifica una disminución progresiva de la línea endometrial, como se ve en la gráfica 1.

Grafica 1: Evolución línea endometrial



DESCRIPTIVO DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DURANTE LA EVOLUCIÓN DEL ESTUDIO

EVOLUCIÓN DEL ESTRADIOL SÉRICO DURANTE EL PROTOCOLO DEL ESTUDIO

Se realiza una representación gráfica de la evolución de los niveles plasmáticos de estradiol durante el estudio. Como se puede observar, los niveles de estradiol se elevan durante la fase proliferativa del ciclo (D2 y D8) y se mantienen estables con un ligero ascenso progresivo durante la fase secretora (DP3.5, DP5 y DP6.5) (ver gráfica 2).

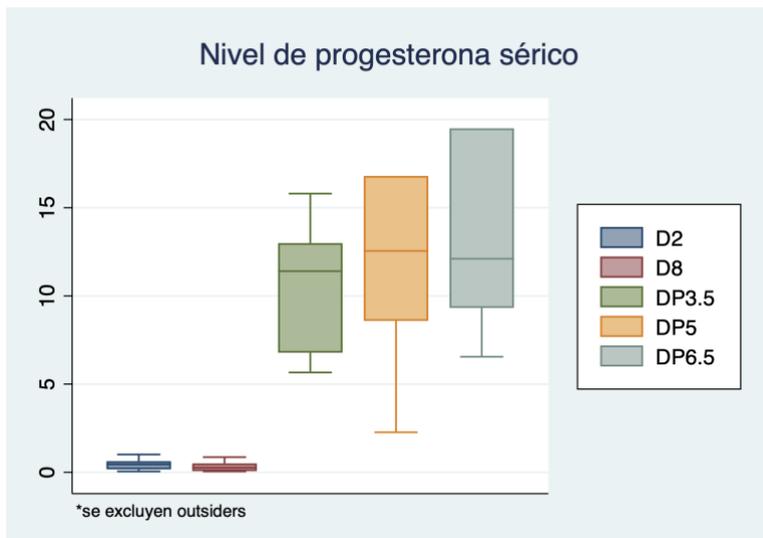
Gráfica 2: Evolución Estradiol sérico



EVOLUCIÓN DE LA PROGESTERONA SÉRICA DURANTE EL PROTOCOLO DEL ESTUDIO

Se realiza una representación gráfica de los niveles de Progesterona sérica durante el estudio, y se excluyen los *outsiders** para optimizar la visualización de dicha gráfica (gráfica 3).

Gráfica 3: Evolución Progesterona sérica

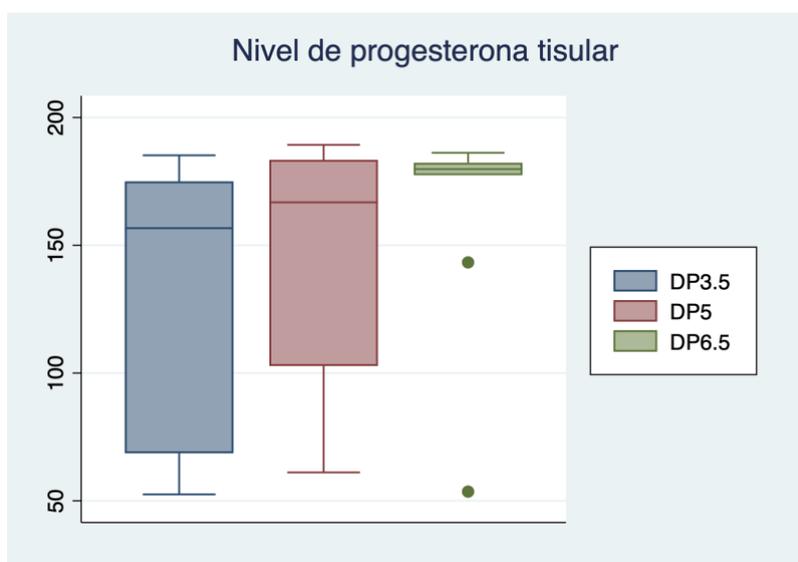


* 8 pacientes tienen valores muy alejados, de 45.50 ng/ml el DP3.5, hasta valores mayores de 200ng/ml el DP5 y finalmente valores mayores de 300 ng/ml en 40.40 ng/ml y 403.74 ng/ml DP6.5.

EVOLUCIÓN DE LA PROGESTERONA TISULAR DURANTE EL PROTOCOLO DEL ESTUDIO
La Progesterona tisular va en aumento progresivo durante el tratamiento del estudio.

Al inicio del descriptivo, se muestran los niveles de Progesterona tisular en los distintos momentos de la ventana de implantación. Describimos como va aumentando la Progesterona tisular, el DP 3.5 la mediana es de 156.7 ng P4/mg con IC 95% (52.5,185.2), el DP5 es la mediana de 166.8 ng P4/mg con IC 95% (68.05,188.25) y finalmente el DP6.5 la mediana es de 179.05 ng P4/mg con IC 95%(53.6,186.2) como se puede ver en la tabla 2 y se representa gráficamente en la gráfica 4.

Gráfica 4 Evolución Progesterona tisular



DESCRIPTIVO DE LA VENTANA DE IMPLANTACIÓN ENDOMETRIAL

En día 5 tras el inicio del tratamiento con Progesterona, el 80% de las pacientes mostraron un endometrio receptivo, aunque el 15% de las pacientes todavía permanecía pre-receptiva y en cambio un 5% de las pacientes eran ya post-receptivas.

En el grupo que fue randomizado a biopsia endometrial en día 3.5 tras el inicio de la progesterona, se detecta un endometrio receptivo en un 54.55% de las pacientes, un 36.36% de las pacientes presentaban endometrio pre-receptivo y 1 de ellas (9.09%) ya mostraba endometrio post-receptivo.

En el grupo que realiza la biopsia endometrial en el día 6.5 de progesterona, un 27.27% de las pacientes tienen endometrio receptivo, el 63.64% de las pacientes presentan el endometrio post-receptivo, y tan solo 1a paciente ,9.09% tiene endometrio pre-receptivo.

Los resultados de la receptividad endometrial se muestran en la **tabla 2**.

Resumimos todos los datos de las variables del estudio y cómo evolucionan durante el estudio, .presentándolo en una **tabla número 2**

TABLA 2 RESUMEN DE LAS VARIABLES DURANTE EL ESTUDIO

	D2	D8	DP3.5 <i>Media +/- DS</i>	DP5 <i>Mediana p5-p95.</i>	DP6.5 <i>n (%)</i>
N	22	22	11	22	11
LE mm	3.97(2.5, 7)	8 (7, 14)	10 (7,18)	9.25 (7,14)	8 (7,12)
E pg/mL	42(14.9, 79.18)	154.88(122.0 1,531.29)	136(11.9, 269.0)	147(76.5,335 .08)	163.67(66.73,4 03.74)
Ps ng/mL	0.44(0.0 7, 0.94)	0.26(0.05, 0.78)	11.4(5.66, 45.5)	12.55(3.83,2 70.24)	12.10(6.55,270. 24)
Pt ngP4/mg	NA*	NA*	156.7(52. 5,185.2)	166.8(68.05, 188.25)	179.05(53.6,18 6.2)
VDI	NA*	NA*			
Pre-R			4(36.36)	3(15)	1(9.09)
R			6(54.55)	16(80)	3(27.27)
Pos-R			1(9.09)	1(5)	7(63.64)

NA* no aplicable

ANÁLISIS COMPARATIVO SEGÚN EL GRUPO DE RANDOMIZACIÓN

Se analiza la homogeneidad de grupos tras la randomización para las distintas variables del estudio.

CARACTERÍSTICAS BASALES

EDAD

Se compara la edad media entre los 2 grupos de randomización, y como se observa en la tabla 3 no se detectan diferencias estadísticamente significativas (p de 0.0827).

IMC

Se compara el IMC medio de las pacientes según el grupo de randomización, y no se observan diferencias significativas (p 0.098), como se muestra en la tabla 3.

AMH

Se compara la Antimulleriana entre los grupos del estudio y como se identifica en la tabla 3, no se observan diferencias significativas con una p de 0.342.

ANTECEDENTES MÉDICO-QUIRÚRGICOS

Se comparan los antecedentes médico-quirúrgicos entre ambos grupos de randomización. Como se observa en la tabla 3, globalmente no se detectan diferencias estadísticamente significativas (p 0.252).

Al analizar los residuales ajustados, no se detectan diferencias significativas en los distintos antecedentes, tanto para la patología tubárica (z 0.000), la patología médica (z 1.864) ni la uterina (z -1.106).

LÍNEA ENDOMETRIAL EN LA FASE PROLIFERATIVA Y DÍA 5 DE PROGESTERONA

Se compara el grosor endometrial en ambos grupos de randomización. no se detectan diferencias significativas tanto en los D2 y D8 de la fase proliferativa (p 0.388 y 0.196, respectivamente), como en D5 tras el inicio de la progesterona (p 0.691), como se observa en la **tabla 3**.

PATRÓN HORMONAL SÉRICO DURANTE LA FASE PROLIFERATIVA Y DÍA 5 DE PROGESTERONA

ESTRADIOL

Se comparan los dos grupos en el D2 el Estradiol sérico y no se evidencian diferencias significativas con una p de 0.973.

Se comparan los dos grupos en el D8 el Estradiol sérico y no se evidencian diferencias significativas con una p de 0.150.

Se compara los dos grupos en el DP5 el Estradiol sérico y existen diferencias significativas con una p 0.019.

Todos estos resultados se detallan en la **tabla 3**.

PROGESTERONA SÉRICA

Se comparan los dos grupos en el D2 la Progesterona sérica y no se evidencian diferencias significativas con una p de 0.178.

Se comparan los dos grupos en el D8 la Progesterona sérica y no se evidencian diferencias significativas con una p de 0.383.

Se compara los dos grupos en el DP5 la Progesterona sérica y no existen diferencias significativas con una p 0.250.

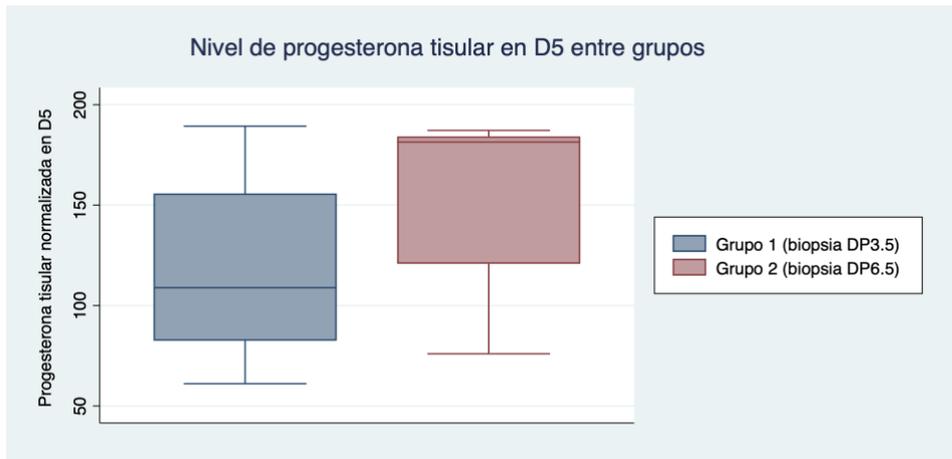
Todos estos resultados se detallan en la **tabla 3**.

PROGESTERONA TISULAR DÍA 5 DE PROGESTERONA

Se comparan los niveles de progesterona tisular en DP5 entre los grupos del estudio y no existen diferencias estadísticamente significativas con una p 0.210.

Representamos la Progesterona tisular entre los dos grupos., en la siguiente gráfica 5.

Gráfica 5: representación Progesterona tisular entre los dos grupos



VENTANA DE IMPLANTACIÓN ENDOMETRIAL EN EL DP5

Se compara la receptividad endometrial el día 5 tras el inicio de la progesterona entre ambos grupos de randomización y no se detectan diferencias significativas (p 0.497).

Se analizan los residuales ajustados por subcategorías, y no se detectan diferencias entre grupos para el endometrio pre-receptivo (z -0.818), receptivo (z 0.225) ni post-receptivo (z 0.928), como se muestra en la **tabla 3**.

Representamos la comparación de los dos grupos en la **tabla número 3**:

TABLA 3 COMPARACIÓN DE LOS GRUPOS EN EL ESTUDIO

Características basales	Grupo 1	Grupo 2	P / z*
	Media+/-DS	Mediana (p5,p95) n (%)	
<i>N</i>	11	11	
<i>Edad</i>	35+/-2.89	37.90+/-4.414	0.083
<i>IMC</i>	23.57(17.64,33.34)	22.862(17.92,34.41)	0.098
<i>AHM</i>	1.77+/- 1.49	1.22+/-1.12	0.342
<i>Factor tubárico</i>	2(18.18)	2(18.18)	0.000*
<i>Patología médica</i>	3(27.27)	0	1.864*
<i>Patología uterina</i>	1(9.09)	3(27.27)	- 1.106*
Línea endometrial			
<i>D2</i>	4(3,8)	3.95(2,7)	0.388
<i>D8</i>	8.2(6.9,14)	8(7,13)	0.195
<i>DP5</i>	9(7,14)	9.5(8,14)	0.691
Estradiol			
<i>D2</i>	42.9(14.9,79.18)	38.9(6.78,224)	0.973
<i>D8</i>	151.03(122.02,225)	193.97(122,67)	0.150
<i>DP5</i>	115.13(5,19)	190(102.14,360.30)	0.019
Ps			
<i>D2</i>	0.37(0.05,0.94)	0.53(0.07,1.01)	0.178
<i>D8</i>	0.22(0.05,0.51)	0.35(0.05,0.86)	0.383
<i>DP5</i>	12(2.27,59.99)	13.30(4.77, 299.99)	0.250
PT			
<i>D5</i>	108.9(61.1, 189.3)	181.4(76,187.2)	0.210
VDI DP5			0.497
<i>Pre receptivo</i>	1(9.09)	2(22.22)	-0.818 *
<i>Receptivo</i>	9(81.82)	7(77.78)	0.225*
<i>Post receptivo</i>	1(9.09)	0(00.0)	0.928.*

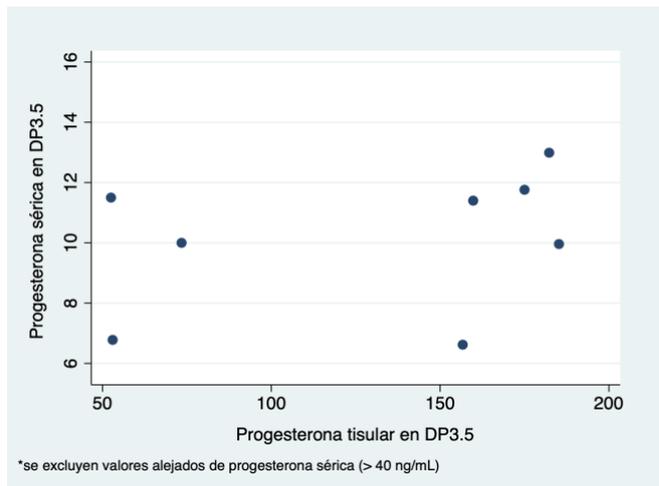
*valores expresados con z al ajustar los valores residuales , z >1.96 se consideran estadísticamente significativos

RELACIÓN ENTRE LA PROGESTERONA SÉRICA Y LA PROGESTERONA TISULAR

Correlación entre la Progesterona tisular y la sérica

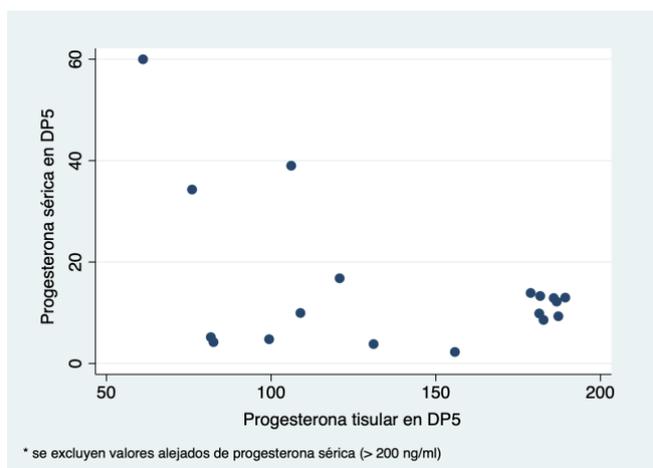
En el análisis de correlación de Pearson en DP3.5 se evidencia un coeficiente de correlación de 0.328 (p 0.427) sin tener en cuenta los valores alejados de la Progesterona sérica (≥ 40 ng/ml), representado en la Gráfica 6.

Gráfica 6: Correlación Ps y Pt en DP3.5

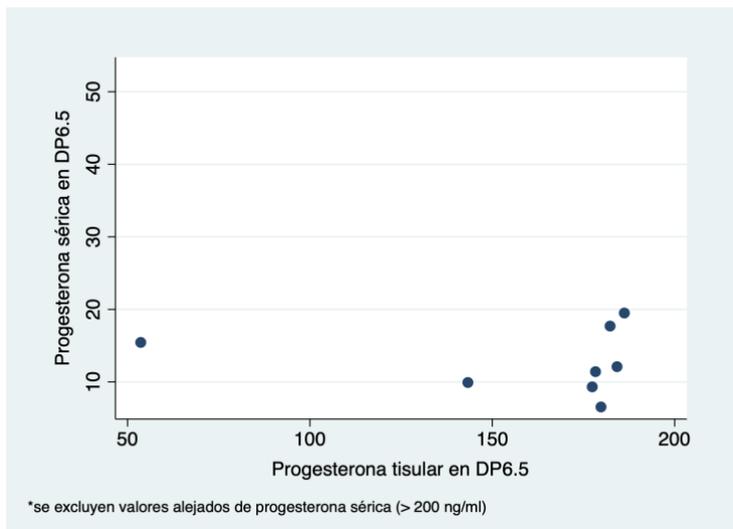


En DP5, el coeficiente de correlación de Pearson es de -0,21 (p 0.417) y en DP6.5 de -0,124 (p 0.769), sin tener en cuenta los valores alejados ($P_s \geq 40$ ng/ml), representados en la Gráfica 7 y 8, respectivamente.

Gráfica 7.: Correlación Ps y Pt en DP5



Gráfica 8: Correlación Ps y Pt en DP6.5



No se evidencia una correlación entre la Progesterona tisular y la sérica estadísticamente significativa en ningún momento del estudio, como se evidencia en la **tabla 4** .

Tabla 4 Correlación entre la Progesterona sérica y tisular

	<i>Pt</i>	<i>P</i>
<i>Ps DP3.5</i>	-1.39	0.460
<i>Ps DP5</i>	0.11	0.382
<i>Ps DP 6.5</i>	0.08	0.691

VENTANA DE IMPLANTACIÓN ENDOMETRIAL: RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL

RELACIÓN ENTRE LA LÍNEA ENDOMETRIAL Y LA RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL

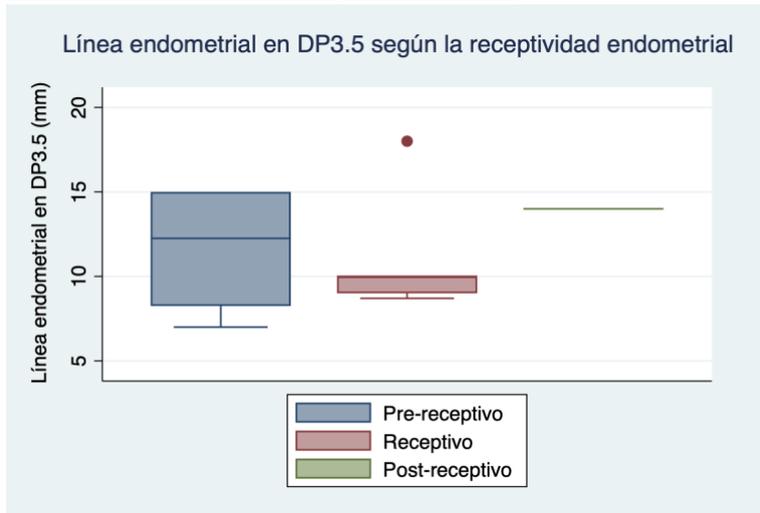
No se detectaron diferencias significativas en el grosor de la línea endometrial en función de la receptividad endometrial para ninguna de las ventanas de implantación en el test de Kruskal Wallis, con una p de 0.805, 0.214 y 0.091 en DP3.5, DP5 y DP6.5, respectivamente.

