

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y
QUIRÚRGICAS



Memoria de investigación remitida por D^a Rosa Mora Ruiz-Moyano
para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad
de Cantabria

Doppler color en la fertilización *in vitro* (FIV) como predictor

TESIS DOCTORAL

“DOPPLER COLOR EN LA FERTILIZACIÓN *IN VITRO* COMO PREDICTOR DE LA RESPUESTA OVÁRICA Y LA RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL”

“COLOR DOPPLER IN *IN VITRO* FERTILIZATION (IVF) AS PREDICTOR OF OVARIAN RESPONSE AND ENDOMETRIAL RECEPTIVITY”

DIRECTORES

Dr D. JUAN LUIS ALCÁZAR ZAMBRANO
Profesor Titular-Agregado (ANECA) Departamento Obstetricia y Ginecología.
Facultad de Medicina. Universidad de Navarra

Dr. D. JOSE RAMÓN DE MIGUEL SESMERO
Catedrático. Departamento Obstetricia y Ginecología. Facultad de Medicina.
Universidad de Cantabria

TUTOR

Dr. D. GERARDO BALLESTEROS OLMOS
Profesor Asociado. Departamento Obstetricia y Ginecología. Facultad de
Medicina. Universidad de Cantabria.

AUTOR

D^a ROSA MORA RUIZ-MOYANO

PALABRAS CLAVE

Doppler, fertilización *in vitro* (FIV), respuesta ovárica, receptividad endometrial

KEY WORDS

Doppler, *in vitro* fertilization (IVF), ovarian response, endometrial receptivity

Doppler color en la fertilización *in vitro* (FIV) como predictor



Don Juan Luis Alcázar Zambrano, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Navarra y Profesor Titular de Obstetricia y Ginecología en dicha Universidad,

Informa que el trabajo de investigación titulado DOPPLER COLOR EN LA FERTILIZACIÓN IN VITRO COMO PREDICTOR DE LA RESPUESTA OVÁRICA Y LA RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL, presentado por doña ROSA MORA RUIZ-MOYANO, ha sido realizado bajo mi dirección y reúne las características necesarias para ser defendida como tesis doctoral para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía de la doctoranda, en la Universidad de Cantabria.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, lo firmo en Pamplona a 19 de enero de 2016.

Firmado,

Juan Luis Alcázar Zambrano

D. JOSE RAMÓN DE MIGUEL SESMERO, CATEDRÁTICO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

INFORMA: Que el presente Trabajo de Investigación titulado “DOPPLER COLOR EN LA FERTILIZACIÓN IN VITRO COMO PREDICTOR DE LA RESPUESTA OVÁRICA Y LA RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL”, presentado por D^a Rosa Mora Ruiz-Moyano, ha sido realizado bajo mi codirección y reúne las características de rigor y originalidad científica para ser presentado como Tesis Doctoral en la Universidad de Cantabria.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, lo firmo en Santander a 22 de enero de dos mil dieciséis

Firmado

Jose Ramón De Miguel Sesmero

AGRADECIMIENTOS

Mi reconocimiento y agradecimiento al fallecido Dr D. Luis T. Mercé Alberto, director del Centro Nacional de Ecografía en Ginecología y Obstetricia, ideólogo y primer director de este proyecto que, con su afán investigador y sus vastos conocimientos en ecografía, ha realizado brillantes aportaciones a esta especialidad, en particular en el estudio vascular y ecografía 3D.

Mi agradecimiento a mis directores y tutor por continuar el trabajo de Luis y poner todo el empeño en mantener su originalidad.

Quiero agradecer a Rafael Millán y Jesús Fernández su apoyo moral y colaboración proporcionando medios para realizarlo.

Finalmente a mi familia, que me ha permitido disponer del tiempo que no existe.

