



Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

PROGRAMA DE DOCTORADO: 3139 Medicina

**IMPACTO DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE ANALISIS DE  
BIOMARCADORES DE IMAGEN ECOGRAFICA  
EN CICLOS SUSTITUIDOS  
SOBRE LA TASA DE ÉXITO EN DONACIÓN DE ÓVULOS**

Trabajo de Tesis Doctoral

Presentado por Dña. Stefania Paoelli

Directores

Prof. Dr. D. José Alejandro Remohí Giménez

Dr. D. Nicolás Garrido Puchalt

Valencia, mayo 2019



Memoria de Tesis Doctoral para optar al grado de  
Doctor en Medicina y Cirugía

Lugar de realización:

Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI), Valencia

Facultad a la que está adscrita:

Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

Título:

Impacto de una nueva metodología de análisis de biomarcadores  
de imagen ecográfica en ciclos sustituidos sobre la tasa de éxito  
en donación de óvulos.

Autora:

Stefania Paoelli

Licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad Cattolica del Sacro  
Cuore de Roma (Italia). Especialista en Obstetricia y Ginecología.

Directores:

Prof. Dr. D. José Remohí Giménez. Instituto Valenciano de Infertilidad  
(IVI), Universidad de Valencia

Dr. D. Nicolás Garrido Puchalt, Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI)





Prof. Dr. D. José Remohí Giménez, Catedrático del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia y Presidente del Instituto Valenciano de Infertilidad.

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado:

IMPACTO DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE ANALISIS DE BIOMARCADORES DE IMAGEN ECOGRAFICA EN CICLOS SUSTITUIDOS SOBRE LA TASA DE ÉXITO EN DONACIÓN DE ÓVULOS

Ha sido realizado íntegramente por Dña. Stefania Paolelli bajo mi tutela y supervisión.

Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como Tesis Doctoral ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia, a 23 de mayo de 2019

Fdo. José Remohí





Dr. D. Nicolás Garrido Puchalt, Doctor en Biología, Máster en Diseño y Estadística en Ciencias de la Salud, y Director de Fundación IVI

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado:

IMPACTO DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE ANALISIS DE BIOMARCADORES DE IMAGEN ECOGRAFICA EN CICLOS SUSTITUIDOS SOBRE LA TASA DE ÉXITO EN DONACIÓN DE ÓVULOS

Ha sido realizado íntegramente por Dña. Stefania Paolelli bajo mi tutela y supervisión.

Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como Tesis Doctoral ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia, a 23 de mayo de 2019

Fdo. Nicolás Garrido

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'N. Garrido', enclosed within a circular scribble.



# Agradecimientos

Aunque sea lo primero que aparece en esta tesis, me gustaría terminar este trabajo expresando las motivaciones que me han impulsado a ser ginecóloga, investigadora y quizás, profesora en un futuro.

A la vez, aprovecharé para agradecer la ayuda extraordinaria y el apoyo personal de muchos con los que he trabajado día a día y minuto a minuto.

Mi motivación surgió de mi familia, esa familia que siempre está conmigo, aunque mi decisión haya sido salir del nido, aprender y ser feliz haciendo lo que más me gusta.

Valoro muchísimo la gran suerte que tengo con ella; esa familia que me ha inculcado la autonomía, el valor del esfuerzo, la habilidad para tomar decisiones críticas, el sentido del humor e implicarme sin dudas para mejorar la vida de los demás. Por supuesto, saber que si lo intentas puedes conseguirlo ha marcado mi vida y mis retos.

Al lado de esas motivaciones, siempre están aquellos que me han ayudado, enseñado, animado, esperado y prestado su ayuda desinteresada, y quiero agradecer su tiempo, recomendaciones, conocimientos, apoyo y dedicación.

Agradezco a España, país soleado y siempre alegre.

Agradezco a mi querida Valencia, que me recibió en el septiembre del 2014 con su cielo inmenso y azul y su gente siempre sonriente y amable, que hizo todo lo posible para que me sintiera acogida y para que no echase tanto de menos a mi Italia.

Siempre, al Dr. Remohí; por confiar en mi cada día, por guiarme y ser mi referente profesional, personal y científico en tantas ocasiones.

Compartir esos momentos difíciles que uno tiene cuando hace una tesis doctoral y su carisma han permitido este trabajo y tantos otros que espero nos sigan vinculando.

Por supuesto, al Dr. Nicolás Garrido que ha sido otro de los artífices de este trabajo con su labor de dirección y estímulo constante. Le agradezco mucho haber puesto a mi disposición su modelo de enseñanza-aprendizaje, haciendo que lo difícil sea sencillo y práctico.

Agradezco a Ángel Alberich-Bayarri, Belén Fos y Irene Mayorga de QUIBIM por su disponibilidad y su empatía.

Igualmente, a mis compañeros del IVI con los que he compartido muchas cosas y me han demostrado el valor del trabajo en equipo y la alta calidad humana y profesional que llevamos en nuestro ADN.

Por último, finalizo agradeciendo a esas familias que confían todos los días en nuestro rigor y a todos mis amigos, de aquí y de allá, su apoyo y cariño, y cómo no, a mi madre y a mi hermana.

Todos son para mí la clave del éxito.

## Dedico este trabajo

¡A Edoardo y Anjara, que fueron mis embrioncitos más queridos y que ahora dan guerra a sus padres!

A la pequeña Giulia, recién nacida, hermanita de  
Edoardo.

A todos los embriones que generaremos y que harán  
felices a muchas mujeres.

A Giulia Dell'Anna, que nunca dejará de ser mi  
Ángel de la guarda.

A me stessa, per aver dimostrato ancora una volta  
che  
volere è potere.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	19
1.1. Endometrio humano	19
➤ Compartimento epitelial	20
➤ Compartimento estromal	22
➤ Células inmunes residentes	23
1.2. Implantación embrionaria	24
➤ Factores inmuno-histo-quimicos	24
➤ Factores clínicos	27
Receptividad endometrial y su evaluación	30
1.3.1. Métodos histológicos	34
1.3.2. Marcadores bioquímicos	36
1.3.3. Marcadores moleculares	37
1.3.4. Técnicas de imagen	40
1.3.4.1. Histeroscopia	40
1.3.4.2. RMN	41
1.3.4.3. Ecografía bi- y tri-dimensional	41
➤ Morfología endometrial: patrón	42
➤ Espesor endometrial	53
➤ Volumen endometrial	55
➤ Delimitación	59
➤ Contractilidad miometrial	60
➤ Perfusión uterina bi- y tri-dimensional	62

1.3. Factores sistemicos	66
1.4. Biomarcadores de imagen, imagen cuantitativa y bioingeniería	69
1.5. Técnicas de reproducción asistida: Donación de óvulos	77
2. OBJETIVOS	85
3. JUSTIFICACIÓN E HIPOTESIS DE TRABAJO	93
4. MATERIAL Y MÉTODOS	97
4.1 Ámbito del estudio	97
4.2 Diseño del estudio	97
4.2.1 Población del estudio	98
4.2.2 Criterios de inclusión y de exclusión	98
4.2.3 Procedimientos y cronograma	100
4.2.3.1 Selección de la donante	101
4.2.3.2 Estimulación ovárica: protocolo de estimulación con antagonista del GnRH	103
4.2.3.3 Punción folicular	105
4.2.3.4 Espermiograma e inseminación de los ovocitos	106
4.2.3.5 Preparación endometrial en las receptoras: ciclo sustituido	107
➤ Fase 1: Ecografía de control	107
➤ Fase 2: Preparación estrogenica	107
➤ Fase 3: Controles ecográfico y hormonales	107
➤ Fase 4: ESTUDIO 1610-VLC-075-SP: Protocolo del análisis ecográfico 2D y recogida de muestras biológicas e imágenes.	108
➤ Fase 5: Preparación progesteronica	118

4.2.3.6 Transferencia embrionaria (TE)	119
4.2.3.7 Base de datos	121
4.3 Métodos estadísticos	121
4.3.1 Tamaño de la muestra	121
4.3.2 Análisis de datos	122
➤ Análisis descriptivo	122
➤ Análisis de resultados gestacionales respecto a los datos ecográficos	122
5. RESULTADOS	
5.1 Características de la población de estudio (receptora de gametos) y sus resultados gestacionales	125
5.2 Resultados de la estimulación ovárica de las donantes de óvulos	127
5.3 Análisis de estadísticos descriptivos	129
➤ Implantación vs. No implantación	129
➤ Tasa de Implantación 50% vs. Tasa de Implantación 100%	129
➤ Embarazo en curso “sí” vs. “no”	132
➤ Aborto Clínico vs. Aborto bioquímico	132
5.4 Análisis de clasificadores basados en <i>Machine Learning</i> para la predicción de embarazo en curso	133
5.5 Análisis de clasificadores basados en <i>Machine Learning</i> para la predicción de la tasa de implantación	140
5.6 Análisis de clasificadores basados en <i>Machine Learning</i> para la predicción de la tasa de implantación en pacientes con doble transferencia de embrión	147

5.7 Resumen del análisis de clasificadores basados en <i>Machine Learning</i>	158
6. DISCUSIÓN	165
6.1 Modelo de donación de óvulos	167
6.2 Ciclo sustituido con o sin supresión hipofisaria VS. Ciclo natural	167
6.3 Grosor endometrial	168
6.4 Patrón endometrial	174
6.5 Volumen endometrial	175
6.6 Vascularización endometrial y subendometrial: 3D Power Doppler.	179
6.7 Niveles de 17 $\beta$ -estradiol (E2)	182
6.8 Vía oral VS. Vía transdermica	183
6.9 Papel de la progesterona (P4)	184
6.10 Biomarcadores de imagen cuantitativa y bioingeniería	187
7. CONCLUSIONES	193
8. BIBLIOGRAFIA	197
9. ANEXOS	223
Abreviaturas	223
Informe del Comité Ético de Investigación Clínica	229
Hoja de Información y Consentimiento Informado	231

# Introducción



## 1.1 ENDOMETRIO HUMANO

El endometrio humano es el tejido que tapiza la cavidad uterina.

En la actualidad, se le considera como un órgano hormonalmente regulado que sufre cambios periódicos que son la base del ciclo menstrual.

Tradicionalmente se ha considerado al endometrio como la membrana de un receptáculo inerte que constituye la parte pasiva de la gestación.

Sin embargo, el endometrio es un órgano activo y dinámico entre cuyas funciones básicas se encuentra la de desarrollar temporalmente su capacidad de adhesión para posibilitar la implantación del embrión.

El endometrio, además, permite que se produzca la posterior invasión controlada, la cual dará lugar a la placentación, y con ello al desarrollo fetal en los mamíferos. Es, por tanto, un órgano clave en la vida reproductiva de la mujer (Dominguez F, 2005)

El endometrio humano se encuentra constituido por los compartimentos epitelial, estromal y vascular, con la existencia, además, de una población de células inmunes residentes.

Todo ello se distribuye en dos regiones denominadas funcionalis y basalis.

La funcionalis se transforma y regenera cada mes durante la menstruación, mientras que la basalis permanece formando la base para regenerar cíclicamente la funcionalis (Figuras 1-2)

- Compartimento epitelial

El epitelio endometrial es una monocapa de células cuboidales polarizadas que tapizan el interior de la cavidad uterina.

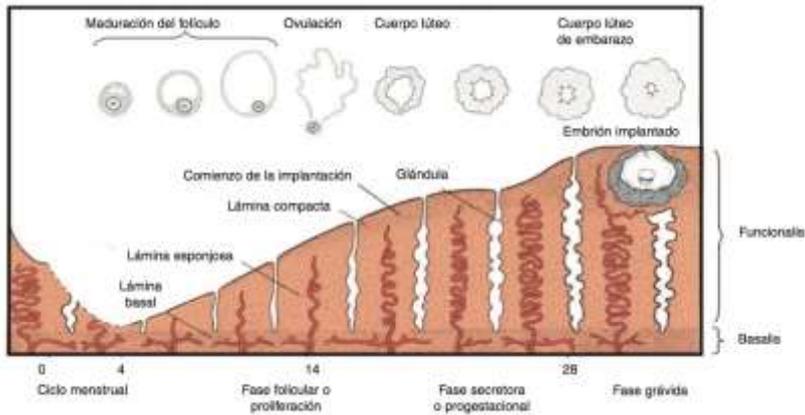


Figura 1: Diagrama representativo de la dinámica del endometrio humano durante el ciclo menstrual.

(Tomado por Simón C, Horcajadas JA, García-Velasco J, y Pellicer A. El endometrio humano: desde la investigación a la clínica 2009. Médica Panamericana, Buenos Aires y Madrid.)

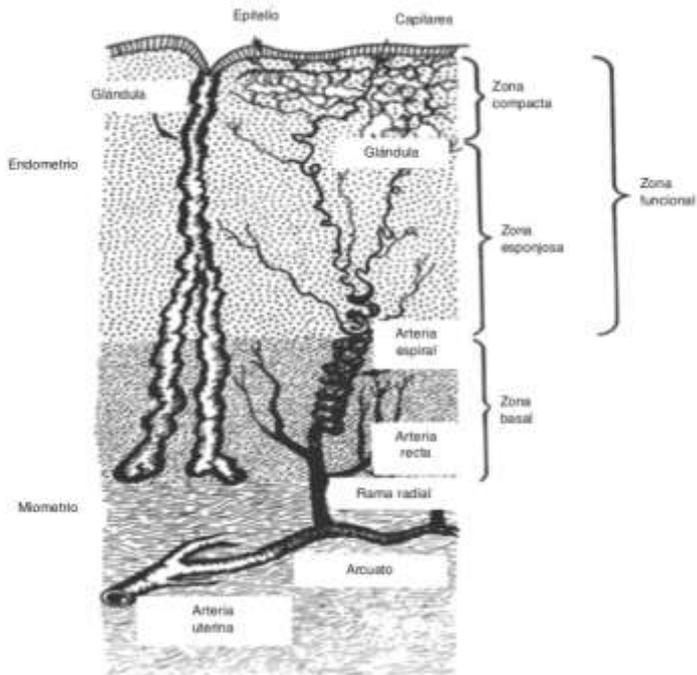


Figura 2: Arquitectura vascular del endometrio humano (Tomado por Simón C, Horcajadas JA, García-Velasco J, y Pellicer A. El endometrio humano: desde la investigación a la clínica 2009. Médica Panamericana, Buenos Aires y Madrid.)

Está constituido por un componente luminal y otro glandular (Martin J, 2002). Esta monocapa, como el resto de las mucosas, actúa como barrera para proporcionar protección contra los patógenos que logran acceder hasta la cavidad endometrial, pero también debe permitir la adhesión del embrión humano que es, en esencia, la función primordial del endometrio.

El epitelio endometrial está regulado por las hormonas esteroideas ováricas que, directamente o a través del estroma, (Cook ID, 1995) inducen cambios morfológicos y bioquímicos cíclicos. Estos cambios ayudan a preparar el

microambiente adecuado para la adhesión del embrión, donde el epitelio actúa también como primer mediador del diálogo entre el embrión y el endometrio materno (Domínguez F, 2005)

El epitelio luminal varía su morfología según la fase del ciclo menstrual y el epitelio glandular forma las glándulas endometriales propiamente dichas.

Estas glándulas proliferan formando glándulas largas y convolutas durante la fase secretora temprana, que van aumentando a medida que la fase secretora avanza. La función del epitelio glandular es la producción y secreción de moléculas necesarias para la nutrición e implantación del blastocisto.

- Compartimento estromal

El estroma endometrial es un tejido conectivo compuesto por células y matriz extracelular. El tipo celular que compone mayoritariamente el estroma es el fibroblasto, y está implicado en la remodelación de la matriz extracelular a lo largo del ciclo menstrual. Esta remodelación ocurre principalmente en la fase lútea mediante el proceso de decidualización. Dicho proceso comienza a partir del día 6-7 después de la aparición de la progesterona y se caracteriza por una serie de cambios morfológicos, bioquímicos y génicos de los fibroblastos.

En respuesta a la exposición a los estrógenos y progesterona los fibroblastos se convierten en células decidualizadas.

La función de estos fibroblastos decidualizados es el control de la invasión del trofoblasto para que se produzca una correcta placentación.

- Células inmunes residentes

El endometrio humano contiene células del sistema inmunológico que son relevantes para la fisiología endometrial, especialmente en la regulación de la respuesta inmune local. El conjunto de células inmunes residentes está formado fundamentalmente por células natural killer uterinas (NKu), macrófagos y linfocitos T. Su función primordial es la de proteger el tracto genital frente a infecciones y evitar el rechazo inmunológico durante la implantación embrionaria (Figura 3)

La población leucocitaria encontrada en el endometrio normal, supone entre un 10-15% de la población celular del estroma, fluctúa cíclicamente y es máxima en la fase secretora tardía y premenstrual (Bulmer JN, 1985)

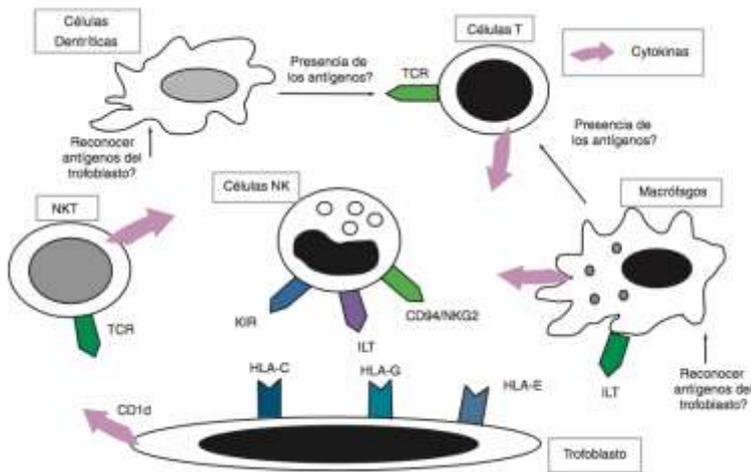


Figura 3: Interacciones que ocurren en el lugar de implantación entre el trofoblasto y células inmunes. Las células trofoblásticas expresan HLA-C, G y . Células NK y macrófagos detectan la presencia de los antígenos del trofoblasto a través de sus receptores HLA. También células dendríticas y macrófagos pueden reconocer antígenos del trofoblasto y presentarlos a células T.

(Tomado por Simón C, Horcajadas JA, García-Velasco J, y Pellicer A. El endometrio humano: desde la investigación a la clínica 2009. Médica Panamericana, Buenos Aires y Madrid.)

## 1.2. IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA

La implantación embrionaria es un paso crítico en el proceso reproductivo (Cakmak H y Taylor HS, 2011; Makker A y Goel MM., 2013), altamente regulado y que requiere de un estrecho diálogo entre el embrión y el endometrio, donde se produce una sincronización de la maduración del embrión hasta la fase de blastocisto con la diferenciación del endometrio para conseguir un estado receptivo del embrión (Wang H., 2005; Revel, 2006; Kennedy TG., 2007; Acache H., 2010; Cakmak H y Taylor HS., 2011; Altmäe S., 2012; Ramirez L., 2013)

### ➤ Factores inmuno-histo-químicos

Se sabe que la interacción entre los factores embrionarios y maternos secretados es crucial para las fases de aposición, adhesión e invasión (Cavagna M., 2003; Hoozemans DA, 2004; Acache H., 2010; Cakmak H y Taylor HS., 2011)

Durante la fase de aposición, que tiene lugar entre los días 5 y 6 postovulación, el embrión se posiciona en el fundus uterino y el tercio superior de la cara posterior uterina. Esto es importante porque va a determinar la localización de la placenta (Simón C., 2009)

La salida del embrión de la zona pelúcida es un requisito necesario para la implantación, la cual también puede darse in vitro o fuera del endometrio con un retraso de un día. Se desconoce cómo el blastocisto llega a su lugar final de implantación pero se cree que puede estar relacionado con la presencia de receptores de quimoquinas en su superficie como el CCR2 (receptor de MCP-1) o CCR5 (receptor de RANTES) y se sabe que el endometrio secreta multitud de quimoquinas (Dominguez F.,2009)

Por tanto, se piensa que un determinado grupo de citoquinas y quimoquinas guían al embrión hacia las células del epitelio endometrial (EEC) y hormonas como progesterona y estradiol empiezan a preparar al endometrio para la implantación y promueven la expresión de MUC1 en el endometrio; actuando como molécula anti-adhesiva para la unión del embrión (Hoozemans DA., 2004; Ramirez L., 2013)

En la siguiente fase, las moléculas de adhesión implicadas en la adhesión célula-célula y en la adhesión célula-matriz extracelular son cruciales para la unión del blastocito al endometrio materno (Simón C, 2009)

El endometrio gracias a la exposición en la superficie de las células trofoblásticas de receptores de factor inhibidor de leucemia (LIF), factor estimulador de colonias (CSF) y factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), L-selectina e integrinas y a la liberación de mensajeros químicos como interleukina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) permite la unión y la fijación del embrión a la pared uterina (Hoozemans DA., 2004; Ramirez L., 2013)

Por último, en la fase de invasión, el blastocisto se adhiere a la monocapa epitelial e induce una reacción apoptótica paracrina mediada por el sistema Fas-Fas ligando que permite al blastocisto atravesar la barrera epitelial

(Simón C, 2009). Posteriormente, el embrión atraviesa las EEC y se embebe en el estroma por la rotura de la matriz extracelular a través de metaloproteasas y serina proteasas sintetizadas por células sinciotrofoblásticas y citotrofoblastos diferenciadas a partir de células trofoblásticas (Cavagna M., 2003; Ramirez L, 2013).

La angiogénesis endometrial es fundamental para el desarrollo de un endometrio receptivo que permita la implantación, la decidualización y la formación de la placenta.

El VEGF y las PGs son los principales factores angiogénicos implicados en este proceso y su expresión depende de condiciones locales como hipoxia (Hoozemasn DA., 2004). Además, durante la implantación tiene lugar un aumento de la permeabilidad vascular endometrial en el sitio donde se colocan los blastocistos; donde las prostaglandinas, por sus propiedades vasoactivas, tienen un papel importante (Wang H., 2005)

El embrión, debido a su naturaleza genética paterna y materna, puede generar una respuesta inmunológica en la madre conocida como “restricción materna”; la cual puede ser causa de un fallo en la implantación o en la placentación (Cavagna M., 2003; Cooke ID., 1995; Acache H. y Revel E., 2006; Cakmak H. y Taylor HS., 2011)

El estudio de la relación entre el sistema inmune y el sistema reproductor ha permitido demostrar la función de determinadas citoquinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión en los órganos del tracto reproductor (Domiguez F, 2005)

De hecho, el proceso de implantación embrionaria presenta muchas similitudes con el proceso de migración leucocitaria (figura 4), ya que el leucocito en su migración a través del endotelio presenta unas fases similares

a las del embrión cuando atraviesa el epitelio endometrial e incluso comparte la funcionalidad de determinados grupos de moléculas como integrinas, selectinas y tetraspaninas (Domínguez F., 2005; Simón C., 2009).

Además, es esencial una inmunomodulación para que el embrión se implante adecuadamente; donde la glicodelina A juega un papel importante inhibiendo la actividad de las células NK (natural killer), junto con otras moléculas inmunomoduladoras como la inhibina y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) secretados por el endometrio e IL-1 $\beta$  liberada por el embrión

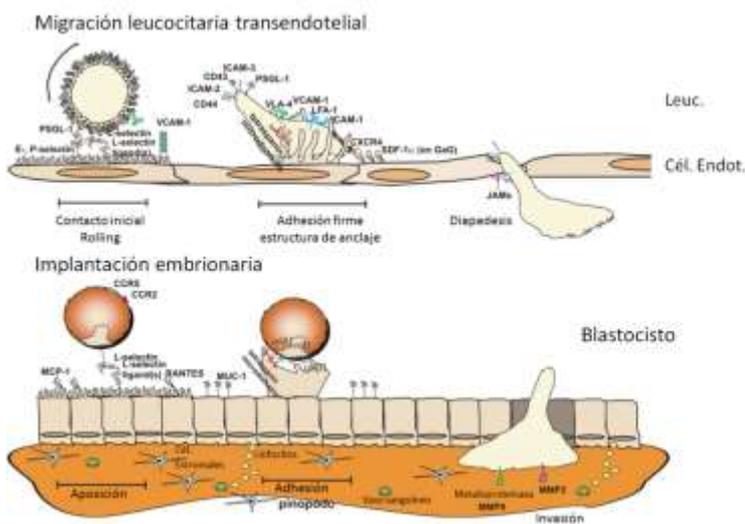


Figura 4: Similitudes de los procesos de migración leucocitaria transendotelial e implantación embrionaria (Tomada de Domínguez y colaboradores, 2005).

➤ Factores clínicos

1. Calidad embrionaria: no va a ser motivo de revisión en este trabajo porque el estudio está diseñado en un programa de donación de

ovocitos donde la calidad suele ser optima (Budak E, 2007) y los embriones que se utilizaron fueron de calidad A o B según ASEBIR.

2. Receptividad endometrial: este aspecto lo analizaremos en el apartado 1.3.
3. Niveles hormonales maternos
4. Factores sistémicos: este aspecto lo analizaremos en el apartado 1.4.

El éxito de la donación de ovocitos está influenciado por múltiples factores, entre ellos, la calidad embrionaria, el estado reproductivo y sobretodo la receptividad endometrial de la receptora (Soares SR, 2005)

La preparación endometrial exógena es necesaria en las pacientes con ciclos irregulares o ausente y es conveniente, en general, pues permite reducir las cancelaciones y programar la fecha del transferencia embrionario con mayor flexibilidad.

En mujeres con función ovárica y con ciclos regulares se puede emplear el ciclo natural: en cuanto a su eficacia en la última Cochrane del 2017 (Ghobara T y cols, 2017) no se encontraron pruebas suficientes para apoyar el uso del régimen natural en lugar del artificial en preparación para transferencia de embriones vitrificados (FET) en mujeres con ciclos ovulatorios regulares. Cardenas Armas DF y colaboradores ( Cardenas Armas DF y cols, 2019) en un retrospectivo de 1215 ciclos vieron que no había diferencias significativas entre los dos grupos (natural vs artificial) en cuanto a la tasa de embarazo clínico, el embarazo en curso, los nacidos vivos y los abortos espontáneos pero que una preparación endometrial en un ciclo natural que evalúe la desaparición del folículo dominante por ultrasonido

aumentaba las tasas de implantación, especialmente cuando se transferían blastocistos.

Sea de forma natural o bien de forma artificial, la concentración sérica de estrógenos y progesterona resulta imprescindible para obtener una perfecta sincronización entre la maduración del endometrio y la transferencia embrionaria y así poder maximizar las oportunidades reproductivas.

El papel protagonista de la progesterona en la preparación endometrial, en la modulación de la respuesta inmune en pro de la implantación, en favorecer el aporte sanguíneo al endometrio, en procurar la quiescencia miometrial y favorecer la receptividad del embrión, ha sido ya extensamente demostrado (Soliman S., 2004; Messinisis I., 2005; Messinisis I., 2006)

En ciclos artificiales la administración de estrógenos exógenos se modula en función de las necesidades de cada paciente individualmente, de forma que está bien establecido cual es el grosor y el aspecto endometrial que se debe alcanzar tras su administración. Si tras administración de estrógenos no se logra un grosor endometrial superior a 6,5-7 mm, se realiza una determinación sérica de estradiol para comprobar si existe una concentración adecuada del mismo y discernir si es un problema de malabsorción o falta de dosis, o, por el contrario, si es un problema uterino que impide el crecimiento endometrial a pesar de alcanzar concentraciones óptimas de estrógenos. En el primer caso, podemos incrementar las dosis de estrógenos exógenos o administrarlas por otra vía (oral, transdérmica) con el fin de aumentar la eficacia del tratamiento. Sin embargo, en el caso de la progesterona exógena, no existen controles tan exhaustivos sobre su eficacia y normalmente se administra la misma dosis a todas las pacientes sometidas a un ciclo de terapia hormonal sustitutiva para llevar a cabo una transferencia embrionaria.

Aunque está claro que un soporte lúteo exógeno pueda mejorar las tasas de implantación y embarazos en ciclos de reproducción asistida, sobre todo en pacientes sometidas a ciclos de donación de óvulos en los cuales la producción endógena de progesterona es mínima, hay debate e investigación sobre el momento, la dosis y la vía de administración de la progesterona.

Es bien sabido que una concentración de progesterona insuficiente en el momento de la implantación o durante la primera fase del embarazo puede determinar una falta de implantación o un aborto espontáneo.

Un bajo nivel de progesterona puede retrasar o impedir, mientras que el exceso de hormona puede acelerar el desarrollo endometrial y en consecuencia retrasar o adelantar la ventana de implantación, generando una falta de sincronía con el embrión.

### **1.3. RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL**

Se define receptividad endometrial como aquel proceso biológico que permite que el endometrio alcance un estado receptivo que posibilita la implantación del embrión. Este proceso se caracteriza por producir toda una serie de cambios que se materializan a nivel histológico, celular y molecular, de modo que el endometrio adopta un fenotipo receptivo.

El endometrio presenta profundos cambios tanto a nivel morfológico, tisular y celular, como molecular que son provocados por la acción de hormonas esteroideas, principalmente  $17\beta$ - estradiol (E2) y progesterona (P4) (Simón y colaboradores, 2009).

El endometrio adquiere en esta etapa del ciclo menstrual una mayor actividad secretora, aumenta la vascularización y presenta unas protusiones llamadas pinópodos en la superficie luminal del epitelio (Cavagna y Mantese, 2003; Ramírez 2013).

Además, expresa moléculas de aposición y fijación como integrinas, laminina, fibronectina, mucina 1 (MUC-1), inhibina, LIF, CSF, prostaglandinas (PGs), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), glicodelina, factor de crecimiento similar a insulina (IGF) y HB-EGF (Hoozemans y colaboradores, 2004).

Este estado receptivo se adquiere entre los días 20 y 21 de un ciclo menstrual regular de 28 días, en el día +7 después del pico de LH endógena que desencadena la ovulación (LH+7).

Este día representa el centro de la ventana de implantación, que es como se conoce este periodo, llamado Window of Implantation (WOI) en inglés (Wilcox y colaboradores, 1999; Achache y Revel, 2006; Achache y colaboradores, 2010; Bellver y colaboradores, 2011; Ramírez, 2013; Vilella y colaboradores, 2013) (figura 5).

De este modo, se denomina día LH 0 al día que se produce el pico, y siguiendo con esta nomenclatura, el endometrio pre-receptivo correspondería al intervalo de LH+1 a LH+5 (días 14 al 18 del ciclo menstrual); el endometrio receptivo, correspondiente a la WOI, al intervalo de LH+6 a LH+8 (días 19 al 21 del ciclo); y el endometrio post-receptivo al intervalo de LH+9 a LH+13 (días 22 al 26 del ciclo) (Díaz-Gimeno, 2011).

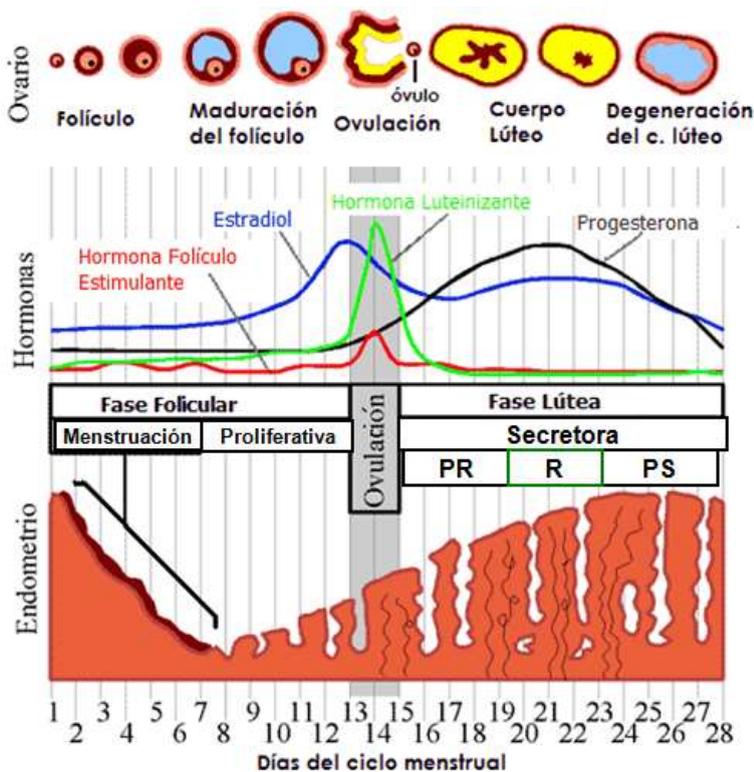


Figura 5: Ciclo menstrual y ovárico. En la parte superior de esta figura se pueden observar los cambios que suceden en el ciclo ovárico en función de los niveles hormonales. En la parte intermedia se muestran los niveles hormonales que acoplan el ciclo ovárico con el ciclo menstrual. En la zona inferior se indican los cambios que acontecen en el endometrio en cuanto al grosor, desarrollo glandular y vascular. Se muestran las fases del ciclo ovárico (folicular y lútea) y las del ciclo menstrual (proliferativa y secretora). Atendiendo a la receptividad del endometrio, podemos distinguir en la fase secretora, un periodo pre-receptivo (PR), el receptivo (R), y el postreceptivo (PS) que culmina con la menstruación. En la parte de debajo del endometrio se marcan los días del ciclo, considerando día 1 el día de comienzo de la regla (Aghajanova y colaboradores, 2008; Simón y colaboradores, 2009; Díaz-Gimeno, 2011)

En cuanto a la biología de sistemas, el análisis computacional de la red de interacciones moleculares entre endometrio y embrión durante la implantación, usando los perfiles transcriptómicos de muestras de endometrio y células embrionarias cultivadas in vitro, ha permitido confirmar la implicación de muchos genes que ya se habían relacionado con la receptividad endometrial como LIF, proteína de unión a hialuronato 2 (HABP2), interleukina 15 (IL15), proteína endometrial asociada a progestágeno (PAEP) y fosfoproteína secretada 1 u osteopontina (SPP1); así como determinar posibles nuevas moléculas con un papel en la interacción embrión-endometrio como apolipoproteína D, biglicano, endotelina 1 (EDN1), fibulina 2 (FBLN2), factor de crecimiento fibroblástico 7 (FGF7), gastrina, Kremen 1 (KREMEN1), neuropilina 1 (NRP1), inhibidor de serina peptidasa, miembro 3, clado A (SERPINA3) y versicano (VCAN), entre otras. Además, se han identificado varias redes genéticas que no se habían relacionado con la receptividad endometrial como las vías de señalización de JAK-STAT, cascadas de complemento y coagulación, adhesión focal, uniones adherentes y respuestas inflamatorias (Altmäe y colaboradores., 2012).

Aunque no se conoce exactamente todos los mecanismos moleculares que rigen este estado, está claro que la receptividad endometrial constituye el cuello de botella del proceso reproductivo (Achache y Revel, 2006).

Denominamos marcadores de receptividad endometrial a todos aquellos parámetros fáciles de detectar que nos permiten caracterizar a un endometrio como receptivo (Achache H. y Revel A., 2006). Los marcadores pueden ser utilizados para datar el endometrio en fase receptiva y evaluar el estatus de

receptividad endometrial y conocer el impacto de los ciclos estimulados sobre la fisiología del endometrio.

Existen distintos tipos de marcadores atendiendo al nivel de estudio en el que se obtiene información. De este modo se habla de marcadores de receptividad endometrial morfológicos cuando es la morfología la que nos informa; de marcadores de receptividad moleculares clásicos cuando son las moléculas de forma aislada las que nos caracterizan el endometrio; y de marcadores moleculares “ómicos” cuando son las moléculas en su conjunto las que nos permiten caracterizar dicho proceso biológico (Aghajanova y colaboradores, 2008).