Describimos gráficamente mediante una diagrama de cajas de la línea endometrial en las distintas ventanas de implantación según el resultado de la receptividad endometrial. Se observa que la mayoría de las pacientes con un endometrio receptivo, independientemente de la ventana de implantación, tienen un grosor endometrial entre 8 y 10mm (como podemos ver en las gráficas 9,10,11).

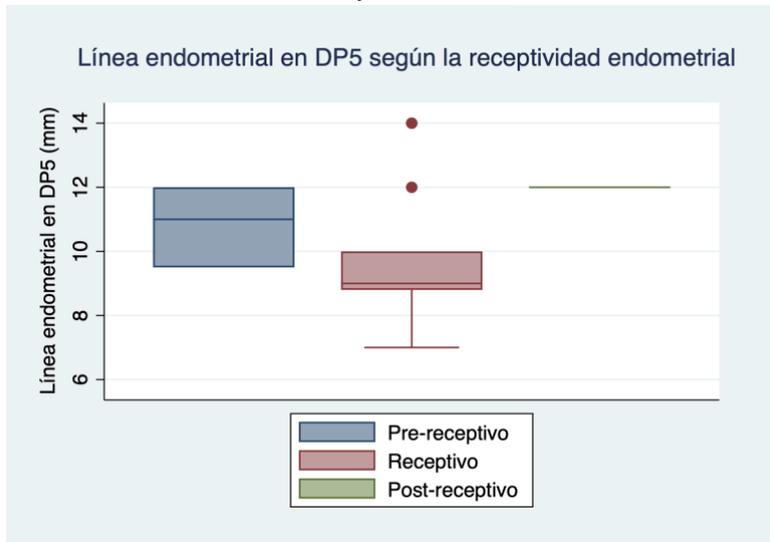
A continuación describimos la relación de la LE en los diferentes momentos de la ventana de implantación.

Se realiza un análisis de regresión no paramétrico para evaluar diferencias en la línea endometrial según la receptividad endometrial. En DP3.5 se detectan diferencias estadísticamente significativas en la LE en pacientes con endometrio post-receptivo en comparación con uno receptivo (p 0.046). En DP5 se detectan diferencias significativas entre mujeres con un endometrio post-receptivo en comparación con un receptivo o pre-receptivo (p 0.000 y 0.070, respectivamente). En DP6.5 se detectan diferencias significativas en el grosor endometrial en mujeres con endometrio pre-receptivo versus receptivo o post receptivo (p 0.000 y 0.028, respectivamente).

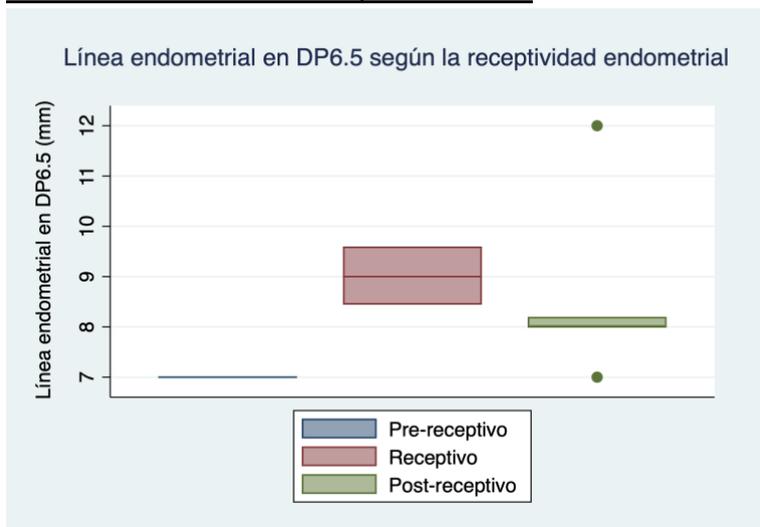
Gráfica 9: Relación LE y VDI DP3.5



Gráfica 10: Relación LE y VDI DP5



Gráfica 11: Relación LE y VDI DP6.5



En la **Tabla 6** se describen los coeficientes de la regresión Cubic-B spline que comparan el grosor endometrial según la receptividad endometrial en cada una de las ventanas de implantación.

Tabla 6 Regresión no lineal entre la LE y la VD

	Coeficiente *	p
DP3.5		
Pre-R vs R	0.67	0.792
Pre-R vs post-R	-2.37	0.246
R vs post-R	-3.05	0.046
DP5		p
Pre-R vs R	1.19	0.158
Pre-R vs post-R	-1.17	0.070
R vs post-R	-2.35	0.000
DP6.5		
Pre-R vs R	-2.01	0.000
Pre-R vs post-R	-1.45	0.028
R vs post-R	0.556	0.449

*Coeficiente obtenido regresión no paramétrica Cubic B Spline .

RELACIÓN ENTRE LA PROGESTERONA SÉRICA Y LA RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL

No se detectaron diferencias significativas en los niveles de Progesterona sérica en función de la receptividad endometrial para ninguna de las ventanas de implantación en el test de Kruskal Wallis, con una p de 0.637, 0.153 y 0.812 en DP3.5, DP5 y DP6.5, respectivamente.

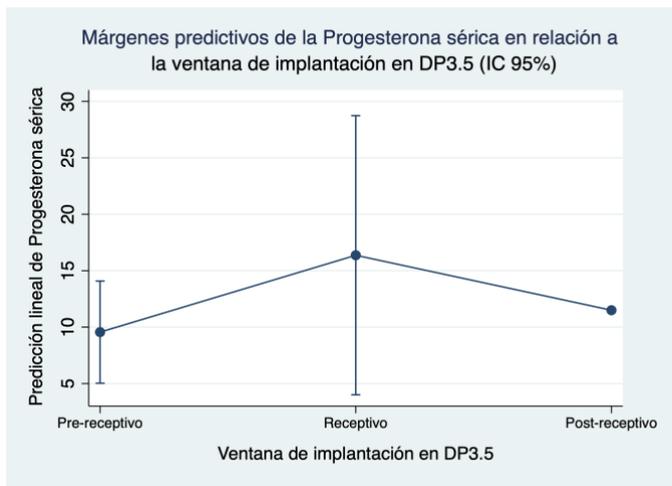
Tras un análisis con métodos de regresión lineal no se identifica una relación lineal entre la Progesterona tisular y la receptividad endometrial en ninguna de las ventanas de implantación, con una p de significación de 0.672 en DP3.5, p 0.819 en DP5, y p 0.881 en DP6.5.

Se evalúa mediante el test de regresión no paramétrico la relación no lineal entre la Progesterona sérica y la receptividad endometrial. En DP3.5 no se detecta ninguna relación no lineal entre ambas variables. En DP5 se detecta unos niveles de Ps significativamente mayores entre el endometrio pre y post-receptivo (p0.000) y entre el endometrio receptivo y post-receptivo las diferencias son cercanas a la significación (p 0.066).

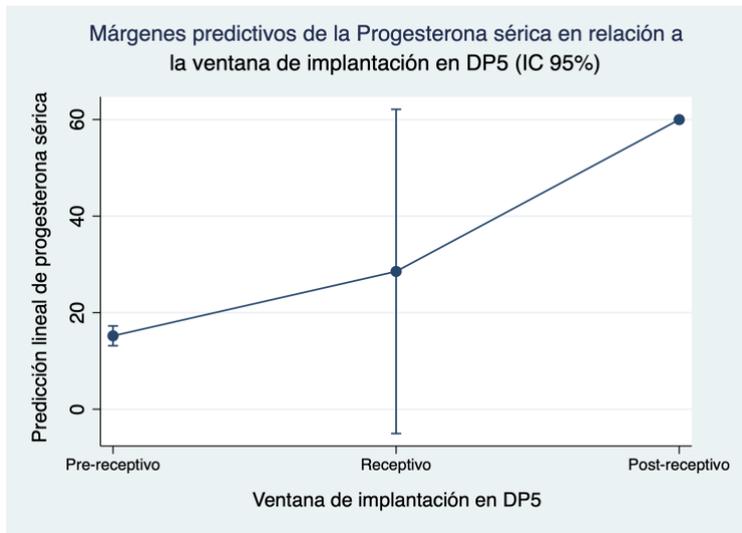
En DP6.5 no se detectaron diferencias significativas en ninguna de las ventanas de implantación.

Los resultados del análisis de regresión se describen en la tabla 6 y se representan los márgenes predictivos de la progesterona sérica con relación a la VDI en las distintas ventanas (ver las gráficas 12 y13).

Gráfica 12: Relación Ps y VDI en DP3.5



Gráfica 13: Relación Ps y VDI en DP5



RELACIÓN ENTRE LA PROGESTERONA TISULAR Y LA RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL

No se detectaron diferencias significativas en los niveles de Progesterona tisular en función de la receptividad endometrial para ninguna de las ventanas de implantación en el test de Kruskal Wallis, con una p de 0.099 en DP3.5, 0.223 en DP5 y 0.952 en DP6.5, respectivamente.

Se realiza un análisis de regresión lineal.

Realizamos la representación gráfica de los niveles de Progesterona tisular en función de la receptividad endometrial en los diferentes momentos del estudio.

Identificamos los rangos de Progesterona tisular en cada momento del estudio

Evidenciamos una relación lineal entre la **Progesterona Tisular y la VDI** solo el DP3.5 (p 0.04), el resto de los días no existe una relación lineal estadísticamente significativa, DP5 con una p 0.23 y el DP6.5 con una p 0.77.

Al realizar el análisis en el DP3.5 en los diferentes momento de la VDI (pre receptivo, receptivo, post receptivo), se puede distinguir entre el endometrio pre receptivo (p 0.03) y post receptivo (p 0.058) pero no podemos distinguir entre el endometrio pre receptivo y receptivo.

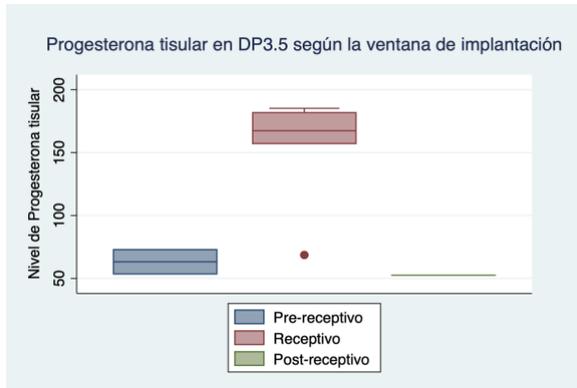
A continuación representamos la comparativa entre la representación gráfica de la Progesterona tisular en los diferentes momentos de la receptividad endometrial y el modelo de predicción tras la regresión entre la Pt y la VDI. Realizamos la representación gráfica de los niveles de Progesterona tisular en función de la receptividad endometrial en los diferentes momentos del estudio.

Identificamos los rangos de Progesterona tisular en cada momento del estudio

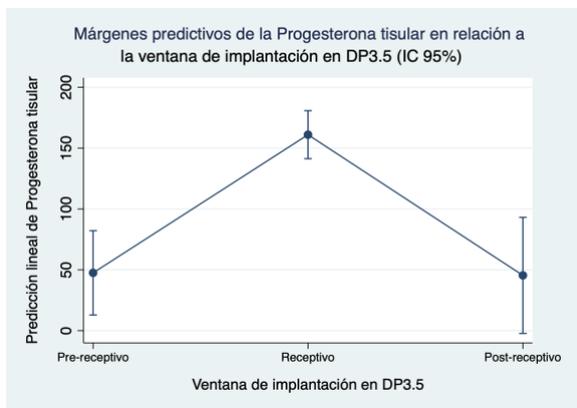
(ver en gráfica número 14 A y B)

Gráfica 14 Primera comparación Pt y VDI el DP 3,5*

A



B



***A** :Rango de Progesterona tisular DP3.5 (150-200 ngP4/ml),**B**: predicción del modelo de regresión

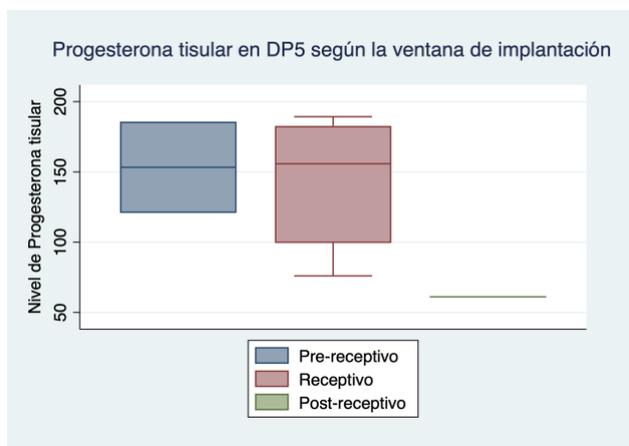
Realizamos la misma comparativa en el DP5 , describimos como es la predicción de la relación entre la Pt y la VDI, donde no hay una relación lineal estadísticamente significativa.

Los resultados más relevantes es que existen diferencias significativas de la Pt entre la VDI receptiva y post receptiva, pero no con la pre receptiva

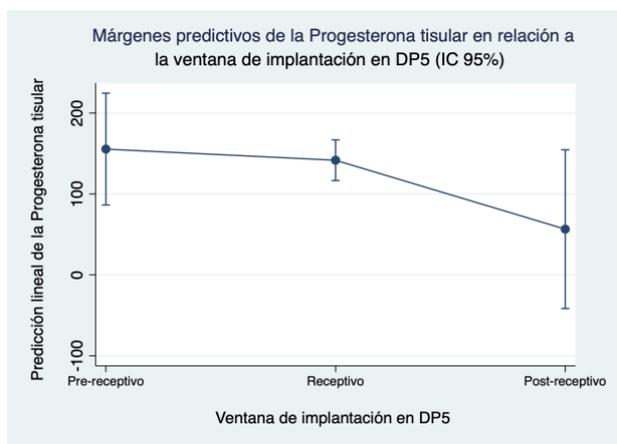
Se evidencia en la regresión una bajada clara de la Progesterona tisular en la VDI post receptiva por lo que cuando estudias la Progesterona tisular puedes distinguir claramente cuando es post receptiva. (ver gráfica 15 A y B)

Gráfica 15 Segunda comparación Pt y VDI el DP5*

A



B

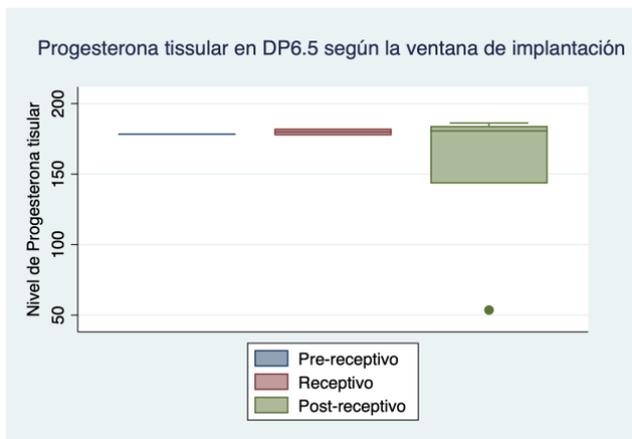


* **A** :Rango de Progesterona tisular DP5 (180-80 ngP4/ml) **B**: predicción del modelo de regresión.

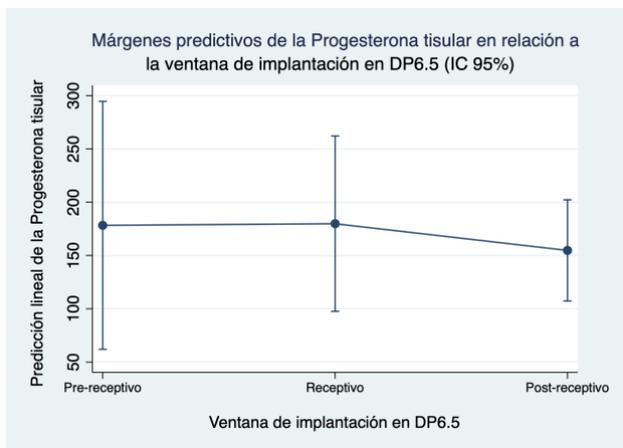
Al realizar la comparativa el DP6.5 , no podemos distinguir entre ninguno de los grupos si son receptivos o no , no es posible realizar una predicción con la prueba de regresión, como se identifica en la gráfica siguiente (ver gráfica 16 A y B).

Gráfica 16 Tercera comparación Pt y VDI el DP6,5*

A



B

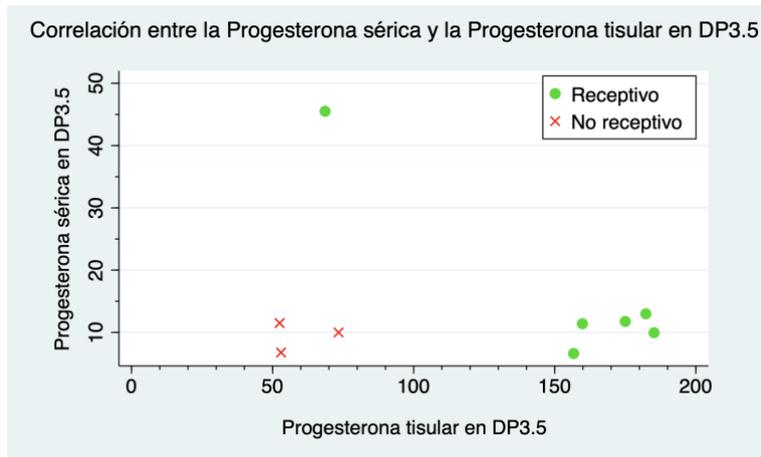


* **A** :Rango de Progesterona tisular DP6.5 (170-180 ngP4/ml) **B**: predicción del modelo de regresión.

DISTRIBUCIÓN GRÁFICA DE LA PROGESTERONA TISULAR EN RELACIÓN CON LA SÉRICA CON LA RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL

Detallamos de manera gráfica como se distribuye la Progesterona tisular con la sérica en función de su receptividad endometrial, como podemos ver en las gráficas 17,18,19.