INDICE

I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
II. <u>MARCO TEÓRICO</u>	
A. DOPPLER DE LA CIRCULACION UTERO-OVARICA DURANTE EL CICLO MENSTRUAL	2
1) Fundamentos de la exploración Doppler para el estudio de la circulación útero-ovárica.	
1.1) Flujo útero-ovárico	
1.2) Técnica Doppler	
2) Doppler de la circulación ovárica y uterina durante el ciclo espontáneo.	
2.1) Doppler de la fase folicular: crecimiento folicular	
2.2) Doppler de la fase periovulatoria: ovulación	
2.3) Doppler de la fase lútea: cuerpo lúteo	
3) Doppler de la circulación ovárica y uterina durante el ciclo estimulado.	
3.1) Doppler y predicción de respuesta ovárica	
3.2) Relación del Doppler con la secreción hormonal y otros factores reguladores del flujo útero-ovárico	
B. MARCADORES ECOGRÁFICOS Y DOPPLER DE LA IMPLANTACIÓN	27
1) Marcadores de implantación	
1.1) Implantación humana	
1.2) Qué es un marcador de implantación. Marcadores no ecográficos	
2) Marcadores de ecografía en modo B	
2.1) Línea endometrial, grosor endometrial y 3D	
3) Marcadores Doppler	
3.1) Marcadores de la receptividad uterina	
a. <i>Arterias uterinas</i>	

<i>b. Arterias endometriales: velocimetría, color y 3D</i>	
3.2) Marcadores foliculares y de competencia ovocitaria	
<i>a. Velocimetría y color perifolicular</i>	
III. <u>HIPÓTESIS</u>	48
IV. <u>OBJETIVOS</u>	49
V. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	
A. MATERIAL	50
1) Pacientes	
1.1) Características de las pacientes	
1.2) Causas de esterilidad:	
<i>a. Etiología</i>	
<i>b. Primaria, secundaria y años de esterilidad.</i>	
2) Estudios básicos	
2.1) Analítica hormonal en fase folicular precoz (2º-5º): FSH, LH, Estradiol, TSH y PRL.	
2.2) Ecografía morfológica basal en fase folicular precoz.	
2.3) Seguimiento ecográfico del ciclo ovárico basal y Progesterona en fase mesolútea	
2.4) Histeroscopia diagnóstica en 2ª fase de ciclo	
2.5) Histerosalpingografía y/o laparoscopia	
2.6) Seminograma. Estudio hormonal del varón cuando estuvo indicado. Cariotipo.	
3) Protocolo de estimulación	
3.1) Frenación larga: Decapeptyl 0,1 mg diario	
3.2) Estimulación: FSH recombinante, y HMG cuando fue necesario	
3.3) Administración de HCG	

3.4) Apoyo de fase lútea con progesterona

B. MÉTODOS

53

1) Estudio ecográfico Doppler

1.1) Características del ecógrafo, Doppler pulsado y Doppler color

1.2) Técnica de exploración

a. Biometría: ovárica y uterina, folicular y endometrial.

b. Planimetría color y Power Doppler: ovárica y uterina, folicular y endometrial.

c. Velocimetría Doppler:

- Arcada ovárica: OVF estromal ovárica, perifolicular, lútea y útero-ovárica.
- Arcada uterina: OVF uterina, intramiométriales- subendométriales y endométriales.

2) Estudio Hormonal: determinaciones hormonales, técnica y fiabilidad

2.1) Estradiol

2.2) Progesterona

2.3) HCG

2.4) FSH

2.5) LH

2.6) TSH

2.7) PRL

3) Seguimiento propiamente dicho

3.1) Al inicio de frenación (22º)

3.2) Día de la supresión

3.3) 6º de estimulación

3.4) Cada 48 horas hasta día de HCG.