### **1.3.1. Métodos histológicos**

Durante la fase lútea del ciclo natural pueden observarse cambios morfológicos en el endometrio que, día a día, permiten su dataje, mediante la observación por microscopía óptica de cortes histológicos. Actualmente la anatomía patológica rutinaria data el endometrio según los criterios de Noyes, que fueron obtenidos a partir de 8.000 biopsias de endometrio de pacientes estériles (Noyes y colaboradores, 1950, 1975). Estos criterios consideran ocho características histológicas básicas del endometrio: grado de mitosis glandular, pseudoestratificación de los núcleos, vacuolas basales, secreción, edema del estroma, reacción pseudodecidual, mitosis del estroma e infiltración leucocitaria (figura 6 ) (Noyes y colaboradores., 1950, 1975).

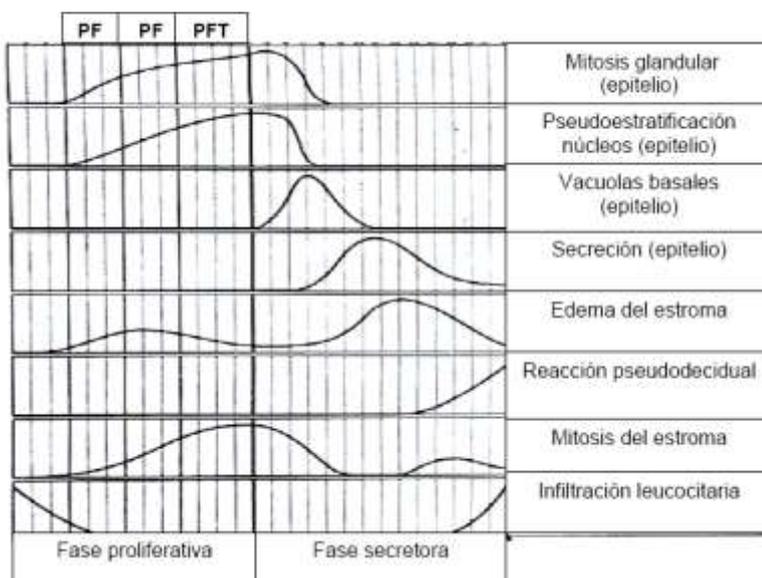


Figura 6: Características histológicas básicas del endometrio.

(Tomado por Noyes RW, Hertig AT, y Rock J. Dating the endometrial biopsy. Fertil Steril 1950: 1; 3-17.)

Aunque el dataje histológico se ha usado durante décadas para las evaluaciones de parejas infértiles, para confirmar la ovulación y evaluar la maduración del endometrio; su eficacia durante la fase lútea, en la ventana de implantación y su relación con la infertilidad sigue generando controversia (Coutifaris y colaboradores, 2004; Murray y colaboradores, 2004).

Se han intentado buscar otros marcadores morfológicos que permitan determinar el estado receptivo, como los pinópodos, cuya aparición coincide con la apertura de la WOI (Nikas, 1999). Se trata de protuberancias del epitelio endometrial, que parecen actuar en la modulación del ambiente uterino para hacer coalescer las paredes endometriales (Bentin-Ley y

colaboradores, 1999) y a través de secreciones (Kabir-Salmani y colaboradores, 2005) . Sin embargo, sólo se pueden observar mediante Microscopía electrónica de barrido SEM, convirtiéndolo en un marcador poco práctico para su uso rutinario (Bentin-Ley y colaboradores, 1999).

### **1.3.2. Marcadores bioquímicos**

No existe una única molécula que sirva como marcador de la receptividad endometrial, sino que se han estudiado distintos factores (figura 7) que podrían ser útiles para este propósito como alternativa a los criterios histológicos de Noyes (Noyes y colaboradores, 1950). Entre estos marcadores se encuentran integrinas ( $\beta 3$ ,  $\alpha 4$  y  $\alpha 1$ , fundamentalmente), mucina 1 (MUC-1), calcitonina, factor inhibidor de leucemia (LIF), ciclooxigenasa 2, homeobox A10 (HOXA10), HB-EGF (Heparan binding EGF like growth factor), lactoferrina, IGFBP-1 (IGF like binding protein 1), IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ), glicodelina y osteopontina (Ben-Nagi y colaboradores, 2010 ; Garrido- Gómez y colaboradores, 2013 ; Simón C, 2009)

Los niveles de MUC1 se incrementan con la presencia de progesterona (P) durante la ventana de implantación y, mediante inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal se ha demostrado que en los sitios de implantación el embrión induce la rotura específica de la MUC1 en la zona del epitelio endometrial al que se va a adherir (Simón C, 2009). La osteopontina, el receptor de la integrina  $\alpha\beta 3$ , ha sido detectada durante la fase receptiva en el epitelio glandular endometrial y en secreciones uterinas.

Además, se considera una molécula consenso puesto que se ha encontrado aumentada durante la fase receptiva en todos los trabajos que investigan la expresión génica del endometrio humano (Carson y colaboradores., 2002; Kao y colaboradores., 2002; Borthwick y colaboradores., 2003; Riesewijk y colaboradores., 2003).

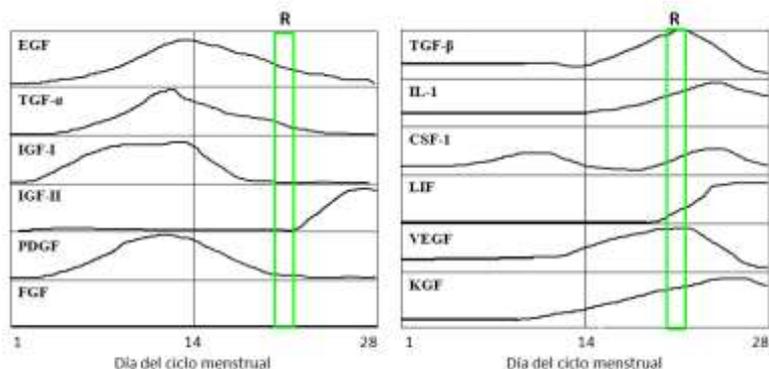


Figura 7: Marcadores bioquímicos de receptividad endometrial y la variación de sus niveles durante el ciclo menstrual. R indica el periodo de receptividad endometrial. (Adaptado de Giudice LC, Saleh W. Growth factors in reproduction. Trends Endocrinol Metab. 1195 Mar, 6 (2): 60-9.)

### 1.3.3. Marcadores moleculares (transcriptómica y protéica)

Los estudios de expresión génica son una alternativa para la búsqueda de huellas transcriptómicas que sirvan como marcadores moleculares de receptividad endometrial (Ponnampalam y colaboradores., 2004; Talbi y colaboradores., 2006; Horcajadas y colaboradores., 2007) y permiten monitorizar de forma cuantitativa la expresión génica en distintas condiciones (Schena y colaboradores., 1995).

Además, los cambios histológicos, biológicos y fisiológicos significantes que ocurren durante las fases proliferativa, secretora y menstrual del ciclo son consecuencia de los cambios que ocurren a nivel de transcripción y/o expresión génica.

Se han llevado a cabo distintos estudios de expresión génica por microarray en el endometrio humano en distintos puntos del ciclo menstrual para tratar de identificar y/o diagnosticar el estado de receptividad endometrial y la ventana de implantación (Carson y colaboradores., 2002; Kao y colaboradores., 2002; Borthwick y colaboradores., 2003; Riesewijk y colaboradores., 2003; Mirkin y colaboradores., 2005; Garrido-Gómez y colaboradores., 2013). Aunque todos estos estudios usaron la misma tecnología, hay muchas diferencias en el diseño y el análisis de datos como el día que se toma la biopsia, las fases de ciclo comparadas, el número de biopsias, la unión o la no unión del ARN aislado y los métodos estadísticos empleados para considerar un gen como sobre-expresado o reprimido.

Esto se refleja en una gran falta de consenso, puesto que sólo un gen se ha considerado sobre-expresado en los cinco estudios, osteopontina (Horcajadas y colaboradores., 2007; Garrido- Gómez y colaboradores., 2013).

A pesar de lo cual se propuso, en 2007 un set de 25 genes (tabla 1) que presentan una expresión alterada en el endometrio durante la ventana de implantación en condiciones normales, en comparación con la hiperestimulación ovárica y condiciones refractorias por la introducción de un dispositivo intra-uterino (Horcajadas y colaboradores., 2007).

Nombre del Gen	Ciclo Natural	HOC	DIU
Glutathione peroxidase 3	+25.87	-11.81	-13,4
Placental protein 14	+81.61	-9.83	-10.18
FXFD domain containing ion transport regulator 2	+4,07	-4.53	-9,43
Dipeptidylpeptidase 4	+31.37	-37.14	-8.47
Leukemia inhibitory factor	+36.62	-23.02	-4.57
Insulin-like growth factor binding protein 3	+4.00	-4.26	-3.76
Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	+8.03	-3.03	-3.52
Hyaluronan binding protein 2	+5.90	-6.41	-3,42
Endothelin receptor type B	+8.21	-3.20	-3.41
Leiomodin 1	+29.73	-4.08	-3.10
Calponin 1, basic, smooth muscle	+10.31	-9.26	-2.86
Clusterin	+28.78	-7.13	-2.79
Transgelin	+8.38	-3.72	-2.73
Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9	+2.48	-4.66	-2,49
Inositol -1 -monophosphatase 2	+5.23	-5.88	-2.23
Calpain 6	-4.58	+10.32	+11.20
Tissue factor pathway inhibitor 2	-3.52	+5.42	+7.32
Mitogen-activated protein kinase kinase 6	-4.87	+8.65	+6.57
Catenin , alpha 2	-8.44	+7.32	+6.40
Sorbitol dehydrogenase	-2.42	+11.56	+5,87
Major histocompatibility complex, class II, DO beta	-16.48	+12.23	+4.93
Branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide	-3.33	+10.32	+4.06
Aldehyde dehydrogenase 3 family, member B2	-3.12	+4,28	+3.52
NDRG family member 2	-5.98	+5.90	+3.35
Folate receptor 1	-10.49	+9.30	+2.53

HOC: hiperestimulación ovárica controlada. DIU: Dispositivo intrauterino.

Tabla 1: Genes implicados en la receptividad endometrial.

(Tomada por Horcajadas JA, Pellicer A, y Simón C. Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. Hum Reprod Update 2007; 13; 77-86.)

En la actualidad hay disponibles varios tests moleculares para el dataje endometrial basados en el análisis de una molécula o un grupo de ellas, como es el caso del E-tegrity Test que utiliza anticuerpos frente a la integrina  $\beta 3$  (Lessey y colaboradores., 1995) o el EFT Quick Guide que evalúa la expresión de ciclinas a lo largo del ciclo menstrual (Kliman y colaboradores., 2006). En los últimos 3 años se ha desarrollado, además, un microarray más complejo para el estudio de la receptividad endometrial (ERA, de sus siglas en inglés: *Endometrial Receptivity Array*) basado en la firma transcriptómica en la fase de receptividad endometrial humana, asociado a un predictor computacional que puede identificar la ventana de implantación de cada paciente sin tener en cuenta su histología endometrial (Díaz-Gimeno y colaboradores., 2011; Díaz-Gimeno y colaboradores., 2013; Garrido-Gómez y colaboradores., 2013; Ruiz-Alonso y colaboradores., 2013).

### **1.3.4 Técnicas de imagen.**

#### *1.3.4.1 Técnicas de imagen: Histeroscopia*

El aspecto histeroscópico del endometrio en fase secretora media ha sido considerado en algunos estudios como un factor pronóstico más válido que cualquier determinación hormonal evaluada en este momento (Makker A y Singh MM, 2006). Según estos estudios, se consideran “buenos” hallazgos

histeroscópicos la aparición de aperturas glandulares en forma de anillo y la visualización de una secreción glandular máxima. Por el contrario, la aparición de venas varicosas en la superficie endometrial es considerado un hallazgo “pobre”. Aún así, la histeroscopia no es uno de los métodos diagnósticos más utilizados en la actualidad para la evaluación endometrial en las técnicas de reproducción asistida.

#### *1.3.4.2 Técnicas de imagen: TAC y RMN*

En el estudio del endometrio podemos utilizar la función TUI (Tomographic ultrasound imaging), que nos proporciona cortes milimétricos del útero a modo de tomografía axial computerizada (TAC) o resonancia magnética nuclear (RMN), y que nos permite el análisis pormenorizado del endometrio y su patología (pólipos, carcinoma, etc.) (Simón y colaboradores., 2009).

#### *1.3.4.3 Técnicas de imagen: la ecografía bi- y tri-dimensional*

La ecografía representa una herramienta sencilla y de empleo rutinario en el estudio del endometrio, ya que permite evaluar su tamaño, textura, volumen y vascularización.

Todo ello puede aplicarse al estudio del ciclo endometrial fisiológico y estimulado así como a la detección de patología orgánica, benigna o maligna (Simón C, 2009).

La ecografía en escala de grises 2D constituye en la actualidad la herramienta de uso rutinario en el estudio del endometrio y nos proporciona información sobre su tamaño y textura así como de la existencia de patología endocavitaria.

A lo largo de la historia se han identificado múltiples variables para determinar la receptividad endometrial y se han intentado correlacionar con la mayor o menor tasa de gestación en TRA. Estas variables se relacionan con el espesor y patrón ecográfico del endometrio, así como con la perfusión endometrial estudiada a distintos niveles del árbol vascular: arterias uterinas, arcuatas, radiales y espirales, zapping endometrial y subendometrial con Doppler color y power Doppler y, más recientemente, estudio de la vascularización endometrial en su conjunto mediante ecografía tridimensional power Doppler (Puente y colaboradores., 2009; Check y colaboradores., Hung y colaboradores, Chien y colaboradores., Cacciatore y colaboradores., Applebaum y colaboradores. ).

Más recientemente, la ecografía tridimensional ha aportado grandes avances técnicos a la hora de explorar y visualizar las estructuras pélvicas femeninas. Destacan en este campo la capacidad para la medición del volumen total del endometrio, y no sólo su medida y visión en un único plano espacial, y el estudio de la vascularización tisular endometrial y subendometrial. Ambas aplicaciones son en este momento posibles gracias a los programas 3D Power-Doppler y VOCAL (*Virtual Organ Computer-aided AnaLysis*).

➤ Morfología endometrial: patrón

Coincidente con los cambios hormonales y ováricos que se generan en el transcurso del ciclo menstrual, en el endometrio también acontecen una serie de cambios tisulares cíclicos que van haciendo que éste adopte unas

determinadas características ultrasonográficas. A través de la ecografía vaginal se han podido comprobar estos cambios e identificar el momento del ciclo en el que cada mujer se encuentra.

Son muy numerosas las publicaciones aparecidas desde que Hackelöer (Hackelöer BJ y colaboradores, 1977; Hackelöer BJ, 1984) clasificara las imágenes ecográficas de la mucosa endometrial y las relacionara con la función ovárica y el resultado reproductivo (Bonilla-Musoles F y Pérez Gil M, 1981; Bonilla-Musoles F y Pérez Gil M, 1988), siendo a día de hoy una clasificación comprensible y adecuada y una de las que más se equipara a la histología.

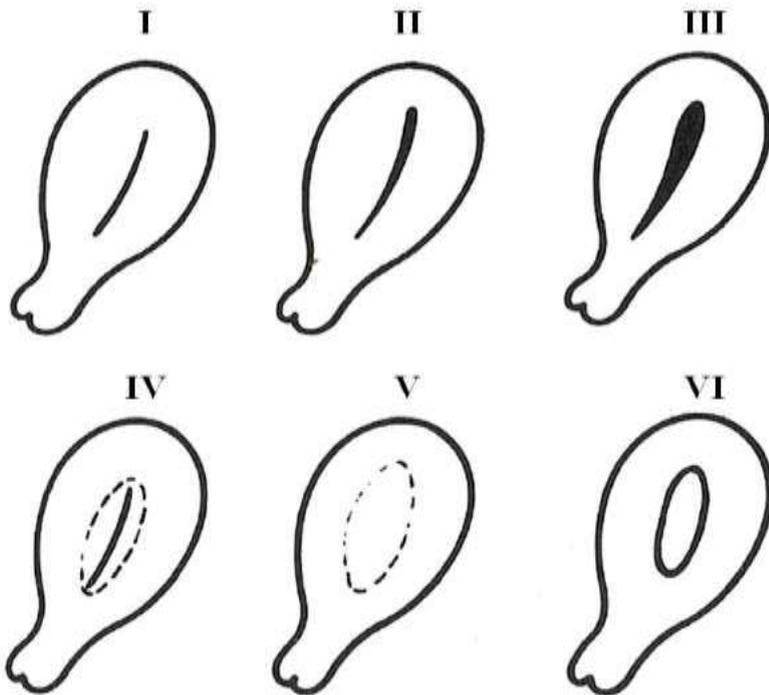


Figura 8: Esquema de Hackelöer de los tipos endometriales (Tomada por Hackelöer BJ, Nitschke S, Baume E, Sturm G, Buchholz R. *Ultraschalldarstellung von*

Ovarveränderungen bei Gonadotropinstimulierung. Geburtshilfe Frauenheilkd. 1977;37(3):185-90)

En la primera fase del ciclo, durante la menstruación, la estimación del espesor (entre 1-4 mm) puede estar dificultada por la presencia de coágulos o de fragmentos endometriales en el interior de la cavidad (Fig. 9).



Figura 9: Durante la menstruación la cavidad endometrial puede presentar áreas anecoicas correspondientes a coágulos o fragmentos endometriales en su interior.

En la etapa posmenstrual inmediata (días 4-6) el endometrio se identifica como una línea continua discretamente ecogénica, de menos de 5 mm de espesor (Fig. 10).

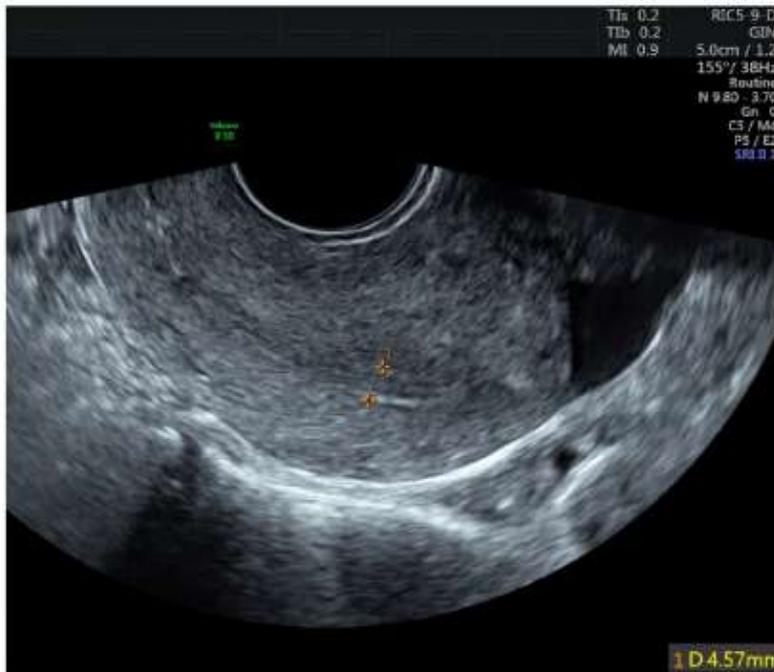


Figura 10: Día 5 del ciclo: el endometrio se identifica como una línea continua discretamente ecogénica de menos de 5 mm de espesor.

Durante la fase proliferativa (días 6 -14) se va engrosando gradualmente al ritmo de 1 mm/día, hasta alcanzar entre 9 y 14 mm en el momento de la ovulación (Fig. 11).



Figura 11: Endometrio el día 12 del ciclo: las líneas periféricas reflejan el desarrollo del estroma, de las glándulas, y de los vasos. En la fase proliferativa inicial, a partir del día 6 el endometrio se va diferenciando en tres capas de diferente ecogenicidad, con clara identificación de una línea ecogénica media.

El endometrio deja de crecer después de la ovulación, alrededor del día 16, siendo de grosor constante durante la fase secretora.

A pesar de que el punto de corte no está totalmente establecido, un espesor superior a 18 mm puede ser considerado como hipertrófico, asociado a hiperplasia endometrial, término no ecográfico que debe reservarse para los estudios histológicos.

En los primeros días del ciclo, durante la menstruación, el endometrio se aprecia como un área muy discretamente ecogénica, en ocasiones discontinua o con imagen de colección y ecos dispersos en la cavidad.

Durante la fase proliferativa, entre los días 6-14, el endometrio se va diferenciando en tres capas de diferente ecogenicidad, con clara identificación de una línea ecogénica media, correspondiente a la cavidad endometrial. Las líneas periféricas reflejan el desarrollo del estroma, de las glándulas y de los vasos (Fig. 11).

La etapa más importante es la de transición entre las fases proliferativa y secretora, pues teóricamente podría ayudar a identificar el momento de la ovulación. El endometrio periovulatorio se caracteriza por presentar bien diferenciadas la capa basal, más periférica y ecogénica, y la capa funcional, interna e hipoeoica.

Durante este período se distinguen tres patrones morfológicos.

- El tipo I aparece en la fase preovulatoria y se caracteriza por un eco medio, que representa la luz de la cavidad endometrial, rodeado por un área hipoeoica correspondiente al endometrio proliferativo y, más externamente, por una banda ecogénica correspondiente al endometrio basal (Fig. 12).



Figura 12: Días 14-15, fase periovulatoria. El endometrio de tipo II, secretor inicial, deja de crecer en espesor y presenta un engrosamiento del endometrio basal que reduce el área hipoeoica.

- El tipo II se presenta en la fase secretora inicial. El endometrio deja de crecer en espesor y se produce un engrosamiento del endometrio basal que reduce el área hipoeoica (Fig. 13).



Figura 13: Días 14-15, fase periovulatoria. En el endometrio de tipo III, ya en fase postovulatoria inmediata, la ecogenicidad se generaliza hasta enmascarar el eco central, probablemente por la presencia de moco y glucógeno.

- En el tipo III, ya en fase postovulatoria, la ecogenicidad se generaliza hasta enmascarar el eco central, probablemente por la presencia de glucógeno (Fig. 14).

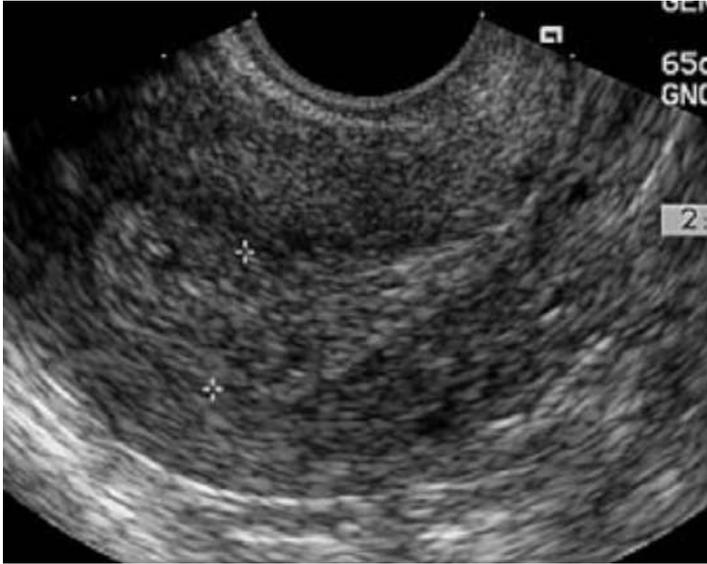


Figura 14: Día 22. El endometrio secretor se identifica como una estructura hiperecogénica y homogénea, producida por el edema del estroma y la presencia de moco y glucógeno en las glándulas.

En ocasiones, especialmente en ciclos estimulados, durante la fase folicular avanzada se puede apreciar una discreta colección endocavitaria procedente de la secreción cervical ascendida por las contracciones endometriales, ya que la secreción de las glándulas endometriales no se inicia hasta bien avanzada la fase lútea.

La desaparición de la imagen en triple capa, reflejo de la luteinización endometrial, tiene lugar unas 48 horas después de la ovulación.

El endometrio secretor se identifica como una ecoestructura hiperecogénica y homogénea, producida por el edema del estroma y la presencia de moco y glucógeno en las glándulas endometriales (Fig. 15A).

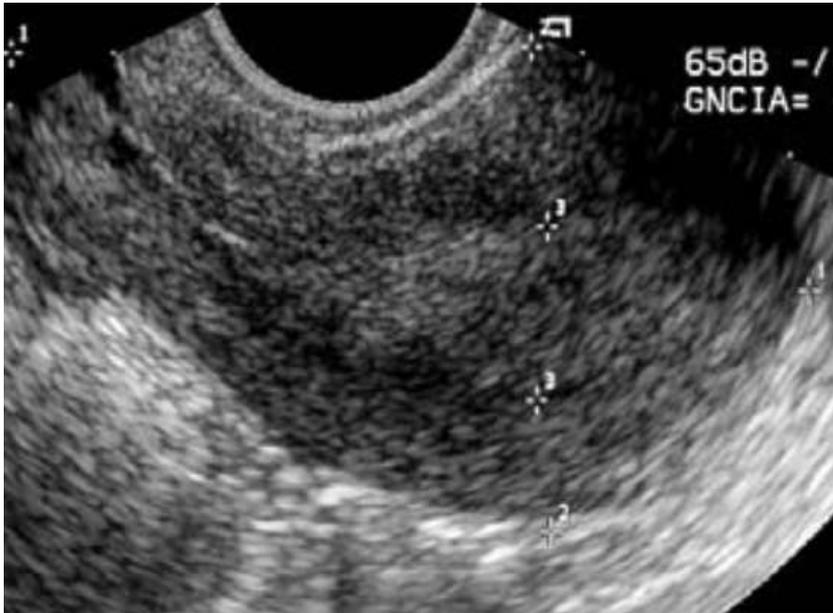


Figura 15 A: Día 26 del ciclo, fase secretora avanzada. Endometrio secretor con discreto halo hipoeico periférico, relacionado con el edema del stroma.

El endometrio se mantiene ecogénico hasta los últimos días del ciclo, ya en fase premenstrual, en que puede apreciarse rodeado por una línea periférica hipoeicoica (Fig. 15B).

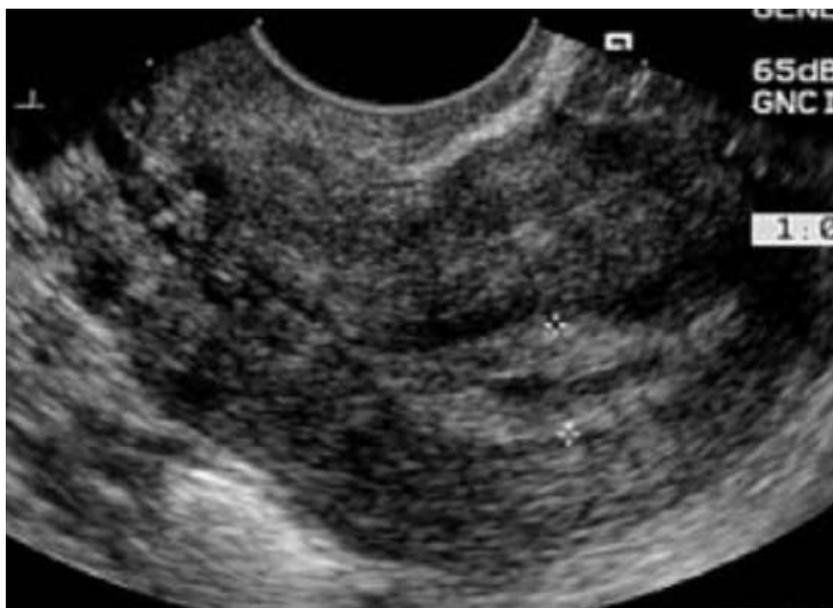


Figura 15 B: Día 26 del ciclo, fase secretora avanzada. Endometrio secretor y presencia de colección premenstrual en la cavidad.

A pesar de que el estudio seriado a lo largo del ciclo permite apreciar y constatar la evolución ecográfica y funcional del endometrio y, en ocasiones, sospechar la existencia de anomalías relacionadas con ciertas deficiencias hormonales, por la detección de cierta asincronía entre el endometrio esperado para la fase del ciclo y el estadio ovárico, está claro que la evaluación ecográfica no puede utilizarse para “datar” el endometrio con la exactitud que proporciona el estudio histológico, y es poco probable que pueda reemplazar a éste.

### ➤ Espesor endometrial

El espesor o grosor endometrial es el parámetro más evaluado del endometrio, aunque los resultados obtenidos sobre su relación con la receptividad endometrial siguen siendo también contradictorios. Una de las principales ventajas, y la razón por la que muchos autores lo han evaluado, es la relativa sencillez de su medida, así como por tratarse de un parámetro diferente e independiente del patrón endometrial (Fleischer y colaboradores, 1986; Dickey y colaboradores, 1992). La medición del grosor endometrial se puede realizar vía vaginal en cortes longitudinales o transversales buscando siempre la zona media, próxima a fundus y de mayor grosor (figuras 16 y 17), o vía abdominal en una corte longitudinal, precisando en este caso una buena repleción vesical (figura 18)

La mayoría de los estudios han medido el grosor máximo en plano longitudinal (Grandberg S y colaboradores, 1991; Saha y colaboradores, 2004; Sit AS, 2004) aunque otros muestran el grosor de la unión del tercio superior de la cavidad endometrial con los dos tercios inferiores (Friedler S y colaboradores, 1996; Raine-Fenning NJ y colaboradores, 2004) Cualquiera de estas formas de medida es válida. De inicio la vía vaginal es superior, pero en ocasiones, cuando hay alguna dificultad, como en el caso de úteros globulosos, adenomiosis, miomatosis, etc, y especialmente en la transferencia embrionaria, la medición vía abdominal con vejiga llena resulta idónea y más aclarativa.

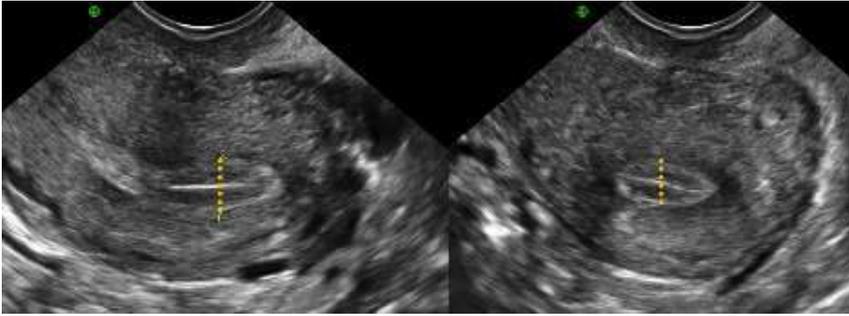


Figura 16: Cortes 2D transvaginales en longitudinal (izquierda) y transversal (derecha) para la medición del grosor endometrial



Figura 17: Ecografía 2D transvaginal en un corte longitudinal para la medición del grosor endometrial

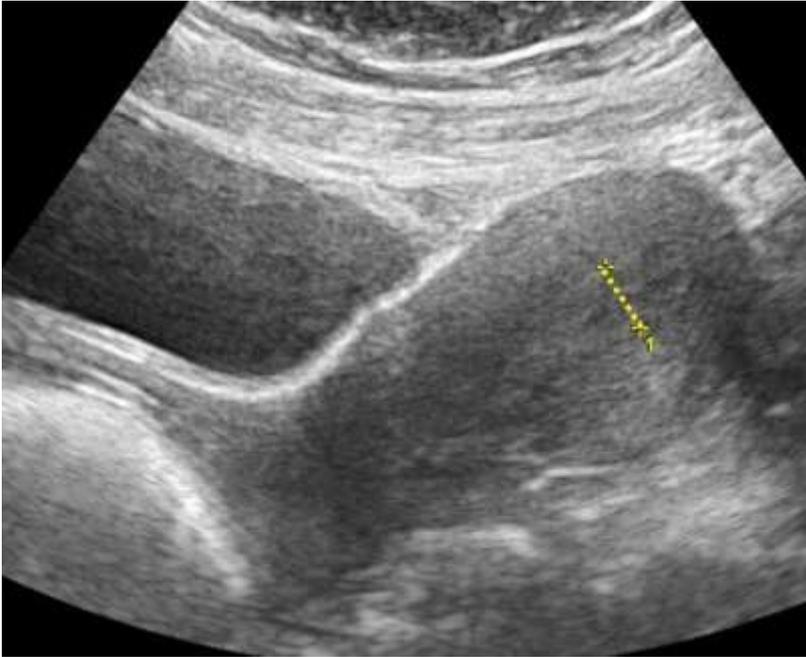


Figura 18: Corte longitudinal 2D con vejiga llena para medir grosor endometrial

➤ Volumen endometrial

La medición fiable del volumen endometrial sólo ha sido posible gracias a la introducción de la ecografía tridimensional. Esta nueva tecnología permite medir objetos irregulares y no emplea las clásicas fórmulas del elipsoide basadas en las medidas de la ecografía bidimensional que pueden aportar errores importantes. Concretamente un programa diseñado específicamente para la medida de volúmenes, es capaz de generar un modelo tridimensional del endometrio (figura 19) a través de la reconstrucción virtual de los mismos mediante la obtención de diversas secciones seleccionadas mediante un eje de rotación de un determinado plano del espacio (Schild RL y colaboradores, 1999).

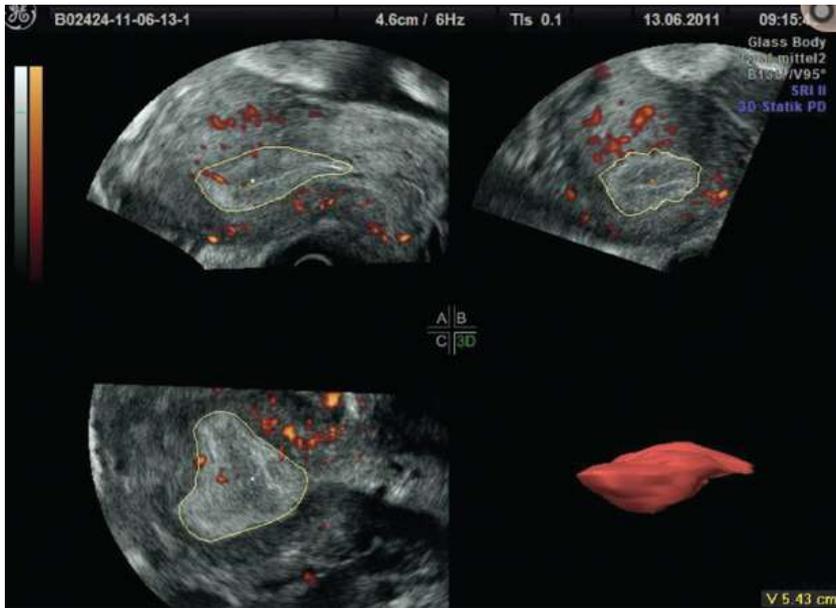


Figura 19: Medición del volumen endometrial mediante sistema VOCAL.  
(Tomado por Yaman 2012)

La ecografía 3D dispone de un software informático que permite medir volúmenes de las diferentes estructuras que se observan en las imágenes. Este programa se denomina VOCAL, siglas que provienen de las palabras anglosajonas *Virtual Organ Computer–Aided analysis*, en castellano “análisis virtual de un órgano asistido por computador”. Este programa se basa en el método rotacional, que permite delimitar volúmenes de una región de interés rotando los planos ortogonales que obtiene la sonda tridimensional, es decir longitudinal, sagital o plano A, transverso, axial o plano B y horizontal, coronal o plano C (figura 20).