Gráfica 17: DP3.5 Pt en relación Ps con la receptividad endometrial

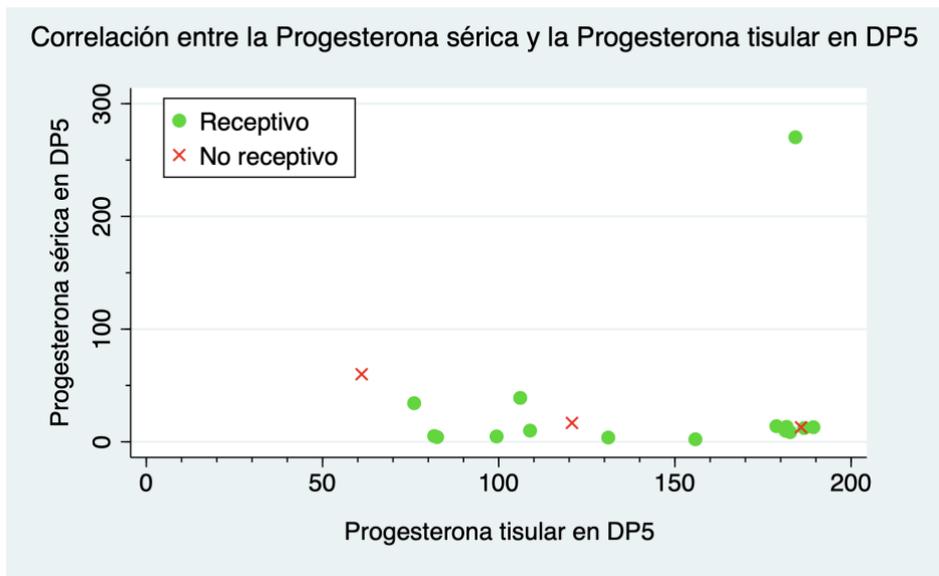


Identificamos que la mayoría de las pacientes no receptivas tienen Pt < 80 ngP4/mg con Ps >10 ng/mL y que las pacientes que son receptivas tienen Pt > 150 ngP4/mg y vemos que la mayoría tiene Ps >10 ng/ml en el DP3.5.

El 66.66% de las pacientes son receptivas.

Durante el DP3.5 conocemos que la mediana de Pt 156.7(52.5,185.2) ngP4/mg y la mediana de Ps 11.4(5.66,45.5) ng/mL y el coeficiente de correlación de 0.328 (p 0.427).

Gráfica 18: DP5 Pt en relación Ps con la receptividad endometrial

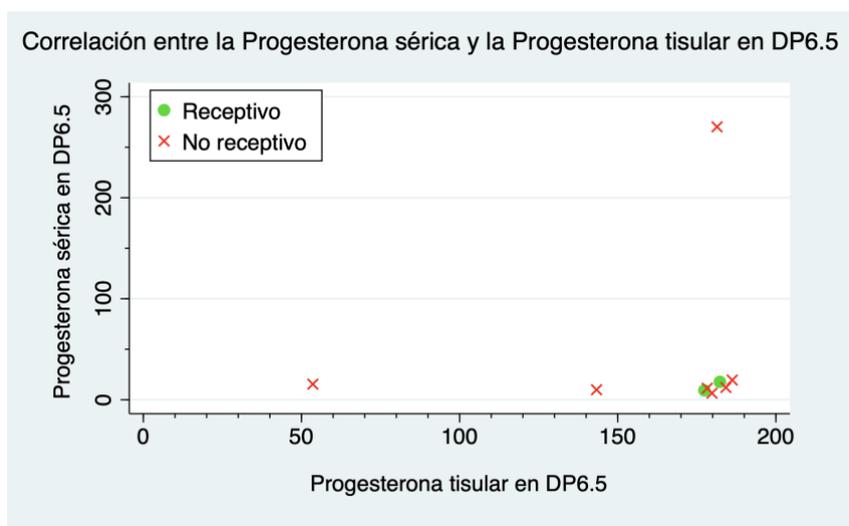


Se evidencia que la mayoría de las pacientes receptivas tiene la Ps >10 ng/mL y tienen un nivel muy variable de la Pt que va entre 80-190 ngP4/mg.

81.25%.de las pacientes son receptivas

Durante el DP5conocemos que la mediana de Pt 166.8 (68.05,188.25) ngP4/mg y la mediana de Ps 12.55(3.83,270.24) ng/mL y el coeficiente de correlación de -0,21 (p 0.417).

Gráfica 19: DP6.5 Pt en relación Ps con la receptividad endometrial



Identificamos que la mayoría de las pacientes son no receptivas 77.8%.

Las únicas pacientes receptivas tienen la Pt entre 180-190 ngP4/mg y la Ps >10 ng/ml.

La variabilidad de la Pt va entre 50-190 ngP4/mg.

Durante el DP6.5 conocemos que la mediana de Pt 179.05(53.6,186.2) ngP4/mg y la mediana de Ps 12.10(6.55,270.24) ng/ml y el coeficiente de correlación de -0,124 (p 0.769).

TABLA 7 RELACIONANDO RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL CON LA CORRELACIÓN Pt/Ps

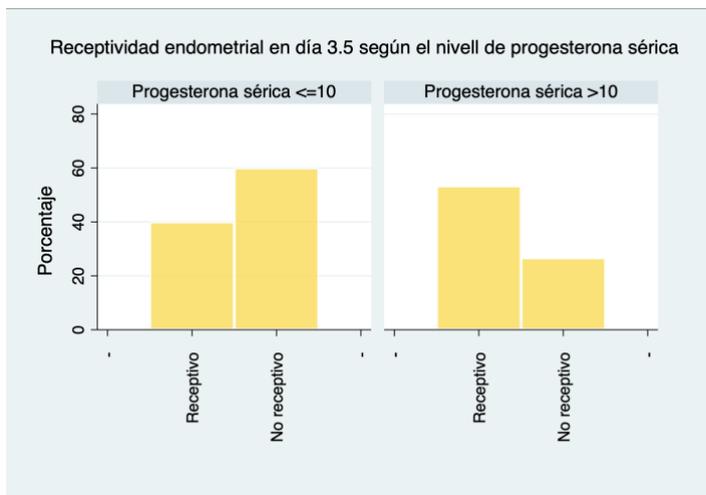
	DP3.5 Coeficiente correlaciónPt/Ps	DP5 Coeficiente correlaciónPt/Ps	DP6.5 Coeficiente correlaciónPt/Ps
	Mediana (p5, p95) n (%) t student p		
Pre- R	36.36%	15%	9.09%
R	54.55% 0.328(p 0.427)	80% -0,21 (p 0.417).	27.27% -0,124 (0.769)
Post- R	9.09%	5%	63.64%

VALOR DE LA PROGESTERONA SÉRICA EN FUNCIÓN DE LA RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL

Finalmente describimos los valores de la Progesterona sérica en función de la receptividad endometrial, utilizamos el punto de corte Ps 10 ng/ml,(79,177) y describimos los valores en los diferentes días del estudio.

Como podemos ver en las siguientes gráficas 20,21,22.

Gráfica 20: Distribución de los valores Ps en función receptividad endometrial DP3.5*

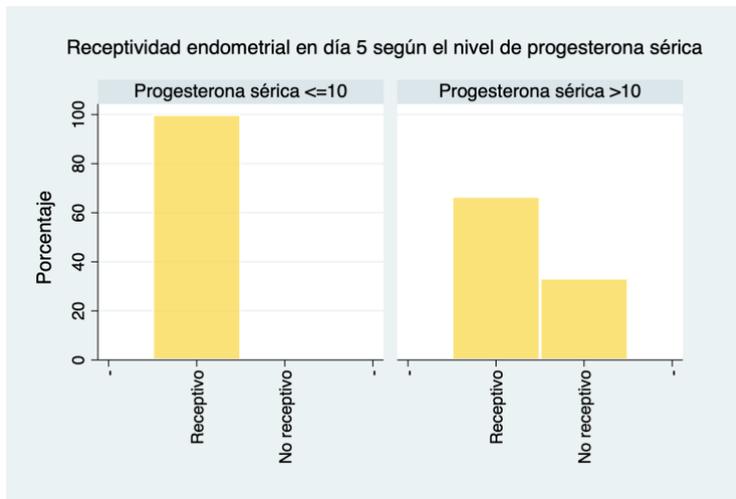


**son porcentajes*

Identificamos que cuando la Ps < 10 ng/ml hay un 40% de receptivos en DP3.5 y 60% de no receptivos

En cambio si la Ps > 10 ng/ml hay un 55% de receptivos y baja a 30% el número de no receptivos en DP3.5.

Gráfica 21: Distribución de los valores Ps en función receptividad endometrial DP5*

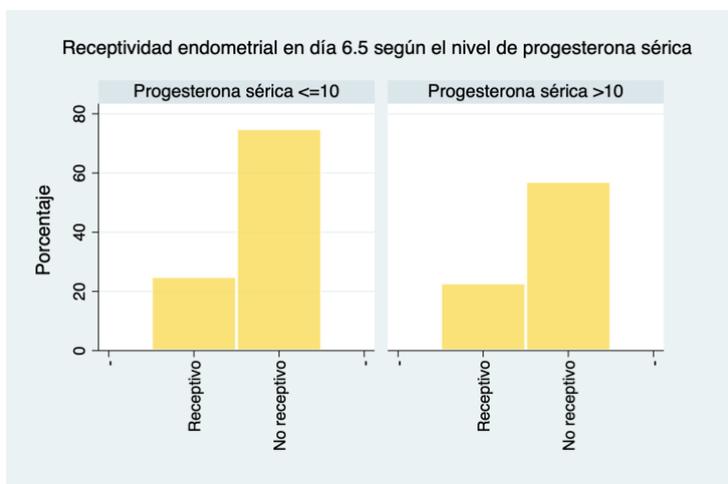


**son porcentajes*

Identificamos que cuando la Ps < 10 ng/ml hay una 90% de Receptivos en DP5 y no hay no receptivos,

En cambio si la Ps > 10 ng/ml hay un 60% de receptivos y sube a 30% el número de no receptivos en DP5.

Gráfica 22: Distribución de los valores Ps en función receptividad endometrial DP6.5*



**son porcentajes*

Identificamos que cuando la Ps < 10 ng/ml hay un 20% de Receptivos en y 75% de no receptivos en DP6.5

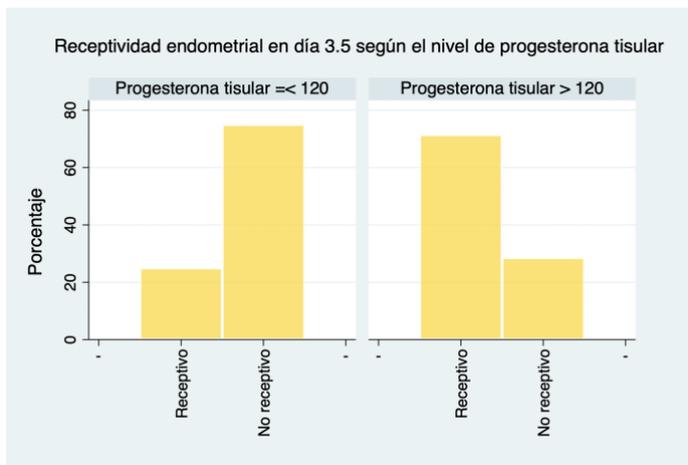
En cambio si la Ps > 10 ng/ml hay una 20% de receptivos y bajo a 55% el número de no receptivos

VALOR DE LA PROGESTERONA TISULAR EN FUNCIÓN DE LA RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL

Realizamos el mismo estudio de la Progesterona Tisular en función de la receptividad endometrial, utilizamos el punto de corte Pt 120 ngP4/mg y describimos los valores en los diferentes días del estudio. Como podemos ver en las siguientes gráficas, 23,24,25.

Hemos elegido el corte Progesterona tisular 120 ngp4/mg donde la Sensibilidad es de 67% y la Especificidad es de 40% en nuestra curva de ROC que describiremos a continuación.

Gráfica 23: Distribución de los valores Pt en función receptividad endometrial DP3.5*

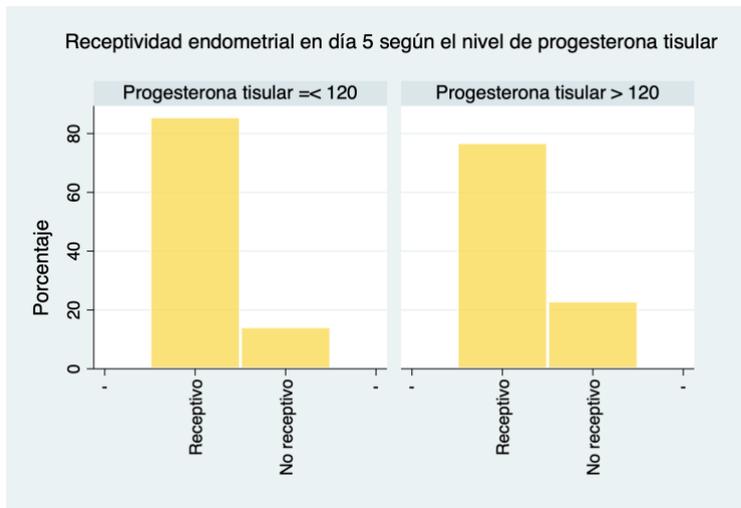


**son porcentajes*

Identificamos que cuando la Pt < 120 ngp4/mg hay una 20% de receptivos en y 75% de no receptivos en DP3.5.

En cambio si la Pt > 120 ngp4/mg hay una 70% de receptivos y 25% de no receptivos.

Gráfica 24: Distribución de los valores Pt en función receptividad endometrial DP5*

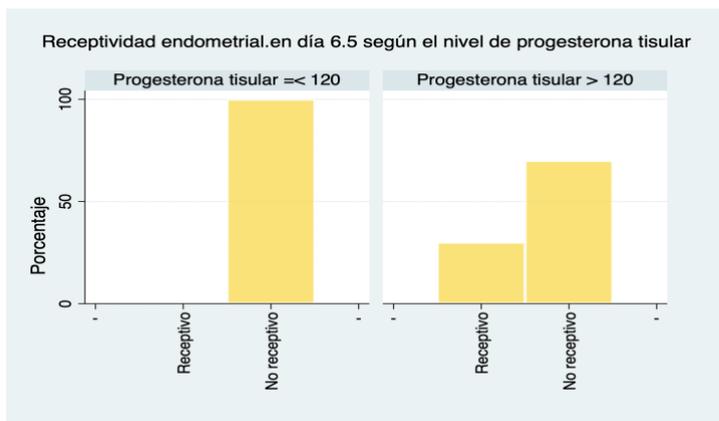


**son porcentajes*

Identificamos que cuando la Pt < 120 ng P4/mg hay un 90% de receptivos en y 15% de no receptivos en DP5.

En cambio si la Pt > 120 ngp4/mg hay un 75% de receptivos y 25% de no receptivos.

Gráfica 25: Distribución de los valores Pt en función receptividad endometrial DP6.5*



**son porcentajes*

Identificamos que cuando la Pt < 120 ngp4/mg hay una 0% de receptivos en y 90% de no receptivos en DP6.5.

En cambio si la Pt > 120 ngp4/mg hay una 25% de receptivos y 75% de no receptivos.

ESTUDIO MULTIVARIANTE: RELACIÓN ENTRE LA PROGESTERONA TISULAR Y LA SÉRICA EN RELACIÓN CON LA VENTANA DE IMPLANTACIÓN.

La relación entre la Progesterona tisular y sérica no es lineal por lo que decidimos realizar una predicción con un análisis multivariable donde estudiamos la relación entre la Progesterona tisular con Progesterona sérica ajustado por la VDI.

La p global del modelo predictivo es estadísticamente significativa $p = 0.012$ en el DP3.5.

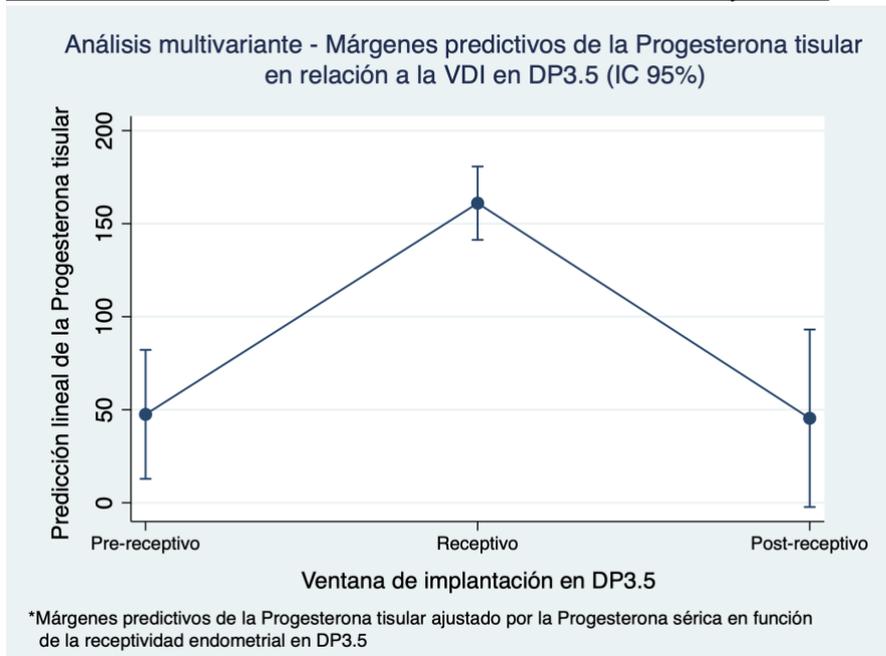
Y el resultado del análisis mostró que el 93,86% de la Progesterona tisular en el DP3.5 se explica con la variabilidad de los predictores, VDI y Progesterona sérica.

Las variables Ps y VDI tiene un impacto estadísticamente significativos en la variabilidad de la Progesterona tisular.

Por lo que para un mismo nivel de Progesterona sérica un endometrio receptivo tendrá un nivel superior de Progesterona tisular que una paciente pre receptiva ($p = 0.01$) En cambio entre pre receptivo y receptivo el impacto no es estadísticamente significativo. ($p = 0.9$).

Representamos gráficamente el modelo predictor en cómo la Progesterona tisular se ajusta en función de la receptividad endometrial y la Progesterona sérica 26,27,28

Gráfica 26: Análisis multivariante DP3.5 Pt con Ps y VDI *



**ajustado por las variables independientes Ps y VDI Modelo predictor de Pt según la receptividad para un mismo valor Ps*

Repetimos el mismo modelo en el DP5 y realizamos un análisis multivariable donde estudiamos la relación entre la Progesterona tisular con Progesterona sérica ajustado por la VDI.

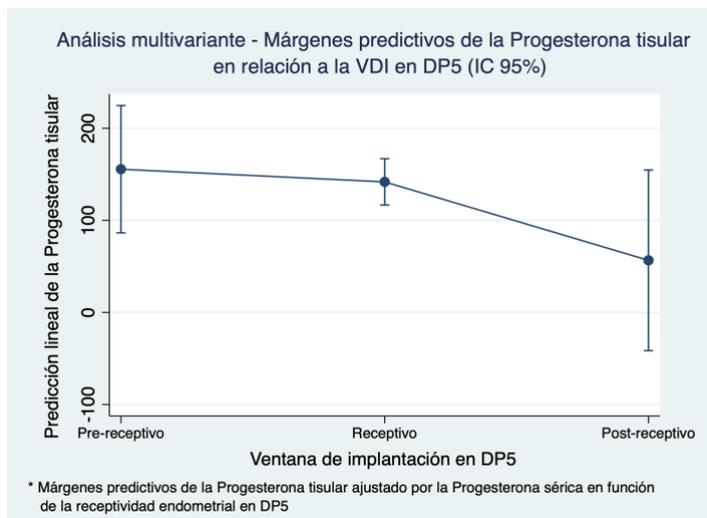
La p global del modelo predictivo aquí no estadísticamente significativa p 0.2.

Y el resultado del análisis demostró que sólo el 21.74% de la Progesterona tisular en el DP5 se explica con la variabilidad de los predictores, VDI y Progesterona sérica.

Como otros resultados del análisis, no se constata la relación significativa ajustando por la VDI de la Progesterona sérica con la tisular con una p 0.418. Y dentro de los diferentes momentos de receptividad endometrial no tiene impacto entre receptivo vs pre receptivo (p0.694) ni entre el post receptivo vs pre receptivo (p 0.100)

En la siguiente gráfica se identifica el modelo predictor en como la Progesterona tisular se ajusta en función de la receptividad endometrial y la Progesterona sérica.