3.5) Día de HCG

3.6) Día de la Punción

3.7) Día de la transferencia

- 3.8) Día +7 postpunción
- 3.9) Día +14 postpunción
- 4) **Técnicas de Laboratorio de Reproducción: Clasificación embrionaria**
 - 4.1) Punción folicular y recuperación de ovocitos
 - 4.2) Estudio de la madurez ovocitaria y clasificación
 - 4.3) Seguimiento de la fertilización y división embrionario
 - 4.4) Clasificación embrionaria
- 5) **Registro de Datos**
- 6) **Análisis estadístico**

VI.	<u>RESULTADOS</u>	76
VII.	<u>DISCUSIÓN</u>	104
VIII.	<u>CONCLUSIONES</u>	134
IX.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	136
X.	<u>SIGLAS Y ABREVIATURAS</u>	166
XI.	<u>ANEXOS</u>	169

I. INTRODUCCIÓN

La consecución de un embarazo tras aplicarse una técnica de reproducción asistida, es decir, el éxito reproductivo, radica esencialmente en la posibilidad de generar un embrión adecuado a partir de los gametos masculinos y femenino con capacidad de implantarse en un endometrio receptivo.

Existen trabajos que avalan la importancia del flujo sanguíneo en los procesos de reclutamiento y desarrollo folicular, estado del ovocito y embrión resultante, si se realiza una fertilización *in vitro*, así como su importancia para determinar la receptividad endometrial y la implantación gestacional.

Por otra parte, el Doppler color transvaginal se ha consolidado en los últimos años como un método incruento para conocer de forma indirecta y reproducible el estado de perfusión útero-ovárica.

El estudio vascular mediante Doppler se convierte en una exploración esencial con capacidad diagnóstica y predictiva sobre todos los factores en los que se fundamenta el éxito de la implantación embrionaria.

Diferentes factores vasculares están implicados en estos procesos, de tal forma que se originan cambios hemodinámicos que podemos valorar mediante Doppler color transvaginal.

En conclusión, se han mejorado nuestros conocimientos sobre el desarrollo de la gestación precoz, pero se conoce muy poco sobre el periodo más crítico del desarrollo humano, entre la concepción y la implantación. La introducción del Doppler color y el Doppler pulsado transvaginal ha abierto nuevos caminos para la evaluación de los sucesos vasculares durante este periodo. Se han realizado importantes avances en el conocimiento de la perfusión ovárica y uterina de la mujer no gestante. Estos resultados estimulan la realización de estudios de los primeros días de la vida humana que pueden contribuir al éxito o fracaso de la implantación que sigue a las técnicas de reproducción asistida (1-61)

II. MARCO TEÓRICO

A. DOPPLER DE LA CIRCULACION UTERO-OVARICA DURANTE EL CICLO MENSTRUAL

1) Fundamentos de la exploración Doppler para el estudio de la circulación útero-ovárica.

1.1) Flujo útero-ovárico

Flujo sanguíneo utero-ovárico

1.1.1 Flujo ovárico

El ovario recibe hasta un 0.2% del total del gasto cardiaco, lo que supone un flujo 7 veces mayor que el del cerebro o el hígado (62).

El flujo ovárico presenta cambios durante el ciclo menstrual y éstos se relacionan con la secreción hormonal ovárica. Hay un patrón cíclico del flujo ovárico que se asocia a las etapas funcionales del ciclo menstrual.

Fase folicular

En la fase folicular precoz, disminuye el flujo vascular en el ovario que mantuvo el cuerpo lúteo durante el ciclo precedente (63,64). Durante este periodo el flujo aumenta de forma brusca y significativa en relación a los procesos de reclutamiento y selección folicular (65).

Este aumento es pequeño, aunque se mantiene durante toda la fase folicular (63-67) en el ovario que no contiene el cuerpo lúteo en regresión (63-66). Esto coincide con un aumento de estradiol en sangre periférica (65) y en la vena ovárica (67).

El flujo folicular aumenta con el tamaño de los folículos y se correlaciona con el número de folículos pequeños que pueden iniciar el proceso de maduración (68).

Por el contrario, el flujo tecal no se relaciona con el diámetro de folículos mayores de 1 mm (69) y su flujo relativo es inversamente proporcional al tamaño folicular (64,70)

El aumento de la demanda sanguínea durante la fase folicular responde a la presencia de un folículo dominante en crecimiento (64,70).