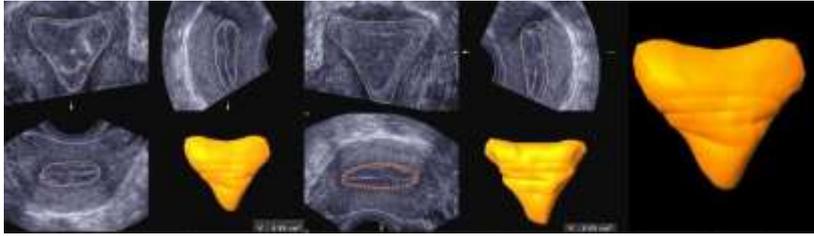


Figura 20: VOCAL de un endometrio aislado. A la izquierda y centro se muestra la forma de delimitar los planos espaciales. A la derecha se muestra el cálculo automático del volumen endometrial

Las rotaciones pueden realizarse desde cualquier plano, no obstante, los giros sólo se realizan en el eje vertical u horizontal de la región de interés. Al escoger el plano A o B se realizan las rotaciones sobre un eje vertical de un semicírculo de  $180^\circ$ . Si se elige el plano C, las rotaciones se realizan sobre un eje horizontal que afecta a los planos C y A. Se puede escoger el número de pasos de cada rotación, lo que permite seleccionar diferentes cortes sobre la imagen bidimensional del plano seleccionado. A partir del trazado del contorno de estos cortes bidimensionales, el programa es capaz de recomponer los cortes intermedios y generar el volumen de la región de interés sobre la que se está trabajando. El volumen en superficie se define por triangulación tridimensional de los contornos bidimensionales, lo que significa que cada punto del contorno del corte bidimensional o plano N es conectado por medio de un triángulo en forma de malla con los correspondientes puntos en el plano N+1 Y N-1.

Una vez trazado y representado el volumen de la región de interés, el programa permite conocer su volumen en milímetros.

Las estructuras irregulares, como por ejemplo el endometrio, requieren un trazado manual de los contornos para calcular su volumen. (figura 21).

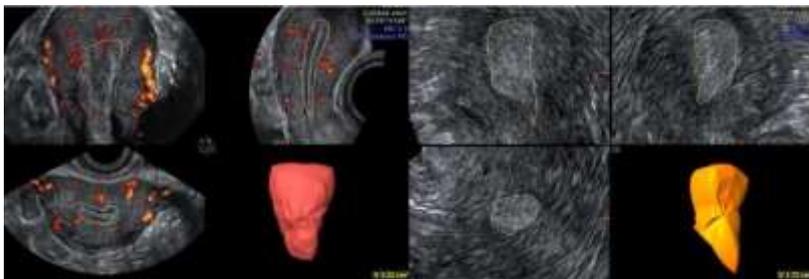


Figura 21: Sistema VOCAL para la valoración del volumen endometrial de un endometrio trilaminar

Otra posibilidad que ofrece este programa es la definición y medición automática de un doble contorno virtual. A partir de la superficie de la región de interés, el programa VOCAL es capaz de generar contornos paralelos al de referencia. Estos caparazones pueden ser internos o externos al contorno de la estructura y pueden definirse diferentes grosores (figuras 22 y 23).

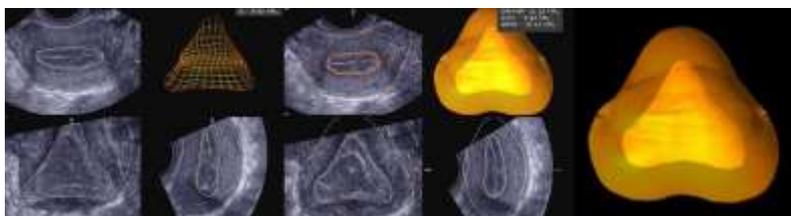


Figura 22: Medición caparazón interno y externo de un endometrio.

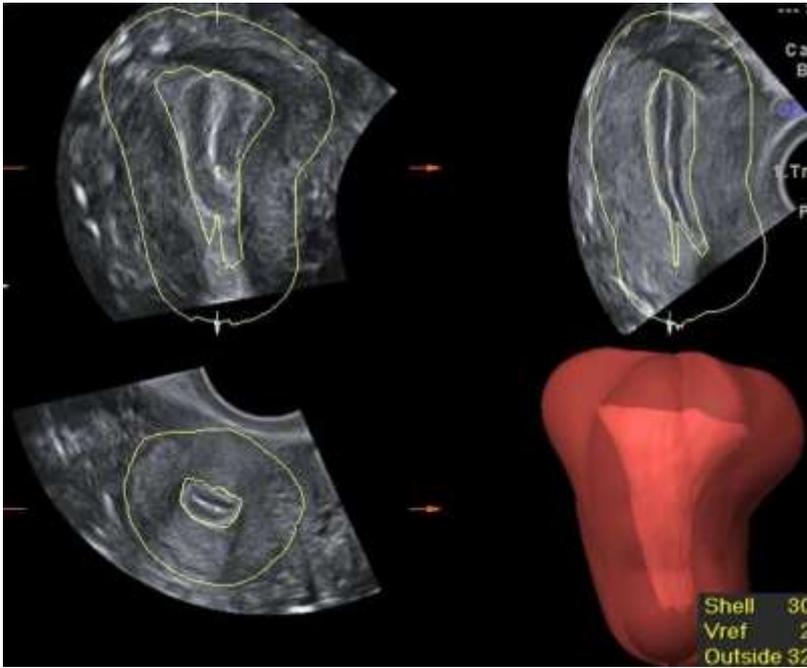


Figura 23: Modo VOCAL, sistema “corteza” para conseguir una perfecta delimitación entre miometrio y endometrio

El volumen endometrial ha sido estudiado por muchos investigadores como predictor de la receptividad uterina con hallazgos contradictorios de forma similar a lo expuesto anteriormente con la medida del grosor endometrial.

#### ➤ Delimitación

La delimitación endometrial es el grado de homogeneidad de la interfase entre endometrio y miometrio.

Una mala delimitación es propia de procesos patológicos de enorme importancia en reproducción, tales como la adenomiosis y adenofibromas,

ambos muy relacionados con una baja tasa de implantación, o como los miomas, cuya afectación de la morfología de la cavidad es vital en pronóstico reproductivo y otras complicaciones ginecológicas (hipermenorreas, metrorragias).

➤ Contractilidad miometrial

La contractilidad miometrial ha sido poco evaluada por la escasa reproductibilidad de los trabajos publicados, así como por la dificultad de obtener una medición fiable y objetiva de la misma.

Su interés fundamental aparece en el momento de la implantación embrionaria, bien sea de forma natural o bien durante la transferencia de embriones en el caso de los ciclos de reproducción asistida.

El útero tiene una actividad contráctil que varía durante el ciclo menstrual. Las contracciones uterinas son más frecuentes durante la fase folicular donde alcanzan un pico de 4-5 contracciones por minuto en la fase folicular tardía. La frecuencia disminuye durante la fase lútea en que el útero se vuelve quiescente (Lesny P y colaboradores, 1998; Abramowicz JS y Archer DF, 1990). Este patrón en la frecuencia de contracciones parece depender de las hormonas esteroides ováricas, aumentado de forma paralela al estradiol durante la fase folicular y disminuyendo con el aumento postovulatorio de la progesterona. El beneficio fisiológico de la actividad contráctil uterina se desconoce, pero la propagación de contracciones desde el cuello al fondo uterino durante el periodo periovulatorio puede favorecer el paso de los espermatozoides a través del útero hacia las trompas y la permanencia de los embriones transferidos (Fanchin R y colaboradores, 2001).

Los primeros estudios se realizaron midiendo la presión con sondas intrauterinas, pero debido a que era un procedimiento invasivo y que podía inducir contracciones no deseadas, fue sustituido por el almacenamiento de la actividad uterina captada por la sonda transvaginal en un vídeo digital y el estudio posterior de las grabaciones (Pusey J y colaboradores, 1980).

La quiescencia relativa durante la fase lútea se entiende fácilmente y se ha demostrado que aparece durante los tratamientos de reproducción asistida a los siete días de la administración de hCG, en el momento de la transferencia de los blastocistos (Fanchin R y colaboradores, 1998)

Por el contrario, una frecuencia de contracciones superior a 5 por minuto en el día de la transferencia de los embriones se asocia con una tasa de implantación muy baja comparativamente con una frecuencia de 1-3 contracciones por minuto (4% versus 21% respectivamente) (Lesny BA y Killick SR, 2004)

Posteriores estudios han confirmado la asociación negativa de las contracciones uterinas con la posibilidad de embarazo tras los procedimientos de reproducción asistida (Fanchin R y colaboradores, 2001) Sería importante no sólo el aumento del número, sino el cambio de orientación ya que las contracciones van de cérvix a fundus, y se ha observado, en la transferencia de embriones, especialmente si se manipula el cérvix, que la liberación de prostaglandinas que acontece cambia la dirección de las mismas y se eliminan los cigotos transferidos (Bonilla-Musoles F y colaboradores, 2010).

La administración precoz de progesterona vaginal disminuye la frecuencia de las contracciones uterinas en el momento de la transferencia embrionaria, aunque no se ha demostrado que aumente significativamente la tasa de

embarazo (Lédée- Bataille N y colaboradores, 2005) y podría provocar una luteinización prematura si se administra muy pronto.

En un estudio caso-control italiano del 2015 (Pinto V y colaboradores, 2015) vieron como la contractilidad uterina ciclo-dependiente estaba alterada en las pacientes con endometritis: observaron una reducción de 3.3 veces de las contracciones retrogradas en la fase periovulatoria en las pacientes con endometritis y en fase medio-luteale una actividad contráctil propagadora anterógrada o retrograda VS una actividad local y no propagadora en las pacientes sin endometritis.

➤ Perfusión uterina.

✓ Evaluación bidimensional

Los cambios cíclicos en la perfusión uterina y la angiogénesis endometrial desempeñan un papel crítico en el crecimiento endometrial y la implantación. Convencionalmente, el Doppler pulsado y Doppler color han sido utilizados para evaluar el flujo sanguíneo de las arterias uterinas y sus ramas con objeto de determinar la contribución relativa de la perfusión uterina a la receptividad endometrial.

La mayoría de los estudios se han centralizado en la evaluación del flujo sanguíneo de la arteria uterina y casi todos ellos se han realizado en el día de la administración de hCG, el día de la recuperación de los ovocitos o el día de la transferencia de los embriones con objeto de predecir el resultado de los tratamientos eje reproducción asistida (Goswamy RK y colaboradores, 1988; Bonilla-Musoles F y colaboradores, 1992). Las ondas de velocidad de flujo de alta resistencia se han asociado en general a resultados adversos (Zaidi J y colaboradores, 1996; Engmann L y

colaboradores, 1999), aunque otros autores no han podido demostrar esta asociación (Coulam CB y colaboradores, 1994). Diferentes límites del índice de pulsatilidad máximo de la arteria uterina, entre 2,5 y 3,6 concretamente, se han propuesto como predictores de que no se produzca la gestación o que ésta sea altamente improbable (Chien LW y colaboradores, 2002; Steer CV y colaboradores, 1995; Cacciatore B y colaboradores, 1996; Sterzik K y colaboradores, 1989; Ng EH y colaboradores, 2009). El hallazgo más consistente es el alto valor predictivo negativo y la elevada sensibilidad, que es cercana al 100%. En la mayoría de ellos el valor predictivo positivo parece más alto que en el caso del grosor endometrial y del patrón endometrial, alcanzando un rango entre 44 y 56%, para una especificidad del 13 y 35% respectivamente (Friedler S y colaboradores, 1996).

Complementariamente, también han sido asociado la presencia de flujo diastólico en la arteria uterina en la fase lútea precoz y media con resultado de embarazo (Serafini P y colaboradores, 1994; Dickey RP, 1997) Por contra, un flujo diastólico reducido con aumento de la resistencia de la arteria uterina se asocia con ciclos en los que no se consigue embarazo (Dickey RP, 1997; Zaidi J y colaboradores, 1995).

El flujo sanguíneo de la arteria uterina influencia el resultado de los ciclos de reproducción asistida y el embarazo es menos probable que ocurra cuando el índice de pulsatilidad de la arteria uterina esté por encima de 3,3 ó cuando el índice de resistencia de esta arteria sea superior a 0,95 durante el periodo más tardío de la estimulación ovárica y alrededor del tiempo de la recuperación ovular y transferencia de embriones (Chien LW y colaboradores, 2002)

### ✓ Evaluación tridimensional

La aplicación de ecografía tridimensional Power-Doppler, también perteneciente al programa VOCAL, es capaz de calcular tres índices angiográficos: el índice de vascularización (IV), el índice de flujo (IF) y el índice de vascularización de flujo (IVF), los cuales representan el número de vasos venosos, el flujo sanguíneo y la perfusión endometrial, respectivamente. El índice de vascularización (IV) muestra el porcentaje de voxels coloreados respecto al número total de voxels.

El vóxel (del inglés volumetric pixel) es la unidad cúbica que compone un objeto tridimensional. Constituye la unidad mínima procesable de una matriz tridimensional y es, por tanto, el equivalente del píxel en un objeto 2D. Un píxel (acrónimo del inglés picture element, 'elemento de imagen'), es la menor unidad homogénea en color que forma parte de una imagen digital.

El índice de flujo representa la intensidad Power-Doppler media de todos los voxels coloreados. El índice de vascularización de flujo es un índice que deriva de la multiplicación de los dos índices previos y la división de este resultado entre  $10^6$ . Estos índices se han intentado asociar también con la receptividad endometrial.

De hecho, una simple y subjetiva valoración del flujo sanguíneo dentro del área endometrial-subendometrial se ha correlacionado positivamente con las tasas de implantación y embarazo en los tratamientos de fertilización in vitro.

La observación de la señal Doppler color se ha asociado con la predicción de la implantación en los ciclos de fertilización in vitro, siendo muy poco probable que la gestación se produzca cuando no aparece una señal Doppler color subendometrial e intraendometrial (Zaidi J y colaboradores, 1995; Chien LW y colaboradores, 2002).

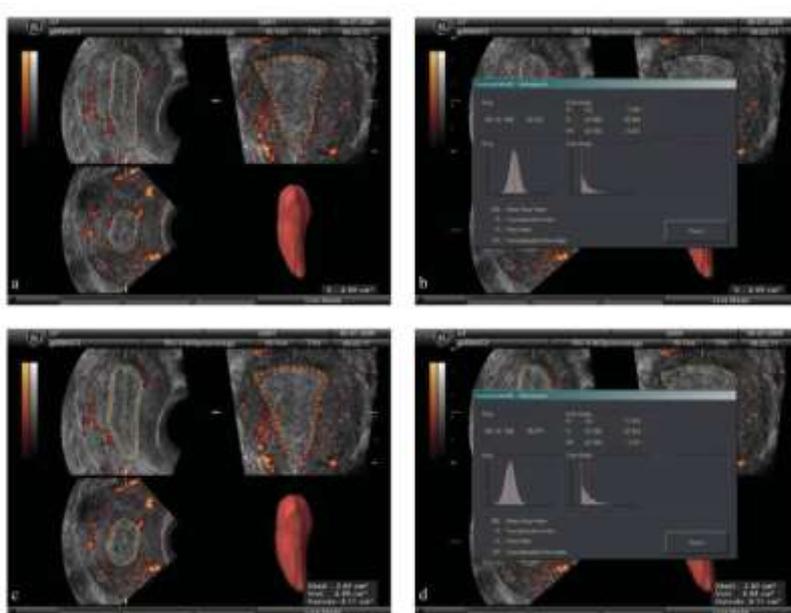


Figura 24: ecografía tridimensional Power-Doppler.

A y B: volumen endometrial e índice de flujo

C y D: volumen subendometrial e índice de flujo

(Tomada por NG E, Chan C, Thang O, Yeung W, Ho p. Changes in endometrial and subendometrial blood flow in IVF. Reproductive Biomedicine Online 2009; 18: 269-75)

## 1.4 FACTORES SISTEMICOS

FACTORES SISTEMICOS	EFFECTO EN LA IMPLANTACIÓN
Hipotiroidismo subclínico	
Autoinmunidad tiroidea	
Deficiencia de vitamina D	
Concentración de prolactina	
Enfermedad inflamatoria intestinal	
Trastornos autoinmunes	
Trombofilias	
Edad Materna	
Hábito tabáquico	
Obesidad	

Resumen de los factores sistémicos que podría alterar la receptividad endometrial en el momento de la implantación.



Efecto poco claro



No hay evidencia de un impacto negativo



Hay evidencia de un impacto negativo

Tabla 2: Factores sistémicos y sus efectos en la implantación

La identificación de factores sistémicos que podrían alterar la receptividad endometrial en el momento de la implantación embrionaria permitiría optimizar los resultados de un ciclo de FIV. Actualmente no hay evidencia clara de un impacto negativo sobre la implantación de la deficiencia de vitamina D, de concentraciones elevadas de prolactina sérica, de la enfermedad inflamatoria intestinal, ni de trastornos autoinmunes. Las trombofilias siguen siendo un punto de debate (Fox C y colaboradores, 2016). La disfunción tiroidea tampoco ha sido claramente relacionada. Uno de los últimos trabajos que de nuevo lo muestra es un reciente estudio prospectivo de cohortes (Plowden T y colaboradores, 2016) que incluyó 1.228 pacientes fértiles con antecedentes de uno o dos abortos espontáneos. Las pacientes con niveles de hormona tiroestimulante (TSH)  $\geq 2,5$  mIU/L o con anticuerpos antitiroideos no presentaron un mayor tiempo hasta conseguir la gestación, un riesgo aumentado de aborto espontáneo o una

reducción en la tasa de nacidos vivos con respecto al grupo de pacientes con TSH  $\leq 2,5$  mIU/L o sin autoinmunidad tiroidea.

Sin embargo, hay tres factores sistémicos maternos que sí parecen afectar a la implantación embrionaria: la edad, la obesidad y el tabaco. La revisión de Reis Soares y colaboradores sobre 3.089 ciclos de donación de óvulos permitió identificar variables clínicas responsables de la alteración de la receptividad endometrial (Reis Soares S y colaboradores, 2008). Este estudio mostró que la mayor edad de la receptora ( $\geq 45$  años), la presencia de hidrosálpinx, el consumo de tabaco ( $> 10$  cigarrillos/día) y un elevado índice de masa corporal (IMC) ( $> 30$  kg/m<sup>2</sup>) tenían un impacto negativo sobre los resultados del ciclo de ovodonación. Precisamente, un estudio retrospectivo de cohortes que revisó 9.587 primeros ciclos de donación de óvulos, observó cómo los resultados reproductivos en pacientes receptoras de óvulos donados variaban según su IMC (Bellver J y colaboradores, 2013) Cuanto mayor era el IMC, tanto menor eran las tasas de implantación, gestación clínica y RNV. Estos resultados han sido posteriormente confirmados en un análisis retrospectivo de 22.317 ciclos de donación de óvulos, sugiriendo que la obesidad genera un efecto deletéreo sobre el endometrio, independiente de la calidad del ovocito (Provost M y colaboradores, 2016)

Un meta-análisis de 21 estudios también proporcionó evidencias acerca del efecto negativo del tabaquismo sobre los resultados clínicos de la FIV (Budani MC, 2017). Se observó una tasa significativamente reducida de gestación clínica y nacidos vivos, y significativamente aumentada de abortos espontáneos y embarazo ectópico en pacientes fumadoras con respecto a las no fumadoras.

## 1.5 BIOMARCADORES DE IMAGEN, IMAGEN CUANTITATIVA Y BIOINGENIERÍA

En las últimas décadas la imagen médica se ha convertido en una herramienta indispensable para conocer y analizar el interior del cuerpo humano de forma no invasiva. Además, la digitalización de la imagen y el desarrollo de técnicas de procesamiento computacional permiten en la actualidad extraer información contenida en la imagen imperceptible para el ojo humano.

Esta información extraída de la imagen se conoce como Biomarcador de Imagen (BI).

Un Biomarcador de Imagen se define como un parámetro que representa y cuantifica de forma objetiva una propiedad (estructural, funcional o biológica) del tejido objeto de estudio, y que se comporta como indicador de un proceso biológico normal, una enfermedad o una respuesta a una intervención terapéutica (Downing G 2001)

Desde simples mediciones de tamaño o forma hasta la aplicación de complejos modelos computacionales, en los últimos años se ha demostrado que los biomarcadores de imagen ofrecen una información complementaria muy útil al diagnóstico (Martí Bonmati y colaboradores, 2012)

Los biomarcadores de imagen presentan una doble ventaja:

- 1) Representan variables numéricas que caracterizan y cuantifican diferentes parámetros, extraídos de las imágenes medicas

- 2) Las imágenes paramétricas permiten analizar la distribución espacial del biomarcador en la muestra observada mediante su representación visual.

Para aplicar adecuadamente los biomarcadores de imagen a la práctica clínica y/o a un ensayo clínico hay que cumplir unos pasos es decir que es un proceso complejo y debe responder a criterios de coherencia conceptual, reproducibilidad técnica, sensibilidad y especificidad (Schuster DP, 2007)

Básicamente, el desarrollo de un biomarcador implica validar su relación con la realidad objetivada y controlar su validez técnica.

Para llegar a su desarrollo, despliegue y posterior aplicación es necesario realizar una serie de pasos sucesivos:

1. Definir los motivos por los que queremos medir un aspecto determinado. Esta prueba de concepto debe verificar que un proceso biológico determinado, entendido como una cadena de causa y efectos, se puede estudiar con las pruebas disponibles de diagnóstico por imagen y computación
2. Conocer la relación existente entre el biomarcador, el parámetro que se analiza, y la enfermedad o la condición fisiológica objeto del estudio. La prueba de mecanismo establece que hay que demostrar la interrelación entre el biomarcador y el concepto, centrándose en comprender la acción que una determinada enfermedad o tratamiento tienen sobre el biomarcador (por ejemplo una relación directa o inversamente proporcional a la gravedad, no lineal, exponencial)

3. Definición del método y la técnica de adquisición de imágenes, cuidando varios aspectos:

- La calidad de la imagen medida como relación señal-ruido (RSR) y relación contraste-ruido (RCR)
- Resolución espacial y cobertura anatómica: debe estudiarse el órgano con la suficiente resolución espacial, definida por el tamaño del voxel. Tanto la resolución como la cobertura deben ajustarse al problema de estudio y al tamaño esperado de la alteración.
- Ausencia de artefactos que degradan o corrompan la señal para que las imágenes mantengan en el tiempo sus calidades (RSR y RCR) sin modificar los parámetros de adquisición.
- Reproducibilidad

4. Procesado de las imágenes:

- Utilización de filtros de reducción de ruido (Behrenbruch CP y colaboradores, 2004)
- Algoritmos de superresolución (Placidi G y colaboradores, 2004) que homogenicen la imagen para eliminar señales y brillos artefactuales (Vovk U y colaboradores. 2007) y maximizar la resolución espacial sin afectar la señal
- Garantizar una coherencia espacial exacta entre todos los puntos del órgano durante todo el estudio mediante un correregistro para que un área del órgano esté representada por los mismos puntos en todas las imágenes adquiridas en distintas series
- Corrección inhomogeneidades (Ladeji-Osias K. y colaboradores, 2002)

- Segmentación que permite clasificar los tejidos para facilitar su análisis y visualización posterior (Clarke LP y colaboradores, 1995)
  - Normalización de la señal y del volumen del órgano estudiado a un marco de referencia que permita su comparación con otros datos poblacionales diferentes (Ashburner J y colaboradores 1999)
5. Análisis y modelado de la señal que permite extraer la información y los biomarcadores mediante los procesos computacionales adecuados.

Los métodos existentes son muy numerosos, pero se pueden agrupar en función de los parámetros que se analizan:

- Volumen y forma
- Topología
- Propiedades físicas
- Propiedades químicas
- Propiedades biológicas
- Propiedades funcionales
- Parametrizaciones

Una vez obtenidas estas variables para cada uno de los vóxeles de interés, puede representarse la distribución espacial del biomarcador mediante imágenes paramétricas convencionales.

En estas imágenes los píxeles representan los valores de un determinado parámetro (morfológico o funcional) obtenido mediante el ajuste numérico de un modelo y representado habitualmente en una

escala de colores diferente a la escala de niveles de gris de las imágenes fuente originales (aunque en algunos casos la imagen paramétrica se representa también en escala de grises). Estas imágenes paramétricas también pueden representarse en escala de color como sólo los vóxeles anómalos superpuestos a la imagen original, con los órganos y estructuras representados en escala de grises.

Para disminuir la redundancia de los datos adquiridos se pueden utilizar imágenes paramétricas multivariantes en las cuales el color de cada vóxel viene determinado por el resultado de una función estadística multivariante que es a su vez una combinación de varios parámetros o biomarcadores.

#### 6. Medición de un biomarcador:

De las imágenes paramétricas, tanto convencionales como multivariantes, se pueden obtener mediciones bien de todo el tejido u órgano estudiado, bien sólo de aquellas áreas que se consideren más representativas o anormales. En este punto debe definirse cómo se va a trabajar con el histograma de los valores obtenidos (representación gráfica de la distribución de los valores de una variable donde el eje vertical representa la frecuencia de aparición de un determinado valor del biomarcador y el horizontal sus distintos valores).

De este histograma se pueden extraer los resultados como el valor medio, la desviación típica y el rango, que pertenecen a la estadística descriptiva estándar. Un problema de esta aproximación es su clara tendencia a

infravalorar los cambios en los tejidos u órganos, minimizando los valores anómalos que representan la enfermedad o sus manifestaciones más relevantes. Es por ello que en algunas situaciones deben utilizarse los valores extremos (como el 10% máximo en los mapas de perfusión tisular o el 25% mínimo en los mapas del coeficiente de difusión) para tener una mejor relación con las variables clínicas predictores más relevantes. Para cada problema debe definirse el tipo de aproximación (histograma completo, histograma parcial por cuartiles, histograma por deciles) más conveniente por la que se opta.

Otra aproximación es analizar para una región dada (normalmente un tumor o una lesión) la heterogeneidad de la distribución espacial de un biomarcador dada por su imagen paramétrica. Un análisis clásico es mediante el cálculo de la curtosis, parámetro estadístico que indica la estrechez del histograma y donde los valores altos indican distribuciones estrechas, es decir, homogéneas, y viceversa.

## 7. Validación de un biomarcador

Cuando ya se dispone del concepto, las imágenes adecuadas, el análisis y los modelados pertinentes y la metodología de medición, es necesario realizar una experiencia piloto que valide el proceso en un grupo de sujetos, con y sin enfermedad, con un tamaño muestral pequeño.

La prueba de principio, o prueba piloto, se centra en demostrar la validez de las pruebas de concepto y de mecanismo, ambas teóricas, en un grupo inicial reducido, antes de emprender un desarrollo clínico completo.

En ella es muy importante además definir si existen variaciones en las medidas asociadas a la edad, al sexo u otros factores que pueden ser de confusión.

Tras el éxito en la prueba piloto se debe trabajar ya con series de un tamaño muestral adecuado y bien definido para extraer conclusiones de peso estadístico. En ellas se definirá la prueba de eficacia como aquella que permite valorar la capacidad de un biomarcador de medir adecuadamente (de modo reproducible, fiable y preciso) el concepto. La eficacia es un estudio demostrativo que define la potencia de la tecnología sanitaria en condiciones de control ideales. La prueba de efectividad analiza, en condiciones habituales de uso, la bondad de un biomarcador para medir la variable clínica relevante a la enfermedad (endpoint).

Es importante recordar que los objetivos sustitutos o subrogados, es decir, los biomarcadores de imagen, pueden reemplazar al objetivo clínico final sólo si se han demostrado eficaces y efectivos. Sólo los biomarcadores de imagen validados deben utilizarse como objetivos sustitutos para definir una enfermedad, su situación y su respuesta a un tratamiento.

Los sesgos son errores sistemáticos que afectan a los resultados y distorsionan los procesos de medida. Los estudios sesgados pierden validez y es por ello que deben reconocerse y minimizar sus fuentes de error para no cometer errores en la interpretación de los resultados (Sica GT y colaboradores. 2006).

Además, es importante disponer de un buen diseño experimental para la validación metodológica, pues en muchos casos la sobreestimación de los resultados hace que las medidas de bondad se desvíen hacia las metodologías propuestas en detrimento de las ya establecidas (Houssami N y colaboradores, 2010)

Aun cumpliendo con esta cascada de pruebas y control de errores, debe tenerse en cuenta que los parámetros que definen a un biomarcador ideal son en la práctica aún más complejos. Un biomarcador debe adquirirse desde equipos tecnológicamente estables (para evitar fuentes de variabilidad en la adquisición), debe obtenerse por métodos incruentos y seguros para el paciente (en nuestro caso a partir de las imágenes médicas), debe estar disponible de forma generalizada (para garantizar su difusión y utilización universal), debe ser reproducible (capacidad de replicar el valor obtenido, de forma que sea siempre menor que las diferencias que se pretenden detectar, obteniéndose los mismos resultados en centros con equipamientos diferentes), debe estar estandarizado en cuanto a la adquisición de la imagen (parámetros técnicos), preparación y proceso (filtrados, mejora de resolución de señal-ruido y de resolución espacial), análisis y modelado de la señal (ajuste de modelos computacionales, extracción de variables), y finalmente estar validado con respecto a su precisión y eficacia.

El biomarcador ideal debe ser clínicamente útil (permitiendo una mejora clínica medible), tener una alta sensibilidad (mejor relación entre la variación del biomarcador y la del efecto que se pretende medir) y un alto porcentaje de verdaderos positivos (clasificar correctamente como anormal un hallazgo

realmente alterado). Debe tener una alta especificidad (probabilidad de que un sujeto verdaderamente sano obtenga un resultado negativo en la prueba) y estar además muy vinculado al proceso biológico o la alteración patológica con la que se relaciona.

Finalmente, debe tener un coste lo más bajo posible, tanto económico (barato) como de dedicación temporal (rápido).

## **1.6 TÉCNICA DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA: DONACIÓN DE OVULOS**

La donación de ovulos en España y en el resto de Europa es una necesidad cada vez más frecuente. Según la estadística de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), un 33% de los tratamientos que se hacen en España son de este tipo.

En los países desarrollados, la necesidad de recurrir a técnicas como la donación de ovulos es cada vez más frecuente, debido al envejecimiento de la población y a la incorporación de la mujer a la formación universitaria y al mercado laboral, lo cual genera un retraso y una disminución evidente de la natalidad.

La donación de ovulos es la técnica de reproducción asistida en la que el gameto femenino es aportado por una mujer distinta de la que recibirá éste o el embrión resultante.

Es el tratamiento de la medicina de la reproducción con la tasa más elevada

de éxito. Permite lograr un embarazo en mujeres en que han fallado los tratamientos homólogos de fecundación in vitro o que por condiciones fisiológicas no pueden ser sometidas a este tipo de tratamiento.

Dentro de las técnicas de RA, la donación de óvulos presenta unas connotaciones destacables que la diferencian del resto de técnicas por el protagonismo de la donante, como persona que se va a someter, de forma altruista y benevolente, a un procedimiento que no está exento de riesgo y del cual la donante no espera un beneficio o contrapartida inmediatos, sino que idealmente se realiza por solidaridad y contribución positiva al bien de otras personas. No obstante, las donantes perciben una compensación económica que obedece a un criterio de justicia, ya que se considera que la acción de donar supona una serie de inconvenientes para ella, como someterse a un procedimiento que conlleva molestias, dedicar un tiempo que puede suponer una pérdida de dinero u horas de trabajo, desplazamiento, etc.

La donación de gametos en España está regulada por la Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida, y los Reales Decretos 9/2014, de 4 julio, y 412/1996, de 1 de marzo.

#### ➤ Selección de las donantes de óvulos

En la selección de donantes de ovulos el objetivo final es conseguir una mujer sana, comprometida, con un fenotipo lo más similar posible a la receptora y que no padezca enfermedades genéticas, hereditarias o infecciosas transmitibles a la descendencia. No existe un consenso sobre el panel de pruebas que se tienen que solicitar, pero estas deberían adaptarse a nuestra población de donantes y receptoras sobre la base de la teórica

prevalencia de enfermedades transmisibles de las que puedan ser portadoras (Association of Biomedical Andrologist; Association of Clinical Embryologist; British Andrology Society; British Fertility Society; Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Hum Fertil 2008) (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine.Fertil Steril 2013).

➤ Estimulación de las donantes de óvulos

El uso de anticonceptivos ayuda en la programación de la punción de la donante en días laborables, la correcta sincronización de ciclos entre la donante y la receptora, pero su uso da lugar a una duración mayor de la estimulación con los ciclos con antagonistas sin pretratamiento. Se recomienda el inicio de la estimulación ovárica tras 5 días de suspender el anticonceptivo (Cedrín-Durnerin I, 2007).

El protocolo más adecuado en la estimulación debe ser sencillo, cómodo y seguro para la donante de ovulos. Sin duda, en el momento actual el mejor protocolo para la estimulación ovárica en la donante es un protocolo con antagonista de la GnRH, con programación del comienzo del antagonista en un protocolo flexible a partir de un diámetro medio de los folículos de 14-15 mm (Cooperman AB, 2013).

Se recomienda la inducción final de la ovulación con análogos de la GnRH, (Bodrid, 2011) (Griesinger G, 2006), administrando 0,2 mg de triptorelina o leuprorelina por vía subcutánea, ya que constituye un protocolo sencillo, eficaz y seguro en la recuperación ovocitaria en los ciclos de estimulación ovárica de las donantes de óvulos (Castillo JC., 2012; Youssef MA., 2010).

➤ Organización de un banco de óvulos

El descubrimiento de la vitrificación de ovocitos, introducida por Kuwayama (Kuwayama M, 2005 y 2007) y sus óptimos resultados clínicos han permitido que aparezcan nuevas aplicaciones de dicha técnica para mejorar la eficiencia, efectividad y eficacia, al realizar algunos tratamientos de reproducción asistida (TRA), como la donación de ovocitos.

En un ensayo clínico, triple ciego, prospectivo y aleatorizado, que incluyó el mayor tamaño de muestra publicado hasta la fecha, el grupo liderado por la Dra Ana Cobo (Cobo A, 2010) demostró que los resultados reproductivos con ovocitos frescos y vitrificados de una misma estimulación de una donante eran similares y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la utilización de ovocitos frescos y vitrificados.

Este estudio confirma que no se altera el potencial de los ovocitos vitrificados para desarrollarse en embriones competentes capaces de generar gestaciones evolutivas en una proporción similar a los ovocitos frescos.

La duración de la preparación endometrial que se observa en los dos grupos de receptoras es una de las contribuciones más interesantes de este estudio, por su impacto en la logística del programa de ovodonación.

En el caso de las receptoras de ovocitos vitrificados, la administración de valerianato de estradiol se prolongó durante  $15,5 \pm 4,6$  días, mientras que en las receptoras de ovocitos frescos fue de  $22,4 \pm 5,4$  días, habiéndose encontrado diferencias estadísticamente significativas.

Debido al gran potencial de los ovocitos vitrificados, y de manera similar a lo que ocurre con las donaciones en fresco, frecuentemente, tras la transferencia embrionaria contamos con embriones viables, aptos para ser vitrificados para futuras transferencias.

En este caso estaríamos hablando de una doble vitrificación, primero en estadio de ovocito MII y, posteriormente, en un estadio embrionario temprano (día 3) o en estadio de blastocisto.

En una publicación del 2013 (Cobo A, 2013) se demostró que la doble vitrificación no tiene ningún efecto en la tasa de parto o de nacido vivo. La doble vitrificación no tuvo efecto sobre los embriones, independientemente de si éstos se encontraban en estadio temprano de desarrollo (día 3) o en estadio de blastocisto.

Recientemente, en un estudio observacional (Cobo A, 2015), donde se describe la experiencia de 6 años con el banco de ovocitos, se incluyeron 3610 ciclos de ovodonación donde 42152 MII fueron desvitrificados con una tasa de supervivencia del 92,6% y se analizó el impacto del tiempo de almacenaje en la supervivencia ovocitaria y en los resultados clínicos: en ningún caso el tiempo de almacenaje afectó a las dos cosas.

Otra de las ventajas de la creación de un banco es que se ha logrado una mejora en la sincronización entre donante-pareja receptora (Kuwayama M, 2005) y esto permite:

- ✓ Crear un “stock” de aquellas características de las donantes más demandadas

- ✓ Programación más precisa por parte de la receptora
- ✓ Evitar la lista de espera para la donación de ovocitos de más de 40 días
  
- ✓ Realizar coordinaciones en paralelo independientemente de la fase del ciclo en la que se encuentre la donante y la receptora (por características, por recién nacidos vivos)
- ✓ Repetir donaciones sin tener que cancelar o posponer la donación a la receptora.
- ✓ Realizar un nuevo test de cribado (de VIH y de VHC) a la donante, antes de usar sus ovocitos para ser donados a una receptora (analítica de la cuarentena)

# **Objetivos de la Tesis Doctoral**



## **OBJETIVO PRINCIPAL:**

Evaluar el interés clínico, basado en la relación y capacidad predictiva de biomarcadores de imagen ecográfica con el éxito reproductivo en un programa de donación de óvulos.