Gráfica 27: Análisis multivariante DP5 Pt con Ps y VDI



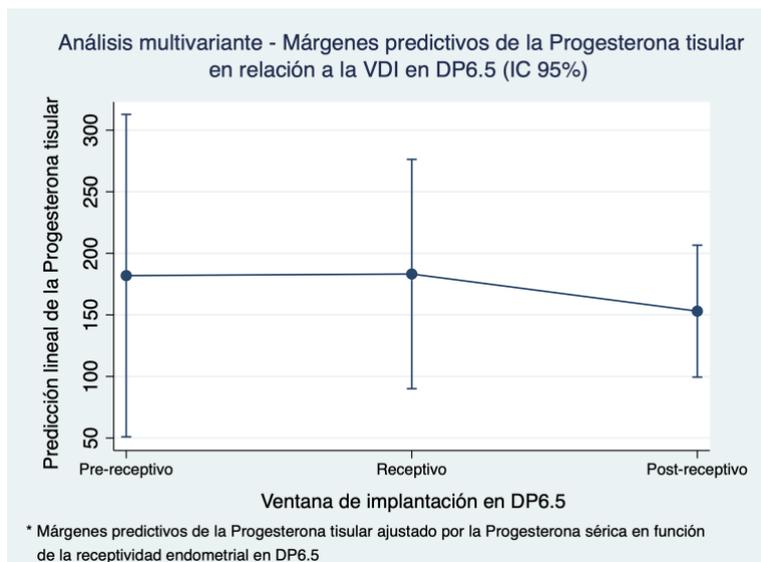
Repetimos el mismo modelo en el DP6.5 y realizamos un análisis multivariable donde estudiamos la relación entre la Progesterona tisular con Progesterona sérica ajustado por la VDI.

La p global del modelo predictivo aquí no estadísticamente significativa $p = 0.736$. Y el resultado del análisis demostró que sólo el 13.64% de la Progesterona tisular en el DP6.5 se explica con la variabilidad de los predictores, VDI y Progesterona sérica.

Como otros resultados del análisis, no se constata la relación significativa ajustando por la VDI de la Progesterona sérica con la tisular con una $p = 0.56$.

En la siguiente gráfica se identifica el modelo predictor en como la Progesterona tisular se ajusta en función de la receptividad endometrial y la Progesterona sérica .

Gráfica 28: Análisis multivariante DP6.5 Pt con Ps y VDI



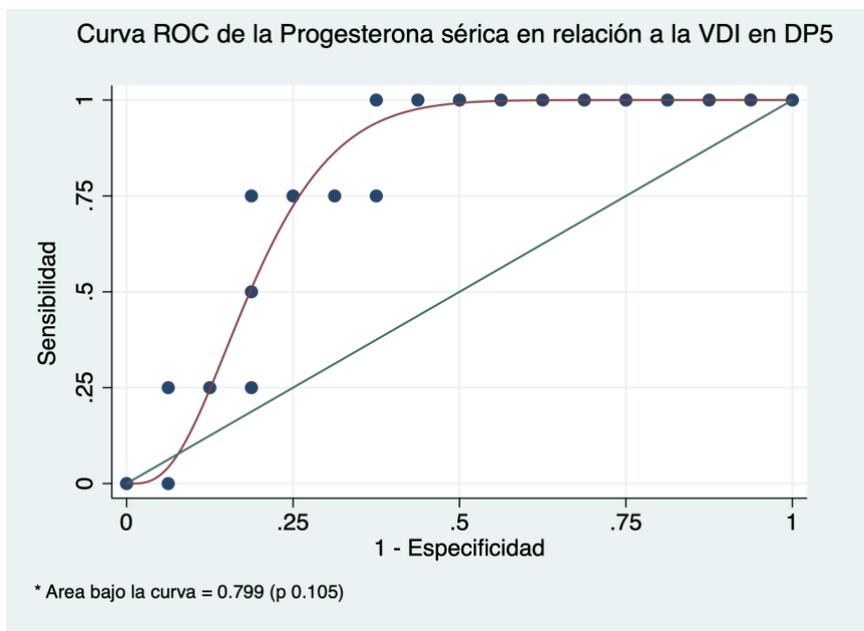
ANÁLISIS DE LAS CURVAS ROC: RELACIÓN DE LA PROGESTERONA SÉRICA Y LA VENTANA DE IMPLANTACIÓN.

Finalmente decidimos realizar curvas ROC para evaluar la capacidad discriminativa de una prueba diagnóstica dicotómica como es la correlación entre la Ps y la VDI.

Y lo que descubrimos fue que, si utilizamos de Punto de corte la Ps 10 ng/mL en DP5 (donde están todas las pacientes y el máximo porcentaje de pacientes receptivas) encontramos un 100% sensibilidad con 43% especificidad. En cambio, si utilizamos de punto de corte Ps 13 ng/mL la sensibilidad es de 75% y la especificidad 62,5% .

Globalmente se constató una Área bajo la curva ROC de 0.797 con una p 0.105 IC 95% (0.591,1). Ver gráfica 29.

Gráfica 29: Ps y VDI en DP5



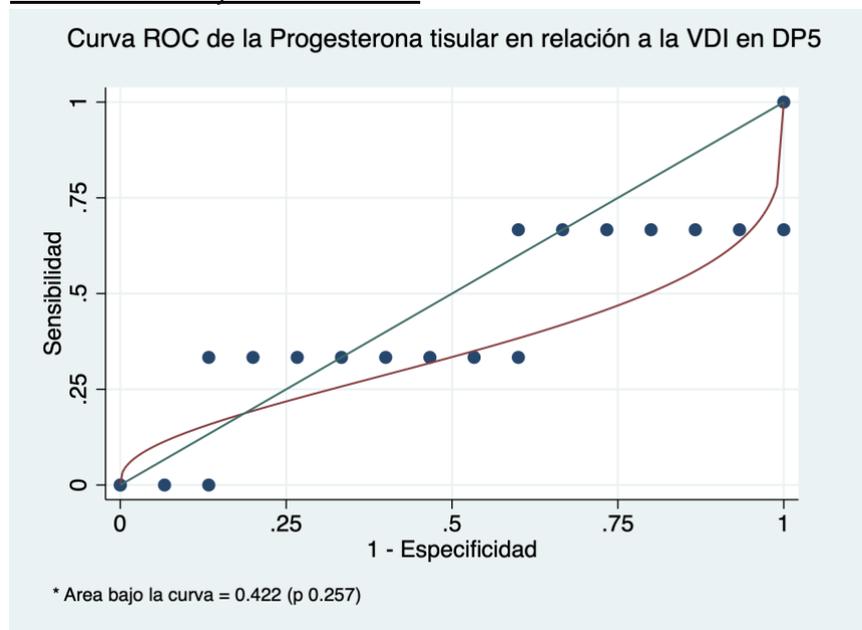
ANÁLISIS DE LAS CURVAS ROC: RELACIÓN DE LA PROGESTERONA TISULAR Y LA VENTANA DE IMPLANTACIÓN.

No tenemos referencias bibliográficas de ningún punto de corte de Progesterona tisular , pero decidimos utilizar el punto de corte de 120 ngP4/mg en DP5 por ser el punto de corte con mayor sensibilidad, una sensibilidad de 66.67 % y especificidad de 40%.

Globalmente se constató un Área bajo la curva ROC 0.422 con una p 0.257 no significativa.

IC 95% (0.00, 0.927). Ver gráfica 30.

Gráfica 30: Pt y VDI en DP5



10.DISCUSIÓN

El objetivo de esta tesis doctoral es valorar la utilidad de la progesterona como biomarcador de la receptividad endometrial.

El resultado del estudio pone de manifiesto la importancia de la progesterona en la receptividad endometrial pero no demuestra su utilidad como biomarcador de la receptividad endometrial .

LA POBLACIÓN ESTUDIADA

La población del estudio resultó homogénea, cómo explicamos en el descriptivo, los dos grupos son comparables en cuanto la edad, el IMC, la AMH, el grosor endometrial en las fases iniciales, la progesterona sérica, estradiol sérico, progesterona tisular, por lo que los resultados son extrapolables a la población general.

Inicialmente también se comprobó que no se evidenciaron diferencias significativas entre los grupos en cuanto la receptividad endometrial por lo que los grupos se pueden comparar en el momento de implantación.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

Para poder contestar nuestro objetivo principal debemos valorar de manera individual la Progesterona sérica con la receptividad endometrial, después la progesterona tisular con la receptividad endometrial y posteriormente analizar la relación entre ellas.

Empezamos con la **Progesterona sérica** y realizamos una correlación con la receptividad endometrial donde no se evidenció significación estadística (p 0.672 en DP3.5, p 0.819 DP5, y p 0.881 DP6.5), En cambio, al realizar una regresión, se evidenció que sí que había asociación, para distinguir las pacientes post receptoras.

Únicamente la determinación de la Progesterona sérica en DP5 nos permitiría diferenciar las pacientes post receptoras (P 0.00).

Al realizar la monitorización de la Progesterona sérica se observó que el 81.25% de las pacientes receptoras tenían un valor de Progesterona sérica medio de 12.55 (3.83,270.24) ng/ml en DP5, sin embargo el 78% de las pacientes post

receptivas tenían un valor medio de Progesterona sérica 12.10 (6.55,270.24) ng/ml) en DP6.5.

A continuación, comprobamos la relación de la **Progesterona tisular** con la receptividad endometrial y evidenciamos que no existen diferencias significativas en el DP5 con una p 0.23 y DP6.5 con una p 0.77. Pero al inicio del tratamiento con Progesterona, el DP3.5, sí que existen diferencias estadísticamente significativas p 0.04.

Al evaluar la relación entre la Progesterona tisular y la VDI en el DP3.5 se evidenció una relación lineal donde se podía distinguir entre las pacientes pre receptivas (p 0.03) y post receptivas (p 0.058).

Al realizar la monitorización de la Progesterona tisular constatamos valores de referencia en cada momento de estudio.

Las pacientes que tenían un buen nivel de Pt (>120 ngP4/ml) en el día DP3.5 era un buen predictor para que el endometrio acabara siendo receptivo.

En cambio, niveles bajos de la Progesterona tisular (<80 ngP4/ml) en la VDI era indicador de endometrio no receptivo.

Identificamos en nuestro estudio que la mayoría de las pacientes receptivas estaban en el rango de Progesterona tisular entre 80-180 ngP4/ml.

La determinación de la Progesterona tisular a partir del DP5 y DP6.5 no es un buen predictor de la VDI por su variabilidad.

Únicamente los niveles de Pt bajos DP5 DP6.5 nos predicen que el endometrio será no receptivo.

Para conocer los objetivos secundarios estudiamos la relación entre la **Progesterona sérica y tisular**.

Como hemos descrito en el descriptivo de manera global existe una baja correlación entre la Progesterona tisular y la sérica, incluso eliminando los valores alejados de la muestra. En el DP5 el coeficiente de correlación es 0.21 (p 0.382) .

Existen poco estudios donde relacionen la progesterona, tanto sérica como tisular, con la receptividad endometrial, el más relevante hasta la fecha es el realizado por Labarta et al en el 2021 donde analiza la relación entre los niveles de progesterona sérica y tisular y la receptividad endometrial utilizando el test ERA. Los resultados que obtuvieron no encontraron asociación entre las progesterona sérica ni tisular con la receptividad endometrial pero si una correlación positiva entre la P4 tisular y la 17a-hidroxiprogesterona y una relación estadísticamente significativa con la receptividad endometrial (177).

Sabemos, que en la actualidad, el uso generalizado del estudio de receptividad no está abalado por la ciencia, porque no se ha demostrado que mejore las tasas de embarazo en la población estéril en general.(178) (179)(180–182).

Nuestro estudio aprovechó la precisión de la expresión genética como una medida de la VDI para poder relacionar de la manera más objetiva la Progesterona tisular y sérica en los diferentes momentos de receptividad endometrial.

No hay duda de que progesterona es la hormona más importante de la fase lútea para lograr y mantener el embarazo. Sin embargo, hasta la fecha, la teoría de que puede usarse como una herramienta para la predicción de la ventana de la implantación no se ha podido demostrar, como explica el artículo de Labarta, donde no se encuentra una asociación entre la progesterona tisular y sérica (183)(177).

Anteriormente, se sugirió que los niveles bajos de progesterona alrededor del día de la transferencia del embrión podrían dar una pista sobre una reabsorción inadecuada de la Progesterona administrada exógenamente y podrían permitir el ajuste del soporte de fase lútea para mejorar el resultado(184) Finalmente se encontró, umbral mínimo de Progesterona para mejorar los resultados reproductivos en TEC bajo THS con progesterona vaginal, que, si se detectada

la insuficiencia, se podía modificar mediante la adición inyección subcutánea de progesterona (79).

La utilidad de la Progesterona en ciclos de reproducción asistida está ampliamente establecida aunque la evidencia científica no sea sólida.

En las pacientes de nuestro estudio era imprescindible la utilización de la Progesterona micronizada para compensar el defecto de la no existencia del cuerpo lúteo. Esta necesidad, sí que está demostrada por el grupo del IVI, en 2017 donde demostraron la relación significativa entre la concentración de Progesterona en THS con la tasa embarazo (185). Posteriormente el mismo grupo en 2021, demostró que niveles séricos Progesterona por debajo de 8,8 ng/ml tenían un 18 % menos de posibilidades de conseguir nacidos vivo que las pacientes con niveles séricos de Progesterona por encima de este límite (177).

En nuestro estudio, los dos grupos presentaron niveles medios mayores de 8,8ng/ml de progesterona sérica por lo que la limitación de deficiencia de progesterona en el estudio no fue una factor limitante. Tampoco presentan factor limitante, en el inicio del estudio, porque cumplen con la mínima Progesterona endógena , porque la mediana de estudio al inicio es de 0.44(0.07, 0.94) ng/ml que es <1 ng/ml para evitar pico LH y la ovulación (79).

La administración de PVM induce un rápido aumento de la Progesterona tisular debido al efecto del primer paso uterino lo que sugiere una rápida absorción de la hormona en el útero después de la administración vaginal de Progesterona (154,175,186).

Sin embargo, hasta la actualidad no se ha podido conocer cuáles son los niveles más importantes para determinar la receptividad endometrial, si los niveles sistémicos o endometriales de Progesterona.

En nuestro estudio se **identifica una tendencia en la correlación** entre ambas Progesteronas, por lo que están relacionadas. Es durante el inicio del tratamiento (DP3.5) cuando se observa claramente la relación y podría ser el momento más adecuado para una posible intervención.

Después del inicio del tratamiento, la asociación no se observó tan clara por lo que cualquier intervención a partir del DP5, DP6.5 ya no tendría tanta repercusión en la modificación del a VDI.

Al conocer los resultados, y constatar la relación entre las Progesteronas con la receptividad endometrial, decidimos realizar un análisis multivariante donde creamos un modelo predictor de cómo de variable es la Pt en relación con la Ps y la VDI durante el tratamiento con Progesterona vaginal

El modelo predictor concluyó de manera significativa, que la variabilidad de la Progesterona tisular al inicio del tratamiento con PVM (DP3.5) depende de la Progesterona sérica y la receptividad endometrial en un 94%. Y a medida que continua el tratamiento con Progesterona la variabilidad de la Progesterona tisular no depende tanto de la Progesterona sérica ni de la VDI bajando a 22% en DP5 a una 13 % DP6.5.

Las dos variables independientes actúan con predictores del valor de la Progesterona tisular en el DP3.5

La predicción de la receptividad de la Progesterona tisular ajustada por Progesterona sérica y la VDI nos sirve para detectar qué endometrios no serán receptivos y así poder actuar en el momento inicial del estudio para mejorar los resultados.

Sabemos que la Progesterona sérica no es útil para predecir la receptividad endometrial. A pesar de eso, conocemos que hay una correlación entre las progesteronas. La medición de los niveles sistémicos de Progesterona es una herramienta más fácil que la medición de la Progesterona tisular , por lo que sus niveles iniciales nos podrían dar una idea de cómo modificar precozmente .

Sin embargo, debe plantearse la cuestión de que, si la sola medición de los niveles sistémicos de Progesterona refleja el estado y la receptividad endometrial, ya que los niveles sistémicos de Progesterona no reflejan la dinámica de los cambios endometriales, que se consideran necesarios para preparar el endometrio para la implantación.

Como ya se explica en el artículo de Young et al en el 2017, los resultados respaldan la hipótesis de que la Progesterona tiene efectos dependientes de la concentración sobre la función y la estructura del endometrio secretor. Su estudio evidenció por primera vez, que las concentraciones anormalmente bajas de Progesterona dan como resultado un desarrollo endometrial retrasado y patrones anormales de expresión génica. Sorprendentemente, sin embargo, también observaron que el desarrollo endometrial histológico puede continuar normalmente incluso cuando las concentraciones de Progesterona están muy por debajo de las observadas normalmente durante la fase lútea de los ciclos naturales.

Otra conclusión importante, encontraron que la Progesterona tenía distintos efectos dependientes de la concentración en la expresión génica del endometrio y observaron patrones diferenciales de expresión al aumentar las concentraciones de Progesterona. Finalmente concluyeron que los retrasos observados en la maduración endometrial histológica no pueden atribuirse únicamente a las bajas concentraciones de Progesterona en las mujeres que ovulan. Por lo que se debe seguir investigando para identificar biomarcadores clínicamente útiles de receptividad endometrial y proporcionar datos normativos esenciales relacionados con las acciones de Progesterona en el endometrio normal.(187).

Posteriormente, Labarta et al en 2021, y Lawrenz et al en 2022, se plantearon la medición de la Progesterona sérica como marcador pronóstico en los ciclos TEC bajo THS. Y la respuesta que obtuvieron es que los niveles séricos de Progesterona no reflejan completamente los niveles de Progesterona endometrial, constatando que seguimos sin conocer todo los factores implicados en el proceso (188), (183).

En nuestro estudio, podemos concluir que sí que distinguimos el estado post receptivo mediante, tanto la progesterona sérica, como con la tisular pero la relación entre las progesteronas está todavía por establecer. Sabemos que dependen mucho una de otra inicialmente pero no conocemos su evolución y todos los factores implicados.

Desde el inicio de la reproducción asistida han existido múltiples marcadores que identifican **la receptividad endometrial**, como son, la ecografía transvaginal donde se valoraba el grosor endometrial y la biopsia endometrial donde valoraba la decidualización del endometrio, pero ninguno de ellos ha demostrado su eficacia ni correlación con el momento de la implantación.

Por ese motivo, a partir del 2010 empezaron a desarrollar las técnicas de transcriptómica, como herramienta para el conocimiento de la ventana de implantación. La técnica consiste en combinar la transcriptómica de una biopsia endometrial, con algoritmos de inteligencia artificial para datar objetivamente la fase del ciclo menstrual del endometrio. (161,189,190).

Este enfoque se ha utilizado en la práctica clínica para individualizar el día de la transferencia de embriones en función de receptividad endometrial en las pacientes que han tendido fallos de implantación .(175)(191)Por lo tanto, esta tecnología ofrece potencial para descubrir las contribuciones relativas de la Progesterona sérica y tisular en la receptividad endometrial.

A pesar del potencial y como aborda el artículo de Rafael et al en 2021, las técnicas transcriptómicas presentan múltiples limitaciones, como son el momento de la biopsia endometrio, no tienen en cuenta el efecto de embrión ni los posibles cambios hormonales relacionado con el nivel de la Progesterona.

En nuestro estudio, constatamos la limitación del test de receptividad, y seguimos la tendencia que refleja el artículo de Rafael et al , donde valora que cualquier procedimiento nuevo que se base en la expresión génica, debe considerar el nivel de progesterona concomitante para su interpretación (192).

En nuestro estudio, una de las fortalezas que presenta, es que no existen diferencias significativas entre los grupos en cuanto a receptividad endometrial, lo que implica que no existe efecto deletéreo por la biopsias de endometrio realizada en los distintos día del estudio en la misma paciente.

Continuamos con otro objetivo secundario de estudio, que es la utilidad de la **línea endometrial** durante el protocolo del estudio como marcador de la receptividad endometrial.