## **OBJETIVOS SECUNDARIOS:**

1. Comparar los valores de parámetros de textura de imagen extraídos de ecografía uterina en los distintos modelos de éxito reproductivo, de implantación vs fallo de implantación, de tasa de implantación embrionaria, de gestación evolutiva y aborto, en función de recibir uno o dos embriones.
2. Comparar la capacidad predictiva de diferentes técnicas de aprendizaje máquina o clasificadores, usando parámetros ecográficos uterino, sobre los resultados reproductivos previamente descritos.

## **VARIABLES DE ESTUDIO:**

### **Variable principal:**

- Tasa de gestación clínica evolutiva (variable cualitativa dicotómica: si/no), determinada como embarazo diagnosticado por visualización ecográfica de uno o más sacos gestacionales a partir de la semana 5 y que evoluciona más allá de la semana 12 de gestación.

### VARIABLES DE EXPOSICIÓN:

- Valor en ng/ml de progesterona medido el día de programación de la transferencia (variable de control)
- Valor en pg/ml de estradiol medido el día de programación de la transferencia (variable de control)
- Grosor endometrial medido en corte longitudinal en 2D a unos 14 mm de fundus (variable cuantitativa continua)
- Aspecto ecogénico endometrial: Menstrual, Trilaminar, Secretor (variable cuantitativa discreta)
- Textura (variable cuantitativa continua):
  - Los parámetros de 1º orden que se analizarán son:
    - Kurtosis: en estadística, este parámetro es una medida de forma. Mide respecto a una distribución normal como de pesadas son las colas del histograma, es decir, si los datos siguen una distribución normal o están distribuidos mayoritariamente en uno de los extremos.
    - Skewness: mide la asimetría del histograma alrededor de su valor medio.
  - Los parámetros de 2º orden analizados son los siguientes:
    - Auto-correlación: este parámetro cuantifica el número de patrones repetidos localizados en la imagen analizada.
    - Prominencia de cluster: mide la asimetría de los datos de la imagen. Cuanto mayor es el valor de

prominencia de grupo menos simétrica es la imagen analizada.

- Sombra del cluster: mide la skewness de la matriz GLCM.
- Contraste: mide la cantidad de variaciones locales de contraste presentes en la imagen.
- Correlación: mide las dependencias lineales existentes entre los valores de gris presentes en la imagen.
- Disimilitud: mide las variaciones existentes entre pares de niveles de gris en la imagen. Este parámetro es análogo al contraste con la diferencia de que el parámetro de disimilitud está ponderado por una serie de pesos, crece cuadráticamente, mientras que el de contraste no.
- Energía: analiza la uniformidad del tejido. Detecta los desórdenes presentes en las imágenes.
- Entropía: mide el desorden o complejidad de la imagen. Si la entropía es alta, la uniformidad de la imagen es baja. La entropía está inversamente correlacionada con la energía.
- Homogeneidad: analiza la homogeneidad de la imagen, decir, la semejanza entre los pixeles de la imagen.
- Diferencia inversa: similar a la homogeneidad, pero decrece linealmente en lugar de cuadráticamente.

- Probabilidad máxima: Valor máximo presente en la matriz de co-ocurrencia.
- Varianza: mide la dispersión de los datos respecto al promedio.

#### VARIABLES DE CONTROL:

- IMC de las receptoras: calculado a partir de los valores de peso y talla de las pacientes mediante la siguiente fórmula:  $IMC = \frac{\text{peso(kg)}}{\text{talla}^2 \text{ (m}^2\text{)}}$  (variable cuantitativa continua)
- Edad de las receptoras: años cumplidos de la paciente en el momento de la transferencia (variable cuantitativa continua)
- Calidad embrionaria según criterios de ASEBIR (variable cualitativa ordinal)
- Número de embriones transferidos por ciclo (variable cuantitativa discreta)

#### VARIABLES DE RESULTADOS\*:

- Gestación clínica (variable cualitativa dicotómica: si/no).

\* El embarazo clínico es el embarazo diagnosticado por visualización ecográfica de uno o más sacos gestacionales a partir de la semana 5.

- Tasa de implantación ( $\frac{\text{n}^\circ \text{ sacos gestacionales}}{\text{n}^\circ \text{ embriones transferidos en total}}$ ): % (variable cuantitativa continua).

\* La tasa de implantación se calcula dividiendo el número de sacos gestacionales por el número de embriones transferidos.

- Pérdidas gestacionales/embarazo: (variable cualitativa dicotómica: si/no)

- Tipo de pérdida gestacional (variable cuantitativa discreta):
  - Abortos bioquímicos (test de gestación positivo, pero no se llega a visualizar saco gestacional ecográficamente).

\*El embarazo bioquímico se define como la detección de una concentración positiva de  $\beta$ HCG ( $>10$  IU/L) en la sangre 11 días después de la transferencia intrauterina de un embrión en estadio de blastocisto

- Abortos clínicos (gestación detenida tras visualización de un saco gestacional por ecografía transvaginal).

\*El aborto es la pérdida espontánea de un embarazo clínico antes de las 24 semanas de edad gestacional.



# **Justificación e hipótesis de trabajo**



## JUSTIFICACIÓN

En pacientes sometidas a tratamiento de reproducción asistida es fundamental establecer los factores que contribuyen al éxito de un tratamiento: corregir estos factores significa aumentar la posibilidad de que el ciclo culmine en un embarazo.

Hasta la fecha, como biomarcadores de imagen han sido utilizado el espesor de la línea endometrial, el patrón trilaminar, el cálculo del volumen endometrial, pero ninguno de ellos da la absoluta seguridad de conocimiento de la implantación.

También hay otras técnicas que se pueden utilizar pero que no son tan inocuas y no se pueden realizar en el mismo ciclo como la ecografía.

Este trabajo de investigación se plantea por la necesidad de incrementar las aportaciones al conocimiento de la receptividad endometrial.

Por esto, vamos a estudiar la existencia de nuevos biomarcadores de imagen endometrial que puedan aportar más información y sean más predictivos sobre la receptividad endometrial.

Si fuera así, se podría pronosticar cuando la paciente receptora se encuentra en el estado de receptividad endometrial adecuado para la realización de técnicas de reproducción asistida, y de esta manera maximizar la tasa de embarazos clínicos en ciclos de transferencia embrionaria con preparación endometrial en ciclo sustituido.

Se ha escogido el modelo de donación ovocitaria y factor masculino normal con el fin de excluir cualquier sesgo relacionado con la calidad embrionaria.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Hipotesis: las técnicas ecográficas actuales para analizar el útero unidas al tratamiento de datos apropiado pueden identificar biomarcadores con relación y capacidad pronóstica sobre el resultado reproductivo en pacientes infértiles que acuden a un programa de donación de ovocitos.

# Material y Metodo



## **4.1 ÁMBITO DEL ESTUDIO**

El presente trabajo se llevó a cabo en el Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) durante el periodo comprendido entre febrero 2017 y diciembre de 2018.

El Comité de Proyectos de Investigación Clínica (con número de protocolo 1610-VLC-075-SP) y el Comité ético de nuestra institución aprobaron el estudio antes de ser iniciado (véase anexos).

## **4.2 DISEÑO DEL ESTUDIO**

Se realizó un estudio prospectivo de cohortes que incluyó a 57 mujeres con edad comprendida entre 22-50 años que se sometieron a tratamientos de fecundación en vitro con ovocitos donados en nuestro centro Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) Valencia durante el período de realización del estudio.

Una vez finalizado, la cohorte de pacientes fue dividida en grupos en función de su evolución clínica (grupo de pacientes que se quedaron embarazada y grupo que tuvieron un resultado negativo a la prueba de embarazo) con el objetivo de establecer relaciones entre los biomarcadores de imagen y la tasa de éxito de implantación, ayudando por lo tanto a detectar biomarcadores de imagen pronóstico.

#### **4.2.1 POBLACIÓN DEL ESTUDIO**

El estudio se llevó a cabo en ciclos de donación ovocitaria, con el fin de excluir cualquier sesgo relacionado con la calidad ovocitaria. Las receptoras aceptaron participar en el estudio tras una descripción detallada del mismo; y firmaron el consentimiento informado pertinente (véase anexos).

#### **4.2.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN**

Criterios de inclusión

Receptoras:

- a) Pacientes sometidas al primer o segundo ciclo de donación ovocitaria (cada tratamiento puede incluir varias transferencias de embriones vitrificados).
- b) Pacientes sin embarazos previos
- c) Edad <50 años.
- d) IMC <30 Kg/m<sup>2</sup>.
- e) Preparación endometrial mediante ciclo sustituido con terapia estrógeno-progesterona para transferencia de embriones vitrificados provenientes de 1º o 2º tratamientos de donaciones.

Línea endometrial:

- Espesor > 6 mm en fase proliferativa, antes del comienzo de la progesterona.
- Patrón trilaminar

- f) Transferencia embrionaria en estadio de blastocisto (día 5-6) con calidad embrionaria óptima (A ó B) según la clasificación de ASEBIR.
- g) Normozoospermia
- h) Consentimiento Informado comprendido, firmado y fechado

#### Criterios de exclusión

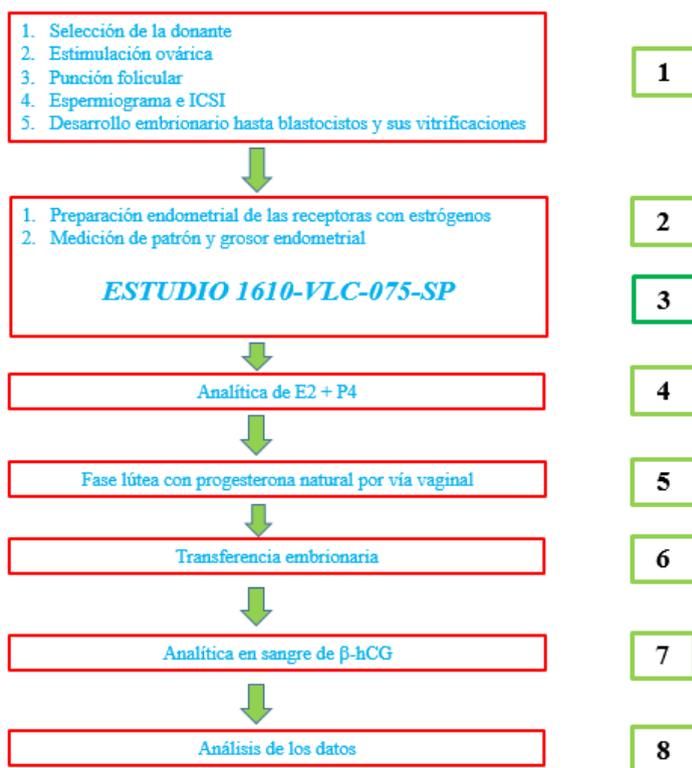
- a) Presencia de patología uterina (miomas submucosos o intramurales, pólipos endometriales o anomalías müllerianas) o anexial (hidrosalpinx comunicantes).
- b) Histerometría < 7 cm (hipoplasia uterina) y > 7 cm (útero aumentado de tamaño)
- c) Mujeres con cesárea previa.
- d) Mujeres que hayan sido sometidas a cirugía uterina incluso un legrado
- e) Mujeres que hayan tenido hijos previos
- f) Factor masculino
- g) Fallo de implantación previo (> 5 embriones transferidos en los tratamientos previos de donación de óvulos)
- h) Participación en otro estudio clínico antes de la inclusión en el presente estudio que pudiera afectar a los objetivos del mismo

Cualquier sujeto que retire íntegramente su consentimiento para participar en el estudio será eliminado del tratamiento y/o las observaciones del estudio inmediatamente después de la fecha en que lo solicite.

Se realizaron todos los esfuerzos necesarios para completar y notificar las observaciones tan ampliamente como fue posible hasta la fecha de la retirada. Toda la información se incluyó en los correspondientes cuadernos de recogida de datos.

Si la paciente en algún momento no deseó continuar el estudio, este se paró, pero prosiguió su tratamiento reproductivo.

#### 4.2.3 PROCEDIMIENTO Y CRONOGRAMA



#### *4.2.3.1 SELECCIÓN DE LA DONANTE*

En lo referente a las mujeres donantes de óvulos, la selección es un proceso extenso y detallado. Los aspectos normativos relevantes que nosotros aplicamos en la selección de las donantes de óvulos, de acuerdo con la legislación vigente en España, son los siguientes:

-La edad debe estar comprendida entre 18 y 35 años, y tener plena capacidad de obrar.

-La donación debe ser anónima respecto a las mujeres receptoras y viceversa.

- La donación de ovocitos no debe tener un carácter lucrativo o comercial.

La compensación económica resarcitoria que se pueda fijar sólo podrá compensar estrictamente las molestias físicas y los gastos de desplazamiento y laborales que se puedan derivar de la donación y no podrá suponer incentivo económico para ésta.

- Es responsabilidad de la institución asignar a las receptoras, los ovocitos de donantes con la máxima similitud fenotípica e inmunológica y la mayor compatibilidad posible en cuanto a grupos sanguíneos y características físicas en general.

-Las donantes, deben tener un buen estado de salud físico y mental. No debe existir ningún antecedente familiar o personal de enfermedades genéticas o antecedentes personales de enfermedades cardiovasculares, ceguera, artritis severa, diabetes juvenil, alcoholismo, esquizofrenia, depresión, epilepsia, enfermedades de Alzheimer, cáncer de mama etc.

- Las donantes no deben tener antecedentes médicos ni quirúrgicos de interés.

- Tienen que estar informadas, sobre todos los detalles del proceso, intentando adaptarse a su capacidad de comprensión, debe aceptar y firmar el consentimiento informado y contrato para la donación de ovocitos antes de realizar la donación.

Si se cumplen todos los requisitos, las mujeres donantes se incluyen en el programa de donación de óvulos, donde serán valoradas desde un punto de vista tanto psicológico como ginecológico:

- A la exploración:

1. Calculamos su IMC en función del peso (Kg.) y la talla (m.). Se aceptan todas aquellas en las que su IMC está comprendido entre 18-28 Kg/m<sup>2</sup>.

2. Se realiza una exploración ginecológica para comprobar la normalidad anatómica de los órganos pélvicos, así como para realizar el conteo del número de folículos antrales. Tras la exploración ginecológica, todas las donantes son valoradas desde un punto de vista psicológico mediante la realización de una entrevista diagnóstica semiestructurada validada por la Sociedad Española de Fertilidad en la que se valoran las siguientes áreas:

- Antecedentes personales e historia familiar - Trastornos de adaptación
- Trastornos del estado de ánimo
- Trastornos psíquicos
- Abuso de sustancias
- Trastorno de conducta
- Trastornos alimentarios

Si tras la valoración ginecológica y la valoración psicológica, se considera a la donante como APTA, se les solicita las siguientes pruebas complementarias:

- Analítica general con vigencia durante 6 meses

- Grupo sanguíneo y Rh.
- Test serológicos para descartar contacto con VHB (se detecta tanto HBsAG como Ac VHBcore T), VIH, VHC y Sífilis con vigencia durante 6 meses.
- Cariotipo sanguíneo, donde sólo se incluyen aquellas mujeres con XX, femenino normal.
- En algunas ocasiones, se les solicita de manera adicional las determinaciones de X FRÁGIL y la fibrosis quística.

#### 4.2.3.2 ESTIMULACIÓN OVARICA: Protocolo de estimulación con antagonista de GnRH.

La introducción del uso de los antagonistas supuso una serie de ventajas; menos días de estimulación, menos consumo de gonadotropinas, ausencia de síntomas de desensibilización hipofisaria, reducción del riesgo de SHO con la administración de un agonista de la GnRH para desencadenar la ovulación.



Figura 25: Esquema de protocolo antagonista de estimulación ovárica.

Dosis de gonadotropinas:

Con un RFA > 20 en ambos ovarios; 150 UI de FSHr o 187/225 de hMG-HP.

Con un RFA entre 12-20 en ambos ovarios: entre 200-225 UI de FSHr o 150 UI de FSH/75 UI de hMG-HP. FSH recombinante (Gonal-F®; Serono, Madrid, España; Puregon®; MSD, Madrid, España) o urinaria (Fostipur®; Angelini, España) y/o de HMG (Menopur®; Ferring Pharmaceuticals, Madrid, España; HMG- Lepori®, Angelini, España).

Los controles de la estimulación se realizaron de manera periódica y se les realizó un control ecográfico y analítico. En el control ecográfico se determinó el número de folículos, así como el tamaño folicular calculando el promedio de las dos mediciones de mayor tamaño de cada uno de los folículos.

En control analítico, se determinó los niveles de estradiol en sangre a lo largo de la estimulación y en función de los niveles obtenidos, se modificó la dosis de gonadotropinas administradas.

En los ciclos con antagonistas de la GnRH, el protocolo fue el de dosis múltiple y el antagonista 0,25 mg/día (Cetrotide®; Merck-Serono, Madrid, España; Orgalutran®; MSD, Barcelona, España), se añadió a la estimulación cuando el tamaño del folículo de mayor tamaño alcanzó los 14 mm de diámetro medio.

Inducción de la ovulación

Se programó la punción folicular cuando > 3 folículos alcanzaron un tamaño > de 18 mm o al menos un folículo alcance el tamaño <20 mm y siempre y cuando el total de folículos >14 mm sea  $\geq$  8 folículos y se desencadena la ovulación con 0,2 mg de acetato de triptorelina (Decapeptyl®; IpsenPharma, Barcelona, España) (Humaidan, 2005).

En todos los casos, el día que se programó para punción se les solicitó:

- Analítica hormonas con estradiol y progesterona
- Ag-Ac VIH

#### 4.2.3.3 PUNCIÓN FOLICULAR

La punción folicular se realizó a las 36 horas exactas de la administración del inductor de la ovulación (tanto hCG como agonista de la GnRH). Este procedimiento quirúrgico tuvo lugar en el quirófano de FIV bajo una sedación general con Propofol (Propofol ® Fresenius Kabi Deutschland GmbH 61346 Bad Homburg v.d.H. Alemania). Se administró profilaxis antibiótica la noche previa a la punción con Azitromicina 1 gr vía oral dosis única (Zitromax® Pfizer, S.A, Madrid España). Previo a punción se realizó lavado vaginal con solución salina. La vía de abordaje es vaginal y se realizó bajo control ecográfico según la técnica habitual. En la sonda se acopló una guía de punción y se utilizó una aguja de aspiración desechable de 19 Greys. (Kitazato Medical, Tokio, Japón) que permitió puncionar a través de la pared vaginal, el ovario más accesible, comenzando con la aspiración del folículo más cercano al punto de entrada, aspirando sucesivamente el resto de los folículos del ovario, siguiendo el mismo criterio de accesibilidad. Una vez dentro del folículo se aplicó vacío y se aspiró todo el líquido folicular el cual es analizado bajo microscopio por los embriólogos que nos informaron de la existencia de ovocitos. En la medida de lo posible, se debe intentar realizar una sola punción para entrar en el ovario, y a partir de ahí, ir accediendo al resto de los folículos. Como la cápsula ovárica suele sangrar cuando se perfora, reduciendo al mínimo el número de pinchazos, se reduce también el riesgo de hemorragia. Una vez realizada la punción de ambos ovarios, se

visualizó la cavidad pélvica con la sonda vaginal intentando comprobar la ausencia de hemorragia. En el laboratorio de FIV una vez recuperados los ovocitos del líquido folicular, se lavaron y posteriormente se almacenaron en el incubador a 37° C y 6% de CO2 hasta el momento de la inseminación o del ICSI.

Una vez realizada la punción la paciente permaneció en observación durante unas 2 horas, para vigilar si aparecieran complicaciones circulatorias y valorar la necesidad de administrar analgesia.

#### *4.2.3.4 ESPERMIOGRAMA E INSEMINACIÓN DE LOS OVOCITOS (ICSI)*

Semen obtenido por eyaculación producida por masturbación con 2-5 días de abstinencia y todos debían de presentar unos parámetros de normalidad pues era condición imprescindible para ser incluido en el estudio que fuese normozoospermico (Cooper TG, 2010).

La muestra de semen se capacitó mediante Swim up (Volpes A, 2010).

Una vez que los ovocitos fueron obtenidos y el emparejamiento receptor-ovocito fue hecho, en base a las características fenotípicas se lleva a cabo la inseminación ovocitaria entre 4 y 6 horas tras la punción folicular mediante la introducción del espermatozoide previamente inmovilizado directamente dentro del citoplasma del ovocito mediante la inyección Intracitoplasmática ICSI (Gámiz, 2013), con la ayuda de un micromanipulador. Para la realización de la ICSI es necesaria la decumulación del ovocito (eliminación de las células del cúmulo y de la corona radiata).

Se realizar en todos los casos ICSI, a pesar de no tener nuestros pacientes un factor masculino, para unificar nuestro estudio y sabiendo que la técnica ICSI no es perjudicial.

Los embriones fueron cultivados en laboratorio hasta día 5/6 de desarrollo y en este estadio vitrificados (Cobo A y colaboradores 2013; Cobo A y colaboradores 2012)

#### *4.2.3.5 PREPARACIÓN ENDOMETRIAL EN LAS RECEPTORAS: CICLO SUSTITUIDO*

La preparación endometrial es imprescindible para el éxito del tratamiento de donación ovocitaria, ya que el endometrio de la receptora debe tener una receptividad óptima para la implantación y mantener los estadios iniciales de la gestación.

La preparación endometrial se realizó en ciclo sustituido: esto consiste en el uso de terapia hormonal sustitutiva (estrógenos y progesterona) a fin de conseguir la proliferación endometrial.

***Fase 1:*** Ecografía de control.

Con el objetivo de certificar que hay reposo ovárico, se realizó una ecografía de control o unos días antes de la menstruación o en el 1º día del ciclo.

***Fase 2:*** Preparación estrogenica.

Tras comprobar reposo ovárico la paciente empezó a tomar 6 mg de valerianato de estradiol/día (Progynova® 1 mg, Bayer Hispania, Barcelona, España) desde 1º día del ciclo durante un número mínimo de días de 8-10 (Glujovsky D, 2010)

***Fase 3:*** Control ecográfico y hormonales.

Tras 10-14 días de tratamiento con estrógenos, se realizó un control ecográfico para evaluar el grosor endometrial y su patrón.

También se determinaron los niveles plasmáticos de E2 y de P4.

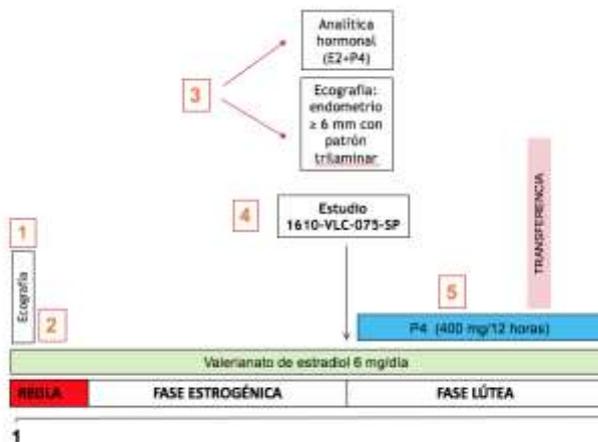


Figura 26: Preparación endometrial en ciclo sustituido: desde la regla hasta la transferencia embrionaria.

**Fase 4:** ESTUDIO 1610-VLC-075-SP: Protocolo del análisis ecográfico 2D y recogida de muestras biológicas e imágenes.

### 1. Adquisición y exportación de imágenes

En primer lugar, se realizó una exploración de útero y anejos con ecografía en 2D a tiempo real. Se realizaron adquisiciones de ecografía endovaginal mediante el protocolo de rutina en un equipo (Voluson S6 Expert System con sonda transvaginal multifrecuencia 3D RIC5-9 (3-9 Mhz) ambos del mismo fabricante (Healthcare, Milwaukee, WI), los ajustes ecográficos (bidimensionales) empleados serán los recomendados para exploración ginecológica por el Grupo MISUS en el Consenso de Barajas del 11 de noviembre de 2005.

La imagen ecográfica 2D capturada, fue analizada en su plano sagital completo, momento en el que se miden el grosor endometrial y se delimitan los contornos endometrial y miometrial para estudio.

Se exportaron las imágenes en formato DICOM (*Digital Imaging and Communication in Medicine*) a un lápiz de memoria del centro para su posterior procesamiento en la plataforma de QUIBIM. Se seleccionó el formato DICOM ya que es el estándar reconocido mundialmente para el intercambio de pruebas médicas, pensado para su manejo, visualización, almacenamiento, impresión, transmisión e intercambio entre entidades. Además, al trabajar con el formato DICOM se puede tratar directamente con la imagen fuente resultante de la adquisición, evitando de este modo la compresión de la misma y la pérdida de información para su posterior análisis.

## **2. Método de obtención de las muestras**

La medición de las hormonas (E2 + P4) se hizo a través de una extracción de 5 ml de sangre total mediante venopunción, antes de la realización de la transferencia embrionaria. La extracción fue llevada a cabo por una enfermera en el centro IVI. Las molestias no son otras que las derivadas del pinchazo con aguja a través de la piel, no conllevando un riesgo médico reseñable.

La captura de las imágenes en 2D se realizará a través de una ecografía transvaginal, del mismo modo que se ha hecho las ecografías previas para la preparación del ciclo. Las molestias son mínimas, derivadas de la introducción de una sonda ecográfica a través de la vagina. Esto no influye

sobre las posibilidades de éxito en la transferencia embrionaria que se realizará más tarde. Las imágenes fueron tomadas por el investigador principal del estudio (Stefania Paoletti).

### **3. Objetivo de la recolección de muestras**

El objetivo de la obtención de una muestra de sangre es medir las concentraciones de las hormonas progesterona y estradiol para ver si existe una correlación entre su valor el día que tengamos el endometrio preparado y la tasa de éxito posterior. Esta analítica se realiza habitualmente, el resultado de la determinación consta en la historia de la propia paciente.

Se evaluó el aspecto uterino a través de ecografía 2 D, realizada por el investigador principal, en el mismo día del comienzo de la progesterona (pero, por supuesto, antes), con el fin de valorar si el aspecto endometrial tiene influencia sobre la tasa de embarazo y si se correlaciona con los biomarcadores de imagen objeto de estudio.

Dichas imágenes fueron guardadas en el disco duro del ecógrafo e identificadas a través del número de historia clínica de la paciente.

Posteriormente fueron exportadas a un disco duro externo donde serán custodiadas por el investigador principal del proyecto de investigación y sólo él tendrá acceso a los mismos.

Tras la finalización del presente estudio de investigación las imágenes ecográficas fueron archivadas.

#### **4. Método de identificación de las muestras**

Se identificaron todas las muestras y las imágenes ecográficas asociadas a una paciente con su número de historia clínica e iniciales, tal y como se realiza en la práctica clínica habitual en IVI Valencia. Las muestras no fueron anonimizadas, y mantuvieron su trazabilidad durante todo el proceso para poder realizar el seguimiento de la evolución clínica. Se garantizó confidencialidad de los datos de acuerdo a lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal (LODP).

#### **5. Guardia y custodia de las imágenes**

Las imágenes se guardaron en el disco duro del ecógrafo e identificadas a través del número de historia clínica de la paciente. Posteriormente fueron exportadas a un disco duro externo donde fueron custodiadas por el investigador principal del proyecto de investigación (Stefania Paoelli) y sólo ella tuvo acceso a los mismos.

Las imágenes fueron transferidas a la plataforma Quibim Precision ([www.quibimprecision.com](http://www.quibimprecision.com)) que permite el análisis de estudios de imagen médica en la nube. La plataforma incorpora un proceso de encriptación y anonimización de las imágenes, acorde a la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD), que hace que los datos de las imágenes sean no trazables por parte de QUIBIM.

A la finalización del estudio QUIBIM se comprometió a almacenar las imágenes sin ningún coste asociado durante el tiempo que el investigador principal del presente estudio estime oportuno.

## **6. Conservación**

Una vez finalizado el proyecto las imágenes permanecerán almacenadas durante un mínimo de 5 años en el repositorio de imágenes de QUIBIM para la mejora de sus procesos de análisis. Estas imágenes estarán encriptadas y sin trazabilidad por parte de QUIBIM y los costes derivados de este almacenamiento correrán a cargo de QUIBIM.'

## **7. Guardia y custodia de las muestras biológicas**

El suero permanecerá congelado en la Clínica IVI Valencia hasta la finalización del estudio por si fuera necesario repetir la determinación hormonal.

## **8. Conservación**

Tras la finalización del presente estudio de investigación las muestras de sangre congeladas fueron destruidas.

## **9. Lectura y preparación de las imágenes**

Se leyeron las imágenes por parte de QUIBIM SL y se evaluó la metodología de optimización de las imágenes requerida, valorando la necesidad de aplicar algoritmos de mejora de la imagen basados en:

- Filtrado de ruido: para la mejora de la relación señal a ruido (SNR), partiendo de un filtro Gaussiano de ventana 5.

- Homogeneidad: para la mejora de la homogeneidad de la señal en la imagen y la corrección por desplazamiento del foco del equipo de ultrasonidos.

## **10.** Análisis de biomarcadores de imagen

Se aplicó un método de segmentación semi-automático, permitiendo al usuario la extracción de la región de interés (ROI) consistente al útero y al tejido endometrial. Las regiones se corrigieron manualmente para verificar la correcta inclusión del endometrio en la ROI, excluyendo cualquier otra estructura.

Se extrajeron 3 regiones de interés para cada una de las imágenes.

La primera ROI comprendía la porción de más alta calidad de imagen del endometrio, según nivel de señal a ruido (figura 27).

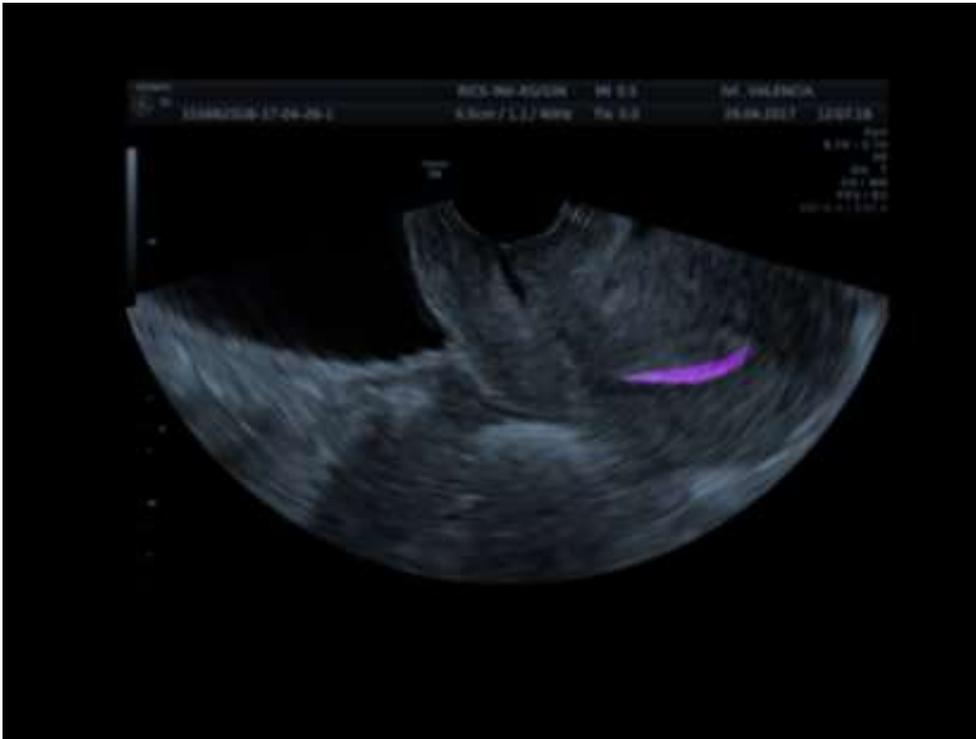


Figura 27: Segmentación de la región de la más alta calidad de imagen del endometrio en un plano sagital.

La segunda ROI estaba compuesta por la segmentación anterior, incluyendo además la cavidad endometrial (figura 28).



Figura 28: Segmentación de la región de la más alta calidad de imagen del endometrio, incluyendo la cavidad endometrial en un plano sagital.

La tercera ROI consistió en considerar todo el endometrio, incluyendo también la cavidad endometrial (figura 29).

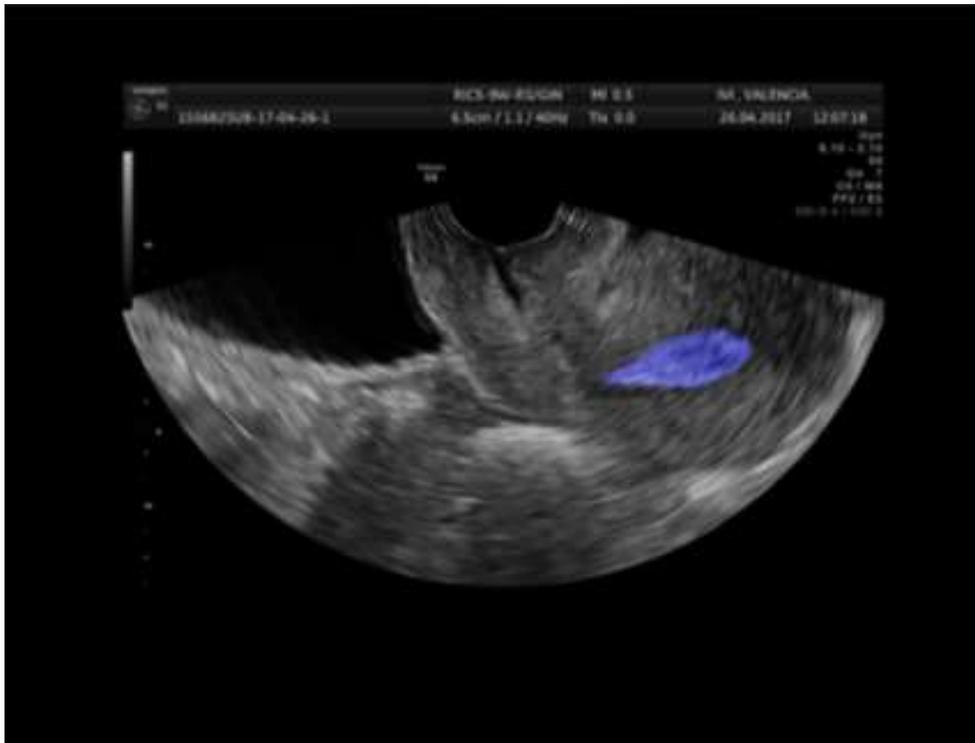


Figura 29: Segmentación de todo el endometrio, incluyendo la cavidad endometrial en un plano sagital.

A continuación, se aplicó un algoritmo semi-automático para la detección de la cavidad endometrial, con la posibilidad de corrección por parte del usuario.

A partir de estas referencias geométricas (útero y cavidad endometrial) se extrajeron biomarcadores de imagen de:

- Valores de intensidad promedios relativos (relacionado con la ecogenicidad)

- Parámetros de textura: kurtosis, skewness y entropía (relacionado con la homogeneidad del tejido) (42-45)
- Parámetro de morfología elíptica del útero (parámetro que expresa la redondez o direccionalidad del útero)
- Ramificaciones y estrías en la línea central del útero, identificación de patrones

Todos estos biomarcadores estarán orientados a la gradación de manera cuantitativa de la tipología trilaminar o secretora del tejido endometrial.

## **11.** Recopilación de variables

Todos los biomarcadores de imagen generados se recopilaron en una base de datos que se complementó con los datos clínicos para su explotación estadística y detección de potenciales biomarcadores predictores de éxito.

En particular, se aplicaron técnicas estadísticas multivariantes para valorar si las combinaciones de varios de los biomarcadores de imagen extraídos explican el pronóstico clínico de las pacientes.

## **12.** Generación de informe estructurado para uso clínico

Una vez analizada la relación de los biomarcadores de imagen con los clínicos “endpoints”, se elaboró una plantilla de informe estructurado para uso clínico, que pueda generarse de manera simple en cada paciente explorada mediante ecografía, y que proporcione indicadores cuantitativos del pronóstico.

QUIBIM posee una metodología automatizada y modular de generación de informes estructurados basada en librerías Jasper Reports.

**Fase 5:** Preparación progesterónica.

El mismo día que realizamos el control ecográfico y hormonas, la paciente empezó el uso de la progesterona micronizada vaginal (Progeffik®, Effik, Madrid España o Utrogestan®, SEID. S.A. Barcelona España), en dosis fija de 400 mg cada 12 horas.

El primer día de progesterona se considera P4+0 y se tomaron 10 dosis y en el momento de la dosis nº11 se realizó la transferencia embrionaria (tras 120 horas aproximadamente desde la primera dosis) (Figuras 30A-B)

	P+0	P+1	P+2	P+3	P+4	P+5
a.m.	P4 (1)	P4 (3)	P4 (5)	P4 (7)	P4 (9)	TRANSFER
p.m.	P4 (2)	P4 (4)	P4 (6)	P4 (8)	P4 (10)	

Figura 30A: Ejemplo de inicio de tomas de progesterona vaginal por la mañana para transferencia por la tarde

	P+0	P+1	P+2	P+3	P+4	P+5
a.m.		P4 (2)	P4 (4)	P4 (6)	P4 (8)	P4 (10)
p.m.	P4 (1)	P4 (3)	P4 (5)	P4 (7)	P4 (9)	TRANSFER

Figura 30B: Ejemplo de inicio de tomas de progesterona vaginal por la tarde para transferencia por la mañana

El tratamiento con estradiol y progesterona se mantuvo hasta el día de la prueba de embarazo mediante el análisis de la hormona  $\beta$ -hCG en sangre.

Si la prueba fuera positiva, se mantendría el tratamiento por más tiempo hasta incluso la semana 12 de gestación; este tema ha generado una gran controversia al respecto (Liu y colaboradores. 2012)

#### *4.2.3.6 TRANSFERENCIA EMBRIONARIA (TE):*

Para poder utilizar los embriones congelados es imprescindible desvitrificarlos. (Cobo A y colaboradores., Fertil Steril 2012, 2013)

Para ello, se sacan del nitrógeno líquido y se pasan por varios medios con concentraciones decrecientes de crioprotectores.

Así se consigue la rehidratación celular, de forma que se van reemplazando los crioprotectores por agua. Es muy importante respetar los tiempos y realizar la desvitrificación de forma correcta, ya que de lo contrario podrían dañarse las estructuras celulares del embrión y éste podría no sobrevivir.

La desvitrificación embrionaria se realizó el mismo día de la transferencia, con unas horas de diferencia para que sea posible comprobar el estado del embrión.

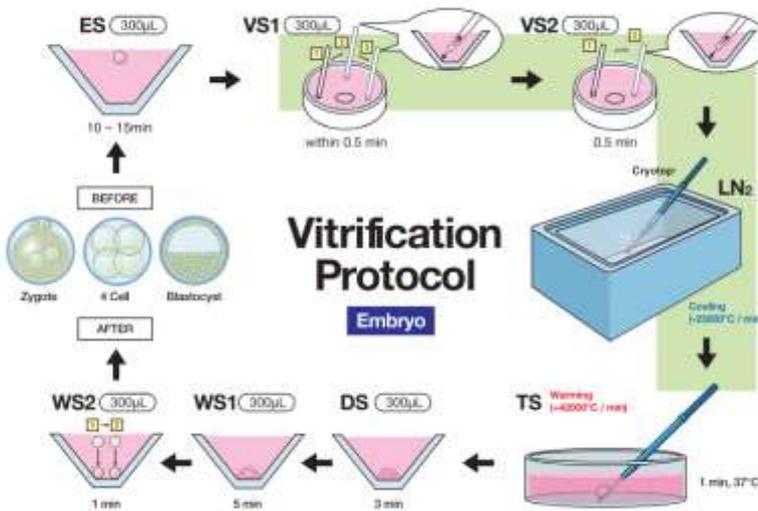


Figura 31: Protocolo de vitrificación/desvitrificación embrionaria.

(Tomado por Cryotop® Safety Kit, Vitrification Protocol for Cryotop® Method, Kitazato ® Tokio-Japón.)

El número de embriones transferidos se hizo en cumplimiento con la legislación nacional actual y según las necesidades, deseos y posibilidades de cada paciente, transfiriendo un máximo de dos embriones.

La transferencia embrionaria se realizó canalizando el cérvix y depositando los embriones con un catéter atraumático blando tipo Ec Pro (Kitazato ® Tokio-Japón) hasta llegar al tercio superior de la cavidad uterina, a una distancia de 1,5 cm del fundus, descargándolos y comprobando posteriormente que no han quedado retenidos en ella, todo ello controlado ecográficamente y con extrema suavidad (Coroleu, 2006)

#### *4.2.3.7 BASE DE DATOS:*

La base de datos se definió rigurosamente con las variables destinadas a ser analizadas en función de los objetivos planteados. La información necesaria fue exportada desde el gestor de información clínica, SIVIS, a una tabla en formato Excel mediante un sistema de consulta a base de datos.

Los datos exportados quedaron debidamente anonimizados con el objeto de proteger la información clínica y personal de las pacientes según dispone la ley 14/2007 de Investigación Biomédica.

Finalmente, y previo paso al estudio estadístico, se llevó a cabo un análisis exploratorio de datos para revisar la calidad de la información extraída.

## **4.3 METODOS ESTADÍSTICOS**

### ***4.3.1 TAMAÑO MUESTRAL***

Teniendo en cuenta que el grosor endometrial de la población de pacientes de IVI Valencia en tratamiento de ovodonación sigue una distribución normal de media 8,58 y desviación típica igual a 1.92

El tamaño de la muestra necesario para obtener una muestra de distribución con un 85,4% de homogeneidad, un nivel de significatividad del 95% y potencia del 80%, es de 57 pacientes y se ha calculado con el objetivo de detectar variaciones en los parámetros calculados que sean de un orden mayor al de la variabilidad de la metodología de análisis.

Todos los biomarcadores de imagen generados se recopilaron en una base de datos que se complementó con los datos clínicos para su explotación estadística y detección de potenciales biomarcadores predictores de éxito.

En particular, se aplicaron técnicas estadísticas multivariantes para valorar si la combinación de varios biomarcadores de imagen extraídos explica el pronóstico clínico de las pacientes (variables de éxito clínico)

#### **4.3.2 ANÁLISIS DE DATOS**

➤ **Análisis descriptivo**

Resumen estadístico de los datos recopilados en el estudio.

Se presentaron los datos categóricos en tablas de frecuencias e histogramas. Los valores continuos se resumieron con la media, desviación típica e intervalo de confianza, se representaron mediante diagramas de cuartiles o densidades.

El análisis exploratorio de los datos permitió valorar la calidad de los datos y la detección de anomalías.

➤ **Análisis de resultados gestacionales respecto a los datos ecográficos**  
Finalmente, se comparó las medias y sus respectivos intervalos de confianza del 95% de las variables ecográficas cuantitativas continuas entre las pacientes gestantes y las que no (tanto gestación clínica como evolutiva) mediante prueba t-Student.

En el caso de evaluar variables de exposición categóricas se aplicó una prueba chi-cuadrado.

Adicionalmente se definió un modelo de regresión logística sobre la gestación evolutiva, tomando como variables explicativas aquellas que consideremos exista correlación con la variable respuesta.

# Resultados



## 5.1 Características de la población de estudio (receptora de gametos) y sus resultados gestacionales

Se incluyeron un total de 57 pacientes estudiadas por ultrasonidos (US). Además de los datos ecográficos y de imagen se disponía de información clínica: edad, IMC, niveles de Estradiol (E2) y progesterona (P4) alcanzados, días de exposición al estradiol valerato y número de embriones en estadio de blastocisto transferidos (Tabla 3).

Algunas pacientes (3 de ellas) tenían hasta 2 imágenes, correspondiendo a diferentes instantes temporales. Finalmente, en el estudio se incluyeron un total de 57 análisis realizados en todo el conjunto de datos

<u>CARACTERISTICAS DE LAS RECEPTORAS</u>	<u>PROMEDIO</u>
Edad (Años)	40,35
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	24,7
Grosos endometrial (mm)	9,2
Patrón endometrial	Trilaminar
Niveles de E2 alcanzados (pg/ml)	220,22
Niveles de P4 alcanzados (ng/ml)	0,11
Días de exposición al estradiol valerato	12,02

Tabla 3: características de las receptoras.

37 pacientes realizaron transferencia de un embrión y 20 pacientes de dos embriones.



6 pacientes de las 20 que decidieron transferir dos embriones, tuvieron un resultado negativo de  $\beta$ -HCG (1 paciente tuvo un embarazo bioquímico) (Tabla 5)

CLAVE	NHC	OVOCCION-RANZO	EMBRICION	FECHA TRANSFER	NFIASFI(%)	CALIDAD	b-HCG	Tasa de implantación	Gingstig pregnancy
3440046				16/01/2017	2,00	3B6 b-c y 3C b-c	426,00	100,00%	OK 9 W
3440050		x		15/01/2017	2,00	3B a-b y 3C a-b	405,00	100,00%	Aborto espontáneo 6
3440041				04/02/2017	2,00	3E b-b y 3E b-b	342,00	100,00%	OK 7 W
3440043				11/02/2017	2,00	4E a-c y 3E a-c	330,00	100,00%	OK 9 W
3440057		x		06/02/2017	2,00	3E a-b y 3E b-b	306,00	100,00%	Aborto espontáneo 5
3440041T				11/02/2017	2,00	4E a-b y 4E b-b	218,00	100,00%	OK semana 6
3440040				20/02/2017	2,00	3E b-b y 3E a-b	181,00	100,00%	Aborto espontáneo 6
3440033T				07/02/2017	2,00		181,00	100,00%	OK semana 12
3440042T				27/02/2017	2,00	3E a-a y 3E b-c	181,00	100,00%	OK semana 17
3440032				20/02/2017	2,00	3E a-a y 3E a-b	170,00	100,00%	OK semana 12
3440051				20/02/2017	2,00	3E a-a y 3E a-b	150,00	100,00%	OK semana 10
3440052		x		24/02/2017	2,00	3E a-b y 3E a-b	25,00		Bioquímico
3440041T				27/02/2017	2,00	3E a-a y 3E a-a	115,00	100,00%	OK semana 18
3440044				04/03/2017	2,00	3E a-c y 3E c-c	100,00	100,00%	OK semana 12
3440054				06/03/2017	2,00	3E a-a y 3E c-c	234,00	100,00%	OK semana 19
3440048				13/03/2017	2,00		230,00	100,00%	OK semana 12
3440057		x		18/03/2017	2,00	3E a y 3E	305,00	100,00%	OK semana 11
3440047T		x		06/02/2017	2,00	4E a-b y 4E a-b	497,00	100,00%	OK semana 12
3440052T				13/02/2017	2,00	3E b-b y 3E b-b	735,00	100,00%	OK semana 17
3440052				20/02/2017	2,00	3E a-b y 3E b-b	330,00	100,00%	OK semana 12

Tabla 5: Características de las pacientes que realizaron DET.

## 5.2 Resultados de la estimulación ovárica de las donantes de óvulos

El estudio incluyó 65 donantes candidatas a donar sus óvulos que fueron inicialmente reclutadas. De las mismas, 8 fueron canceladas por los siguientes motivos: ovulación precoz (n=3), ciclo anovulatorio (n=3) y auto-cancelación por voluntad propia (n=2).

Se realizó la punción folicular en 57 mujeres-donantes obteniendo ovocitos en el 100% de ellas.

La edad media de las donantes de óvulos que completaron el estudio fue de  $24,7 \pm 1,2$  años. Su índice de masa corporal (IMC) fue de  $20,6 \pm 0,4$  (Kg/m<sup>2</sup>)

y los niveles séricos de E2 y de P4 el día de la administración del análogo de la GnRH fueron de  $3643 \pm 654$  pg/ml y  $1,6 \pm 0,2$  ng/ml, respectivamente. La media de los días de estimulación ovárica y la dosis de gonadotrofinas utilizadas fueron de  $10,6 \pm 0,4$  y  $2163 \pm 130$  UI, respectivamente. Se recuperaron una media de  $16,0 \pm 1,1$  ovocitos, de los cuales  $12,3 \pm 2,1$  eran en metafase II y entonces aptos a ser sometidos a fecundación por inyección espermática intracitoplasmática (ICSI) (Tabla 6)

Edad (años)	$24,7 \pm 1,2$
BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	$20,6 \pm 0,4$
Estradiol pg/ml (día del triggering)	$3643 \pm 654$
Progesterona ng/ml (día del triggering)	$1,6 \pm 0,2$
Días de estimulación	$10,6 \pm 0,4$
Ovocitos recuperados	$16,0 \pm 1,1$
Ovocitos Metafase II	$12,3 \pm 2,1$
Dosis de gonadotropinas utilizada (UI)	$2163 \pm 130$

Tabla 6: Resultados de los ciclos de estimulación de las donantes de óvulos: promedio y su desviación estándar.

### 5.3 Análisis de estadísticos descriptivos

Un total de 57 pacientes fueron prospectivamente incluidas en el estudio de cohorte, realizando una transferencia de un único embrión (SET) o de dos (DET).

➤ Implantación vs. No implantación

En el análisis comparativo no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con implantación “sí” y el grupo implantación “no”.

➤ Tasa de Implantación 50% vs. Tasa de Implantación 100%

El análisis comparativo permitió evaluar diferencias en la IR en los casos de DET con 50% de IR (6 casos) vs. 100% de IR (8 casos).

Se calcularon los estadísticos descriptivos de media, mediana y desviación típica y se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney (95% intervalo de confianza) para muestras independientes (MATLAB, Natick, MA, USA), ya que la distribución de las variables era no normal. Como resultados, se obtuvo que la autocorrelación ( $p=0,019$ ), la sombra del clúster ( $p=0,026$ ), la suma de medias ( $p=0,010$ ) y la asimetría ( $p=0,019$ ) presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p<0.05$ ). (Tablas 7 y 8)

	Edad	Endometrio	Auto Correlation	Cluster Prominence	Cluster Shade	Contrast	Correlation	Difference Entropy
mean	38,5	8,48333333	743,706515	639951,949	5124,46649	31,0278358	0,87562333	2,31512321
median	38,5	8,9	717,689309	636280,978	4762,88764	26,0611937	0,87486086	2,29141936
std	4,03732585	1,59300555	66,2023717	310872,714	2466,47964	18,528266	0,04975517	0,30179079

	Difference Variance	Dissimilarity	Energy	Entropy	Homogeneity	Information Measure Of Correlation 1	Information Measure Of Correlation 2	Inverse Difference
mean	12,3949743	3,9320691	0,00329946	6,08607024	0,26923802	-0,34652781	0,94953946	0,35320661
median	10,5157913	3,70898229	0,00341463	6,06486682	0,26275929	-0,35819228	0,95948696	0,35004075
std	6,71542309	1,31745881	0,00072948	0,10713868	0,08027432	0,0561192	0,03233367	0,07233533

	Maximum Probability	Sum Average	Sum Entropy	Sum Of Squares Variance	Sum Variance	Kurtosis	Skewness	Thickness
mean	0,01167724	50,4601633	4,36451312	123,231197	123,231197	3,09276326	0,53314438	6,84870797
median	0,01126026	49,7723688	4,40872925	131,408982	131,408982	2,85744517	0,48008205	6,97981004
std	0,00266236	2,13088705	0,15150697	40,5041396	40,5041396	0,57971728	0,17260912	1,59412977

Tabla 7: estadísticos descriptivos de media, mediana y desviación típica en los 6 casos con 50 % de IR en DET

	Edad	Endometrio	Auto Correlation	Cluster Prominence	Cluster Shade	Contrast	Correlation	Difference Entropy
mean	39	9,24444444	1028,66185	595851,474	777,685624	24,1091365	0,89577693	2,23331278
median	39	9,2	937,326859	536506,198	1520,74818	22,3363626	0,90072348	2,25120655
std	3,16227766	1,54686062	278,836442	279112,303	4051,28928	9,86498924	0,04762925	0,18113716

	Difference Variance	Dissimilarity	Energy	Entropy	Homogeneity	Information Measure Of Correlation 1	Information Measure Of Correlation 2	Inverse Difference
mean	9,48923735	3,52770261	0,00331179	6,13836698	0,28802817	-0,33708231	0,93848266	0,37109928
median	9,16506691	3,43578133	0,00296979	6,17704511	0,2823886	-0,31443971	0,93904566	0,36705051
std	3,48923453	0,78767636	0,00086928	0,29634363	0,05404801	0,09901809	0,03256713	0,04814939

	Maximum Probability	Sum Average	Sum Entropy	Sum Of Squares Variance	Sum Variance	Kurtosis	Skewness	Thickness
mean	0,01505048	60,2325831	4,38492849	115,137165	115,137165	2,97248669	0,14718371	8,498499
median	0,0153438	58,2085912	4,41878636	118,250151	118,250151	3,04002809	0,15776467	8,24727488
std	0,00283077	8,80867415	0,08392559	26,9596546	26,9596546	0,32524432	0,30295473	2,25583485

Tabla 8: estadísticos descriptivos de media, mediana y desviación típica en los 8 casos con 100 % de IR en DET

No obstante, los resultados no parecen concluyentes, dado que la significación estadística es limitada y no hay una relación lineal entre la tasa de implantación de 0%, 50%, 100% y estas variables (ver figura 31).

Dada la falta de referencias con el uso de GLCM y el análisis de texturas en este tipo de imágenes, se necesitan más estudios de validación para analizar las variables texturales en los diferentes grupos, conocer cómo se relacionan entre sí y cuáles son los mejores ajustes del algoritmo para poder detectar cambios significativos en el patrón de textura en función de la situación clínica.

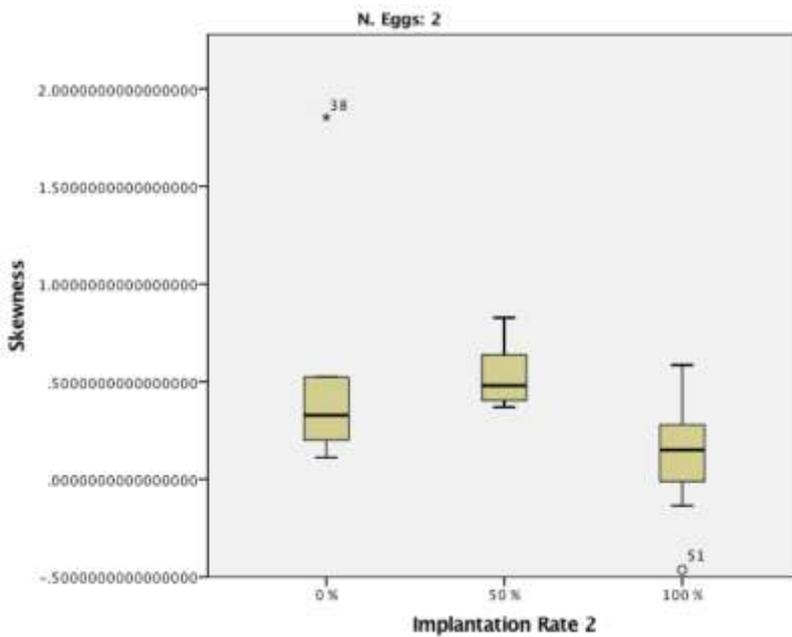


Figura 32: Diferencias en la variable asimetría entre la tasa de implantación 0, 50 y 100% para DET.

➤ Embarazo en curso “sí” vs. “no”

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para la región de endometrio completo en las variables medida de información de correlación 1 y 2 ( $p=0,017$  y  $p=0,010$ , respectivamente), ver figura 33.

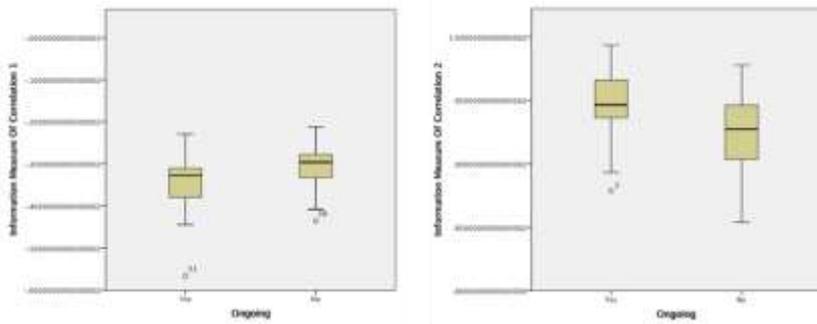


Figura 33: Diferencias en las variables de medida de la información de correlación 1 (IZQ) y 2 (DER) en función de la variable embarazo en curso.

➤ Aborto Clínico vs. Aborto bioquímico

Tuvimos solo 4 abortos clínicos (3 tras DET: 50%, 50% y 100% IR; 1 tras SET: 100% IR) y 1 aborto bioquímico y el hecho de no tener suficientes casos en cada grupo (4 vs. 1) no nos permitió extraer conclusiones de significación (Tabla 9)

	Edad	Endometrio	Auto Correlation	Cluster Prominence	Cluster Shade	Contrast	Correlation	Difference Entropy
mean	38,25	8,825	711,866483	330429,239	2158,4337	17,5441613	0,89290027	2,10533739
median	39,5	8,9	687,040447	306284,435	2077,24058	19,3646701	0,89441647	2,15616346
std	4,34932945	0,78475049	64,7814422	155436,653	965,90945	4,45128119	0,02310364	0,1097319

	Difference Variance	Dissimilarity	Energy	Entropy	Homogeneity	Information Measure Of Correlation 1	Information Measure Of Correlation 2	Inverse Difference
mean	7,43250867	2,97989555	0,00385947	5,9990108	0,31692379	-0,30283294	0,9240102	0,39760111
median	8,05654587	3,11945651	0,00395481	5,98681996	0,30492759	-0,3109629	0,92812956	0,38726484
std	1,87273502	0,38936704	0,00085222	0,18774718	0,03148823	0,04543891	0,03141777	0,0272907

	Maximum Probability	Sum Average	Sum Entropy	Sum Of Squares Variance	Sum Variance	Kurtosis	Skewness	Thickness
mean	0,01458047	50,4571872	4,21883016	84,2183467	84,2183467	3,45359031	0,48363572	7,78555853
median	0,01367896	49,7723688	4,18610944	77,9334004	77,9334004	3,64764192	0,49638155	7,75778652
std	0,00261921	1,45109563	0,17115555	30,7232188	30,7232188	0,74736488	0,30158423	0,78332531

Tabla 9: estadísticos descriptivos de media, mediana y desviación típica en los 5 casos de abortos clínicos y bioquímicos.

## 5.4 Análisis de clasificadores basados en *Machine Learning* para la predicción de embarazo en curso

Todos los registros con sus 17 biomarcadores de imagen correspondientes previamente analizados se cargaron en Matlab R2017a (Mathworks Inc, Natick, MA) para el entrenamiento de los algoritmos y la evaluación del rendimiento en un banco de clasificadores, con el objetivo de minimizar la incertidumbre.

Por cada región de interés se dibujó:

- La curva ROC (acrónimo de Receiver Operating Characteristic, o Característica Operativa del Receptor) que es una representación grafica que muestra el rendimiento de un modelo de clasificación en todos los umbrales de clasificación y que representa dos parámetros: la tasa de verdaderos positivos (TPR) y la tasa de falsos positivos (FPR).

- El área bajo curva ROC (AUC) correspondiente que mide toda el área bidimensional por debajo de la curva ROC completa de (0,0) a (1,1) y que proporciona una medición agregada del rendimiento en todos los umbrales de clasificación posibles.

El AUC oscila en valor del 0 al 1. Un modelo cuyas predicciones son un 100% incorrectas tiene un AUC de 0,0; otro cuyas predicciones son un 100% correctas tiene un AUC de 1,0.

#### **5.4.1 Región de mayor calidad de imagen del endometrio**

Entre todos los clasificadores evaluados, el mejor rendimiento se logró con el clasificador *k-Nearest Neighbourhood*, que consiste en hacer predicciones buscando en todo el conjunto de entrenamiento para las K instancias más similares (los vecinos) y resumiendo la variable de salida para esas instancias K. Para determinar cuáles de las instancias de K en el conjunto de datos de capacitación son más similares a una nueva entrada, se utiliza una medida de distancia. La medida de distancia más popular es la distancia euclidiana. Los resultados obtenidos en el conjunto de datos con validación cruzada en 5 pasos están resumidos en la tabla nº 10.

Embarazo evolutivo			Predicción	
			Sí	No
Original	N	Sí	28	3
		No	22	7

	Sí	No
Valor predictivo positivo	56.0 %	70.0 %
Tasa de falsos descubrimientos	44.0 %	30.0 %

	Sí	No
Tasa de verdaderos positivos	90.0 %	24.0 %
Tasa de falsos negativos	10.0 %	76.0 %

Tabla 10: resultados con el clasificador k-Nearest Neighbourhood

Considerando los resultados globales, el 58,3% de los casos fueron pronosticados correctamente.

La curva ROC y el área bajo curva correspondiente (AUC) se pueden apreciar en la figura 34

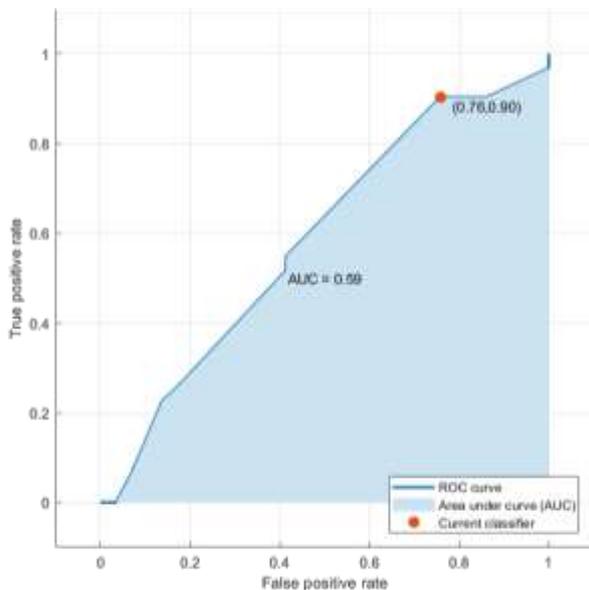


Figura 34: Curva ROC obtenida con el clasificador KNN. Se obtiene un AUC de 0,59.

#### 5.4.2 Región de mayor calidad de imagen del endometrio incluyendo la cavidad endometrial

Entre todos los clasificadores evaluados, el mejor rendimiento se logró con el clasificador lineal discriminante, basado en el concepto de búsqueda de una combinación lineal de variables (predictores) que mejor separa dos clases (objetivos). Supone que diferentes clases generan datos basados en diferentes distribuciones gaussianas. Para entrenar a un clasificador, la función de ajuste estima los parámetros de una distribución gaussiana para cada clase.

Para predecir las clases de datos nuevos, el clasificador entrenado encuentra la clase con el menor costo de clasificación errónea. Los resultados obtenidos en el conjunto de datos con validación cruzada en 5 pasos están resumidos en la tabla nº 11.

Embarazo evolutivo			Predicción	
			Sí	No
Original	N	Sí	17	14
		No	7	22

	Sí	No
Valor predictivo positivo	71.0 %	61.0 %
Tasa de falsos descubrimientos	29.0 %	39.0 %

	Sí	No
Tasa de verdaderos positivos	55.0 %	76.0 %
Tasa de falsos negativos	45.0 %	24.0 %

Tabla 11: resultados con el clasificador lineal discriminante.

Considerando los resultados globales, el 65,0 % de los casos fueron pronosticados correctamente.

La curva ROC y el área bajo curva correspondiente (AUC) se pueden apreciar en la figura 35:

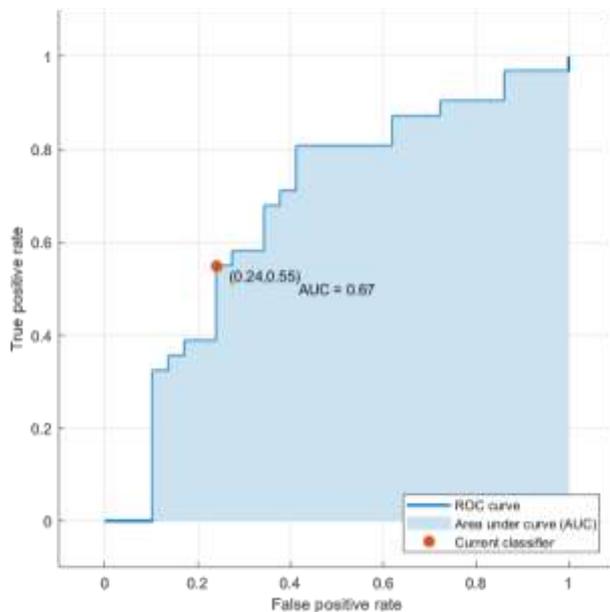


Figura 35: Curva ROC obtenida con el clasificador lineal discriminante. Se obtiene un AUC de 0,67.

### 5.4.3 Endometrio completo incluyendo la cavidad endometrial

Entre todos los clasificadores evaluados, el mejor rendimiento se logró con el clasificador lineal *Support Vector Machine*, que consiste en una representación de los puntos de muestra en un espacio de dimensionalidad muy alta o incluso infinita, para poder separar ambas clases en 2 espacios de ancho como sea posible mediante la construcción del hiperplano o conjunto de hiperplanos que maximizan la distancia a los dos puntos más cercanos, cada uno perteneciente a cada uno de los grupos (vectores de soporte).

Los resultados obtenidos en el conjunto de datos validación cruzada en 5 pasos están resumidos en la tabla nº 12.

Embarazo evolutivo		Predicción			
		Sí	No		
Original	Count	Sí	26	No	5
		No	17		12

	Sí	No
Valor predictivo positivo	60.0 %	71.0 %
Tasa de falsos descubrimientos	40.0 %	29.0 %

	Sí	No
Tasa de verdaderos positivos	84.0 %	41.0 %
Tasa de falsos negativos	16.0 %	59.0 %

Tabla 12: resultados con el clasificador lineal *Support Vector Machine*

Considerando los resultados globales, el 63,3 % de los casos se pronosticaron correctamente.

La curva ROC y el área bajo curva correspondiente (AUC) se pueden apreciar en la figura 36.

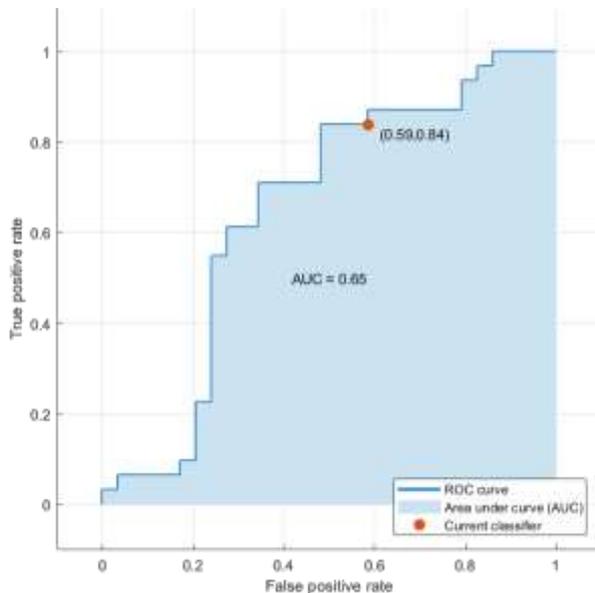


Figura 36: Curva ROC obtenida con el clasificador *Support Vector Machine*. Se obtiene un AUC de 0,65.

## 5.5 Análisis de clasificadores basados en *Machine Learning* para la predicción de la tasa de implantación

### 5.5.1 Región de mayor calidad de imagen del endometrio

Entre todos los clasificadores evaluados, el mejor rendimiento se logró con el clasificador línea *Support Vector Machine*, que consiste en una representación de los puntos de muestra en un espacio de dimensionalidad muy alta o incluso infinita, para poder separar ambas clases en 2 espacios

tanto como sea posible mediante la construcción del hiperplano o conjunto de hiperplanos que maximizan la distancia a los dos puntos más cercanos, cada uno perteneciente a cada uno de los grupos (vectores de soporte). Los resultados obtenidos en el conjunto de datos validación cruzada en 5 pasos están resumidos en la tabla nº 13.

Embarazo evolutivo			Predicción	
			Sí	No
Original	N	Sí	28	7
		No	18	7

	Sí	No
Valor predictivo positivo	61.0 %	50.0 %
Tasa de falsos descubrimientos	39.0 %	50.0 %

	Sí	No
Tasa de verdaderos positivos	80.0 %	28.0 %
Tasa de falsos negativos	20.0 %	72.0 %

Tabla 13: resultados con el clasificador lineal *Support Vector Machine*

Considerando los resultados globales, el 58,3 % de los casos se pronosticaron correctamente.

La curva ROC y el área bajo curva correspondiente (AUC) se pueden apreciar en la figura 37.

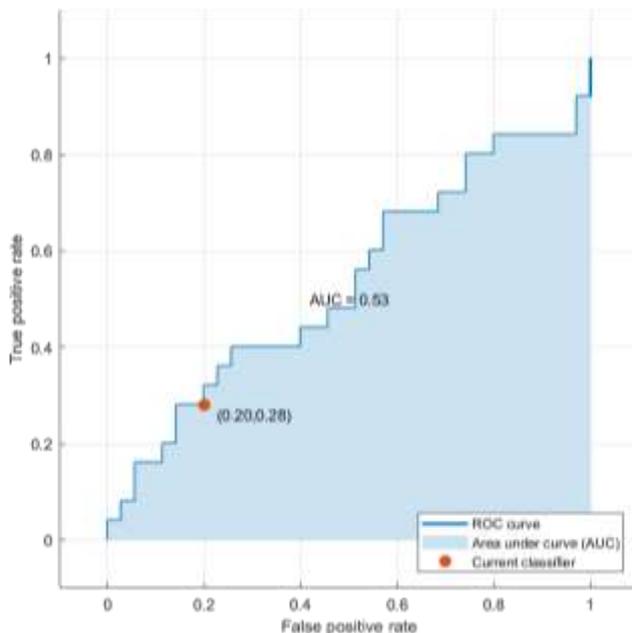


Figura 37: Curva ROC obtenida con el clasificador *Support Vector Machine*. Se obtiene un AUC de 0,53.

### 5.5.2 Región de mayor calidad de imagen del endometrio incluyendo la cavidad endometrial

Entre todos los clasificadores evaluados, el mejor rendimiento se logró con el clasificador lineal *Support Vector Machine*, que consiste en una representación de los puntos de muestra en un espacio de dimensionalidad muy alta o incluso infinita, para poder separar ambas clases en 2 espacios tanto como sea posible mediante la construcción del hiperplano o conjunto de hiperplanos que maximizan la distancia a los dos puntos más cercanos, cada uno perteneciente a cada uno de los grupos (vectores de soporte).

Los resultados obtenidos en el conjunto de datos con validación cruzada en 5 pasos están resumidos en la tabla n° 14.

Embarazo evolutivo			Predicción	
			Sí	No
Original	N	Sí	31	4
		No	16	9

	Sí	No
Valor predictivo positivo	66.0 %	69.0 %
Tasa de falsos descubrimientos	34.0 %	31.0 %

	Sí	No
Tasa de verdaderos positivos	89.0 %	36.0 %
Tasa de falsos negativos	11.0 %	64.0 %

Tabla 14: resultados con el clasificador lineal *Support Vector Machine*

Considerando los resultados globales, el 66,7 % de los casos se pronosticaron correctamente.

La curva ROC y el área bajo curva correspondiente (AUC) se pueden apreciar en la figura 38.