Se identificó una curva similar a la Progesterona sérica, en la evolución de la línea endometrial durante el protocolo de estudio, donde se observó un máximo en el grosor del endometrio en el día donde la ventana de implantación mostraba receptividad endometrial y a partir de aquí es cuando el grosor endometrial disminuía de manera progresiva.

A pesar de eso, en nuestro estudio no se correlaciona la LE en el momento de la receptividad de manera significativa. Esta disminución de grosor endometrial nos permite identificar de manera significativa los endometrios post receptivos.

La utilidad de la LE como marcador de receptividad endometrial independiente, no se ha demostrado. Existen múltiples estudios donde se ha estudiado, como el realizado por el grupo de Griesinger donde realizaron un análisis retrospectivo de dos estudios metodológicamente similares prospectivos randomizados en fase III con Progesterona, donde concluyeron que la variabilidad de la LE durante el tratamiento no permite utilizarla como marcador para mejorar las tasas de embarazos(193).

Otros artículos hablan de la medida útil del endometrio para que la transferencia embrionaria sea exitosa, no hablan de la LE como marcador, sino de que la media exitosa de la LE oscila entre 8.7- 14.5 mm(194) el día de la transferencia. En cambio, en nuestro estudio se acota de manera importante el grosor endometrial de las pacientes receptoras entre 8- 10 mm.

Finalmente, la repercusión de la LE en el proceso de implantación, es una parte más, que puede modificar la interacción compleja entre el endometrio y el blastocisto necesaria para conseguir la implantación. Es por tanto una diana diagnóstica que todavía no hemos podido demostrar su utilidad por lo que se necesitan más estudio en este camino para poder demostrar su valor independiente (195).

LIMITACIÓN DEL ESTUDIO

Nuestro estudio era un estudio experimental no era un estudio clínico. En nuestro estudio no era un objetivo la tasa de recién nacido vivo ni la tasa de pacientes embarazadas.

Éticamente hacer una biopsia en el momento de transferir un embrión sería reprobable, por eso no pudimos realizar una transferencia embrionaria durante nuestro estudio.

No podemos asegurar la reproducibilidad en ciclos naturales porque hemos estudiado la relación de la progesterona sérica con la tisular en ciclos sustituidos.

Todas nuestras pacientes han utilizado progesterona vaginal por lo que los diferentes tipos de rutas de administración de progesterona exhibirán patrones distintos de liberación de Progesterona lo que puede afectar al proceso de la transformación secretora.

Y por último, pero no menos importante, tampoco hemos tenido en cuenta los factores embrionarios al no tener como objetivo el embarazo ni realizar una transferencia embrionaria.

Además, debemos recordar, en los ciclos de concepción espontánea, la importancia del cuerpo lúteo que es una fuente importante de hormonas esteroides, vasoactivas, sustancias reguladoras génicas que juegan un papel crítico en las etapas iniciales de embarazo (196) y son deficientes en nuestras pacientes al realizar un tratamiento sustituido.

Los estudios futuros deberían valorar no solo la Progesterona tisular y sérica, y la receptividad endometrial sino también enfoques no invasivos, en los cuales se evaluará el embrión y su diálogo con el endometrio para lograr una transferencia embrionaria verdaderamente personalizada (183).

Otra de las limitaciones del estudio es la utilización de un procedimiento a ciegas para conseguir la información de la Progesterona tisular, donde solo tenemos una porción muy pequeña del endometrio, con la limitación que comporta el no ver directamente el material recogido. Y además, no existe

evidencia de que haya un alto grado de concordancia entre la datación histológica y el análisis molecular de transcriptómica (197)(192).

A pesar de que nuestro estudio es prospectivo randomizado, y aunque, encontramos asociaciones entre la Progesterona tisular y la sérica con la receptividad endometrial, el número de pacientes incluidos no nos permite determinar valores de corte a partir del cual se puede distinguir si el endometrio es receptivo.

11. PRESPECTIVAS Y APLICABILIDAD

Las técnicas de reproducción han mejorado en los últimos 30 años, a pesar de eso, la eficacia de la FIV en términos absolutos sigue siendo baja en todo el mundo, con las tasas actuales de nacidos vivos de 25-30% por ciclo iniciado (198) Sabemos que una de las causas, puede derivar de la pérdida de sincronía entre el endometrio y el embrión tras la TRA. El factor endometrial, es el gran desconocido pero imprescindible para conseguir la coordinación y sincronía y conseguir así la implantación.

Nuestro estudio plantea adelantar el momento de las modificaciones del tratamiento substituido con Progesterona al día 3.5 porque parece ser el momento más determinante para modificar la Progesterona tisular y así conseguir mejores tasas de embarazo y evitar abortos por fallos de implantación.

Está claro que el estudio de receptividad endometrial no debe generalizarse, no mejora las tasas de embarazo ni tiene una reproducibilidad consistente.

A pesar de eso, consideramos que todavía tiene utilidad para estudiar la Progesterona de manera básica y para ayudar a establecer su función en la implantación endometrial con estudios bien diseñados, con más pacientes y así evidenciar la implicación real de la Progesterona en el proceso, como se plantean en el artículo de Rafael et al (192).

Quizás el paso que ha realizado el estudio de la receptividad endometrial de la básica a la práctica clínica debe retroceder, y volver a la investigación básica para ser el vehículo metodológico para seguir estudiando la implicación de la Progesterona y otros marcadores séricos, más accesibles, como los lípidos (10), para conocer mejor la fase lútea y mejorar la receptividad endometrial (199).

Existen múltiples estudios buscando de qué manera la Progesterona tisular puede mejorar la fase lútea, sobre todo para poder realizar una transferencia embrionaria en fresco y evitar demorarla. A pesar de la bibliografía creciente en este tema, no existe hasta la fecha unos niveles de corte de Progesterona tisular, ni nivel mínimo o máximo para optimizar su función en la implantación embrionaria. Creemos que nuestro estudio puede ser el principio para conocer el nivel tisular de la Progesterona que descarta la posibilidad de transferencia embrionaria (177,184,200)33).

Porque está claro que vamos hacia una medicina más personalizada, más contextualizada, intentando mejorar el conocimiento de la paciente de manera global para optimizar su tratamiento y mejorar los resultados.

Creemos que deben realizarse más estudios para corroborar la tendencia que hemos encontrado entre la progesterona tisular y la sérica, con las técnicas necesarias, la cual serviría para poder datar mejor el momento para la transferencia embrionaria.

12.CONCLUSIONES

El objetivo principal del trabajo de investigación es valorar la utilidad de la Progesterona como biomarcador de la receptividad endometrial.

La Progesterona no se muestra como un biomarcador de la receptividad endometrial, únicamente se encuentra relación entre la Progesterona tisular y la sérica con la receptividad endometrial al inicio del tratamiento con Progesterona.

Objetivos secundarios

Correlacionar los niveles de Progesterona en el tejido endometrial con cada una de las fases de receptividad de la VDI dada por el patrón genómico.

Identificamos una relación lineal entre la Progesterona tisular y la ventana de implantación endometrial durante el inicio del tratamiento con Progesterona.

La Progesterona tisular, solo nos permite identificar qué pacientes serían post receptivas.

Estudiar la relación existente entre los niveles de Progesterona sérica y tisular.

Se identifica una correlación baja entre la Progesterona tisular y la sérica pero no estadísticamente significativa. La Progesterona tisular y sérica están relacionadas entre sí de manera estadísticamente significativa al inicio del tratamiento con Progesterona.

Evaluar el valor de Progesterona sérica como marcador no invasivo para el estudio y manejo de la VDI y así optimizar la transferencia embrionaria.

La Progesterona sérica no se muestra como marcador de la receptividad endometrial. Únicamente la Progesterona sérica serviría para predecir las pacientes post receptivas.

Evaluar el valor de la línea endometrial como marcador no invasivo para el estudio y manejo de la VDI y así optimizar la transferencia embrionaria.

La línea endometrial no aparece como marcador pronóstico de la receptividad endometrial. La línea endometrial solo nos permite diferenciar qué pacientes serán post receptivas.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Treloar AE. Variation of the human menstrual cycle through reproductive life. *Int J Fertil*. 1967 Jan-Mar;12(1 Pt 2):77-126. *Int J Fertil* 1967 Jan-Mar;12(1 Pt 2):77-126
2. MESSINIS IE. From Menarche to Regular Menstruation: Endocrinological Background. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1092(1):49–56.
3. Bayraktar OA, Teichmann SA, Turco MY. Mapping the temporal and spatial dynamics of the human endometrium in vivo and in vitro. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00972-2>
4. Messinis IE, Messini CI, Dafopoulos K. Novel aspects of the endocrinology of the menstrual cycle. *Reprod Biomed Online* 2014;28(6):714–22.
5. Bayraktar OA, Teichmann SA, Turco MY. Mapping the temporal and spatial dynamics of the human endometrium in vivo and in vitro. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00972-2>
6. Prapas Y, Prapas N, Jones EE, Duleba AJ, Olive DL, Chatziparasidou A, et al. The window for embryo transfer in oocyte donation cycles depends on the duration of progesterone therapy. *Human Reproduction* 1998;13(3):720–3.
7. Navot D, Scott RT, Droesch K, Veeck LL, Liu H-C, Rosenwaks Z. The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro. *Fertil Steril* 1991;55(1):114–8.
8. Riesewijk A. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod* 2003;9(5):253–64.
9. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update* [Internet] 2006;12(6):731–46. Available from: <https://academic.oup.com/humupd/article/12/6/731/624054>
10. Yang T, Zhao J, Liu F, Li Y. Lipid metabolism and endometrial receptivity. *Hum Reprod Update* 2022;28(6):858–89.
11. Ruiz-Alonso M, Valbuena D, Gomez C, Cuzzi J, Simon C. Endometrial Receptivity Analysis (ERA): data versus opinions. *Hum Reprod Open* 2021;2021(2).
12. Rincon A C-CMGEMCVDSC. What is the real length of the window of implantation (WOI) in humans? *Hum Reprod* 2018; 33:360–360.

13. Garrido-Gómez T, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Diaz-Gimeno P, Vilella F, Simón C. Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. *Fertil Steril* 2013;99(4):1078–85.
14. Tamaya T, Murakami T, Okada H. Concentrations of steroid receptors in normal human endometrium in relation to the day of the menstrual cycle. *Acta Obstet Gynecol Scand* [Internet] 1986 [cited 2022 Nov 20];65(3):195–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3739626/>
15. O'malley1 BW, Tsai M-J. Molecular Pathways of Steroid Receptor Action [Internet]. 1992. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/46/2/163/2763098>
16. Lukaszuk K, Liss J, Lukaszuk M, Maj B. Optimization of estradiol supplementation during the luteal phase improves the pregnancy rate in women undergoing in vitro fertilization–embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 2005;83(5):1372–6.
17. Kwon S-K, Kim C-H, Lee K-H, Jeon IK, Ahn J-W, Kim S-H, et al. Luteal estradiol supplementation in gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles for infertile patients *in vitro* fertilization. *Clin Exp Reprod Med* 2013;40(3):131.
18. Tavaniotou A, Devroey P. Luteal hormonal profile of oocyte donors stimulated with a GnRH antagonist compared with natural cycles. *Reprod Biomed Online* 2006;13(3):326–30.
19. Pinheiro LMA, Cândido P da S, Moreto TC, Almeida WG Di, Castro EC de. Estradiol use in the luteal phase and its effects on pregnancy rates in IVF cycles with GnRH antagonist: a systematic review. *JBRA Assist Reprod* 2017;21(3).
20. Diczfalusy E. Gregory Pincus and steroidal contraception: A new departure in the history of mankind. *J Steroid Biochem* 1979;11(1):3–11.
21. DeMayo FJ, Lydon JP. 90 YEARS OF PROGESTERONE: New insights into progesterone receptor signaling in the endometrium required for embryo implantation. *J Mol Endocrinol* 2020;65(1):T1–14.
22. Sitruk-Ware R, Bricaire C, De Lignieres B, Yaneva H, Mauvais-Jarvis P. Oral micronized progesterone. *Contraception* 1987;36(4):373–402.
23. Ruan YC, Chen H, Chan HC. Ion channels in the endometrium: regulation of endometrial receptivity and embryo implantation. *Hum Reprod Update* 2014;20(4):517–29.
24. Swyer GIM. Progestogens and Their Clinical Uses: Part II. *BMJ* 1960;1(5166):121–2.

25. Pickar JH. Progesterone. *Climacteric* 2018;21(4):305–305.
26. Taraborrelli S. Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2015; 94:8–16.
27. Oettel M, Mukhopadhyay AK. The Aging Male Progesterone: the forgotten hormone in men? Progesterone: the forgotten hormone in men? 2010 [cited 2022 Nov 27]; Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=itam20>
28. Ruan X, Mueck Alfred O. Systemic progesterone therapy—Oral, vaginal, injections and even transdermal? *Maturitas* 2014;79(3):248–55.
29. Bergeron C. Morphological changes and protein secretion induced by progesterone in the endometrium during the luteal phase in preparation for nidation. *Human Reproduction* 2000;15(suppl 1):119–28.
30. Putnam CD, Brann DW, Kolbeck RC, Mahesh VB. Inhibition of uterine contractility by progesterone and progesterone metabolites: Mediation by progesterone and gamma amino butyric acid(A) receptor systems. *Biol Reprod* 1991;45(2).
31. Arab H, Alharbi AJ, Oraif A, Sagr E, Al Madani H, Abduljabbar H, et al. The role of progestogens in threatened and idiopathic recurrent miscarriage. *Int J Womens Health* 2019;11.
32. Alqudah M, Al-Shboul O, Al-Dwairi A, Al-U´Dat DG, Alqudah A. Progesterone Inhibitory Role on Gastrointestinal Motility. *Physiol Res* 2022;(2):193–8.
33. Labarta E, Rodríguez C. Progesterone use in assisted reproductive technology. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2020; 69:74–84.
34. Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med* 2012;18(12):1754–67.
35. Namiki T, Ito J, Kashiwazaki N. Molecular mechanisms of embryonic implantation in mammals: Lessons from the gene manipulation of mice. *Reprod Med Biol* 2018;17(4):331–42.
36. Okada H, Nakajima T, Sanezumi M, Ikuta A, Yasuda K, Kanzaki H. Progesterone Enhances Interleukin-15 Production in Human Endometrial Stromal Cells in Vitro¹. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(12):4765–70.
37. Wilkens J, Male V, Ghazal P, Forster T, Gibson DA, Williams ARW, et al. Uterine NK Cells Regulate Endometrial Bleeding in Women and Are

Suppressed by the Progesterone Receptor Modulator Asoprisnil. The Journal of Immunology 2013;191(5):2226–35.

38. Patel B, Elguero S, Thakore S, Dahoud W, Bedaiwy M, Mesiano S. Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology. Hum Reprod Update [Internet] 2015;21(2):155–73. Available from: <https://academic.oup.com/humupd/article/21/2/155/782221>
39. Mote PA, Balleine RL, McGowan EM, Clarke CL. Colocalization of Progesterone Receptors A and B by Dual Immunofluorescent Histochemistry in Human Endometrium during the Menstrual Cycle¹. J Clin Endocrinol Metab 1999;84(8):2963–71.
40. Mesiano S. Myometrial Progesterone Responsiveness. Semin Reprod Med 2007;25(1):005–13.
41. Cowan S, Calder AA, Kelly RW. Decidualisation of cervical stromal cells. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 2004;114(2):189–96.
42. Chalubinski K, Deutinger J, Bernaschek G. Vaginosonography for recording of cycle-related myometrial contractions. Fertil Steril 1993;59(1):225–8.
43. Kunz G, Beil D, Deininger H, Wildt L, Leyendecker G. The dynamics of rapid sperm transport through the female genital tract: evidence from vaginal sonography of uterine peristalsis and hysterosalpingoscintigraphy. Human Reproduction 1996;11(3):627–32.
44. Bygdeman M, Swahn M-L, Gemzell-danielsson K, Svalander P. Mode of Action of RU 486. Ann Med 1993;25(1):61–4.
45. Gemzell-Danielsson K, Swahn M-L, Svalander P, Bygdeman M. Early luteal phase treatment with mifepristone (RU 486) for fertility regulation. Human Reproduction 1993;8(6):870–3.
46. Avrech OM, Golan A, Weinraub Z, Bukovsky I, Caspi E. Mifepristone (RU486) alone or in combination with a prostaglandin analogue for termination of early pregnancy: a review. Fertil Steril 1991;56(3):385–93.
47. Chai SY, Smith R, Fitter JT, Mitchell C, Pan X, Ilicic M, et al. Increased progesterone receptor A expression in labouring human myometrium is associated with decreased promoter occupancy by the histone demethylase JARID1A. Mol Hum Reprod 2014;20(5):442–53.
48. Mesiano S, Chan E-C, Fitter JT, Kwek K, Yeo G, Smith R. Progesterone Withdrawal and Estrogen Activation in Human Parturition Are Coordinated by Progesterone Receptor A Expression in the Myometrium [Internet].

2002. Available from:
<https://academic.oup.com/jcem/article/87/6/2924/2847517>

49. Thomson AJ TJYACSSCCIGINJE. Leukocytes infiltrate the myometrium during human parturition: further evidence that labour is an inflammatory process. *Hum Reprod* 1999 Jan;14(1):229-36
50. Jabbour HN, Kelly RW, Fraser HM, Critchley HOD. Endocrine Regulation of Menstruation. *Endocr Rev* 2006;27(1):17–46.
51. Bathgate R, Hsueh A, Sherwood D. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3rd ed. St Louis: 2006.
52. (www.nordiqc.org/Run-18-B2/assessment/assessment-PR.htm).
53. Di Nezza LA, Jobling T, Salamonsen LA. Progesterin suppresses matrix metalloproteinase production in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2003;89(2):325–33.
54. Jaffe RC, Ferguson-Gottschall SD, Gao W, Beam C, Fazleabas AT. Histone deacetylase inhibition and progesterone act synergistically to stimulate baboon glycodeclin gene expression. *J Mol Endocrinol* 2007;38(3):401–7.
55. Ward EC, Hoekstra A V., Blok LJ, Hanifi-Moghaddam P, Lurain JR, Singh DK, et al. The Regulation and Function of the Forkhead Transcription Factor, Forkhead Box O1, Is Dependent on the Progesterone Receptor in Endometrial Carcinoma. *Endocrinology* 2008;149(4):1942–50.
56. Neubauer NL, Ward EC, Patel P, Lu Z, Lee I, Blok LJ, et al. Progesterone Receptor-B Induction of BIRC3 Protects Endometrial Cancer Cells from AP1-59-Mediated Apoptosis. *Horm Cancer* 2011;2(3):170–81.
57. Shiozawa T. Involvement of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in growth inhibition of endometrium in the secretory phase and of hyperplastic endometrium treated with progesterone. *Mol Hum Reprod* 1998;4(9):899–905.
58. Kyo S, Sakaguchi J, Kiyono T, Shimizu Y, Maida Y, Mizumoto Y, et al. Forkhead Transcription Factor FOXO1 is a Direct Target of Progesterin to Inhibit Endometrial Epithelial Cell Growth. *Clinical Cancer Research* 2011;17(3):525–37.
59. UCHIDA H, MARUYAMA T, ARASE T, ONO M, NAGASHIMA T, MASUDA H, et al. Histone acetylation in reproductive organs: Significance of histone deacetylase inhibitors in gene transcription. *Reprod Med Biol* 2005;4(2):115–22.