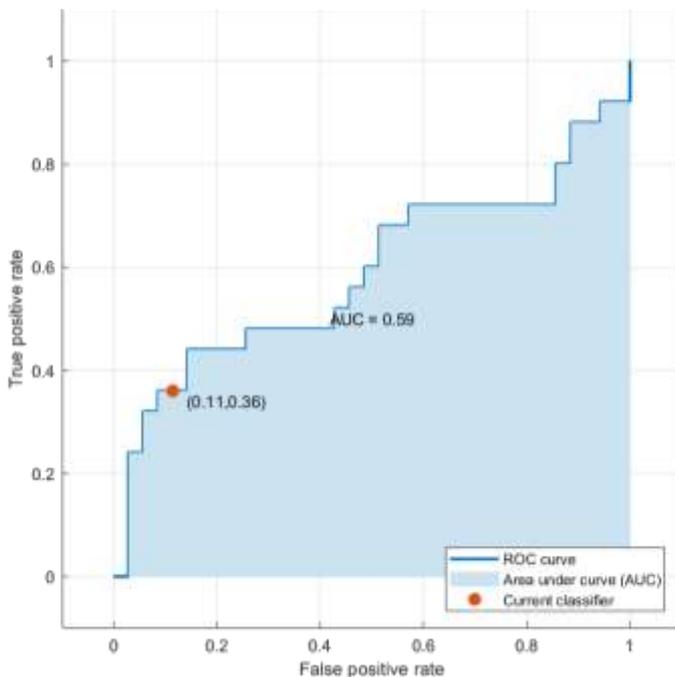


Figura 38: Curva ROC obtenida con el clasificador Support Vector Machine. Se obtiene un AUC de 0,59.

### 5.5.3 Endometrio completo incluyendo la cavidad endometrial

Entre todos los clasificadores evaluados, el mejor rendimiento se logró con el clasificador lineal Support Vector Machine, que consiste en una representación de los puntos de muestra en un espacio de dimensionalidad muy alta o incluso infinita, para poder separar ambas clases en 2 espacios tanto como sea posible mediante la construcción del hiperplano o conjunto de hiperplanos que maximizan la distancia a los dos puntos más cercanos, cada uno perteneciente a cada uno de los grupos (vectores de soporte).

Los resultados obtenidos en el conjunto de datos con 5 veces la validación cross-fold están resumidos en la tabla nº 15.

Embarazo evolutivo			Predicción	
			Sí	No
Original	N	Sí	28	7
		No	15	10

	Sí	No
Valor predictivo positivo	65.0 %	59.0 %
Tasa de falsos descubrimientos	35.0 %	41.0 %

	Sí	No
Tasa de verdaderos positivos	80.0 %	40.0 %
Tasa de falsos negativos	20.0 %	60.0 %

Tabla 15: resultados con el clasificador lineal *Support Vector Machine*

Considerando los resultados globales, el 63,3 % de los casos se pronosticaron correctamente.

La curva ROC y el área bajo curva correspondiente (AUC) se pueden apreciar en la figura 39.

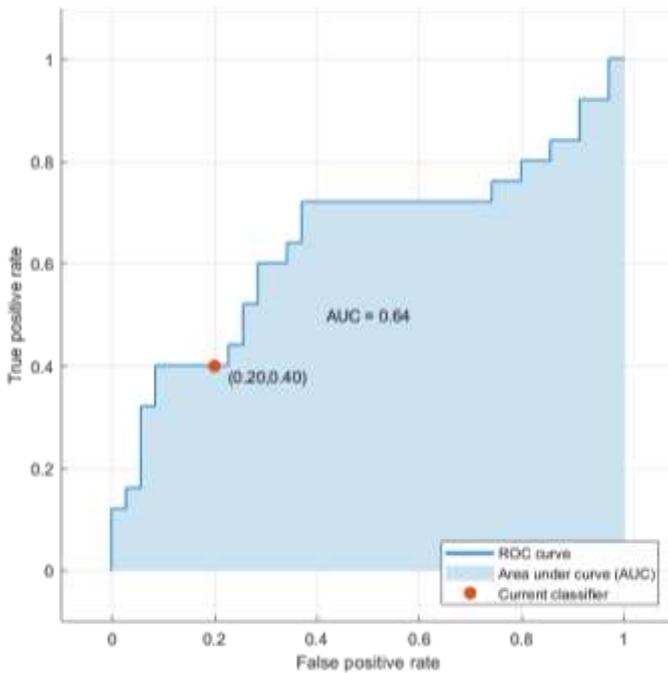


Figura 39: Curva ROC obtenida con el clasificador Linear Support Machine. Se obtiene un AUC de 0,64.

## 5.6 Análisis de clasificadores basados en *Machine Learning* para la predicción de la tasa de implantación en pacientes con doble transferencia de embrión.

### 5.6.1 Tasa de implantación 0 % - 50 % - 100%

#### 5.6.1.1 Región de mayor calidad de imagen del endometrio

Entre todos los clasificadores evaluados, el mejor rendimiento se logró con el clasificador *Ensemble Subspace Discriminant*, que consiste en combinar varios clasificadores para mejorar las capacidades generales de predicción. Los resultados obtenidos en el conjunto de datos con validación cruzada en 5 pasos estan resumidos en la tabla nº 16.

Embarazo evolutivo		Predicción			
		0	50	100	
Original	N	0	3	1	3
		50		3	3
		100	3	1	5

	0	50	100
Valor predictivo positivo	50.0 %	60.0 %	45.0 %
Tasa de falsos descubrimientos	50.0 %	40.0 %	55.0 %

	0	50	100
Tasa de verdaderos positivos	43.0 %	50.0 %	56.0 %
Tasa de falsos negativos	57.0 %	50.0 %	44.0 %

Tabla 16: resultados con el clasificador *Ensemble Subspace Discriminant*

Considerando los resultados globales, el 50,0 % de los casos se pronosticaron correctamente.

La curva ROC y el área bajo curva correspondiente (AUC) se pueden apreciar en la figura 40.

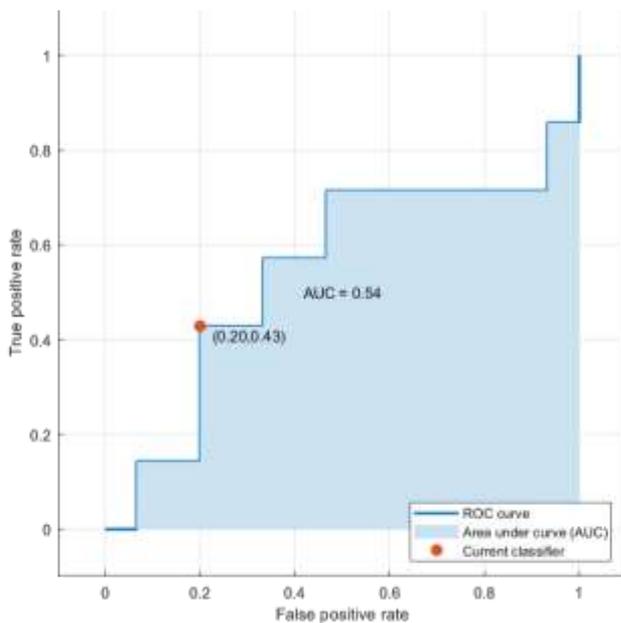


Figura 40: Curva ROC obtenida con el clasificador Ensemble Subspace Discriminant. Se obtiene un AUC de 0,54.

### 5.6.1.2 Región de mayor calidad de imagen del endometrio incluyendo la cavidad endometrial

Entre todos los clasificadores evaluados, el mejor rendimiento se logró con el clasificador k-Nearest Neighbourhood, que consiste en hacer predicciones buscando en todo el conjunto de entrenamiento para las K instancias más similares (los vecinos) y resumiendo la variable de salida para esas instancias K. Para determinar cuáles de las instancias de K en el conjunto de datos de

capacitación son más similares a una nueva entrada, se utiliza una medida de distancia. La medida de distancia más popular es la distancia euclidiana. Los resultados obtenidos en el conjunto de datos con validación cruzada en 5 pasos están resumidos en la tabla nº 17.

Embarazo evolutivo			Predicción		
			0	50	100
Original	N	0	2	1	4
		50		2	4
		100			9

	0	50	100
Valor predictivo positivo	100.0 %	67.0 %	53.0 %
Tasa de falsos descubrimientos		33.0 %	47.0 %

	0	50	100
Tasa de verdaderos positivos	29.0 %	33.0 %	100.0 %
Tasa de falsos negativos	71.0 %	67.0 %	

Tabla 17: resultados con el clasificador k-Nearest Neighbourhood

Considerando los resultados globales, el 59,1 % de los casos se pronosticaron correctamente.

La curva ROC y el área bajo curva correspondiente (AUC) se pueden apreciar en la figura 41.

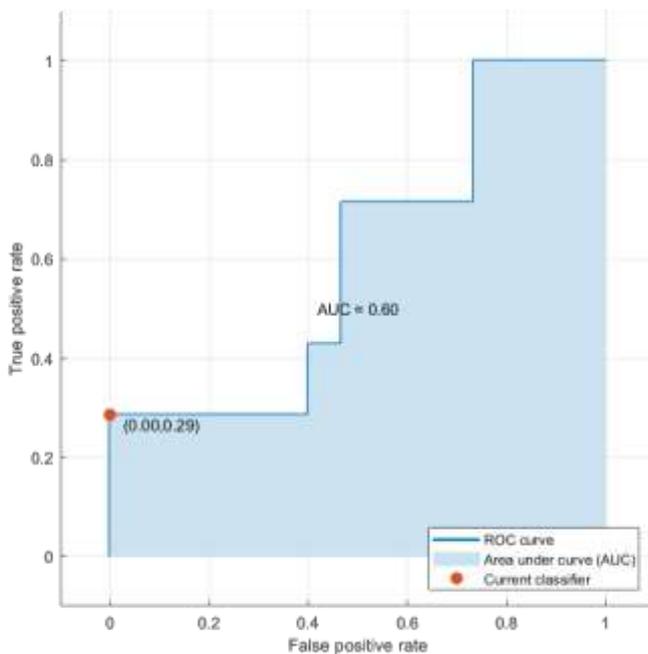


Figura 41: Curva ROC obtenida con el clasificador KNN. Se obtiene un AUC de 0,60.

### 5.6.1.3 Endometrio completo incluyendo cavidad endometrial

Entre todos los clasificadores evaluados, el mejor rendimiento se logró con el clasificador de *Quadratic Support Vector Machine*, que consiste en una representación de los puntos de muestra en un espacio de dimensionalidad muy alta o incluso infinita, para poder separar las clases en 3 espacios tanto como sea posible mediante la construcción del hiperplano o conjunto de hiperplanos que maximizan la distancia a los puntos más cercanos, cada uno perteneciente a cada uno de los grupos (vectores de soporte).

Los resultados obtenidos en el conjunto de datos con validación cruzada en 5 pasos están resumidos en la tabla nº 18.

Embarazo evolutivo		Predicción			
		0	50	100	
Original	N	0	2	2	3
		50		4	2
		100	2	1	6

		0	50	100
Valor	predictivo	50.0 %	57.0 %	55.0 %
Tasa	de falsos descubrimientos	50.0 %	43.0 %	45.0 %

		0	50	100
Tasa	de verdaderos positivos	29.0 %	67.0 %	67.0 %
Tasa	de falsos negativos	71.0 %	33.0 %	33.0 %

Tabla 18: resultados con el clasificador de *Quadratic Support Vector Machine*

Considerando los resultados globales, el 54,5 % de los casos se pronosticaron correctamente.

La curva ROC y el área bajo curva correspondiente (AUC) se pueden apreciar en la figura 42.

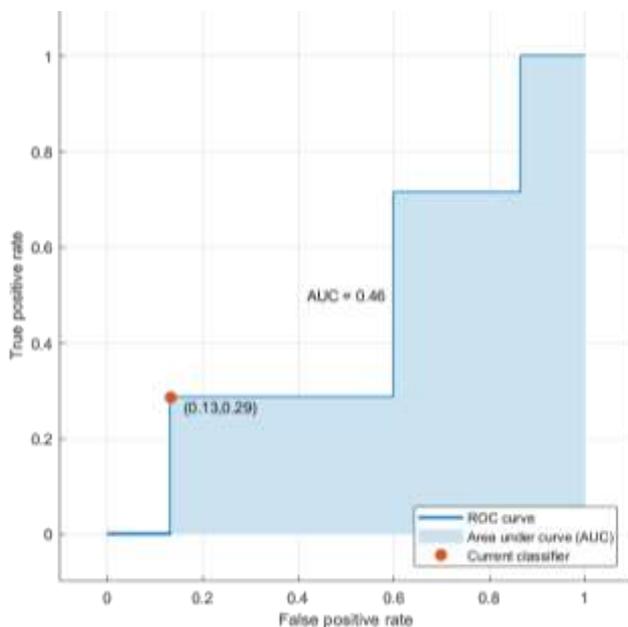


Figura 42: Curva ROC obtenida con el clasificador *Quadratic Support Vector Machine*. Se obtiene un AUC de 0,46.

## 5.6.2 Tasa de implantación 50 % - 100%

### 5.6.2.1 Región de mayor calidad de imagen del endometrio

Entre todos los clasificadores evaluados, el mejor rendimiento se logró con el clasificador de árbol de decisión, que consiste en un modelo predictivo que conduce de diferentes observaciones a conclusiones sobre el valor objetivo. Las hojas del árbol representan etiquetas de clase y las ramas representan conjuntos de características que conducen a esas etiquetas de clase. Los resultados obtenidos en el conjunto de datos con validación cruzada en 5 pasos están resumidos en la tabla n° 19.

Embarazo evolutivo			Predicción	
			50	100
Original	N	50	5	1
		100	2	7

	50	100
Valor predictivo positivo	71.0 %	88.0 %
Tasa de falsos descubrimientos	35.0 %	41.0 %

	50	100
Tasa de verdaderos positivos	83.0 %	78.0 %
Tasa de falsos negativos	17.0 %	22.0 %

Tabla 19: resultados con el clasificador de árbol de decisión

Considerando los resultados globales, el 80,0 % de los casos se pronosticaron correctamente.

La curva ROC y el área bajo curva correspondiente (AUC) se pueden apreciar en la figura 43.

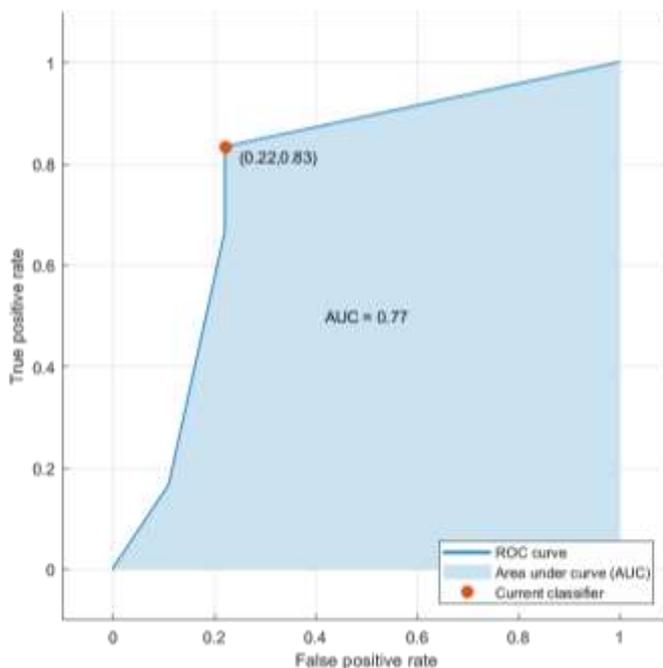


Figura 43: Curva ROC obtenida con el clasificador basado en árbol de decisión. Se obtiene un AUC de 0,77.

### 5.6.2.2 Región de mayor calidad de imagen del endometrio incluyendo la cavidad endometrial

Entre todos los clasificadores evaluados, el mejor rendimiento se logró con el clasificador *Ensemble Subspace Discriminant*, que consiste en combinar varios clasificadores para mejorar las capacidades generales de predicción. Los resultados obtenidos en el conjunto de datos con validación cruzada en 5 pasos están resumidos en la tabla n° 20.

Embarazo evolutivo			Predicción	
			50	100
Original	N	50	3	3
		100	2	7

	50	100
Valor predictivo positivo	60.0 %	70.0 %
Tasa de falsos descubrimientos	40.0 %	30.0 %

	50	100
Tasa de verdaderos positivos	50.0 %	78.0 %
Tasa de falsos negativos	50.0 %	22.0 %

Tabla 20: resultados con el clasificador *Ensemble Subspace Discriminant*

Considerando los resultados globales, el 66,7 % de los casos se pronosticaron correctamente.

La curva ROC y el área bajo curva correspondiente (AUC) se pueden apreciar en la figura 44.

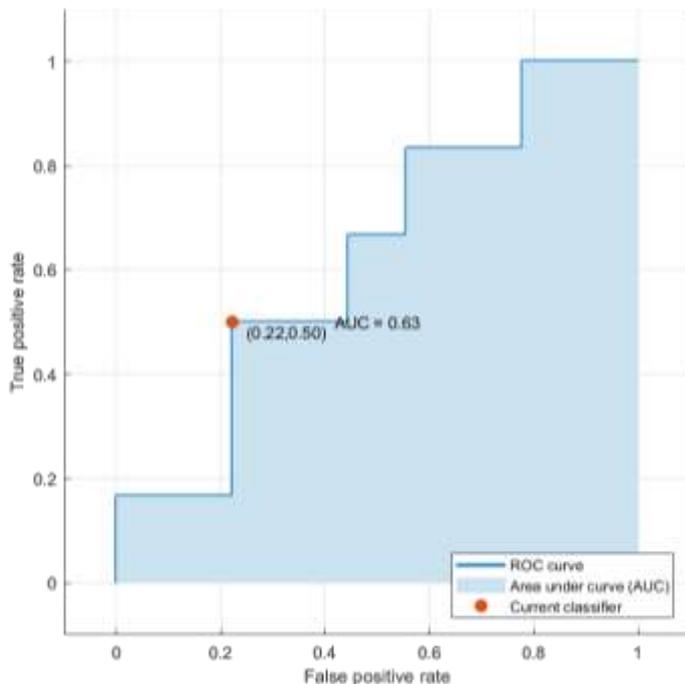


Figura 44: Curva ROC obtenida con el *Ensemble Subspace Discriminant*. Se obtiene un AUC de 0,63.

### 5.6.2.3 Endometrio completo incluyendo la cavidad endometrial

Entre todos los clasificadores evaluados, el mejor rendimiento se logró con el clasificador de Regresión logística, que es un algoritmo de clasificación binario estrechamente relacionado con Máquinas de vectores de soporte (SVM). Los resultados obtenidos en el conjunto de datos con validación cruzada en 5 pasos están resumidos en la tabla nº 21.

Embarazo evolutivo			Predicción	
			50	100
Original	N	50	5	1
		100	2	7

	50	100
Valor predictivo positivo	71.0 %	88.0 %
Tasa de falsos descubrimientos	29.0 %	13.0 %

	50	100
Tasa de verdaderos positivos	83.0 %	78.0 %
Tasa de falsos negativos	17.0 %	22.0 %

Tabla 21: resultados con el clasificador de Regresión logística

Considerando los resultados globales, el 80,0 % de los casos se pronosticaron correctamente.

La curva ROC y el área bajo curva correspondiente (AUC) se pueden apreciar en la figura 45.

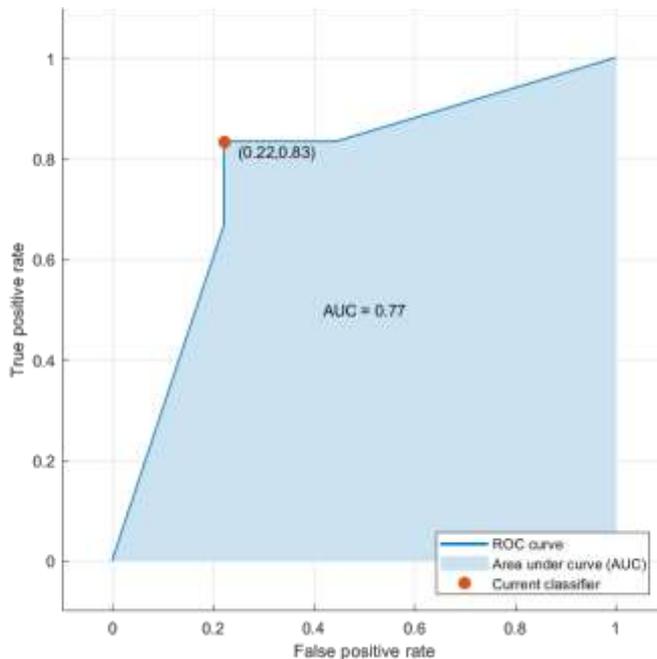


Figura 45: Curva ROC obtenida con el clasificador de regresión logística. Se obtiene un AUC de 0,77.

## 5.7 Resumen del análisis de clasificadores basados en Machine Learning

En conclusión, la región en la que los clasificadores consiguieron mayor tasa de acierto es el endometrio completo incluyendo la cavidad endometrial (Tabla 22, 23,24, 25).

<b><u>EMBARAZO</u></b> <b><u>EVOLUTIVO</u></b>	<b>Endometrio completo incluyendo cavidad endometrial</b>	<b>Región de mayor calidad de imagen del endometrio</b>	<b>Región de mayor calidad de imagen del endometrio incluyendo cavidad endometrial</b>
<b>Acierto</b>	63,3 %	58,3 %	65,0 %
<b>AUC</b>	0,65	0,59	0,67
<b>Modelo de clasificación</b>	SVM	KNN	Linear Discriminant

Tabla 22: Análisis de clasificadores basados en *Machine Learning* sobre Ongoing Pregnancy Rate

<b><u>TASA DE IMPLANTACIÓN</u></b> <b><u>0 vs. 50 o 100</u></b>	<b>Endometrio completo incluyendo cavidad endometrial</b>	<b>Región de mayor calidad de imagen del endometrio</b>	<b>Región de mayor calidad de imagen del endometrio incluyendo cavidad endometrial</b>
<b>Acierto</b>	63,3 %	58,3 %	66.7 %
<b>AUC</b>	0,64	0,53	0,59
<b>Modelo de clasificación</b>	SVM	SVM	SVM

Tabla 23: análisis de clasificadores basados en *Machine Learning* sobre Implantation Rate

<b><u>TASA DE IMPLANTACIÓN</u></b> <b><u>0 vs. 50 vs. 100 en</u></b> <b><u>DET</u></b>	<b>Endometrio completo incluyendo cavidad endometrial</b>	<b>Región de mayor calidad de imagen del endometrio</b>	<b>Región de mayor calidad de imagen del endometrio incluyendo cavidad endometrial</b>
<b>Acierto</b>	54,5 %	50,0 %	59,1 %
<b>AUC</b>	0,46	0,54	0,60
<b>Modelo de clasificación</b>	SVM	Ensamble Subspace Discriminant	KNN

Tabla 24: análisis de clasificadores basados en *Machine Learning* sobre Implantation Rate 0 vs. 50 vs. 100 en doble transferencia embrionaria.

<b><u>TASA DE IMPLANTACIÓN</u></b> <b><u>50 vs. 100 en DET</u></b>	<b>Endometrio completo incluyendo cavidad endometrial</b>	<b>Región de mayor calidad de imagen del endometrio</b>	<b>Región de mayor calidad de imagen del endometrio incluyendo cavidad endometrial</b>
<b>Acierto</b>	80,0 %	80,0 %	66.7 %
<b>AUC</b>	0,77	0,77	0,63
<b>Modelo de clasificación</b>	Logistic Regression	Tree	Ensamble Subspace Discriminant

Tabla 25: análisis de clasificadores basados en *Machine Learning* sobre Implantation Rate 50 vs. 100 en doble transferencia embrionaria.

# Discusión



## DISCUSIÓN

El éxito de un tratamiento reproductivo sigue estando limitado por fenómenos relacionados con la implantación embrionaria, a pesar de los importantes avances en los últimos 20 años de las técnicas de reproducción asistida (TRA) y pese a la creciente atención por el estudio de la fisiología endometrial.

Estudiar los procesos que regulan dicha implantación resulta complicado, en parte por las diferencias existentes entre los seres humanos y los animales de experimentación, y también por los aspectos éticos, morales y legales que limitan el estudio directo del embrión en el momento en que interactúa con el endometrio.

Los factores implicados en el éxito de la implantación embrionaria en reproducción asistida son principalmente tres:

- la receptividad endometrial
- la calidad embrionaria
- la eficiencia de la técnica de transferencia (Schoolcraft 2016).

Solo si el embrión es transferido en el sitio correcto (fundus uterino) (Wang Y 2018) de forma atraumática y en un endometrio adecuado, un embrión morfológicamente normal podrá presentar una alta probabilidad de implantar.

El endometrio humano es un tejido complejo y dinámico que sufre modificaciones a lo largo del ciclo menstrual en respuesta a cambios en los niveles de las hormonas esteroideas circulantes. La implantación embrionaria, para ser exitosa, debe coincidir con la fase de máxima

receptividad endometrial, período temporalmente definido que se extiende entre los días 6 y 10 post-ovulación y que es conocido como ventana de implantación (Lessey 2011). Si un embrión, independientemente de su calidad, fuese transferido fuera de la ventana de implantación, en cualquier otra fase del ciclo menstrual, encontraría un endometrio no receptivo y, por tanto, sería incapaz de implantar. La ventana de implantación puede alterarse por la estimulación ovárica (Haouzi D 2010): por la presencia de una patología uterina/tubárica (Donaghay M 2007), por factores ambientales o de forma intrínseca en una paciente.

El estudio de la receptividad endometrial sigue recibiendo mucha atención por parte de la comunidad científica, pues aún representa un misterio sin resolver. Durante más de 50 años la evaluación histológica se consideró el método de referencia para su análisis (Noyes R 1950) pese a ser claramente inexacto (Coutifaris C., 2004; Murray M., 2004). La medición de los niveles séricos de estradiol (E2) (Simón C 1998) y progesterona (P) (Fanchin R 1993) el último día de la estimulación ovárica controlada (HOC) (Bosch 2015) junto a la ecografía endometrial (Friedler S., 1996), y más recientemente, algunos métodos de estudio molecular como la transcriptómica (Horcajadas., 2007; Ruiz-Alonso M., 2012) o la proteómica (Scotchie J., 2009) son las principales técnicas utilizadas en la actualidad para evaluar la receptividad endometrial, pese a no haber consenso sobre su papel pronóstico real en la tasa de implantación embrionaria.

A día de hoy la ecografía transvaginal, método no invasivo de fácil realización, supone el procedimiento de rutina más empleado en la práctica clínica diaria durante una TRA para la valoración del endometrio y la

estimación indirecta de su receptividad. Los parámetros considerados como factores predictivos de receptividad endometrial incluyen:

1. Patrón y grosor endometrial (Zhao J, 2014)
2. vascularización endometrial y sub-endometrial (Wang L, 2010)
3. Volumen endometrial.

### ***6.1 Modelo de donación de óvulos***

La receptividad endometrial es un factor clave en reproducción humana, tanto tras un ciclo natural espontáneo como tras la realización de técnicas de reproducción asistida. El éxito de un tratamiento de donación de óvulos depende fundamentalmente de este factor, excluyendo normalmente el factor embrionario pues la calidad de los ovocitos procedentes de la donante suele ser óptima (Budakx E, 2007). Con el fin que la paciente receptora de los óvulos esté en un estado de receptividad endometrial adecuado, se administra un tratamiento con hormonas esteroideas ováricas exógenas que facilita la sincronización entre la donante y la receptora.

### ***6.2 Ciclo sustituido con o sin supresión hipofisaria VS. Ciclo natural***

En una Cochrane del 2017 (Ghobara T, Cochrane Database Syst Rev. 2017) que incluyó 18 RCTs comparando diferentes protocolos de transferencia de embriones congelados (FET) en un total de 3815 pacientes.

Se demostró que no había una evidencia científica sólida que indicara el uso de un ciclo natural con o sin administración de hCG para desencadenar la ovulación o de una preparación endometrial con terapia

hormonal sustituida, con o sin supresión hipofisaria. No se demostró ninguna diferencia significativa en termino de resultados clínicos entre ciclo natural y ciclos sustituidos.

En marzo 2018 también se publicó un ensayo controlado aleatorio prospectivo (Agha-Hosseini M, 2018) para investigar si había una diferencia en los resultados del embarazo entre los ciclos modificados de transferencia de embriones congelados y descongelados (NC-FET) y los ciclos artificiales (AC) -FET en mujeres que tenían ciclos menstruales regulares. No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos con respecto a las tasas de embarazo bioquímico, clínico y en curso (48,2% vs 45,9%,  $p > 0,05$ ; 38,9% vs 35,3%,  $p > 0,05$ ; y 37,6% vs 34,1%,  $p > 0,05$ , respectivamente), así como las tasas de nacidos vivos o abortos espontáneos por ciclo (35,3% vs 31,8%,  $p > 0,05$ ; y 1,2% vs 1,2%,  $p > 0,05$ , respectivamente).

En conclusión, los hallazgos sugirieron que, aunque ambos protocolos de FET son igualmente efectivos en términos de resultados de embarazo en mujeres con ciclos menstruales regulares, NC-FET es más favorable porque no requiere medicación, no tiene eventos adversos y tiene una reducción significativa de los costes.

### ***6.3 Grosor endometrial***

Hasta la actualidad hay publicados numerosos estudios que han tratado de establecer un límite inferior por debajo del cual la gestación resulta más dificultosa o incluso imposible, acuñándosele a éste límite el nombre genérico de endometrio fino.

Así, la consideración de un grosor endometrial fino ha variado mucho a lo largo de la literatura (tabla 26) (Frydman R, 2011).

<u>Grosor</u>	<u>Autores</u>
< 5 mm	DIX (2010)
< 6 mm	SOARES (2008)
< 6,3 mm	DE GEYTER (2000)
< 7 mm	BASIR (2002) VERNAEVE (2007) BELLVER (2007) SHUFARO (2008) QUBLAH (2008) GLEICHER (2011)
< 8 mm	TAKASHI (2010) BONILLA-MUSOLES (2010)
< 9 mm	NOYES (2005) BORINI (1996) SHER (2002) ZHANG (2005)
< 10 mm	RINALDI (1996)

Tabla 26. Criterios de grosor endometrial fino (Tomado de Frydman R, 2011)

También hay estudios que muestran la frecuencia de grosos endometriales finos en la población general (tabla 27), parámetro también variable en la literatura (Frydman R, 2011).

Grosor	%	Autores
< 3 mm	3,1%	NOYES (2001)
< 7 mm	0,9%	SHUFARO (2008)
	12,8 %	NOYES (2001)
	6,9%	AMIR (2007)

Tabla 27. Grosor endometrial fino en población general (Tomado de Frydman R, 2011)

Un grosor endometrial entre 5 y 8 mm en el momento periovulatorio es el que se refiere como normal en la literatura, mientras que existe el consenso según el cual un grosor endometrial inferior a 6 mm tiene un valor predictivo negativo muy elevado para predecir el embarazo (Gonen Y y Casper RF, 1990; Melo MA y col. 2006; Richter KS y colaboradores; 2007). Aunque conocemos que son posibles gestaciones con grosores muy reducidos incluso inferiores a 4 mm (Remohí J y colaboradores, 1997), un grosor adecuado debe superar los 10 mm (Bonilla-Musoles F y colaboradores 2010) No obstante, en una revisión de 25 trabajos que incluían 2.665 ciclos de tratamiento, Friedler S y colaboradores (1996) observaron que sólo en 8 estudios (1.203 ciclos) se encontraron diferencias significativas entre el grosor endometrial de los ciclos con embarazo y los que no lo conseguían. Los rangos para el grosor endometrial son similares para los ciclos con concepción (8,6-11,8 mm) y los ciclos sin embarazo (8,6- 11,9 mm) De modo parecido al patrón endometrial, incluso un grosor del endometrio superior a 10 mm tiene un valor predictivo y una especificidad bajos como predictores de embarazo, de 49 y 20% respectivamente.

Contrariamente, un estudio de 1.294 ciclos de fertilización in vitro confirma una estrecha relación entre el grosor endometrial y la tasa de embarazo. En él, los autores cuestionan que, aunque no es una práctica infrecuente cancelar la transferencia de embriones con un endometrio delgado, con un endometrio que mida 6 mm se pueden alcanzar tasas de embarazo superiores al 50% (Raine-Fenning N y colaboradores, 2002).

Muchos estudios han investigado la relación existente entre el grosor endometrial y la tasa de gestación en pacientes sometidas a tratamientos de fecundación in vitro (FIV) con resultados dispares (Kovacs P 2003; Grant D 2007; Richter K 2007; Al-Ghamdi A 2008; Traub M 2009; Barker M 2009). En un reciente estudio de Zollner U y colaboradores (2012), se analizó la relación entre el espesor endometrial, medido el día de la transferencia embrionaria de embriones congelados, y la obtención de la gestación, tanto en ciclos artificiales como el ciclo espontáneo, no encontrando diferencias estadísticamente significativas.

Otro aspecto importante de esta práctica es que no existe ningún tratamiento basado en la evidencia científica que asegure que el endometrio puede aumentar su grosor en los siguientes ciclos.

En el campo de la reproducción asistida se observa además que ciertos protocolos de estimulación ovárica han mostrado un efecto deletéreo sobre el endometrio, como es el caso del clomifeno y de los antagonistas de la GnRH (Bonilla-Musoles F y Pérez Gil M, 1988). Estos tratamientos, fundamentalmente el empleo de antagonistas de la GnRH puede producir una luteinización precoz con la consecuente elevación de los niveles de progesterona. El mecanismo por el cual niveles aumentados de esta hormona interfieren en la consecución de la gestación es hoy en día aún desconocido.

Se postula que este aumento de la progesterona produce un endometrio “fuera de fase”, acelerando la maduración endometrial y su transformación hacia un endometrio secretor (Bosch E y colaboradores, 2003).

Algunos autores han analizado también la relación de este parámetro ecográfico con la fisiopatología, después de la consecución de la gestación.

Se ha observado que el espesor endometrial medido 14 días después de la transferencia embrionaria aumenta de forma estadísticamente significativa en las pacientes que quedaron gestantes respecto a las pacientes que no consiguieron gestación (Zohav E y colaboradores, 2008). Se ha analizado también la relación entre éste y otros parámetros ecograficos como posibles predictores del nacimiento de un recién nacido vivo frente a la posibilidad de un aborto precoz, encontrándose datos dispares entre los diferentes estudios (Ng EH y colaboradores, 2007; Zohav E y colaboradores, 2008).

Una revisión sistemática y meta-análisis reciente de 22 estudios observó que la tasa de gestación clínica se reducía significativamente, en alrededor de un 60 %, en pacientes con un grosor endometrial  $\leq 7$  mm al final de la estimulación ovárica. Sin embargo, esta situación fue bastante infrecuente, pues sólo se evidenció en un 2,4 % de los casos reportados (Kasius A, 2014)

El trabajo de Dix y Check mostró resultados parecidos: el porcentaje de gestación clínica se redujo a un 8,5 % por transferencia cuando el grosor endometrial fue inferior a 6 mm (Dix E, 2010) Analizando un total de 10.046 primeros ciclos de FIV, Bu y Sun también llegaron a la misma conclusión: en presencia de un endometrio más delgado y especial  $\leq 7$  mm el día de la administración de la gonadotropina coriónica humana (hCG), las tasas de embarazo evolutivo se reducían significativamente, independientemente de la respuesta ovárica de la paciente (Bu Z, 2015.).

Sin embargo, la incidencia de endometrio fino fue de nuevo baja (1,5-2,5 %) (25). Un endometrio delgado ( $\leq 7$  mm) parece no relacionarse solo con tasas reducidas de concepción, sino también con una probabilidad aumentada de aborto espontáneo y embarazo ectópico, como se demostró en otro estudio retrospectivo reciente que incluyó 10.787 ciclos en fresco de FIV (Yuan X, 2016).

En un estudio retrospectivo de cohorte sobre más de 40.000 embryo transfer, (tras analizar 24363 transfers en frescos y 20114 transfer de embriones congelados) se vio como en la clinical pregnancy y la live birth rates se reducía y los abortos subían por cada reducción milimétrica del grosor endometrial a partir de 8 mm en los ciclos en fresco, a partir de 7 mm en los transfers congelados (Liu KE y colaboradores, 2018).