60. Uchida H, Maruyama T, Ohta K, Ono M, Arase T, Kagami M, et al. Histone deacetylase inhibitor-induced glycodefin enhances the initial step of implantation. *Human Reproduction* 2007;22(10):2615–22.
61. Ivell R, Vanselow J, Christenson LK, Pate JL. Editorial: Regulation of Dynamic Changes and Remodeling Events During the Formation, Rescue and Regression of the Corpus Luteum Editorial on the Research Topic Regulation of Dynamic Changes and Remodeling Events During the Formation, Rescue and Regression of the Corpus Luteum. *Frontiers in Endocrinology* | www.frontiersin.org [Internet] 2020; 1:244. Available from: www.frontiersin.org
62. Arck P, Hansen PJ, Mulac Jericevic B, Piccinni M-P, Szekeres-Bartho J. Progesterone During Pregnancy: Endocrine? Immune Cross Talk in Mammalian Species and the Role of Stress. *American Journal of Reproductive Immunology* 2007;58(3):268–79.
63. Liu W-J, Gottshall SL, Hansen PJ. Increased Expression of Cell Surface Markers on Endometrial $\gamma\delta$ T-Cell Receptor+ Intraepithelial Lymphocytes Induced by the Local Presence of the Sheep Conceptus. *American Journal of Reproductive Immunology* 1997;37(2):199–205.
64. Meeusen E, Fox A, Brandon M, Lee C-S. Activation of uterine intraepithelial $\gamma\delta$ T cell receptor-positive lymphocytes during pregnancy. *Eur J Immunol* 1993;23(5):1112–7.
65. Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Miko E, Polgar B, Palkovics T. The role of $\gamma\delta$ T cells in the fetomaternal relationship. *Semin Immunol* 2001;13(4):229–33.
66. Polgar B, Kispal G, Lachmann M, Paar G, Nagy E, Csere P, et al. Molecular Cloning and Immunologic Characterization of a Novel cDNA Coding for Progesterone-Induced Blocking Factor. *The Journal of Immunology* 2003;171(11):5956–63.
67. Szekeres-Bartho J, Szekeres Gy, Debre P, Autran B, Chaouat G. Reactivity of lymphocytes to a progesterone receptor-specific monoclonal antibody. *Cell Immunol* 1990;125(2):273–83.
68. Chiu L, Nishimura M, Ishii Y, Nieda M, Maeshima M, Takedani Y, et al. Enhancement of the Expression of Progesterone Receptor on Progesterone-Treated Lymphocytes After Immunotherapy in Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion. *American Journal of Reproductive Immunology* 1996;35(6):552–7.
69. van den Heuvel M, McBey B-A, Hahnel AC, Croy BA. An analysis of the uterine lymphocyte-derived hybridoma cell line GWM 1–2 for expression of

- receptors for estrogen, progesterone, and interleukin 2. *J Reprod Immunol* 1996;31(1–2):37–50.
70. Roussev RG, Higgins NG, McIntyre JA. Phenotypic characterization of normal human placental mononuclear cells. *J Reprod Immunol* 1993;25(1):15–29.
 71. Chien EJ, Liao C-F, Chang C-P, Pu H-F, Lu L-M, Shie M-C, et al. The non-genomic effects on Na⁺/H⁺-exchange 1 by progesterone and 20 α -hydroxyprogesterone in human T cells. *J Cell Physiol* 2007;211(2):544–50.
 72. Szekeres-Bartho J, Halasz M, Palkovics T. Progesterone in pregnancy; receptor–ligand interaction and signaling pathways. *J Reprod Immunol* 2009;83(1–2):60–4.
 73. Warning JC, Mccracken SA, Morris JM. REPRODUCTION REVIEW A balancing act: mechanisms by which the fetus avoids rejection by the maternal immune system. *Reproduction* [Internet] 2011; 141:715–24. Available from: www.reproduction-online.org
 74. Petersen JF, Andersen AN, Klein BM, Helmggaard L, Arce J-C. Luteal phase progesterone and oestradiol after ovarian stimulation: relation to response and prediction of pregnancy. *Reprod Biomed Online* 2018;36(4):427–34.
 75. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of Implantation of the Conceptus and Loss of Pregnancy. *New England Journal of Medicine* 1999;340(23):1796–9.
 76. Katorke N, Vilella F, Ruiz M, Krüssel J-S, Simón C. Diagnosis of Endometrial-Factor Infertility: Current Approaches and New Avenues for Research. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2016;76(06):699–703.
 77. Griesinger G, Meldrum D. Introduction: Management of the luteal phase in assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2018;109(5):747–8.
 78. González-Foruria I, Gaggiotti-Marre S, Álvarez M, Martínez F, García S, Rodríguez I, et al. Factors associated with serum progesterone concentrations the day before cryopreserved embryo transfer in artificial cycles. *Reprod Biomed Online* 2020;40(6).
 79. Álvarez M, Gaggiotti-Marre S, Martínez F, Coll L, García S, González-Foruria I, et al. Individualised luteal phase support in artificially prepared frozen embryo transfer cycles based on serum progesterone levels: a prospective cohort study. *Human Reproduction* 2021;36(6):1552–60.
 80. Campbell NA. Campbell NA RJ. Reproducción animal. In Panamericana EM (ed) *Biología*. 2005, pp. 964-986. 2005.

81. Simón C HJ PAG-VJ. El endometrio humano. Desde la investigación a la clínica. 2009.
82. MARUYAMA T, YOSHIMURA Y. Molecular and Cellular Mechanisms for Differentiation and Regeneration of the Uterine Endometrium. *Endocr J* 2008;55(5):795–810.
83. Masterton R, Amstrong EM, More IAR. The cyclical variation in the percentage of ciliated cells in the normal human endometrium. *Reproduction* 1975;42(3):537–40.
84. Ferenczy A. Surface ultrastructural response of the human uterine lining epithelium to hormonal environment. A scanning electron microscopic study. *Acta Cytol.* 1977 Jul-Aug;21(4):566-72. PMID: 269610.
85. Rogers P, Murphy C. Morphometric and freeze fracture studies of human endometrium during the peri-implantation period. *Reprod Fertil Dev* 1992;4(3):265.
86. Sarani SA, Ghaffari-Novin M, Warren MA, Dockery P, Cooke ID. Morphological evidence for the 'implantation window' in human luminal endometrium. *Human Reproduction* 1999;14(12):3101–6.
87. Singh H, Aplin JD. Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation. *J Anat* 2009;215(1):3–13.
88. Wynn RM, Harris JA. Ultrastructural Cyclic Changes in the Human Endometrium. *Fertil Steril* 1967;18(5):632–48.
89. Cornillie FJ, Lauweryns JM, Brosens IA. Normal Human Endometrium. *Gynecol Obstet Invest* 1985;20(3):113–29.
90. Coaker T, Downie T, More IAR. Complex giant mitochondria in the human endometrial glandular cell: Serial sectioning, high-voltage electron microscopic, and three-dimensional reconstruction studies. *J Ultrastruct Res* 1982;78(3):283–91.
91. Wynn RM. The human endometrium: cyclic and gestational changes. 1989.
92. Wienke EC, Cavazos F, Hall DG, Lucas F V. Ultrastructure of the human endometrial stroma cell during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1968;102(1):65–77.
93. More IAR, Armstrong EM, Carty M, McSeveney D. Cyclical changes in the ultrastructure of the normal human endometrial stromal cell. *Bjog* 1974;81(5):337–47.

94. Parmley TH, Roberts DK, Walker NJ, Horbelt DV. Intercellular contacts between stromal cells in the normal human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Pathol* 1990;21(10):1063–6.
95. Roberts DK, Walker NJ, Lavia LA. Ultrastructural evidence of stromal/epithelial interactions in the human endometrial cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1988;158(4):854–9.
96. 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.
97. Daly DC, Maslar IA, Riddick DH. Prolactin production during in vitro decidualization of proliferative endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1983;145(6):672–8.
98. Giudice LC, Dsupin BA, Irwin JC. Steroid and peptide regulation of insulin-like growth factor-binding proteins secreted by human endometrial stromal cells is dependent on stromal differentiation. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet] 1992 [cited 2022 Nov 20];75(5):1235–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1385468/>
99. Gellersen B, Brosens I, Brosens J. Decidualization of the Human Endometrium: Mechanisms, Functions, and Clinical Perspectives. *Semin Reprod Med* 2007;25(6):445–53.
100. Saleh L, Otti GR, Fiala C, Pollheimer J, Knöfler M. Evaluation of human first trimester decidual and telomerase-transformed endometrial stromal cells as model systems of in vitro decidualization. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2011;9(1):155.
101. Jabbour HN, Kelly RW, Fraser HM, Critchley HOD. Endocrine Regulation of Menstruation. *Endocr Rev* 2006;27(1):17–46.
102. Smith SK. Angiogenesis and implantation. *Hum Reprod.* 2000 Dec;15 Suppl 6:59-66. PMID: 11261484.
103. Shibuya M. Differential Roles of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 and Receptor-2 in Angiogenesis. *BMB Rep* 2006;39(5):469–78.
104. Tsuzuki T, Okada H, Cho H, Shimoi K, Miyashiro H, Yasuda K, et al. Divergent regulation of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and vascular endothelial growth factor by hypoxia and female sex steroids in human endometrial stromal cells. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2013;168(1):95–101.

105. Teles A, Zenclussen A. How Cells of the Immune System Prepare the Endometrium for Implantation. *Semin Reprod Med* 2014;32(05):358–64.
106. Saito S, Shiozaki A, Sasaki Y, Nakashima A, Shima T, Ito M. Regulatory T cells and regulatory natural killer (NK) cells play important roles in fetomaternal tolerance. *Semin Immunopathol* 2007;29(2):115–22.
107. Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Human Reproduction* 1991;6(6):791–8.
108. Bulmer JN, Lash GE. The Role of Uterine NK Cells in Normal Reproduction and Reproductive Disorders. 2015. p. 95–126.
109. Craciunas L, Gallos I, Chu J, Bourne T, Quenby S, Brosens JJ, et al. Conventional and modern markers of endometrial receptivity: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2019;25(2):202–23.
110. Munro MG. Uterine polyps, adenomyosis, leiomyomas, and endometrial receptivity. *Fertil Steril*. 2019;111(4).
111. Kodaman PH, Taylor HS. Hormonal regulation of implantation. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2004;31(4):745–66.
112. Vasquez YM, DeMayo FJ. Role of nuclear receptors in blastocyst implantation. *Semin Cell Dev Biol* 2013;24(10–12):724–35.
113. Csapo AI, Pulkkinen M. Indispensability of the human corpus luteum in the maintenance of early pregnancy luteectomy evidence. *Obstet gynecol surv* 1978;33(2):69–81.
114. Lessey BA, Young SL. What exactly is endometrial receptivity? *Fertil Steril* 2019;111(4):611–7.
115. Grund S, Grümmer R. Direct Cell–Cell Interactions in the Endometrium and in Endometrial Pathophysiology. *Int J Mol Sci* 2018;19(8):2227.
116. Ye X. Uterine Luminal Epithelium as the Transient Gateway for Embryo Implantation. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2020;31(2):165–80.
117. Large MJ, Demayo FJ. The Regulation of Embryo Implantation and Endometrial Decidualization by Progesterone Receptor Signaling. 2011;
118. Simón C, Martín JC, Pellicer A. Paracrine regulators of implantation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000;14(5):815–26.
119. Fox C, Morin S, Jeong J-W, Scott RT, Lessey BA. Local and systemic factors and implantation: what is the evidence? *Fertil Steril* 2016;105(4):873–84.

120. Aghajanova L, Hamilton AE, Giudice LC. Uterine receptivity to human embryonic implantation: Histology, biomarkers, and transcriptomics. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19(2):204–11.
121. Galliano D, Pellicer A. MicroRNA and implantation. *Fertil Steril* 2014;101(6):1531–44.
122. José Pedro Carrascosa de la Blanca. *Firma Molecular de la Receptividad Endometrial en Humanos: Aplicación en Investigación y Clínica*. 2017.
123. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 1975;122(2):262–3.
124. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Reprint of: Dating the Endometrial Biopsy. *Fertil Steril* 2019;112(4):e93–115.
125. Coutifaris C, Myers ER, Guzick DS, Diamond MP, Carson SA, Legro RS, et al. Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status. *Fertil Steril* 2004;82(5):1264–72.
126. Murray MJ, Meyer WR, Zaino RJ, Lessey BA, Novotny DB, Ireland K, et al. A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertil Steril* 2004;81(5):1333–43.
127. Practice Committee of the ASRM 2015.
128. Martel D MCGJPA. Surface Changes of the Luminal Uterine Epithelium during the Human Menstrual Cycle: A Scanning Electron Microscopic Study. In de Brux J, Mortel R and Gautray JP (eds) *The Endometrium: Hormonal Impact*. 1981.
129. Nikas G, Drakakis P, Loutradis D, Mara-Skoufari C, Koumantakis E, Michalas S, et al. Implantation: Uterine pinopodes as markers of the 'nidation window' in cycling women receiving exogenous oestradiol and progesterone. *Human Reproduction* 1995;10(5):1208–13.
130. Ordi J, Creus M, Quintó L, Casamitjana R, Cardesa A, Balasch J. Within-Subject Between-Cycle Variability of Histological Dating, $\alpha\beta 3$ Integrin Expression, and Pinopod Formation in the Human Endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(5):2119–25.
131. Quinn C, Ryan E, Claessens EA, Greenblatt E, Hawrylyshyn P, Cruickshank B, et al. The presence of pinopodes in the human endometrium does not delineate the implantation window. *Fertil Steril* 2007;87(5):1015–21.

132. Tabibzadeh S, Kong QF, Babaknia A, May LT. Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. *Human Reproduction* 1995;10(10):2793–9.
133. Arici A, Seli E, Senturk LM, Gutierrez LS, Oral E, Taylor HS. Interleukin-8 in the Human Endometrium ¹. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(5):1783–7.
134. Taube SE, Clark GM, Dancey JE, McShane LM, Sigman CC, Gutman SI. A Perspective on Challenges and Issues in Biomarker Development and Drug and Biomarker Codevelopment. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 2009;101(21):1453–63.
135. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75(5):843–54.
136. Zhu W Z. Diagnostic Value of Serum miR-182, miR-183, miR-210, and miR-126 Levels in Patients with Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS one* 2016
137. Lugli G, Cohen AM, Bennett DA, Shah RC, Fields CJ, Hernandez AG, et al. Plasma Exosomal miRNAs in Persons with and without Alzheimer Disease: Altered Expression and Prospects for Biomarkers. *PLoS One* 2015;10(10): e0139233.
138. AL-kafaji G, AL-mahroos G, Alsayed NA, Hasan ZA, Nawaz S, Bakhiet M. Peripheral blood microRNA-15a is a potential biomarker for type 2 diabetes mellitus and pre-diabetes. *Mol Med Rep* 2015;12(5):7485–90.
139. Schulte C, Molz S, Appelbaum S, Karakas M, Ojeda F, Lau DM, et al. miRNA-197 and miRNA-223 Predict Cardiovascular Death in a Cohort of Patients with Symptomatic Coronary Artery Disease. *PLoS One* 2015;10(12): e0145930.
140. Sha A-G, Liu J-L, Jiang X-M, Ren J-Z, Ma C-H, Lei W, et al. Genome-wide identification of micro-ribonucleic acids associated with human endometrial receptivity in natural and stimulated cycles by deep sequencing. *Fertil Steril* 2011;96(1):150-155.e5.
141. Altmäe S, Esteban FJ, Stavreus-Evers A, Simón C, Giudice L, Lessey BA, et al. Guidelines for the design, analysis and interpretation of ‘omics’ data: focus on human endometrium. *Hum Reprod Update* 2014;20(1):12–28.
142. Kresowik JDK, Devor EJ, Van Voorhis BJ, Leslie KK. MicroRNA-31 is Significantly Elevated in Both Human Endometrium and Serum During the

- Window of Implantation: A Potential Biomarker for Optimum Receptivity¹. *Biol Reprod* 2014;91(1).
143. Ohlsson Teague EMC, Van der Hoek KH, Van der Hoek MB, Perry N, Wagaarachchi P, Robertson SA, et al. MicroRNA-Regulated Pathways Associated with Endometriosis. *Molecular Endocrinology* 2009;23(2):265–75.
 144. Revel A, Achache H, Stevens J, Smith Y, Reich R. MicroRNAs are associated with human embryo implantation defects. *Human Reproduction* 2011;26(10):2830–40.
 145. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409(6822):860–921.
 146. Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The Human Genome Project: Lessons from Large-Scale Biology. *Science (1979)* 2003;300(5617):286–90.
 147. Holdsworth-Carson SJ, Fung JN, Luong HTT, Sapkota Y, Bowdler LM, Wallace L, et al. Endometrial vezatin and its association with endometriosis risk. *Human Reproduction* 2016;31(5):999–1013.
 148. Hu S, Yao G, Wang Y, Xu H, Ji X, He Y, et al. Transcriptomic Changes During the Pre-Receptive to Receptive Transition in Human Endometrium Detected by RNA-Seq. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(12):E2744–53.
 149. Achache H, Tsafrir A, Prus D, Reich R, Revel A. Defective endometrial prostaglandin synthesis identified in patients with repeated implantation failure undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2010;94(4):1271–8.
 150. Metwally M, Preece R, Thomas J, Ledger W, Li T. A proteomic analysis of the endometrium in obese and overweight women with recurrent miscarriage: preliminary evidence for an endometrial defect. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2014;12(1):75.
 151. Lessey BA, Cass SJ. Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertil Steril* 1995 Mar;63(3):535–42.
 152. Lessey BA, Castelbaum AJ, Wolf L, Greene W, Paulson M, Meyer WR, et al. Use of integrins to date the endometrium. *Fertil Steril* 2000;73(4):779–87.
 153. Dubowy RL, Feinberg RF, Keefe DL, Doncel GF, Williams SC, McSweet JC, et al. Improved endometrial assessment using cyclin E and p27. *Fertil Steril* 2003;80(1):146–56.

154. Díaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Alamá P, Pellicer A, et al. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril* 2011;95(1):50-60.e15.
155. Enciso M, Carrascosa JP, Sarasa J, Martínez-Ortiz PA, Munné S, Horcajadas JA, et al. Development of a new comprehensive and reliable endometrial receptivity map (ER Map/ER Grade) based on RT-qPCR gene expression analysis. *Human Reproduction* 2018;33(2):220–8.
156. Singh M, Chaudhry P, Asselin E. Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. *Journal of Endocrinology* 2011;210(1):5–14.
157. Haller-Kikkatalo K, Altmäe S, Tagoma A, Uibo R, Salumets A. Autoimmune Activation toward Embryo Implantation is Rare in Immune-Privileged Human Endometrium. *Semin Reprod Med* 2014;32(05):376–84.
158. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 2009;10(1):57–63.
159. Mullis K FFSSSRHGEH. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. . *Biotechnology* 1992;24:17-27
160. Horcajadas JA, Mínguez P, Dopazo J, Esteban FJ, Domínguez F, Giudice LC, et al. Controlled Ovarian Stimulation Induces a Functional Genomic Delay of the Endometrium with Potential Clinical Implications. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(11):4500–10.
161. Díaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Alamá P, Pellicer A, et al. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril* 2011;95(1):50-60.e15.
162. Zhang S, Kong S, Lu J, Wang Q, Chen Y, Wang W, et al. Deciphering the molecular basis of uterine receptivity. *Mol Reprod Dev* 2013;80(1):8–21.
163. Ng YH, Rome S, Jalabert A, Forterre A, Singh H, Hincks CL, et al. Endometrial Exosomes/Microvesicles in the Uterine Microenvironment: A New Paradigm for Embryo-Endometrial Cross Talk at Implantation. *PLoS One* 2013;8(3):e58502.
164. Altmäe S, Martínez-Conejero JA, Salumets A, Simon C, Horcajadas JA, Stavreus-Evers A. Endometrial gene expression analysis at the time of embryo implantation in women with unexplained infertility. *Mol Hum Reprod* 2010;16(3):178–87.