Si también en el estudio retrospectivo de cohorte de 1512 ciclos de IVF realizados en China el cut-off parecía ser de 8,75 mm (Zhang y colaboradores, 2018), en otro estudio retrospectivo, publicado en el 2018 (Gallos ID y colaboradores, 2018), el grosor endometrial optimo parece ser a partir de 10 mm tras analizar 25767 tratamientos de IVF realizados en UK entre el 2007 y el 2016.

Aún no queda claro el mecanismo por el cual un endometrio más delgado asocia tasas de embarazo reducidas. Según Casper, la mayor tensión de oxígeno presente en la capa basal de un endometrio fino podría ser uno de los factores responsables del fallo de implantación (Casper R. 2011)

El endometrio delgado o fino parece estar claramente relacionado con un peor pronóstico reproductivo en TRA al generar una deficiente implantación embrionaria. Por ello, la ecografía vaginal sigue siendo un arma diagnóstica útil para la valoración del aspecto endometrial y así de su posible

receptividad, al menos hasta que otros tests diagnósticos más recientes queden completamente validados. De este modo, para estudiar las estrategias de mejora de la receptividad endometrial deberíamos distinguir entre aquellas dirigidas a endometrios morfológicamente normales (aspecto y grosor) por ecografía, y aquellas a aplicar en endometrios francamente patológicos (delgados pese a la presencia de buenas concentraciones séricas de estrógenos e/o irregulares).

#### ***6.4 Patrón endometrial***

Los patrones morfológicos se han relacionado en múltiples estudios con la receptividad endometrial, considerando la implantación y el embarazo como resultado de una receptividad adecuada y demostrando de forma repetida que el patrón trilaminar es mejor que el hiperecogénico en el día de la ovulación o en el día de la administración de la gonadotropina coriónica humana en los tratamientos de reproducción asistida (Cohen BM y colaboradores, 1992; Fanchin R y colaboradores, 2000; Killick SR, 2007). Mientras que algunos estudios basados en esta evaluación subjetiva de la ecogenicidad han aportado datos contradictorios sobre su relación con la posibilidad o no de gestación (Sher y colaboradores, 1991; Gonen y Casper RF, 1990; Al-Shawaf I y colaboradores, 1993) otros han intentado relacionar la receptividad endometrial con el aspecto ecográfico del endometrio a través de una valoración algo más objetiva del mismo mediante la aplicación de sistemas informáticos medidores de su ecogenicidad, como es el caso de Leibovitz y colaboradores (1999).

Un estudio de Friedler y colaboradores en 1996 (Friedler S y colaboradores, 1996) demostró que, mientras un endometrio homogéneo sin patrón trilaminar en el día de administración de la gonadotropina coriónica humana para desencadenar la ovulación en los ciclos de reproducción asistida tiene un valor predictivo negativo del 87,5% para conseguir quedar gestante, un patrón endometrial trilaminar el mismo día sólo tiene un valor predictivo positivo del 33,1 % y una especificidad del 13,7% para la predicción del embarazo. Así, la presencia de un endometrio trilaminar no parece garantizar un resultado exitoso, incluso cuando se obtengan embriones de buena calidad.

Además del aspecto morfológico del endometrio, también otras valoraciones más objetivas como el grosor y el volumen han sido evaluadas como marcadores de la receptividad endometrial, existiendo aún importantes discrepancias sobre su valor predictivo en la literatura (Frydman R, 2011).

### ***6.5 Volumen endometrial***

El volumen endometrial ha sido estudiado por muchos investigadores como predictor de la receptividad endometrial uterina con hallazgos contradictorios de forma similar a lo expuesto anteriormente con la medida del grosor endometrial. El primer estudio realizado a estos efectos es el trabajo de Raga F y colaboradores (1999). Este estudio seleccionó 72 primeros ciclos de estimulación ovárica para posterior fecundación in vitro con el objetivo de evaluar el papel del cálculo del volumen endometrial, medido mediante ecografía tridimensional como predictor de receptividad endometrial en esta técnica de reproducción asistida. Se clasificaron los

ciclos de acuerdo al volumen endometrial obtenido el día de la transferencia embrionaria en tres grupos: volumen menor de 2 ml, volumen entre 2 y 4 ml, y volumen mayor de 4 ml. Los índices de implantación y gestación fueron significativamente menores ( $p < 0,05$ ) en el grupo con volumen endometrial menor 2 ml, sin obtenerse ninguna gestación cuando el volumen fue menor de 1 ml. En los otros dos grupos no se encontraron diferencias significativamente estadísticas entre el grupo de embarazo y el de no embarazo. El volumen mínimo encontrado con consecución de gestación fue de 1,2 ml. Este estudio concluye que la volumétrica 3D es un parámetro objetivo y preciso para predecir la receptividad endometrial.

Mientras que este primer estudio realizado (Raga F y colaboradores, 1999), así como la mayoría de los que siguieron, sugieren que el volumen endometrial en el día de la administración de la hCG, el día de recuperación de ovocitos o el día de la transferencia de los embriones, es básico a la hora de los resultados reproductivos, otros no han hallado correlación con la posibilidad de embarazo en ciclos de fertilización in vitro (Yaman C y colaboradores, 2000; Kupesic S y colaboradores, 2001; Schild RL y colaboradores, 2000; Järvelä IY y colaboradores, 2005; Ng EH y colaboradores, 2006; Ng EH y colaboradores, 2007).

Muchos de los trabajos que estiman el volumen endometrial y su relación con la receptividad uterina valoran también el grado de perfusión endometrial y subendometrial mediante el uso de la aplicación ecográfica tridimensional *Power-Doppler*.

Un trabajo de Alcázar JL (2006) resume los resultados de un número considerable de estudios acerca del valor de la ecografía tridimensional, en sus variantes de cálculo de volumen y de medición de flujos endometriales y

submendometriales, como predictores de la receptividad endometrial. Estos resultados quedan reflejados en la tabla 28.

Summary of data published about the role of 3D-ultrasound for predicting outcome in IVF program

Author	N	Primary outcome	3D Method	Day 3D US	Sub-endometrial area	Pregnancy rate (PR)	Findings
Rago (65)	72	Pregnancy rate	Multislice	Embryo transfer		29.2%	No pregnancy if endometrial volume < 1 ml If endometrial volume ≥ 2 ml, no difference in PR
Schild (64)	47	Pregnancy rate	Multislice	Oocyte retrieval		31.0%	No difference in endometrial volume between conception and non-conception cycles
Yaman (66)	63	Pregnancy rate	Multislice	HCG		32.3%	No difference in endometrial volume between conception and non-conception cycles No pregnancy if endometrial volume < 2.5 ml
Zolner (67)	125	Pregnancy rate	Multislice	Embryo transfer		27.2%	PR 35% if endometrial volume ≥ 2.5 ml PR 9% if endometrial volume < 2.5 ml
Schild (68)	96	Pregnancy rate	Multislice	1 <sup>st</sup> day ovarian stimulation		20%	Subendometrial VI, FI and VFI lower in conception cycles
Kupesic (69)	89	Pregnancy rate	Multislice	Embryo transfer	5 mm	31.5%	No difference in endometrial volume, subendometrial VI and VFI between conception and non-conception cycles Subendometrial FI higher in conception cycles
Wu (70)	34	Pregnancy rate	Multislice	HCG	5 mm	50%	Subendometrial VFI higher in conception cycles. No differences in subendometrial VI and FI No differences in endometrial VI, FI and VFI
Jarvela (71)	35	Pregnancy rate	VOCAL	Before HCG and 36 hours after oocyte retrieval	10 mm	37%	No difference in endometrial volume, endometrial/subendometrial VI, FI and VFI
Ng (73)	451	Pregnancy rate	VOCAL	Oocyte retrieval	1 mm	20.8%	Endometrial VI and VFI lower in conception cycles. No differences in endometrial volume and subendometrial VI, FI and VFI

Tabla 28: Revisión de publicaciones sobre el valor predictivo de ecografía 3D. (Tomado de Alcazar JL, 2006)

Mercé y colaboradores (2008) publicaron un estudio en el que evaluaban estos parámetros ecográficos tridimensionales en ciclos de fecundación in vitro el día de la administración de la hCG. Concluyeron que no había diferencias significativamente estadísticas entre el grupo de mujeres

gestantes y no gestantes en cuanto al grosor endometrial y el patrón endometrial. Sin embargo, sí las obtuvieron en el caso de la valoración del volumen endometrial y el índice de vascularización (IV), índice de flujo (FI) y índice de vascularización de flujo (VFI) endometriales, siendo éstos mayores en el caso de las pacientes que sí quedaron gestantes.

En el trabajo de Zollner U y colaboradores (2012) ya comentado con anterioridad en el caso del espesor endometrial, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al volumen endometrial como predictor de la gestación en ciclos de transferencia de embriones congelados. Además, habla de volúmenes mínimos asociados a embarazo de 1,6 ml en el caso de ciclos espontáneos, frente a 2,1 ml para los ciclos artificiales.

El volumen endometrial se ha relacionado también con resultados gestacionales sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre ciclos que obtuvieron un recién nacido vivo con ciclos que finalizaron en un aborto precoz (Ng EH y colaboradores, 2007; Zohav E y colaboradores, 2008). En el estudio de Zohav E y colaboradores encontraron además una probabilidad mayor de aborto precoz de forma estadísticamente significativa para volúmenes endometriales menores de 2 ml.

En la revisión que hizo Yaman en el 2012 (Yaman, 2012) evidenció como las interacciones entre endometrio y blastocisto juegan un papele mucho más importante del volumen endometrial y de la vascularización endometrial y subendometrial.

Recientemente, en noviembre 2018, el grupo austriaco liderado por Mayer, hizo un estudio de cohorte retrospectivo realizando una evaluación 3D power Doppler 30 minutos antes de la transferencia embrionaria. Dividió la polución en dos grupos (pregnant “yes” y pregnant “not”).

Vio como había diferencias significativas de volumen endometrial en los dos grupos, pero los parámetros de la vascularización (IF, IVF y IV) se mantenían iguales

### ***6.6 Vascularización endometrial y subendometrial: 3D Power Doppler.***

La aplicación de ecografía tridimensional Power-Doppler, también perteneciente al programa VOCAL, es capaz de calcular tres índices angiográficos: el índice de vascularización (IV), el índice de flujo (IF) y el índice de vascularización de flujo (IVF), los cuales representan el número de vasos venosos, el flujo sanguíneo y la perfusión endometrial, respectivamente. El índice de vascularización (IV) muestra el porcentaje de voxels coloreados respecto al número total de voxels.

Chien LW y colaboradores (2002) valoraron de forma semicuantitativa la presencia de flujo sanguíneo dentro del endometrio y en el área subendometrial el día de la transferencia de embriones. Mientras la tasa de embarazo total fue de 28,4%, las tasas de implantación y de embarazo por transferencia en las pacientes que presentaron flujo endometrial y subendometrial fueron de 47,8 y 24,2% respectivamente. Estos valores cayeron hasta 29,7 y 15,8% cuando sólo se evidenció flujo subendometrial y hasta 7,5 y 3,5% cuando no se detectó flujo mediante la señal color.

Kupesic S y colaboradores (2001) utilizando la angiografía power Doppler 3D en el día de la transferencia de embriones, demostraron un IF endometrial más alto en aquellos ciclos en los que la mujer quedó gestante, pero no encontraron diferencias para los valores de IV e IVF.

Wu HM y colaboradores (2003) también encontraron que la angiografía power Doppler 3D en el día de la administración de hCG es un factor esencial que determina la receptividad endometrial pues comprobaron que el IVF subendometrial era el mejor predictor de gestación siendo superior al IV, IF y volumen endometrial cuando se analizaron mediante una curva operador - receptor (ROC).

La ecografía 3 D también se ha utilizado para evaluar la vascularización endometrial y determinar la receptividad endometrial antes de la estimulación ovárica. Concretamente Schild RL y colaboradores (2000) evaluaron estos índices el primer día de la estimulación ovárica controlada, encontrando valores de VI, FI y IVF subendometriales menores en aquellos ciclos en los que se consiguió gestación.

La mayoría de estos estudios, utilizando ecografía 2D y 3D, han evaluado un solo momento y no han considerado las variaciones cíclicas que se producen a través del ciclo menstrual y durante la estimulación ovárica controlada, la cual puede ser un factor negativo para el desarrollo endometrial. Raine-Fenning NJ y colaboradores (2004) lo hicieron durante el ciclo menstrual normal de pacientes con subfertilidad no explicada (figura 24).

Los cambios cíclicos en la vascularización endometrial y subendometrial se caracterizan por un pico preovulatorio y una caída máxima post-ovulatoria de los índices energía Doppler 3D en el momento de la ventana de la implantación. Un patrón similar se observó en mujeres con subfertilidad de causa desconocida, aunque estas mujeres tenían valores preovulatorios de los índices Power-Doppler 3D significativamente más bajos.

Ng EH y colaboradores (2006) encontraron un IV e IVF endometriales más bajos en el día de la recuperación de los ovocitos en las mujeres que quedaban gestantes tras un ciclo de fertilización in vitro que un grupo similar pero que no quedó gestante, mientras que el IF endometrial y los IV, IF e IVF subendometrial y el volumen endometrial fueron similares en ambos grupos. El valor predictivo de receptividad endometrial de los índices Power-Doppler 3D, sin embargo, fue pobre, con un área bajo la curva próxima a 0,5 para todos los índices.

Se ha considerado el VI endometrial como el mejor parámetro predictor de la obtención de un recién nacido vivo frente a la aparición de un aborto precoz, con una sensibilidad del 80,7% y una especificidad del 42,9%. (Zollner U y colaboradores, 2012).

En el 2009 NG y colaboradores realizaron una ecografía 3D Power Doppler en el día de la hCG y del transfer. Tras dividir la población del estudio en dos grupos (embarazo si vs no), vieron que no había diferencias significativas de los cambios de vascularización en los dos grupos y que entonces estos cambios de vascularización entre el día del hCG e día 5 no eran predictivos de embarazo en los tratamientos de IVF.

A la misma conclusión llegaron en el 2016 Zhang y colaboradores.

En el 2017 una metanálisis de Wang y colaboradores analizó 10 artículos con en total 895 mujeres embarazadas y 882 con  $\beta$ -HCG negativa.

Llegaron a la conclusión que la precisión de los parámetros de vascularización endometrial y subendometrial en predecir un embarazo tras IVF tenían que ser confirmados tras más estudios sobre larga escala.

Estos resultados conducen a que los autores sugieran que el cambio cíclico del flujo sanguíneo puede ser un factor determinante de receptividad endometrial.

### ***6.7 Niveles de 17β-estradiol (E2)***

En un estudio publicado en diciembre 2017 Fritz et col quisieron evaluar la correlación entre los niveles séricos de estradiol (E2) durante los ciclos de transferencia de embrión congelado autólogo (FET) artificial y las tasas de embarazo en curso / nacidos vivos (OP / LB) (Fritz R, 2017)

Se realizó un estudio de cohorte histórico en un entorno académico para correlacionar los niveles de estradiol máximos y medios con las tasas de embarazo en curso / nacidos vivos para todos los ciclos autólogos de transferencia de embriones artificiales congelados realizados entre el 2011 y el 2014.

Se analizaron los niveles medios y máximos de E2 de 110 ciclos de FET artificiales autólogos de 95 pacientes. Los niveles promedio de E2 fueron significativamente más bajos en los ciclos que dieron como resultado OP / LB en comparación con aquellos que no lo hicieron ( $234,1 \pm 16,6$  pg / ml vs.  $315 \pm 24,8$  pg / ml, respectivamente,  $p = 0,04$ ). Aunque los niveles máximos de E2 no fueron significativamente diferentes entre los ciclos que dieron como resultado OP / LB en comparación con los que no lo hicieron ( $366,9 \pm 27,7$  pg / ml vs.  $459,1 \pm 32,3$  pg / ml, respectivamente,  $p = 0,19$ ), el análisis de correlación reveló una significación estadística ( $p = 0,02$ ) tendencia a la baja en las tasas de OP / LB con niveles crecientes de E2.

En conclusión, este estudio sugirió que los niveles elevados de E2 en los ciclos de FET autólogos artificiales se asocian con tasas de OP / LB más bajas, recomendando controlar los niveles de estradiol durante los ciclos FET artificiales.

Hasta ahora, se había demostrado que las tasas séricas de estradiol durante la preparación endometrial no tenían impacto en el resultado gestacional y que también niveles bajos de oestradiol (100 pg/ml) daban buenas tasas de embarazo (Grzegorzczuk-Martin V 2012, Soares SR 2005, Noyes N 2001, Remohí J 1997)

### ***6.8 Vía oral VS. Vía transdermica***

El estrógeno oral, administrado en forma de valerato de estradiol, difunde a nivel gastrointestinal; donde una parte es transformada en estrona. A este nivel se absorben por la circulación sanguínea vía porta, hasta llegar al hígado; donde ambos compuestos son transformados en estradiol. Todo este proceso se lleva a cabo mediante glucuronidación, lo que conlleva una pérdida de biodisponibilidad de estrógeno circulante. A pesar de ello, suele ser el método de administración estrogénica más frecuentemente utilizado por su comodidad y seguridad de administración.

La administración vía transdérmica evita el paso hepático, esto ayuda a que la dosis estrogénica administrada sea más equilibrada respecto al ciclo natural, con dosis más fisiológicas en relación estradiol/estrona y una menor fluctuación estrogénica al mantenerse los niveles de absorción respecto a la vía oral; sin embargo, puede dar reacción en el lugar de aplicación. (Devroey P, 1998)

Tras un estudio clínico randomizado de Davar en el 2016 y otro de Kahraman del 2018 se demostró que no había diferencia clínica entre la utilización de la vía transdérmica y la vía oral pero la vía transdérmica permite llegar de forma ligeramente más rápida a un grosor endometrial adecuado, a pesar de conseguir concentraciones plasmáticas inferiores (Molina 2018).

En la Cochrane del 2017 se llegó a la conclusión que no había suficientes datos para poder elegir el mejor protocolo de preparación endometrial (natural vs artificial y oral vs transdérmico)

### ***6.9 Papel de la progesterona (P4)***

En cuanto al momento de administración, los datos que emergen de una revisión sistemática de Connel del 2015 que examina estudios que analizan ciclos con ovocitos propios en fresco, sugieren que empezar la progesterona el día antes de la punción o esperar hasta el día 6 después de la punción determina una tasa de embarazo reducida e identifican una ventana óptima para iniciar la administración de la progesterona desde la noche de la punción hasta el día 3 tras punción (Connell MT, 2015). En ciclos de donación ovocitaria en los que la receptora está sometida a un ciclo sustituido, nuestro grupo observó que los resultados gestacionales no se veían modificados si la progesterona se introducía un día antes, el día de la punción de la donante, o un día después, si bien en el primer grupo se observó una mayor tasa de embarazos bioquímicos (Escribá MJ, 2006).

Sin embargo, estudios de receptividad uterina a través del análisis de la expresión génica a nivel endometrial durante la ventana de implantación (en día de progesterona +5 en ciclo sustituido) con la técnica ERA (del inglés,

*Endometrial Receptivity Array*) (Diaz-Gimeno, 2011) muestran cómo un 20% de pacientes con fallo de implantación presentan un endometrio pre-receptivo (en más del 80% de los casos) o post-receptivo (aproximadamente el 20% restante). Sorprendentemente, la modificación en el momento de la introducción de la progesterona exógena según los resultados obtenidos previamente en el ERA mejoran significativamente las tasas de gestación de estas pacientes (Ruiz-Alonso M, 2012)

Recientemente se ha visto que las diferencias en el soporte de fase lútea empleadas (y en función de si se ha desencadenado la ovulación con análogo de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) versus gonadotropina coriónica humana (hCG)) demuestran un profundo impacto sobre la concentración de progesterona lútea medida 7 días después de la punción: existe una correlación inversa entre la tasa de abortos tempranos y las concentraciones séricas de progesterona lútea (Humaidan P., 2010; Humaidan P., 2012; Humaidan P., 2005)

Esta suplementación con progesterona es positiva incluso en el contexto de ciclos naturales. De hecho, Bjuresten y colaboradores., muestran que, en las pacientes sometidas a transferencia de embriones congelados en ciclo natural, la suplementación de la fase lútea con progesterona aumenta de manera estadísticamente significativa la tasa de nacidos vivos en comparación con las pacientes que no reciben la suplementación con hormonas exógenas (Bjuresten K, 2011). Otro reciente estudio retrospectivo que examina 228 pacientes, llega a la misma conclusión, además demuestra que la adición de progesterona reduce las tasas de aborto (Kim CH, 2014).

En lo que respecta a ciclos sustituidos, Alsbjerg y colaboradores. muestran que en transferencia de embriones propios congelados duplicar la dosis de progesterona vaginal reduce la tasa de aborto temprano y determina un aumento significativo de la tasa de embarazo (Alsbjerg B, 2013). Los resultados de este estudio confirman y amplían los estudios anteriores de Orvieto y colaboradores. y Check at al. que muestran cómo aumentando la dosis de progesterona en fase lútea se obtiene una tasa significativamente más alta de embarazos clínicos (Orvieto R, 2007) (Check JH, 2010)

Varios artículos han analizado el poder predictivo que tienen tanto el estradiol como la progesterona medidos en fase lútea sobre la posibilidad de embarazo, y los resultados son contradictorios.

Sonntag y colaboradores han descrito que los niveles séricos de estradiol y progesterona en día +7 post transferencias embrionarias son significativamente diferentes en los ciclos en los que se ha obtenido embarazo y los que no en mujeres sometidas a Fecundación in vitro (FIV)/Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Sonntag B, 2013).

Una revisión reciente describe una concentración óptima de progesterona en fase lútea en el intervalo de 80-100 nmol/l para ciclos estimulados (Andersen CY, 2014)

Un reciente estudio retrospectivo sobre un total de 529 ciclos de transferencia de un único blastocisto desvitrificado en ciclos de preparación endometrial con terapia hormonal sustitutiva ha descrito que existe una ventana de concentración de progesterona en la cual se obtienen los mejores resultados de gestación y nacidos vivos, estando comprendida entre 70 nmol/l y 99 nmol/l. Yovich y colaboradores (Yovich JL, 2015) muestran cómo por encima de 100 nmol/l y por debajo de 50 nmol/l la tasa de gestación disminuye de manera estadísticamente significativa, lo cual sugiere la existencia de una estrecha ventana de implantación.

Un reciente estudio prospectivo de cohorte publicado por nuestro grupo (Labarta E 2018) ha mostrado una OPR significativamente más bajo en las mujeres que tenían el día del transfer embrionario en estadio de blastocisto (day 5) valores séricos de P4 < 9,2 ng/ml versus las que tenían  $\geq 9,2$  ng/ml, sugiriendo la necesidad de conseguir un nivel sérico mínimo de P4 en el día del transfer embrionario en los ciclos artificiales sustituidos para optimizar los resultados clínicos (IR y OPR).

### ***6.10 Biomarcadores de imagen cuantitativa y bioingeniería***

En este estudio formulamos la hipótesis de la utilidad del análisis de textura aplicado a la ecografía en la caracterización del endometrio con el propósito de predecir la tasa de éxito de la implantación y el embarazo en ciclos sustituidos en la donación de óvulos. El análisis de *Machine Learning* (ML) proporcionó un rendimiento de clasificación prometedor para los biomarcadores de imágenes cuantitativas extraídos del análisis de textura de ultrasonido.

En el análisis de clasificación mediante técnicas de *Machine Learning* para la predicción de la variable de embarazo en curso se logró una tasa de acierto del 64,9% y un AUC de 0,62. En los casos de DET, si consideramos un clasificador binario capaz de separar entre IR de 50 y 100, los resultados fueron prometedores (Precisión de 85,7% y AUC de 0,92). En el caso de los clasificadores de entrenamiento de más de dos grupos (0, 50 y 100% de IR en casos DET), reduciendo así el número de muestras por grupo, la precisión se redujo significativamente. En el análisis de clasificación de ML para la predicción de OP, se logró una precisión del 66,7% y un AUC de 0,71.

Gracias a los clasificadores entrenados, el IR del paciente podría predecirse con éxito en alrededor del 65% de los casos, a diferencia del 50% actual. Se sugirió que la clasificación asistida por computadora del tejido endometrial, basada en características basadas en la textura, podría contribuir a una mejor predicción de la tasa de éxito del embarazo en ciclos sustituidos en la donación de óvulos.

La principal limitación fueron los datos desbalanceados entre el número de pacientes que pertenecen a cada clase (p. Ej., Implantación versus No Implantación). Esto se minimizó mediante el uso de validación cruzada con 5 particiones (*5-fold cross validation*).

Equilibrar las clases con más datos superaría esta limitación, obteniendo un clasificador más robusto con quizás un mejor rendimiento. Agregar nuevos casos de ambos grupos también permitiría mejorar el rendimiento del clasificador.

Para mejorar y validar el rendimiento del método propuesto, se requiere trabajo adicional con conjuntos de datos más grandes.

Como líneas futuras en este tipo de imágenes (imágenes de ultrasonidos adquiridas en mujeres para la caracterización del tejido endometrial), la Inteligencia Artificial podría aplicarse a través de un extractor automático de las características de la imagen que nos ayuda a predecir ciertos patrones en diferentes grupos mediante técnicas basadas en redes neuronales convolucionales. No obstante, para esta línea de trabajo el número de casos debería ser muy elevado, implicando muy probablemente la realización de un estudio multicéntrico.



# Conclusiones



## CONCLUSIONES

1. El análisis de *Machine Learning* proporcionó un rendimiento de clasificación prometedor para los biomarcadores de imagen analizados cuando se usaron de forma combinada en un clasificador. Los resultados estadísticos descriptivos no aportaron conclusiones de elevada significación estadística.
2. En el análisis de clasificación mediante técnicas de *Machine Learning* para la predicción de la variable de embarazo en curso se logró una tasa de acierto del 65,0% y un AUC de 0,67.
3. En el análisis de clasificación mediante técnicas de *Machine Learning* para la predicción de Tasa de Implantación, se logró una tasa de acierto del 63,3% y un AUC de 0,64.
4. En el análisis de clasificación mediante técnicas de *Machine Learning* para predicción de Tasa de Implantación en casos de Transferencia Doble de Embriones, si consideramos un clasificador binario capaz de separar entre IR de 50 y 100, los resultados son prometedores (acierto entre 66,7 y 80% y AUC entre 0,63 y 0,77) a pesar del reducido número de pacientes en cada caso. En el caso de los clasificadores de más de dos grupos (0, 50 y 100% de IR en los casos de DET), el entrenamiento no es tan representativo, por el reducido número de muestras por grupo, por lo que los resultados empeoran.

5. Al analizar todos los valores, se puede destacar que la mayor tasa de acierto y la mejor AUC se obtiene con el ROI correspondiente al endometrio completo, incluida la cavidad endometrial.
6. Los resultados obtenidos añaden información sobre el uso del análisis de textura en la caracterización del endometrio con el fin de predecir la tasa de éxito del embarazo en ciclos sustituidos en la donación de óvulos.

# Bibliografia



## **BIBLIOGRAFIA**

Agha-Hosseini M, Hashemi L, Aleyasin A, Ghasemi M, Sarvi F, Shabani Nashtaei M, Khodarahmian M. Natural cycle versus artificial cycle in frozen-thawed embryo transfer: A randomized prospective trial. *Turk J Obstet Gynecol.* 2018 Mar;15(1):12-17.)

Al-Ghamdi A, Coskun S, Al-Hassan S, Al-Rejjal R, Awartani K. The correlation between endometrial thickness and outcome of in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) outcome. *Reprod Biol Endocrinol.* 2008; 6: 37.

Almodin CG, Minguetti-Camara VC, Paixao CL, Pereira PC. Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes. *Hum. Reprod.* 2010;25(5):1192-8.

Applebaum M. The “Steel” or “teflon” endometrium- ultrasound visualization of endometrial vascularity in IVF patients and outcome. Presented at The third world Congress of ultrasound in obstetrics and gynecology. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1993; 3(Suppl 2):10

Applebaum M. The uterine biophysical profile. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1995; 5:67-68.

Assessment of changes in utero-ovarian arterial impedance during the peri-implantation period by Doppler sonography in women undergoing assisted reproduction. Chien LW, Lee WS, Au HK, Tzeng CR. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2004 May;23(5):496-500.

Ashburner J, Friston KJ. Nonlinear spatial normalization using basis functions. *Hum Brain Mapp.* 1999; 7:254-66.

Barker M, Boehnlein L, Kovacs P, Lindheim S. Follicular and luteal phase endometrial thickness and echogenic pattern and pregnancy outcome in oocyte donation cycles. *J Assist Reprod Genet.* 2009; 26(5): p. 243-9).

Behrenbruch CP, Petroudi S, Bond S, Declerck JD, Leong FJ, Brady JM. Image filtering techniques for medical image post- processing: an overview. *Br J Radiol.* 2004; 77:126-32.

Bellver J, Pellicer A, García-Velasco J, Ballesteros A, Remohí J, Meseguer M. Obesity reduces uterine receptivity: clinical experience from 9,587 first cycles of ovum donation with normal weight donors. *Fertil Steril.* 2013; 100(4): p. 1050-8.

Bellver J, Simón C. Implantation failure of endometrial origin: what is new? *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2018 Aug;30(4):229-236.

Bibault JE, Giraud P, Durdux C, Taieb J, Berger A, Coriat R, Chaussade S, Dousset B, Nordlinger B, Burgun A. Deep Learning and Radiomics predict complete response after neo-adjuvant chemoradiation for locally advanced rectal cancer. *Sci Rep* 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-30657-6.

Bodri D, Sunkara SK, Coomarasamy A. Gonadotropin-releasing hormone agonists versus antagonists for controlled ovarian hyperstimulation in oocyte donors: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2011 Jan;95(1):164-9.

Bosch E. High responders and patients with a good prognosis are not immune to the negative impact on live birth rate of elevated P on the day of triggering. *Fertil Steril*. 2015 Jun;103(6):1423

Bu Z, Sun Y. The impact of endometrial thickness on the day of human chorionic gonadotrophin (hCG) administration on ongoing pregnancy rate in patients with different ovarian response. *PLoS One*. 2015; 10(12): p. 1-8.

Budakx E, Garrido N, Barreto Melo MA, Meseguer M, Pellicer A, Remohí J. Improvements achieved in an oocyte donation program over a 10-year period: sequential increase in implantation and pregnancy rates and decrease in high-order multiple pregnancies. *Fertility and Sterility* 2007;88(2):342–9.

Budani MC, Tiboni GM. Ovotoxicity of cigarette smoke: A systematic review of the literature. *Reprod Toxicol.* 2017 Sep; 72:164-181.

Cai L, Wang X, Wang Y, Guo Y, Yu J, Wang Y. Robust phase-based texture descriptor for classification of breast ultrasound images. *Biomed Eng Online.* 2015;14(1):26.

Cardenas Armas DF, Peñarrubia J, Goday A, Guimerá M, Vidal E, Manau D, Fabregues F.

Frozen-thawed blastocyst transfer in natural cycle increase implantation rates compared artificial cycle. *Gynecol Endocrinol.* 2019 Apr 11:1-5.

Casper R. It's time to pay attention to the endometrium. *Fertil Steril.* 2011; 96(3): p. 519-21.).

Castillo JC, Dolz M, Moreno J, Gijón L, Ferrer R, Ferrero E, Bonilla-Musoles F.

Triggering with GnRH agonist in oocyte-donation cycles: oestradiol monitoring is not necessary during ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online.* 2012 Feb;24(2):247-50.

Cédrin-Durnerin I, Bständig B, Parneix I, Bied-Damon V, Avril C, Decanter C, Hugues JN. Effects of oral contraceptive, synthetic progestogen or natural estrogen pre-treatments on the hormonal profile

and the antral follicle cohort before GnRH antagonist protocol. *Hum Reprod.* 2007 Jan;22(1):109-16

Chang CY, Chang YT, Chien SC, Yu SS, Hung YC, Lin WC Factors associated with operative hysteroscopy outcome in patients with uterine adhesions or submucosal myomas. *Int J Gynaecol Obstet.* 2010 May;109(2):125-7.

Check, J.H., Lurie, D., Dietterich, C., Callan, C. and Baker, A. (1993a) Adverse effect of a homogenous hyperechogenic endometrial sonographic pattern, despite adequate endometrial thickness on pregnancy rates following in vitro fertilization. *Hum. Reprod.*, 8, 1293–1296.

Check, J.H., Nowroozi, K., Choe, L. and Dietterich, C. (1991) Influence of endometrial thickness and echogenic patterns on pregnancy rates during in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 56, 1173–1175.

Check, J.H., Nowroozi, K., Choe, L., Lurie, D. and Dietterich, C. (1993b) The effect of endometrial thickness and echo pattern on in vitro fertilization outcome in a donor oocyte embryo transfer cycle. *Fertil. Steril.*, 59, 72–75.

Chien LW, Lee WS, Au HK, Tzeng CR. Assessment of changes in utero-ovarian arterial impedance during the peri-implantation period by

Doppler sonography in women undergoing assisted reproduction. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2004 May;23(5):496-500.

Christianson MS, Bellver J. Innovations in assisted reproductive technologies: impact on contemporary donor egg practice and future advances. *Fertil Steril.* 2018 Nov;110(6):994-1002

Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohí J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertility and Sterility* 2008;89(6):1657-64.

Cobo T, Bonet-Carne E, Martínez-Terrón M, Perez-Moreno A, Elías N, Luque J, Amat-Roldan I, Palacio M. Feasibility and reproducibility of fetal lung texture analysis by Automatic Quantitative Ultrasound Analysis and correlation with gestational age. *Fetal Diagn Ther.* 2012;31(4):230-6.

Cobo A, Garrido N, Pellicer A, Remohí J. Six years' experience in ovum donation using vitrified oocytes: report of cumulative outcomes, impact of storage time, and development of a predictive model for oocyte survival rate. *Fertil Steril.* 2015 Dec;104(6):1426-34.e1-8.

Cobo A, Castellò D, Vallejo B, Albert C, de los Santos JM, Remohí J. Outcome of cryotransfer of embryos developed from vitrified oocytes:

double vitrification has no impact on delivery rates. *Fertil Steril*. 2013 May;99(6):1623-30.

Cobo A, de los Santos MJ, Castellò D, Gámiz P, Campos P, Remohí J. Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles. *Fertil Steril*. 2012 Nov;98(5):1138-46

Cobo A, Meseguer M, Remohí J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod*. 2010 Sep;25(9):2239-46.

Cui Y, Yang X, Shi Z, Yang Z, Du X, Zhao Z, Cheng X. Radiomics analysis of multiparametric MRI for prediction of pathological complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Eur Radiol* 2018. DOI: 10.1007/s00330-018-5683-9.

Connell MT, Szatkowski JM, Terry N, DeCherney AH, Propst AM, Hill MJ. Timing luteal support in assisted reproductive technology: a systematic review. *Fertility and Sterility* 2015;103(4):939-46.

Contart P, Baruffi RL, Coelho J, Mauri AL, Petersen C, Franco Júnior JG. Power Doppler endometrial evaluation as a method for the prognosis of embryo implantation in an ICSI program. *J Assist Reprod Genet*. 2000 Jul;17(6):329-34.

Coutifaris C, Myers E, Guzick D, Diamond M, Carson S, Legro R, y colaboradores. Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status. *Fertil Steril*. 2004; 82(5): p. 1264-72.)

Daya S. Luteal support: progestogens for pregnancy protection. *Maturitas* 2009;65(1):S29-34.

Devroey P, Pados G. Preparation of endometrium for egg donation. *Hum Reprod Update* 1998 Nov-Dec;4(6):856-61.

Díaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Alamá P, Pellicer A, Simón C. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril*. 2011 Jan;95(1):50-60, 60.e1-15.

Dix E, Check J. Successful pregnancies following embryo transfer despite very thin late proliferative endometrium. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2010; 37(1): p. 15-6.

Donaghay M, Lessey B. Uterine receptivity: alterations associated with benign gynecological disease. *Semin Reprod Med*. 2007; 25(6): p. 461-75.),

Druckmann R, Druckmann MA. Progesterone and the immunology of pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005;97(5):389-96.