165. Osteen KG, Igarashi TM, Bruner-Tran KL. Progesterone action in the human endometrium: Induction of a unique tissue environment which limits matrix metalloproteinase (MMP) expression. *Frontiers in Bioscience*. 2003;(4).
166. Porias H C-LAS-AIG-MRCCPAC-G V. Hormonal content of plasma and endometrium of women taking oral contraceptives. *Obstet Gynecol* 1978 Dec;52(6):703-7
167. Bayard F LJMJSWDLBC. Concentrations plasmatiques de LH et des stéroïdes sexuels pendant le cycle menstruel normal et sous thérapeutique contraceptive [Plasma concentrations of LH and of sex steroids during the normal menstrual cycle and during contraceptive treatment]. . *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 1975;4(7):915-26
168. Ruiz-Alonso M, Blesa D, Díaz-Gimeno P, Gómez E, Fernández-Sánchez M, Carranza F, et al. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril* 2013;100(3):818–24.
169. Petersen JF, Andersen AN, Klein BM, Helmggaard L, Arce JC. Luteal phase progesterone and oestradiol after ovarian stimulation: relation to response and prediction of pregnancy. *Reprod Biomed Online* 2018;36(4):427–34.
170. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of Implantation of the Conceptus and Loss of Pregnancy. *New England Journal of Medicine* 1999;340(23):1796–9.
171. Cozzolino M, Diaz-Gimeno P, Pellicer A, Garrido N. Evaluation of the endometrial receptivity assay and the preimplantation genetic test for aneuploidy in overcoming recurrent implantation failure. *J Assist Reprod Genet* 2020;37(12):2989–97.
172. Tan J, Kan A, Hitkari J, Taylor B, Tallon N, Warraich G, et al. The role of the endometrial receptivity array (ERA) in patients who have failed euploid embryo transfers. *J Assist Reprod Genet* 2018;35(4):683–92.
173. Yding Andersen C, Vilbour Andersen K. Improving the luteal phase after ovarian stimulation: reviewing new options. *Reprod Biomed Online* 2014;28(5):552–9.
174. Tan J, Kan A, Hitkari J, Taylor B, Tallon N, Warraich G, et al. The role of the endometrial receptivity array (ERA) in patients who have failed euploid embryo transfers. *J Assist Reprod Genet* 2018;35(4):683–92.
175. Ruiz-Alonso M, Blesa D, Díaz-Gimeno P, Gómez E, Fernández-Sánchez M, Carranza F, et al. The endometrial receptivity array for diagnosis and

personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril* 2013;100(3):818–24.

176. Labarta E, Sebastian-Leon P, Devesa-Peiro A, Celada P, Vidal C, Giles J, et al. Analysis of serum and endometrial progesterone in determining endometrial receptivity. *Advance Access Publication on August [Internet]* 2021;36(11):2021. Available from: <https://academic.oup.com/humrep/article/36/11/2861/6348476>
177. Labarta E, Sebastian-Leon P, Devesa-Peiro A, Celada P, Vidal C, Giles J, et al. Analysis of serum and endometrial progesterone in determining endometrial receptivity. *Advance Access Publication on August [Internet]* 2021;36(11):2021. Available from: <https://academic.oup.com/humrep/article/36/11/2861/6348476>
178. Cozzolino M, Díaz-Gimeno P, Pellicer A, Garrido N. Use of the endometrial receptivity array to guide personalized embryo transfer after a failed transfer attempt was associated with a lower cumulative and per transfer live birth rate during donor and autologous cycles. *Fertil Steril* 2022;118(4):724–36.
179. Arian SE, Hessami K, Khatibi A, To AK, Shamshirsaz AA, Gibbons W. Endometrial receptivity array before frozen embryo transfer cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2023;119(2):229–38.
180. Lensen S, Wilkinson J, van Wely M, Farquhar C. Comments on the methodology of an endometrial receptivity array trial. *Reprod Biomed Online* 2021;42(1):283.
181. Hirschberg CI, Blakemore JK, Fino E, Grifo JA. Prospective analysis of progesterone exposure in programmed single thawed euploid embryo transfer cycles and outcomes. *J Assist Reprod Genet* 2021;38(4):901–5.
182. Bassil R, Casper R, Samara N, Hsieh T-B, Barzilay E, Orvieto R, et al. Does the endometrial receptivity array really provide personalized embryo transfer? *J Assist Reprod Genet* 2018;35(7):1301–5.
183. Lawrenz B, Fatemi HM. Are serum progesterone measurements truly representative for the identification of an adequate luteal phase in hormonal replacement therapy frozen embryo transfers? *Human Reproduction* 2022;37(4):639–43.
184. Labarta E, Mariani G, Rodríguez-Varela C, Bosch E. Individualized luteal phase support normalizes live birth rate in women with low progesterone levels on the day of embryo transfer in artificial endometrial preparation cycles. *Fertil Steril* 2022;117(1):96–103.

185. Labarta E, Mariani G, Holtmann N, Celada P, Remohí J, Bosch E. Low serum progesterone on the day of embryo transfer is associated with a diminished ongoing pregnancy rate in oocyte donation cycles after artificial endometrial preparation: a prospective study. *Human Reproduction* 2017;32(12):2437–42.
186. Díaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Alamá P, Pellicer A, et al. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril* 2011;95(1):50-60.e15.
187. Young SL, Savaris RF, Lessey BA, Sharkey AM, Balthazar U, Zaino RJ, et al. Effect of randomized serum progesterone concentration on secretory endometrial histologic development and gene expression. *Human Reproduction* 2017;32(9):1903–14.
188. Labarta E, Mariani G, Paoletti S, Rodriguez-Varela C, Vidal C, Giles J, et al. Impact of low serum progesterone levels on the day of embryo transfer on pregnancy outcome: a prospective cohort study in artificial cycles with vaginal progesterone. *Human Reproduction* 2021;36(3):683–92.
189. Díaz-Gimeno P, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Bosch N, Martínez-Conejero JA, Alamá P, et al. The accuracy and reproducibility of the endometrial receptivity array is superior to histology as a diagnostic method for endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2013;99(2):508–17.
190. Díaz-Gimeno P, Ruiz-Alonso M, Sebastian-Leon P, Pellicer A, Valbuena D, Simón C. Window of implantation transcriptomic stratification reveals different endometrial subsignatures associated with live birth and biochemical pregnancy. *Fertil Steril* 2017;108(4):703-710.e3.
191. Ruiz-Alonso M, Galindo N, Pellicer A, Simon C. What a difference two days make: “personalized” embryo transfer (pET) paradigm: A case report and pilot study. *Human Reproduction* 2014;29(6):1244–7.
192. Ben Rafael Z. Endometrial Receptivity Analysis (ERA) test: an unproven technology. *Hum Reprod Open* 2021;2021(2).
193. Griesinger G, Trevisan S, Cometti B. Endometrial thickness on the day of embryo transfer is a poor predictor of IVF treatment outcome. *Hum Reprod Open* 2018;2018(1).
194. Shaodi Z, Qiuyuan L, Yisha Y, Cuilian Z. The effect of endometrial thickness on pregnancy outcomes of frozen-thawed embryo transfer cycles which underwent hormone replacement therapy. *PLoS One* 2020;15(9):e0239120.

195. Lensen S, Lantsberg D, Gardner DK, Sophian AD, Wandafiana N, Kamath MS. The role of timing in frozen embryo transfer. *Fertil Steril* 2022;118(5):832–8.
196. Pereira MM, Mainigi M, Strauss JF. Secretory products of the corpus luteum and preeclampsia. *Hum Reprod Update* 2021;27(4):651–72.
197. Cohen AM, Ye XY, Colgan TJ, Greenblatt EM, Chan C. Comparing endometrial receptivity array to histologic dating of the endometrium in women with a history of implantation failure. *Syst Biol Reprod Med* 2020;66(6):347–54.
198. Adamson GD, de Mouzon J, Chambers GM, Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology, 2011. *Fertil Steril* 2018;110(6).
199. Ruiz-Alonso M, Valbuena D, Gomez C, Cuzzi J, Simon C. Endometrial Receptivity Analysis (ERA): data versus opinions. *Hum Reprod Open* 2021;2021(2).
200. Simón C, Gómez C, Cabanillas S, Vladimirov I, Castellón G, Giles J, et al. A 5-year multicentre randomized controlled trial comparing personalized, frozen and fresh blastocyst transfer in IVF. *Reprod Biomed Online* 2020;41(3):402–15.
201. Carrascosa JP, Cotán D, Jurado I, Oropesa-Ávila M, Sánchez-Martín P, Savaris RF, et al. The Effect of Copper on Endometrial Receptivity and Induction of Apoptosis on Decidualized Human Endometrial Stromal Cells. *Reproductive Sciences* 2018;25(7):985–99.

14.ANEXOS

ANEXO I: ACEPTACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN POR PARTE DEL CEIC PSMAR



INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS DEL PARC DE SALUT MAR

Doña Cristina Llop Julià, secretaria técnica del **Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Parc de Salut MAR**,

CERTIFICA

Que este Comité, de acuerdo a la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica, Principios éticos de la Declaración de Helsinki, y resto de principios éticos aplicables, ha evaluado la propuesta para que se realice el proyecto de investigación núm. 2021/9717/I, promovido por el Consorci Mar Parc de Salut de Barcelona, y titulado: *“Ensayo clínico piloto aleatorizado para conocer la correlación entre el nivel de progesterona tisular y sérica responsable de la receptividad endometrial para la implantación embrionaria”*, código FER2021-RECEPNDOM.

Versión de los documentos:

- PROTOCOLO VERSIÓN 6 DE FECHA 1/10/2021
- **HIP/CI versión 6.0 fecha 01/10/2021**

Y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

- Son adecuados los procedimientos para obtener el consentimiento informado y el modo de reclutamiento previsto, así como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Y que este Comité aprueba que dicho proyecto de investigación sea realizado en el Servicio de Obstetricia y Ginecología por la Dra. Margalida Sastre Cuadri como investigadora principal, tal como recoge el ACTA de reunión del día 19/10/2021.

Lo que firmo en Barcelona a 25 de octubre de 2021



Firmado digitalmente por LLOP JULIA CRISTINA - 53314050G

Nombre de reconocimiento (DN): c=ES,

serialNumber=IDCES-53314050G, givenName=CRISTINA, sn=LLOP JULIA, cn=LLOP JULIA CRISTINA - 53314050G

Firmado: Fecha: 2021.10.25 09:03:20 +02'00'

Secretaria técnica

CEIm – Parc de Salut MAR

Dr. Aiguader, 88 | 08003 Barcelona | Tel. 93 316 06 77 | Fax 93 316 06 36 ceic-psmar@imim.es | www.parcdesalutmar.cat

Es responsabilidad del promotor garantizar que todos los investigadores asociados con este proyecto conozcan las condiciones de aprobación y los documentos aprobados.

Se debe informar a la Secretaría del CEIm mediante una enmienda, informe anual de seguimiento o notificación, de:

- Cualquier cambio significativo en el proyecto y la razón de ese cambio, incluida una indicación de las implicaciones éticas (si las hubiera);
- Eventos adversos graves en los participantes y la acción tomada para abordar esos efectos;
- Cualquier otro evento imprevisto o inesperado, como desviaciones de protocolo;
- El cambio de Investigador Principal;
- Informe anual de seguimiento;
- La fecha de finalización del estudio;
- Informe final del estudio y/o publicación de resultados.

El Comité tanto en su composición como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95).

En dicha reunión el Comité se cumplió el quórum preceptivo legalmente.

En el caso de que se evalúe algún proyecto del que un miembro sea investigador/colaborador se detecte conflicto de interés, éste se presentará en la reunión durante la discusión del proyecto.

?

▪

Presidenta	Dra. Marta Guix Arnau, Oncología Médica
Vicepresidenta	Dra. Ana Maria Aldea Perona, Farmacóloga Clínica
Secretaría técnica	Sra. Cristina Llop Julià, Bióloga
Vocal	Dra. Anna Oliveras Serrano, Nefrología
Vocal	Dr. Antonio Montes Pérez, Anestesiología y Reanimación
Vocal	Sra. Assumpció Álvarez Carrera, Farmacéutica Atención Primaria
Vocal	Dra. Blanca Sánchez González, Hematología
Vocal	Dr. David Benaiges Boix, Endocrinología
Vocal	Sr. Lluís Berenguer Maimó, Arquitecto. Miembro Lego
Vocal	Dr. Helmut Schröder, Epidemiología y Salud Pública
Vocal	Dra. Mercè Espona Quer, Farmacéutica Hospitalaria
Vocal	Dra. Marta Ferran Farrés, Dermatología
Vocal	Sra. María de los Ángeles Jodar Sánchez. Lda. en Derecho. Servicio de Atención al Ciudadano.
Vocal	Sra. Azucena Justicia Díaz, Enfermera
Vocal	Dra. Patricia Díaz Pellicer, Farmacóloga Clínica
Vocal	Sr. Ramon Figueras Sabater, Abogado
Vocal	Dra. Silvia Tórtola Pérez, Bióloga

?

CEIm - Parc de Salut MAR

Dr. Aiguader, 88 | 08003 Barcelona | Tel. 93 316 06 77 | Fax 93 316 06 36 ceic-psmar@imim.es | www.parcdesalutmar.cat



HOJA INFORMATIVA PARA PACIENTES

Título del estudio: Ensayo clínico piloto aleatorizado para conocer la correlación entre el nivel de progesterona tisular y sérica responsable de la receptividad endometrial para la implantación embrionaria

Código del estudio: FER2021-RECEPNDOM
Versión 6.0 fecha 01/10/2021

Investigador principal: Margalida E. Sastre Cuadri
Promotor del estudio: Parc Salut Mar
Centro: Parc Salut Mar Clínica Fertty de Barcelona

Nos dirigimos a usted para invitarle a participar en un estudio clínico en el que se evalúa la receptividad endometrial (estudiar donde va a anidar el embrión) para mejorar los resultados de la transferencia embrionaria en el Parc Salut Mar y Clínica Fertty de Barcelona.

La doctora que lleva a cabo el estudio, Dra. Margalida E. Sastre, y el equipo del Dr. Checa y el Dr. Espinós que realizan el seguimiento, consideran que usted reúne todos los requisitos para poder participar.

Para ello, es necesario que previamente usted reciba toda la información correcta y suficiente, de este modo podrá valorar si desea participar en el estudio.

Por favor, lea detenidamente esta hoja informativa con atención y no dude en ponerse en contacto con su médico para cualquier duda que le pueda surgir acerca de este documento y/o de la información sobre el estudio que le entregamos a continuación.

Participación en el estudio

Debe saber que su participación en el estudio es totalmente voluntaria. Usted puede negarse a participar antes o durante el estudio sin que ello se derive en ningún perjuicio, ni que se vea afectada su atención médica o que suponga pérdida de los beneficios a los que usted tiene derecho.

Introducción y descripción del estudio

En las últimas décadas, la Medicina Reproductiva ha evolucionado de manera sustancial, y ha permitido introducir mejoras centradas en el paciente.

Por un lado, se han perfeccionado los protocolos de estimulación ovárica, que permiten recuperar un mayor número de ovocitos maduros, aumentando así las posibilidades de embarazo. Y, por otro lado, se han introducido mejoras en el campo del desarrollo embrionario, desde los sistemas de incubación, como las técnicas que permiten la detección de embriones que genéticamente son viables para la transferencia. Asimismo, se han personalizado los tratamientos de preparación endometrial previos a la transferencia embrionaria.

Aun así, son limitadas las técnicas que permiten sincronizar a la perfección la transferencia embrionaria.

Clásicamente, el estudio de la ventana de implantación endometrial (seleccionar el mejor momento para transferir el embrión) se centraba en mujeres que presentaban fallos de implantación mediante el análisis de un grupo de genes que informan sobre posibles desplazamientos de esta ventana de implantación a través de un método invasivo, una biopsia endometrial. Desafortunadamente no existe en la actualidad ningún marcador biológico que permita detectar el momento idóneo de la implantación y realizar una transferencia embrionaria personalizada de manera no invasiva.

Sabemos que la progesterona es una hormona clave tanto en la ventana de implantación como en el mantenimiento del embarazo, y sus niveles podrían correlacionarse con la ventana de implantación.

Objetivo y procedimiento

El objetivo es correlacionar los niveles de progesterona en sangre y tejido endometrial con el patrón genómico y la clasificación de receptividad de manera que se pueda identificar el mecanismo de comportamiento y un posible algoritmo de diagnóstico no invasivo, es decir, queremos encontrar una herramienta no invasiva, para poder conseguir el mejor momento para colocar el embrión en el útero.

Si usted otorga su consentimiento para participar en el estudio, se le propondrá realizar un ciclo de preparación endometrial sustitutivo, análogo a los que se realizan previa transferencia embrionaria, excepto que en este ciclo evaluaremos los niveles de progesterona en sangre y realizaremos un estudio de receptividad endometrial en distintas fases.

Para la preparación endometrial recibirá:

- Estradiol oral 6mg/día desde el día 2 de ciclo menstrual.
- Tras 8-10 días de tratamiento se realizará ecografía transvaginal para medir el grosor y calidad endometrial, y si supera el grosor de 6-7mm se realizará una primera determinación en sangre de estrógenos y progesterona.
- Se añadirá Progesterona 200mg/8h vía vaginal cuando el grosor endometrial se encuentre entre 8 y 14mm.
- En este momento se le asignará de forma aleatoria su inclusión a un grupo:

Grupo 1. Se realizará biopsia de endometrio y analítica hormonal el día 3.5 y el día 5 tras inicio de la Progesterona. Se realizarán dos biopsias endometrio en total a cada grupo

Grupo 2. Se realizará biopsia de endometrio y analítica hormonal el día 5 y el día 6.5 tras inicio de la Progesterona Se realizarán dos biopsias endometrio en total a cada grupo

Procedimiento para la toma de muestra de biopsia endometrial: Se introduce un especuloscopio de forma análoga a cuando se realiza una citología de cribado. Posteriormente se introduce una cánula semirrígida a través del canal cervical, hasta sobrepasar el orificio cervical interno, el interior del útero. En este momento se realiza la toma de muestra de tejido endometrial para estudio. Es un procedimiento que se realiza sin anestesia.

Estudio del tejido endometrial: Se utilizará un panel de expresión de 48 genes que permiten clasificar el estadio de la Ventana de implantación clínica endometrial, el mejor momento para que el embrión se anide en el útero.

Beneficios posibles por participar en el estudio

La participación en el estudio no le ofrece ningún beneficio directo que mejore sus posibilidades de gestación. Aun así, la información obtenida en este estudio podría ayudar a individualizar los tratamientos de fertilidad y mejorar las tasas de embarazo globales en un futuro.

Riesgos derivados del estudio

Participar en este estudio la somete a los riesgos derivados hacer el tratamiento hormonal y controles ecográficos que se realizan habitualmente para un ciclo de transferencia embrionaria. Asimismo, se somete al riesgo inherente de realizar la biopsia endometrial, que, aunque es un procedimiento habitual en la práctica clínica, se acompaña de dolor similar a una menstruación y sangrado escaso posterior. Los

riesgos de complicación, tipo infección pélvica o perforación son anecdóticos (< 0,7%), las complicaciones más frecuentes suelen ser dolor momentáneo 0,7% y mareo transitorio 0,7%, puesto que se realiza el procedimiento bajo condiciones de asepsia y se utilizan las cánulas endometriales actuales semirrígidas.

Financiación y compensación económica

Usted no recibirá ninguna compensación económica por participar en este estudio. Asimismo, su participación le supondrá tener información genética de cuál es el mejor momento para la implantación endometrial de su embrión, gracias al estudio genético.

Confidencialidad

Toda la información que se obtenga durante el estudio será confidencial y ni usted ni sus datos, en ningún caso estarán identificados en cualquier informe que se emita de este estudio. Al aceptar su participación en el estudio, se le asignará un código numérico, y la anonimización de sus datos se mantendrá mediante protección disociada reversible. Estos datos se manejarán de acuerdo con el Reglamento General de Protección de Datos 2016/679 y la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, teniendo usted los derechos que la citada ley le reconoce de acceso, rectificación, cancelación y oposición de los datos.