Escribá MJ, Bellver J, Bosch E, Sánchez M, Pellicer A, Remohí J. Delaying the initiation of progesterone supplementation until the day of fertilization does not compromise cycle outcome in patients receiving donated oocytes: a randomized study. *Fertility and Sterility*. 2006;86(1):92-7.

Chang CY, Chang YT, Chien SC, Yu SS, Hung YC, Lin WC. Factors associated with operative hysteroscopy outcome in patients with uterine adhesions or submucosal myomas. *Int J Gynaecol Obstet*. 2010 May;109(2):125-7.

Clarke LP, Velthuisen RP, Camacho MA, Heine JJ, Vaidyanathan M, Hall LO, y colaboradores. MRI segmentation: methods and applications. *Magn Reson Imaging*. 1995; 13:343-68.

Downing G, Biomarkers Definitions Working Group. Bio- markers and surrogate endpoints. *Clin Pharmacol Therap*. 2001;69:89-95.

Fanchin R, de Ziegler D, Taieb J, Hazout A, R F. Premature elevation of plasma progesterone alters pregnancy rates of in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril*. 1993; 59(5): p. 1090-4.

Fox C, Morin S, Jeong J, Scott Jr. R, Lessey B. Local and systemic factors and implantation: what is the evidence? *Fertil Steril*. 2016; 105(4): p. 873-84.

Friedler S, Schenker J, Herman A, Lewin A. The role of ultrasonography in the evaluation of endometrial receptivity following assisted reproductive treatments: a critical review. *Human Reproduction Update*. 1996; 2(4): p. 323-35.

Fritz R, Jindal S, Feil H, Buyuk E. Elevated serum estradiol levels in artificial autologous frozen embryo transfer cycles negatively impact ongoing pregnancy and live birth rates. *J Assist Reprod Genet*. 2017 Dec;34(12):1633-1638

Gallos ID, Khairy M, Chu J, Rajkhowa M, Tobias A, Campbell A, Dowell K, Fishel S, Coomarasamy A. Optimal endometrial thickness to maximize live births and minimize pregnancy losses: Analysis of 25,767 fresh embryo transfers. *Reprod Biomed Online*. 2018 Oct 6

Ghobara T, Gelbaya TA, Ayeleke RO. Cycle regimens for frozen-thawed embryo transfer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Jul 5;7:CD003414

Gillies RJ, Kinahan PE, Hricak H. Radiomics: Images Are More than Pictures, They Are Data. *Radiology* 2016; 278 : 563-577.

Giordano R, Cacciatore A, Romano M, La Rosa B, Fonti I, Vigna R. Uterine artery Doppler flow studies in obstetric practice. *J Prenat Med*. 2010 Oct;4(4):59-62.

Glasser MH, Heinlein PK, Hung YY. Office endometrial ablation with local anesthesia using the HydroThermAblator system: Comparison of outcomes in patients with submucous myomas with those with normal cavities in 246 cases performed over 5(1/2) years.

Gonen y colaboradores. Endometrial thickness and growth during ovarian stimulation: a possible predictor of implantation in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1989; 52(3):446-50

Gonen, Y. and Casper, R.F. (1990) Prediction of implantation by the sonographic appearance of the endometrium during controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization (IVF). *J. In Vitro Fertil. Embryo Transf.*, 7, 146–152.

Gonen, Y., Calderon, M., Direnfeld, M. and Abramovici, H. (1991) The impact of sonographic assessment of the endometrium and meticulous hormonal monitoring during natural cycles in patients with failed donor artificial insemination. *J. Ultrasound Obstet. Gynecol.*, 1, 122–126.

Gonen, Y., Casper, R.F., Jacobson, W. and Blankier, J. (1989) Endometrial thickness and growth during ovarian stimulation: a possible predictor of implantation in in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 52, 446–450.

Grant D, McWilliams D, Frattarelli J. Changes in measured endometrial thickness predicting vitro fertilization success. *Fertil Steril*. 2007; 88(1): p. 74-81.

Grzegorzczak-Martin V, Mayenga JM, Kulski O, Belaid Y, Grefenstette I, Belaisch-Allart J. Endometrial preparation in oocyte recipients. *Gynecol Obstet Fertil*. 2012 Sep;40(9):507-10.

Griesinger G, Diedrich K, Devroey P, Kolibianakis EM. GnRH agonist for triggering final oocyte maturation in the GnRH antagonist ovarian hyperstimulation protocol: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2006 Mar-Apr;12(2):159-68

Haouzi D, Assou S, Dechanet C, Anahory T, Dechaud H, De Vos J, y colaboradores. Controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization alters endometrial receptivity in humans: protocol effects. *Biology of Reproduction*. 2010; 82(4): p. 679-86.

Haralick RM., Shanmugam K., Dinstein I. Textural features for image classification. *IEEE Trans Syst Man Cybern* 1973; 3: 610–621.

Hilal T, Covington M, Kosiorek HE, Zwart C, Ocal IT, Pockaj BA, Northfelt DW, Patel BK. Breast MRI phenotype and background parenchymal enhancement may predict tumor response to neoadjuvant endocrine therapy. *Breast J* 2018. DOI: 10.1111/tbj.13101.

Horcajadas J, Pellicer A, Simón C. Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. *Human Reproduction Update*. 2007; 13(1): p. 77-86.

Houssami N, Ciatto S. Design-related bias in estimates of accuracy when comparing imaging tests: examples from breast imaging research. *Eur Radiol*. 2010; 20:2061-6.

Kahraman S, Çetinkaya CP, Sahin Y, Oner G. Transdermal versus oral estrogen: clinical outcomes in patients undergoing frozen-thawed single blastocyst transfer cycles without GnRH $\alpha$  suppression, a prospective randomized clinical trial. *J Assist Reprod Genet*. 2018 Dec 5.

Karahaliou M, Vaiopoulos G, Papaspyrou S, Kanakis MA, Revenas K, Sfikakis PP. Colour duplex sonography of temporal arteries before decision for biopsy: a prospective study in 55 patients with suspected giant cell arteritis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8 : R116.

Kasius A, Smit J, Torrance H, Eijkemans M, Mol B, Opmeer B, y colaboradores. Endometrial thickness and pregnancy rates after IVF: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*. 2014; 20(4): p. 530-41.).

Khan MS, Shaikh A, Ratnani R. Ultrasonography and Doppler Study to Predict Uterine Receptivity in Infertile Patients Undergoing Embryo Transfer. *J Obstet Gynaecol India*. 2016 Oct;66(Suppl 1):377-82.

Kovacs y colaboradores. The effect of endometrial thickness on IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod* 2003;18(11):2337-2341

Kuwayama M. Highly efficiently vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology* 2007; 67: 73-80

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. *Hum Reprod.* 2017 Dec 1;32(12):2437-2442.

Lessey B. Assessment of endometrial receptivity. *Fertil Steril.* 2011; 96(3): p. 522-9.

Messinis IE, Messini CI, Dafopoulos K. Luteal-phase endocrinology. *Reprod Biomed Online* 2009;19(4):4314.

Liu KE, Hartman M, Hartman A, Luo ZC, Mahutte N. The impact of thin endometrial lining on fresh and frozen-thaw IVF outcomes: an analysis of over 40000 embryo transfers. *Human Reproduction*, Vol.33, No.10 pp.1883-1888, 2018.

Martí Bonmatí L, Alberich-Bayarri A, García-Martí G, Sanz Requena R, Pérez Castillo C, Carot Sierra JM, Manjón Herrera JV. Imaging

biomarkers, quantitative imaging, and bioengineering. *Radiologia*. 2012 May-Jun;54(3):269-78.

Mayer RB, Ebner T, Weiis C, Allerstorger C, Altmann R, Oppelt P, Shebl O. The role of endometrial volume and endometrial and subendometrial vascularization parameters in a frozen embryo transfer cycle. *Reprod Scii*, 2018, nov 12.

Messinis IE, Messini CI, Dafopoulos K. Luteal-phase endocrinology. *Reprod Biomed Online* 2009;19(4):4314.

Molina PF, Lliso CC, Collado RC, García MM, Bachiller MD, Espí JB, Checa M. Oral versus transdermal oestrogen delivery for endometrial preparation before embryo transfer: a prospective, comparative, randomized clinical trial. *Reprod Biomed Online*. 2018 Sep 29

Molina P, Calatayud Lliso, Carreras Collado R, Muñoz garcía M, Diaz Bachiller M, Blanes Espi J, Checa M. Oral versus transdermal oestrogen delivery for endometrial preparation before embryo transfer: a prospective, comparative, randomized clinical trial. *Reproductive Biomedicine Online* December 2018 Volume 37, issue 6 , pages 693-702.

Momeni M, Rahbar M, Kovanci E. A meta-analysis of the relationship between endometrial thickness and outcome of in vitro fertilization cycles. *J Hum Reprod Sci*. 2011; 4(3): p. 130-7.

Murray M, Meyer W, Zaino R, Lessey B, Novotny D, Ireland K, y colaboradores. A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertil Steril.* 2004; 81(5): p. 1333-43

NG E, Chan C, Thang O, Yeung W, Ho p. Changes in endometrial and subendometrial blood flow in IVF. *Reproductive Biomedicine Online* 2009; 18: 269-75.

Noyes N, Hampton BS, Berkeley A, Licciardi F, Grifo J, Krey L. Factors useful in predicting the success oocyte donation: a 3-year retrospective analysis. *Fertility and Sterility* 2001;76(1):92-7.

Noyes R, Hertig A, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril.* 1950; 1(1): p. 3-25.

Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Cuomo S, Ciampaglia W, Infante FE, Tabarelli de Fatis C, Arnone A, Maccarini AM, Filicori M. Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 2011;23(4):505-12.

Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Cuomo S, Ciampaglia W, Infante FE, Tabarelli de Fatis C, Arnone A, Maccarini AM, Filicori M. Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 2011;23(4):505-12.

Placidi G, Sotgiu A. A novel algorithm for the reduction of undersampling artefacts in magnetic resonance images. *Magn Reson Imaging*. 2004; 22:1279-87.

Plowden T, Schisterman E, Sjaarda L, Zarek S, Perkins N, Silver R, y colaboradores. Subclinical hypothyroidism and thyroid autoimmunity are not associated with fecundity, pregnancy loss, or live birth. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016; 101(6): p. 2358-65.

Provost M, Acharya K, Acharya C, Yeh J, Steward R, Eaton J, y colaboradores. Pregnancy outcomes decline with increasing recipient body mass index: an analysis of 22,317 fresh donor/recipient cycles from the 2008–2010 Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcome Reporting System registry. *Fertil Steril*. 2016; 105(2): p. 364-8.

Reis Soares S, Garcia Velasco J, Fernandez M, Bosch E, Remohí J, Pellicer A, y colaboradores. Clinical factors affecting endometrial receptiveness in oocyte donation cycles. *Fertil Steril*. 2008; 89(3): p. 491-501.

Remohí J, Ardiles G, García-Velasco JA, Gaitán P, Simón C, Pellicer A. Endometrial thickness and serum oestradiol concentrations as predictors of outcome in oocyte donation. *Hum Reprod*. 1997 Oct;12(10):2271-6.

Richter K, Bugge K, Bromer J, Levy M. Relationship between endometrial thickness and embryo implantation, based on 1294 cycles of in vitro fertilization with transfer of two blastocyst-stage embryos. *Fertil Steril.* 2007; 87(1): p. 53-9.

Rienzi L, Romano S, Albricci L, Maggiulli R, Capalbo A, Baroni E, Colamaria S, Sapienza F, Ubaldi F. Embryo development of fresh "versus" vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Hum Reprod.* 2010;25(1):66-73.

Ruiz-Alonso M, Blesa D, Díaz-Gimeno P, Gómez E, Fernández-Sánchez M, Carranza F, Carrera J, Vilella F, Pellicer A, Simón C. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril.* 2013 Sep;100(3):818-24.

Ruiz-Alonso M, Galindo N, Pellicer A, Simón C. What a difference two days make: "personalized" embryo transfer (pET) paradigm: a case report and pilot study. *Hum Reprod.* 2014 Jun;29(6):1244-7.

Salle B, Bied-Damon V, Benchaib M, Desperes S, Gaucherand P, Rudigoz RC. Preliminary report of an ultrasonography and colour Doppler uterine score to predict uterine receptivity in an in-vitro fertilization programme. *Hum Reprod.* 1998 Jun;13(6):1669-73.

Samar N, Casper RF, Bassil R, Shere M, Brzilay E, Orvieto R, Haas J. Sub-endometrial contractility or computer-enhanced 3-D modeling scoring of the endometrium before embryo transfer: are they better than measuring endometrial thickness? *J Assist Reprod Genet.* 2018 Oct 25.

Samara N, Casper RF, Bassil R, Shere M, Barzilay E, Orvieto R, Haas J. Sub-endometrial contractility or computer-enhanced 3-D modeling scoring of the endometrium before embryo transfer: are they better than measuring endometrial thickness? *J Assist Reprod Genet.* 2018 Oct 25.

Sar-Shalom Nahshon C, Sagi-Dain L, Wiener-Megnazi Z, Dirnfeld M. The impact of intentional endometrial injury on reproductive outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2018 Nov 2

Schoolcraft W. Importance of embryo transfer technique in maximizing assisted reproductive outcomes. *Fertil Steril.* 2016; 105(4): p. 855-60

Scotchie J, Fritz M, Mocanu M, Lessey B, Young S. Proteomic analysis of the luteal endometrial secretome. *Reprod Sci.* 2009; 16(9): p. 883-93.

Serafini, P., Batzofin, J., Nelson, J. and Olive, D. (1994) Sonographic uterine predictors of pregnancy in women undergoing ovulation induction for assisted reproductive treatments. *Fertil. Steril.*, 62, 815–822.

Schuster DP. The opportunities and challenges of developing imaging biomarkers to study lung function and disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 176:224-30.

Sica GT. Bias in research studies. *Radiology.* 2006; 238:780-9.

Simón C, Garcia Velasco J, Valbuena D, Peinado J, Moreno C, Remohí J, y colaboradores. Increasing uterine receptivity by decreasing estradiol levels during the preimplantation period in high responders with the use of a follicle-stimulating hormone step-down regimen. *Fertil Steril.* 1998; 70(2): p. 234-9.

Soares SR, Velasco JA, Fernandez M, Bosch E, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Clinical factors affecting endometrial receptiveness in oocyte donation cycles. *Fertility and Sterility* 2008;89(3):491-501.

Soike MH, McTyre ER, Shah N, Puchalski RB, Holmes JA, Paulsson AK, Miller LD, Cramer CK, Lesser GJ, Strowd RE, Hinson WH, Mott RT, Johnson AJ, Lo HW, Laxton AW, Tatter SB, Debinski W, Chan MD. Glioblastoma radiomics: can genomic and molecular characteristics correlate with imaging response patterns? *Neuroradiology* 2018. DOI: 10.1007/s00234-018-2060-y.

Spandorfer S. Egg donation model: an excellent way to isolate and analyze the impact of the male partner on assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril.* 2018 Oct;110(5):844.

Tenorio V, Bonet-Carne E, Botet F, Marques F, Amat-Roldan I, Gratacos E. Correlation between a semiautomated method based on ultrasound texture analysis and standard ultrasound diagnosis using white matter damage in preterm neonates as a model. *J Ultrasound Med.* 2011;30(10):1365-77.

The effect of endometrial thickness and echo pattern on IVF outcome in donor oocyte–embryo transfer cycles. 40th Annual Meeting of the Pacific Coast Fertility Society, Abstract 0-001.

Traub M, Van Arsdale A, Pal L, Jindal S, Santoro N. Endometrial thickness, Caucasian ethnicity, and age predict clinical pregnancy following fresh blastocyst embryo transfer: a retrospective cohort. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009; 7: 33.

Vidal C, Giles J, Garrido N, Remohí J, Simón C, Bellver J, Pellicer A. GnRH antagonist for endometrial priming in an oocyte donation programme: a prospective, randomized controlled trial. *Reprod Biomed Online.* 2018 Oct;37(4):415-424.

Virmani J, Kumar V, Kalra N, Khandelwal N. Neural network ensemble based CAD system for focal liver lesions from B-mode ultrasound. *J Digit Imaging.* 2014;27(4):520-37.

Vovk U, Pernus F, Likar B. A review of methods for correction of intensity inhomogeneity in MRI. *IEEE Trans Med Imaging*. 2007; 26:405-21.

Wang Y, Zhu Y, Sun Y, Di W, Qiu M, Kuang Y, Shen H. Ideal embryo transfer position and endometrial thickness in IVF embryo transfer treatment. *Int J Gynaecol Obstet* 2018 Dec; 143 (3):282-288.

Wang J, Xia F, Zhou Y, Wei X, Zhuang Y, Huang Y. Association Between Endometrial/Subendometrial Vasculature and Embryo Transfer Outcome: A Meta-analysis and Subgroup Analysis. *J Ultrasound Med*. 2018 Jan;37(1):149-163.

Wang L, Qiao J, Li R, Zhen X, Liu Z. Role of endometrial blood flow assessment with color Doppler energy in predicting pregnancy outcome of IVF-ET cycles. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010; 8(122).

Yaman C, Mayer R. Three-dimensional ultrasound as a predictor of pregnancy in patients undergoing ART. *J Turkish-German Gynecology Assoc* 2012; 13: 128-34.

Yang W, Zhang T, Li Z, ren X, Hunag B, Zhu G, Jin L. Combined analysis of endometrial thickness and pattern in predicting clinical outcomes of frozen embryo transfer cycles with morphological good-quality blastocyst. *Medicine* (2018) 97:2(e9577)

Youssef MA, Van der Veen F, Al-Inany HG, Griesinger G, Mochtar MH, van Wely M. Gonadotropin-releasing hormone agonist versus HCG for oocyte triggering in antagonist assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 Nov 10;(11):CD008046.

Yuan X, Saravelos S, Wang Q, Xu Y, Li T, Zhou C. Endometrial thickness as a predictor of pregnancy outcomes in 10787 fresh IVF-ICSI cycles. *Reproductive BioMedicine Online*. 2016; 33(2): p. 197-205.).

Zhao J, Zhang Q, Wang Y, Li Y. Endometrial pattern, thickness and growth in predicting pregnancy outcome following 3319 IVF cycle. *Reprod Biomed Online*. 2014; 29(3): p. 291-8.

Zhang T, Li Z, Ren X, Huang B, Zhu G, Yang W, Jin L. Endometrial thickness as a predictor of the reproductive outcomes in fresh and frozen embryo transfer cycles. *Medicine* (2018) 97:2(e9689)

Zhang T, He Y, Wang Y, Zhu Q, Yang j, Zhao X, Sun Y. The role of three-dimensional power Doppler ultrasound parameters measured on hCG day in the prediction of pregnancy during in vitro fertilization treatment. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Bio*. 2016 Aug; 203: 66-71.

Zollner U, Specketer MT, Dietl J, Zollner KP. 3D-Endometrial Volume and outcomes of cryopreserved embryo replacement cycles. *Arch Gynecol Obstet* 2012 Aug; 286(2):517-21.



# Anexos



## ABREVIATURAS

2D: *Two dimension*

3D: *Three dimensión*

Ac VHB core: Anticuerpo "core" de la hepatitis B

Ac VHB Core: Anticuerpo contra el antígeno "core" de la Hepatitis B

Ag-Ac VIH: Antígenos y anticuerpo de Virus de la inmunodeficiencia humana

ARN: Ácido ribonucleico

ASEBIR: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

AUC: Área bajo curva ROC

BI: Biomarcador de Imagen

CCR2: *Chemokine receptor type 2*

CCR5: *Chemokine receptor type 5*

CSF: Factor estimulador de colonias

DICOM: *Digital Imaging and Communication in Medicine*

DIU: Dispositivo intrauterino

E2: 17 $\beta$ - estradiol

EDN1: Endotelina 1

EEC: Células del epitelio endometrial

EGF: *Epidermal Growth Factor*

ERA: *Endometrial Receptivity Array*

FBLN2: Fibulina 2

FET: *Frozen embryo transfer*

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico

FGF 7: Factor de crecimiento fibroblástico 7  
FIV: Fecundación in vitro  
FSHr:  $\alpha$ folitropina  
FPR: Tasa de falsos positivos  
GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina  
HABP2: Proteína de unión a hialuronato 2  
HB-EGF: Factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina  
HB-EGF: Heparan binding EGF like growth factor  
HbsAG: Antígeno de Hepatitis B  
HBsAG: *Hepatitis B surface antigen*  
hCG: Gonadotropina coriónica humana  
hMG-HP: *Highly purified Human menopausal gonadotropin*  
HMG: *Human menopausal gonadotropin*  
HOC: Hiperestimulación ovárica controlada  
HOXA10: Homeobox A10  
ICSI: Inyección espermática intracitoplasmática  
IF: Índice de flujo  
IFV: Índice de vascularización de flujo  
IGF-I: *Insulin-like growth factor tipo I*  
IGF-II: *Insulin-like growth factor tipo II*  
IGF: Factor de crecimiento similar a insulina  
IGFBP-1: *IGF like binding protein 1*  
IL-10: Interleukina 10  
IL-1 $\beta$ : Interleukina 1- $\beta$   
IL-6: Interleukina 6  
IL15: Interleukina 15

IMC: Índice de masa corporea  
IV: Índice de vascularización  
IVF: Índice de vascularización de flujo  
IVI: Instituto Valenciano de Infertilidad  
JAK-STAT: *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*  
Kg: Kilogramo  
KGF: Keratinocyte growth factor  
KREMEN1: Kremen 1  
LH: Lutropina  
LH+7: Pico de LH + 7 días  
LIF: Factor inhibidor de leucemia  
LIF: Factor inhibidor de leucemia  
LODP: Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal  
M.: Metros  
M<sup>2</sup>: Metros cuadrados  
MCP1: Monocyte Chemoattractant Protein-1  
MUC-1: Mucina 1  
NK: Células natural killer  
NKu: Células natural killer uterinas  
NRP1: Neuropilina 1  
P4: Progesterona  
PAEP: Proteína endometrial asociada a progestágeno  
PDGF: *Platelet-derived growth factor*  
PF: Fase proliferativa  
PFT: Fase proliferativa temprana

PGs: Prostaglandinas

PÍXEL: *Picture element*

PR: Periodo pre-receptivo

PS: Periodo Post- receptivo

R: Receptivo

RA: Reproducción asistida

RANTES: *Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*

RCR: Relación contraste-ruído

RFA: Recuento de folículos antrales

Rh: Factor Rhesus

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

ROC: Curva de característica operativa del receptor

RSR: Relación señal-ruído

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SERPINA3: Serpin Family A Member 3

SHO: Síndrome de hiperestimulación ovarica

SPP1: Fosfoproteína secretada 1 u osteopontina

TAC: Tomografía axial computerizada

TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante  $\beta$

TGF-  $\alpha$ : *Transforming growth factor alpha*

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

TPR: Tasa de verdaderos positivos

TRA: Tratamiento de reproducción asistida

TUI: *Tomographic ultrasound imaging*

VCAN: Versicano

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

VHB: Hepatitis B

VHC: Hepatitis C

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VOCAL: *Virtual Organ Computer-aided Analysis*

VÓXEL: *Volumetric pixel*

WOI: *Window of Implantation*



**CERTIFICADO DEL CEIC IVI VALENCIA SOBRE EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN  
“IMPACTO DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE BIOMARCADORES DE IMAGEN  
ECOGRÁFICA EN CICLO SUSTITUIDOS SOBRE LA TASA DE ÉXITO EN DONACIÓN DE ÓVULOS”  
1610-VLC-075-SP**

Miguel Moreno Albiñana, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica de IVI Valencia,

**CERTIFICA**

**I.- Que este Comité ha evaluado la propuesta del Promotor del Proyecto de Investigación denominado:**

- Título: *“Impacto de una nueva metodología de análisis de biomarcadores de imagen ecográfica en ciclo sustituidos sobre la tasa de éxito en donación de óvulos”*
- Código del Protocolo del Promotor / Promotor: 1610-VLC-075-SP / IVI Valencia S. L.
- Investigador Principal: Dra. Stefania Paoelli
- Fecha del Protocolo: enero 2017
- Hoja de Información al Sujeto / Consentimiento Informado: enero 2017

**II.- Que tomando en consideración:**

- La pertinencia del Estudio, idoneidad de investigadores y colaboradores, idoneidad de instalaciones, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica, de la Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre Técnicas de Reproducción Asistida, el Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de julio, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos; y las normas que las desarrollan.
- Los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.

En su virtud, este Comité emite **DICTAMEN FAVORABLE** para la realización de dicho Estudio.

Lo que firmo en Valencia, a 12 de enero de 2017

FDO.: MIGUEL MORENO ALBIÑANA  
SECRETARIO CEIC IVI VALENCIA







## HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Título del estudio:

Impacto de una nueva metodología de análisis de biomarcadores de imagen en ciclo sustituidos sobre la tasa de éxito en donación de óvulos.

Código del estudio:

1610-VLC-075-SP

Promotor:

*IVI Valencia*

Investigador Principal:

*Stefania Paoelli*

Centro:

*IVI Valencia*

### INTRODUCCION

Nos dirigimos a Vd. para informarle sobre un estudio de investigación, aprobado por el Comité de Ética, en el que se le invita a participar. Nuestra intención es tan sólo que Vd. reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar, si quiere o no participar en este estudio. Para ello le ruego lea esta hoja informativa con atención, pudiendo consultar con las personas que considere oportuno, y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir.

### PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.



## DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

En los programas de **donación de ovocitos o en transferencias de embriones congelados**, la ecografía vaginal juega un papel fundamental para confirmar que el endometrio está preparado.

El objetivo para poder realizar la transferencia de **embriones** es conseguir un endometrio con un espesor y un patrón adecuado.

Usted ha recibido un tratamiento hormonal con estrógenos con el objetivo de obtener una perfecta sincronización entre el estado de maduración del endometrio y el momento en el que se transfieren o colocan los embriones en el útero materno (proceso denominado transferencia embrionaria).

El propósito de la presente investigación es estudiar si existen biomarcadores de imágenes, predictivos de embarazo, en el momento de la preparación endometrial, es decir cuando tengamos un endometrio preparado, con un grosor mínimo de 7 mm con patrón trilaminar.

Para ello, se va a llevar a cabo unas adquisiciones de imágenes, rutinariamente realizadas con ecografía transvaginal 2D (GE Voluson S6) y se exportarán las imágenes en formato DICOM (Digital Imaging and Communication in Medicine) a un lápiz de memoria y al repositorio de imágenes médicas del centro para su posterior procesamiento por parte de QUIBIM SL.

Se leerán las imágenes con el objetivo de extraer biomarcadores de imágenes, orientados a la clasificación multiparamétrica del tejido endometrial.

QUIBIM SL, empresa biotecnológica de análisis avanzado de imágenes médicas, es un laboratorio central de referencia en la extracción y análisis de biomarcadores de imágenes.

QUIBIM aplica modelos computacionales avanzados a las imágenes radiológicas (ultrasonográfica en nuestro caso) para medir objetivamente los cambios producidos por un tratamiento farmacológico, ofreciendo información adicional cuantitativa al enfoque cualitativo de la radiología.



Todos los biomarcadores de imagen generados se recopilarán en una base de datos que se complementará con los datos clínicos para su explotación estadística y detección de potenciales biomarcadores predictivos.

El procedimiento de adquisición de imágenes ecográficas se llevará a cabo antes de la realización de la transferencia embrionaria y siempre y cuando usted haya aceptado participar en el presente estudio y haya firmado el consentimiento informado.

El requisito para participar en el presente estudio es que la paciente vaya a someterse a un tratamiento de ovodonación, sea de 1 ó 2 embriones en estadio de blastocisto de buena calidad (según los criterios establecidos por ASEBIR-Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción) con independencia del origen de los ovocitos frescos o vitrificados.

Las pacientes deberán aceptar voluntariamente participar en este estudio y firmar este documento para poder ser incluidas en él.

## LAS MUESTRAS

### **A. Objetivo de la obtención de las imágenes:**

Se va a evaluar el grosor endometrial a través de ecografía 2D, tras 10 días de preparación endometrial con estradiolo valerato 6 mg/día. Haremos la adquisición de las imágenes ecográficas y la exportaremos en un lápiz de memoria.

### **Método de obtención de las imágenes:**

La captura de las imágenes en 2D se realizará a través de una ecografía transvaginal, del mismo modo que se ha hecho las ecografías previas. Las molestias son mínimas, derivadas de la introducción de una sonda ecográfica a través de la vagina.

Las imágenes serán tomadas por los investigadores principales del estudio (Dra. Stefania Paoletti, Dr. José Remohí).

### **Método de identificación de las imágenes:**



Se identificarán todas las imágenes ecográficas asociadas a una paciente con su número de historia clínica e iniciales, tal y como se realiza en la práctica clínica habitual en IVI Valencia. Se garantiza confidencialidad de los datos de acuerdo a lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD).

**Guardia y custodia de las imágenes:** las imágenes ecográficas serán sometidas a un proceso de anonimización y encriptación previo a su subida a la plataforma QUIBIM Precision. Esta anonimización y encriptación se realiza en el equipo del cliente (usuario), es decir, ningún dato sensible del paciente será almacenado por QUIBIM. La empresa únicamente trabajará con la información de imagen.

El almacenamiento de las imágenes se realizará en los servidores de Microsoft Azure bajo las máximas condiciones de seguridad y protección de datos.

**Conservación:** una vez finalizado el proyecto las imágenes permanecerán almacenadas durante un mínimo de 5 años en el repositorio de imágenes de QUIBIM para la mejora de sus procesos de análisis. Estas imágenes estarán encriptadas y sin trazabilidad por parte de QUIBIM y los costes derivados de este almacenamiento correrán a cargo de QUIBIM.'

**Metodo, objetivo e identificación de la muestra biológica:**

La medición de las hormonas (E2 + P4) se hará a través de una extracción de 5 ml de sangre total mediante venopunción, antes de la realización de la transferencia embrionaria. La extracción será llevada a cabo por una enfermera en el centro IVI. Las molestias no son otras que las derivadas del pinchazo con aguja a través de la piel, no conllevando un riesgo médico reseñable.

El objetivo es medir las concentraciones de las hormonas progesterona y estradiol para ver si existe una correlación entre su valor el día que

tengamos el endometrio preparado y la tasa de éxito posterior. Esta analítica se realiza habitualmente, el resultado de la determinación constará en la historia de la propia paciente.

Se identificarán todas las muestras y las imágenes ecográficas asociadas a una paciente con su número de historia clínica e iniciales, tal y como se realiza en la práctica clínica habitual en IVI Valencia. Las muestras no serán anonimizadas, y mantendrán su trazabilidad durante todo el proceso para poder realizar el seguimiento de la evolución clínica. Se garantiza confidencialidad de los datos de acuerdo a lo establecido en la LODP.

**Guardias y custodias de las muestras biológicas:** el suero permanecerá congelado en la Clínica IVI Valencia hasta la finalización del estudio por si fuera necesario repetir la determinación hormonal.

**Conservación:** tras la finalización del presente estudio de investigación las muestras de sangre congeladas serán destruidas.

## BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Participar en este estudio no le aportará un beneficio inmediato. Solo una vez completado el estudio, y una vez analizados los resultados del mismo, la paciente podrá ser informada sobre los hallazgos obtenidos, y actuar en consecuencia en caso de no haber logrado gestación.

Su participación en este estudio no supondrá un coste adicional. La realización de una ecografía transvaginal 2D el día serán responsabilidad del promotor del estudio. Usted será responsable de los costes del tratamiento de fecundación in vitro con ovulos donados (tratamiento hormonal para la preparación endometrial, coste de la técnica de reproducción asistida, analíticas de sangre no relacionadas con el estudio).

No existen inconvenientes y riesgos derivados del estudio. La realización de la ecografía no conlleva riesgos para la paciente y además es imprescindible para programar el correcto timing de la transferencia embrionaria.

## SEGURO

El Promotor del Estudio, esto es, IVI Valencia, dispone de una Póliza de Seguros de Responsabilidad Civil en vigor que se ajusta a la legislación vigente y con cobertura para compensar e indemnizar supuestos de menoscabo de la salud o lesiones de los sujetos, que pudieran producirse en relación con su participación en el Estudio.

## CONFIDENCIALIDAD Y TRATAMIENTO DE DATOS

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal.

De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse al investigador principal o su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada, excepto en caso de urgencia médica o requerimiento legal. Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo como nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias, al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar



los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

## COMPENSACIÓN ECONÓMICA

El Investigador del estudio es el responsable de gestionar la financiación del mismo.

El paciente no recibirá remuneración alguna. Su participación en el estudio no le supondrá ningún gasto adicional al tratamiento que se le practica en la clínica.

## OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE

Cualquier nueva información relevante referente al estudio y que pueda afectar a su disposición para participar en el estudio, que se descubra durante su participación, le será comunicada por su médico lo antes posible.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

También debe saber que puede ser excluido del estudio si el promotor o los investigadores del estudio lo consideran oportuno, ya sea por motivos de seguridad, o porque consideren que no está cumpliendo con los procedimientos establecidos. En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo que ha ocasionado su retirada del estudio

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.



## CONSENTIMIENTO INFORMADO

(a rellenar por el paciente)

*Para investigación con muestras No Anonimizadas*

Código: 1610-VLC-075-SP

Yo .....

con Nº de Historia .....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: .....  
Investigador/Médico del centro

quien me ha explicado los pormenores del mismo, en particular de:

1. La finalidad de la investigación o de la línea de investigación para la que consiento.
2. De los posibles beneficios esperados con la misma.
3. De la posibilidad de ser contactado con posterioridad con el fin de recabar nuevos datos.
4. De la identidad del responsable de esta investigación, el..... Investigador/Médico del centro
5. Del derecho que me asiste de revocación de este consentimiento y de sus efectos, incluida la posibilidad de la destrucción o de la anonimización de las imágenes ecográficas de que tales efectos no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo.
6. Del lugar en el que se realizará la ecografía y del destino de las imágenes ecográficas una vez concluida la investigación, que será la destrucción, comportando siempre el cumplimiento de los requisitos previstos en la Ley de Investigación Biomédica.
7. La garantía de confidencialidad que se me ha dado sobre la información obtenida, indicándome la identidad de las personas que tendrán acceso a mis datos de carácter personal.
8. Que se me ha advertido acerca de la posibilidad de que los investigadores deban contactar conmigo, y que he especificado el modo en que prefiero que se haga.



Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera
2. Sin tener que dar explicaciones.
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información que se me ha entregado.

**Firma del paciente**

**Firma del investigador**

**Nombre:**

---

**Nombre:**

---

**Fecha:**

**Fecha:**



## CONSENTIMIENTO INFORMADO

(a rellenar por el paciente)

*Para investigación con muestras No Anonimizadas*

Código: 1610-VLC-075-SP

Yo .....

con Nº de Historia .....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:.....  
Investigador/Médico del centro

quien me ha explicado los pormenores del mismo, en particular de:

1. La finalidad de la investigación o de la línea de investigación para la que consiento.
2. De los posibles beneficios esperados con la misma.
3. De la posibilidad de ser contactado con posterioridad con el fin de recabar nuevos datos.

De la identidad del responsable de esta investigación,.....  
.....

Investigador/Médico del centro

5. Del derecho que me asiste de revocación de este consentimiento y de sus efectos, incluida la posibilidad de la destrucción o de la anonimización de las imágenes ecográficas y de que tales efectos no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo.
6. Del lugar en el que se realizará la ecografía y del destino de las imágenes ecográficas una vez concluida la investigación, que será la destrucción, comportando siempre el cumplimiento de los requisitos previstos en la Ley de Investigación Biomédica.
7. La garantía de confidencialidad que se me ha dado sobre la información obtenida, indicándome la identidad de las personas que tendrán acceso a mis datos de carácter personal.



8. Que se me ha advertido acerca de la posibilidad de que los investigadores deban contactar conmigo, y que he especificado el modo en que prefiero que se haga.

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera
2. Sin tener que dar explicaciones.
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información que se me ha entregado.

**Firma del paciente**

**Firma del investigador**

**Nombre:**

---

**Nombre:**

---

**Fecha:**

**Fecha**