Si usted decide participar sus datos serán accesibles a las Autoridades Sanitarias, Comités Éticos de Investigación Clínica (CEICs), auditores y al Promotor, para la verificación de los procedimientos de ley datos obtenidos durante el estudio, sin violar la confidencialidad de sus datos. Los datos del estudio podrán ser publicados en revistas científicas pero su identidad permanecerá confidencial

Información adicional y teléfono de contacto

El presente estudio y consentimiento Informado han sido aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital del Mar de Barcelona. Su médico y/o miembros de su equipo están a su disposición para atender cualquier consulta que usted quiera realizar con relación al procedimiento del estudio. Recibirá una copia de este documento de consentimiento informado y podrá solicitar información adicional contactando con el investigador principal, la Dra. Margalida Sastre, a través del número de teléfono 932483129.

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio: Ensayo clínico piloto aleatorizado para conocer la correlación entre el nivel de progesterona tisular y sérica responsable de la receptividad endometrial para la implantación embrionaria

Código del estudio: FER2021-RECEPNDOM

Versión 6.0, fecha 01/10/2021

Código del paciente

Yo, _____, manifiesto que he sido informado/a del presente estudio, y:

- He leído la hoja informativa que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido suficiente información sobre el estudio
- Comprendo que mi participación es voluntaria
- Comprendo que puedo retirarme del estudio: cuando quiera, sin tener que dar explicaciones, y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos
- Comprendo que mi participación en el estudio no conlleva ningún perjuicio para mi salud
- He sido informado/a que mis datos serán protegidos, que los resultados de mi evaluación serán estrictamente confidenciales
- He recibido una copia firmada de este consentimiento

Teniendo esto en consideración, OTORGO libremente mi consentimiento para participar en el estudio, y a que mis datos puedan ser utilizados con fines de investigación.

DOY PERMISO para que estas personas tengan acceso a mi historia clínica. Autorizo la utilización de mis datos, siguiendo el protocolo de confidencialidad pertinente, en futuros estudios relacionados y en las posibles publicaciones científicas que salgan de los estudios realizados.

Fecha: ____/____/____

Firma del participante

Firma del investigador

ANEXO III PROCESAMIENTO DEL RNA PARA LA TÉCNICA TRANSCRIPTÓMICA

Retro-transcripción, pre-amplificación y tratamiento con exonucleasas(179)

Una vez extraído el RNA de las biopsias endometriales, se obtiene el DNA complementario por retro-transcripción, ya que la estabilidad del RNA es muy baja. Esta retro-transcripción se consigue a través de PCR, mediante el kit Reverse Transcription Master Mix (Fluidigm, San Francisco, Estados Unidos). En un Eppendorf de PCR se alícuota 3 μ l de Master Mix del kit, 1 μ l de agua libre de RNasas por reacción, y 1 μ l del RNA dentro del rango de concentraciones optimo (70-250 ng/ μ l). Una vez añadidos todos los reactivos, dar un breve vortex y posterior spin a los tubos, colocar en el termociclador MyCycler Thermal Cycler 170- 9701 (Bio-Rad, Madrid, España), y correr el protocolo de la **Tabla compuesto** por un ciclo de 4 pasos que se repite una sola vez. Una vez finalizada la reacción, la muestra puede almacenarse a 4°C o -20°C hasta el momento de la pre-amplificación (122).

Tabla1. Protocolo de PCR para retro-transcripción con el sistema Fluidigm (Fluidigm, San Francisco, Estados Unidos).

Condición	Hold	Hold	Hold	Hold
T ^a (°C)	25	42	85	4
Tiempo (min)	5	30	5	∞

El siguiente paso es la realización de una pre-amplificación por PCR para enriquecer las muestras en los genes de interés, siguiendo el protocolo descrito en Delta Gene assays Fluidigm (Fluidigm, San Francisco, Estados Unidos). Para ello, se añade 1 μ l de cada uno de los 192 primers a una concentración de 100 μ M (192 μ l en total) y Buffer TE hasta completar los 200 μ l, quedando cada primer con una concentración final de 500 nM. Esta mezcla de primers constituye el "Ensayo DELTAgene" y debe almacenarse a -20°C.

La mezcla total de reacción para la pre-amplificación se compone de los siguientes reactivos (Fluidigm, San Francisco, Estados Unidos):

Tabla 2 Protocolo de mezcla de reacción para la pre-amplificación con Fluidigm (DELTAgene).

Reactivos	Vol. 1x (µl)	Vol. 192x (µl) + 10% (µl)
Agua Libre de RNAsas	2.25	475.2
PreAmp Master Mix	1	211.2
Ensayos DELTAgene (500 nM)	0.5	105.6
cDNA	1.25	-
Volumen Total	5	-

La mezcla final de 5 µl se agita, se centrifuga brevemente y se introduce en el termociclador MyCycler Thermal Cycler 170-9701 (Bio-Rad, Madrid, España) con el siguiente protocolo:

Tabla 3 . Protocolo de PCR para la pre-amplificación con Fluidigm (DELTAgene).

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Hold	95	2	1
Desnaturalización	95	15 s	10
Unión/Elongación	60	4	10
Hold	8	∞	∞

Una vez finalizada la pre-amplificación, se realiza un tratamiento con exonucleasas para eliminar el exceso de primers que no hayan sido incorporados. Para ello, se diluye la enzima Exonucleasa I a 4 U/µl como muestra la siguiente tabla:

Tabla 4 Mezcla de reacción para el tratamiento con Exonucleasa de Fluidigm (DELTAgene).

Reactivos	Vol. 1x (µl)
Agua	1.4
Buffer de la reacción	0.2
Exonucleasa I a 20 U/µl	0.4
Volumen total	2.0

A continuación, añadir 2 µl de la dilución anterior a cada tuba de reacción pre-amplificado. Mezclar, centrifugar brevemente e incubar en el termociclador con el siguiente protocolo.

Tabla 5. Protocolo de PCR para el tratamiento con Exonucleasa de Fluidigm (DELTAgene).

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Digestión	37	30	1
Inactivación	80	15	1
Hold	4	∞	∞

Finalmente, diluir el producto final en buffer de lavado TE (10 mM Tris-HCl, 1.0 mM EDTA, TEKnova, PN T0221) a una dilución 1/5, añadiendo 18 µl de este a cada tuba

Tecnología Fluidigm

La tecnología Fluidigm consiste en una PCR cuantitativa o Real-Time PCR particular, capaz de cuantificar la emisión de fluorescencia producida por el fluoróforo EVAGreen, el cual se une a la cadena doble del DNA. Esta tecnología detecta la amplificación de DNA a tiempo real de forma cuantitativa, en referencia a un conjunto de genes constitutivos o housekeeping que mantienen su expresión de forma constante. La técnica empleada se basa en un sistema de microfluidos. Se trata de un chip denominado Circuito Fluidico Integrado (IFC, de sus siglas en inglés) donde se depositan y combinan las muestras y primers de interés. La máster mix empleada para la PCR es la SSoFast™ EvaGreen Super Mix con Low Rox (Laboratorios Bio-Rad, Madrid, España). La plataforma Biomark HD (Fluidigm, San Francisco) entrecruza ambos reactivos (muestras y primers) en las celdas centrales del chip, de manera independiente, teniendo lugar así muchas PCR cuantitativas en el mismo momento, en un espacio reducido y con menos cantidad de reactivo que en una PCR cuantitativa habitual (Fluidigm, San Francisco).(201)

ANEXO IV: KIT ELISA PARA PROCESAR LA PROGESTERONA TISULAR DEL ENDOMETRIO

invitrogen

PRODUCT INFORMATION SHEET

Progesterone Competitive ELISA Kit

Catalog Number EIAP4C21 [96 tests]

Rev 1.C

For safety and biohazard guidelines, see the "Safety" appendix in the *ELISA Technical Guide* (Pub. no. MAN0006796). Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves.

Product description

The Progesterone ELISA Kit is a solid-phase competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). This assay is designed to detect and quantify the level of progesterone in dried fecal extracts, urine, and tissue culture media. The assay recognizes progesterone independent of species.

Progesterone, C₂₁H₃₀O₂, also known as P₄ (pregn-4-ene-3,20-dione) is a C-21 steroid hormone involved in the female menstrual cycle, gestation and embryogenesis of humans and other species.

Contents and storage

Kit and components are shipped at -20°C. Upon receipt, store the kit at -20°C. Once open, store the kit at 4°C and use within 2 weeks.

Components	Quantity
Progesterone Standard; 32,000 pg/mL progesterone in a special stabilizing solution	125 µL
Assay Buffer Concentrate (5X)	28 mL
Antibody Coated Wells, 96-well strip-well plate coated with goat anti-mouse IgG	1 plate
Progesterone Antibody	3 mL
Progesterone Conjugate	3 mL
Wash Buffer Concentrate (20X)	30 mL
TMB (Tetramethylbenzidine) Substrate	11 mL
Stop Solution; contains 1 M HCl, CAUSTIC	5 mL
Plate Sealer	1

Materials required but not supplied

- Distilled or deionized water
- Microtiter plate reader with software capable of measurement at or near 450 nm (preferably with correction between 570 nm and 590 nm).
- Plate Shaker
- Plate washer—automated or manual (squirt bottle, manifold dispenser, or equivalent)
- Calibrated adjustable precision pipettes and glass or plastic tubes for diluting solution

Procedural guidelines

IMPORTANT! Reagents are lot-specific. Do not mix or interchange different reagent lots from various kit lots.

- Review the **Procedural guidelines** and **Plate washing directions** in the *ELISA Technical Guide* available at thermofisher.com
- Allow reagents to reach room temperature before use. Mix to redissolve any precipitated salts.
- Solutions containing sodium azide will inhibit the activity of the peroxidase conjugate. Ensure that there is no contamination of labware or the plate washer with azide-containing solutions.

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

Prepare 1X Wash Buffer

1. Dilute 15 mL of Wash Solution Concentrate (20X) with 285 mL of deionized or distilled water. Label as 1X Wash Buffer.
2. Store the concentrate and 1X Wash Buffer in the refrigerator. Use the diluted buffer within 3 months.

Prepare 1X Assay Buffer

1. Dilute 14 mL of Assay Buffer (5X) with 56 mL of deionized or distilled water. Label as 1X Assay Buffer.
2. Store the concentrate and 1X Assay Buffer in the refrigerator. 1X Assay Buffer is stable at 4°C for 3 months.

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Sample preparation guidelines

- Refer to the *ELISA Technical Guide* at thermofisher.com for detailed sample preparation procedures.
- Collect samples in pyrogen/endotoxin-free tubes.
- Freeze samples after collection if samples will not be tested immediately. Avoid multiple freeze-thaw cycles of frozen samples. Thaw completely and mix well (do not vortex) prior to analysis.
- Avoid the use of hemolyzed or lipemic sera.
- If large amounts of particulate matter are present in the sample, centrifuge or filter sample prior to analysis.

Prepare samples

Sample concentrations should be within the range of the standard curve. Because conditions may vary, each investigator should determine the optimal dilution for each application.

Use all samples within **2 hours** of dilution, or store at -20°C or lower until ready to perform assay.

Sample type	Procedure
Dried feces	See detailed extraction protocol on the product page at thermofisher.com Note: The ethanol concentration in the final diluted 1X Assay Buffer added to the well should be <5%.
Urine	Dilute samples $\geq 1:4$ with 1X Assay Buffer. Note: A Urinary Creatinine Detection Kit (Cat. no. EIACUN) is available for measuring urine creatinine for normalization of corticosterone in a random urine specimens.
Tissue culture media	Perform sample dilutions with the corresponding tissue culture medium.

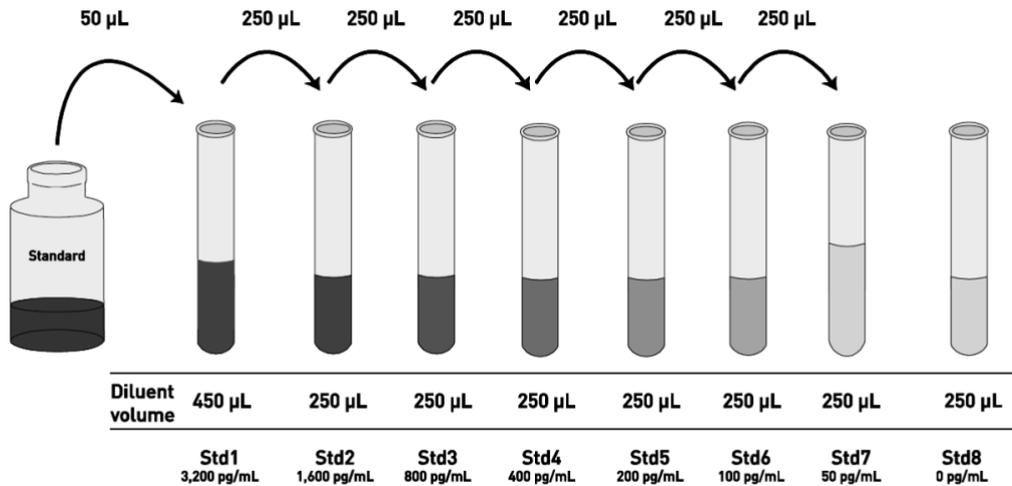
Dilute standards

Note: Use glass or plastic tubes for diluting standards.

Instructions are for diluting standards from 3,200 to 50 pg/mL, but a curve can be obtained using a range of 1,600 to 50 pg/mL. Choose the range that fits your sample concentrations most appropriately.

The Progesterone Standard contains an organic solvent. Pipette the standard up and down several times to wet the pipet tip before transfer to ensure that volumes are accurate.

1. Add 50 μL Progesterone Standard to one tube containing 450 μL 1X Assay Buffer and label as 3,200 pg/mL progesterone.
2. Add 250 μL Standard Diluent Buffer to each of 7 tubes labeled as follows: 1,600, 800, 400, 200, 100, 50, and 0 pg/mL progesterone.
3. Make serial dilutions of the standard as described below in the dilution diagram. Mix thoroughly between steps.
4. Use the standards within 2 hours of preparation.

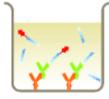


Perform ELISA (Total assay time: 2.5 hours)

IMPORTANT! Perform a standard curve with each assay.

Allow all components to reach room temperature before use. Mix all liquid reagents prior to use.

Determine the number of 8-well strips required for the assay. Insert the strips in the frames for use. Re-bag any unused strips and frames, and store desiccated at 2°C to 8°C for future use. The silica pack in the bag keeps the plate dry, and turns from blue to pink if the bag is not properly sealed.

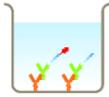


Bind antigen

- Add 50 µL of standards or samples (see "Prepare samples" on page 2) to the appropriate wells.
- Add 75 µL of 1X Assay Buffer into wells for detecting non-specific binding (NSB).
- Add 25 µL of Progesterone Conjugate to each well.
- Add 25 µL of Progesterone Antibody to each well except NSB wells.
- Tap the side of the plate to mix. Cover the plate with plate sealer and incubate for 2 hours at room temperature with shaking.

Note: If the plate is not shaken the bound of the signals will be ~45% lower.

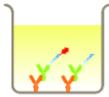
- Thoroughly aspirate the solution and wash wells 4 times with 300 µL of 1X Wash Buffer.



Add chromogen

- Add 100 µL TMB Substrate to each well. The substrate solution will begin to turn blue.
- Incubate for 30 minutes at room temperature without shaking.

Note: TMB should not touch aluminum foil or other metals.



Add stop solution

- Add 50 µL Stop Solution to each well. Tap side of the plate gently to mix. The solution in the wells changes from blue to yellow.



Read the plate and generate the standard curve

- Read the absorbance at 450 nm. Read the plate within 10 minutes after adding the Stop Solution.
- Use curve-fitting software to generate the standard curve. A four parameter algorithm provides the best standard curve fit. Optimally, the background absorbance may be subtracted from all data points, including standards, unknowns and controls, prior to plotting.
- Read the concentrations for unknown samples and controls from the standard curve. Multiply value(s) obtained for sample(s) by the appropriate factor to correct for the sample dilution.

Note: Dilute samples producing signals lower than that of the highest standard in Standard Diluent Buffer and reanalyze. Multiply the concentration by the appropriate dilution factor.

Performance characteristics

Standard curve (example)

The following data were obtained for the various standards over the range of 0–3,200 pg/mL progesterone.

Standard Progesterone [pg/mL]	Optical Density (450 nm)*
3,200	0.132
1,600	0.220
800	0.355
400	0.541
200	0.714
100	0.827
50	0.900
0	0.944

Note: The NSB gave a Mean OD value of 0.045

Intra-assay precision

Samples were assayed in replicates of 20 to determine precision within an assay.

Parameters	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean [pg/mL]	1,038.0	405.0	260.6
%CV	3.5	3.1	5.1

CV = Coefficient of Variation

Inter-assay precision

Samples were assayed in duplicates in 14 assay runs by four operators to determine precision between assays.

Parameters	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean [pg/mL]	1,057.0	406.0	261.9
%CV	4.1	5.9	7.0

CV = Coefficient of Variation

Performance characteristics, continued

Expected values

Eight human urine samples were tested in the assay, three came from pregnant women who were 10 weeks to 7 months pregnant. Adjusted neat concentrations of progesterone ranged from 4.041 to 164.1 ng/mL. When adjusted for urine creatinine using the Urinary Creatinine detection kit, EIACUN, the values ranged from 3.57 to 2,240 ng/mg creatinine.

Recovery

Recovery was determined by taking two urine samples diluted with 1X Assay Buffer; one with a low diluted progesterone level of 404.1 pg/mL and one with a higher diluted level of 1,774.5 pg/mL, and mixing them in the ratios given below. The measured concentrations were compared to the expected values based on the ratios used.

Low Sample %	High Sample %	Expected Conc. (pg/mL)	Observed Conc. (pg/mL)	% Recovery
80	20	678.2	716.3	105.6
60	40	952.3	1,012.5	106.3
40	60	1,226.4	1,245.2	101.5
20	80	1,500.5	1,491.6	99.4

Mean Recovery 103.2%

Specificity

The following cross reactants were tested in the assay and calculated at the 50% binding point.

Steroid	Cross-reactivity %
Progesterone	100
3 β -hydroxy-progesterone	172
3 α -hydroxy-progesterone	188
11 β -hydroxy-progesterone	2.7
11 α -hydroxy-progesterone	147
5 α -dihydroprogesterone	7.0
Pregnenolone	5.9
Corticosterone	<0.1
Androstenedione	<0.1

Sensitivity

The analytical sensitivity of progesterone is 47.9 pg/mL. This was determined by adding two standard deviations to the mean O.D. obtained when the zero standard was assayed 20 times, and calculating the corresponding concentration.

Limited product warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale found on Life Technologies' website at www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html. If you have any questions, please contact Life Technologies at www.thermofisher.com/support.



Catalog Number



Batch code



Temperature limitation



Use by



Manufacturer



Consult instructions for use



Caution, consult accompanying documents

Manufacturer's address: Life Technologies Corporation | 7335 Executive Way | Frederick, MD 21704 | USA

The information in this guide is subject to change without notice.

DISCLAIMER

TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.

Important Licensing Information: These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses. By use of these products, you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

Corporate entity: Life Technologies Corporation | Carlsbad, CA 92008 USA | Toll Free in USA 1 800 955 6288

© 2017 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. MAGPIX, FLEXMAP 3D, xPONENT, Luminex, Luminex 100, and Luminex 200 are trademarks of Luminex Corporation. Excel is a trademark of Microsoft Corporation.

For support visit thermofisher.com/support or email techsupport@lifetech.com.

thermofisher.com

21 February 2017

ThermoFisher
SCIENTIFIC