Ovulación

El folículo preovulatorio presenta un aumento de su vascularización con ingurgitación y vasodilatación capilar (71-76). Este fenómeno se ha involucrado en el proceso de ruptura folicular y se considera relacionado con el pico mesocíclico de LH (74-76).

En el periodo ovulatorio, aumenta el porcentaje de gasto cardíaco que reciben los ovarios (77). El aporte de flujo sanguíneo a la pared del folículo preovulatorio está incrementado después del pico de la LH y disminuye tras la ovulación (78).

Fase lútea

El flujo aumenta en el ovario que mantiene el cuerpo lúteo y no se modifica en el contralateral.

La distribución ovárica del flujo se relaciona con el estado funcional del cuerpo lúteo. En su periodo funcional máximo, el cuerpo lúteo recibe hasta un 90% del total del flujo ovárico, mientras que el componente estromático, recibe un aporte similar al estroma del ovario contralateral. El flujo del estroma se mantiene constante durante toda la fase lútea. Por otra parte, se han descrito variaciones regionales de flujo dentro del cuerpo lúteo. Las áreas de mayor aporte sanguíneo corresponden a las zonas diana de las gonadotropinas encargadas de la secreción de esteroide.

Durante esta fase, el flujo ovárico se correlaciona con los niveles sistémicos de progesterona y con las tasas de esta hormona en la vena ovárica.

El flujo ovárico es mayor durante la fase lútea precoz y desciende, gradualmente, con la edad del cuerpo lúteo, de forma paralela a la progesterona. Por este motivo se le ha implicado en el proceso de luteólisis fisiológica. La reducción del flujo ocasiona la delección de las células endoteliales del cuerpo lúteo.

Sin embargo, la mayoría de los trabajos demuestra una clara independencia entre la luteólisis hormonal y el descenso del flujo ovárico. El flujo ovárico puede disminuir sin que se altere la secreción de progesterona. Además, el flujo ovárico permanece constante durante el proceso de luteólisis y, en general, el descenso en las tasas de progesterona precede a la disminución del flujo ovárico.

Atresia folicular

Durante el proceso de atresia, los folículos ováricos son invadidos por los vasos, sin embargo su flujo tecal es cuantitativamente menor que los no atrésicos.

El flujo ovárico aumenta cuando el proceso de atresia disminuye, siendo este aumento mayor en los ovarios ovulatorios que en los anovulatorios. Por tanto, parece existir una relación inversa entre el flujo ovárico y el proceso de atresia folicular.

1.1.2 Flujo uterino

Mediante la técnica de aclaramiento de ^{133}Xe , diversos autores coinciden en que el flujo uterino se encuentra entre 20-25 ml/min x 100gr.

Se describen dos componentes de perfusión intrauterinos: el componente con mayor flujo correspondería al miometrio, mientras que el endometrio tendría una perfusión menor. Sin embargo, otros autores no encuentran diferencias entre los distintos componentes uterinos. Por otra parte, este autor encuentra un mayor flujo en el útero de la mujer múltipara que en el de las nulíparas.

El estudio del flujo de la arteria uterina ascendente mediante fluxometría Doppler, obtiene un valor de su diámetro medio fuera del embarazo de 1,6 mm y un flujo de 94,5 ml/min. Aunque es imposible calcular el flujo tisular relativo, se

deduce de los resultados que el flujo uterino total, calculado por este método, es aproximadamente siete veces superior al referido por los métodos de aclaramiento.

Se observó que el flujo uterino en la mujer aumenta durante la fase folicular y descendía en la fase lútea.

1.2) Técnica Doppler

Técnicas de obtención de ondas Doppler en la circulación utero-ovárica

Para asegurar la posibilidad de reproducir la exploración y así llegar a su valoración correcta se procede a presentar el mapa de los vasos utero-ováricos a través de los patrones OVF obtenidos en localizaciones anatómo-ecográficas concretas. Se establecen varios circuitos en el estudio de la circulación utero-ovárica (**Figuras 1 y 2**).

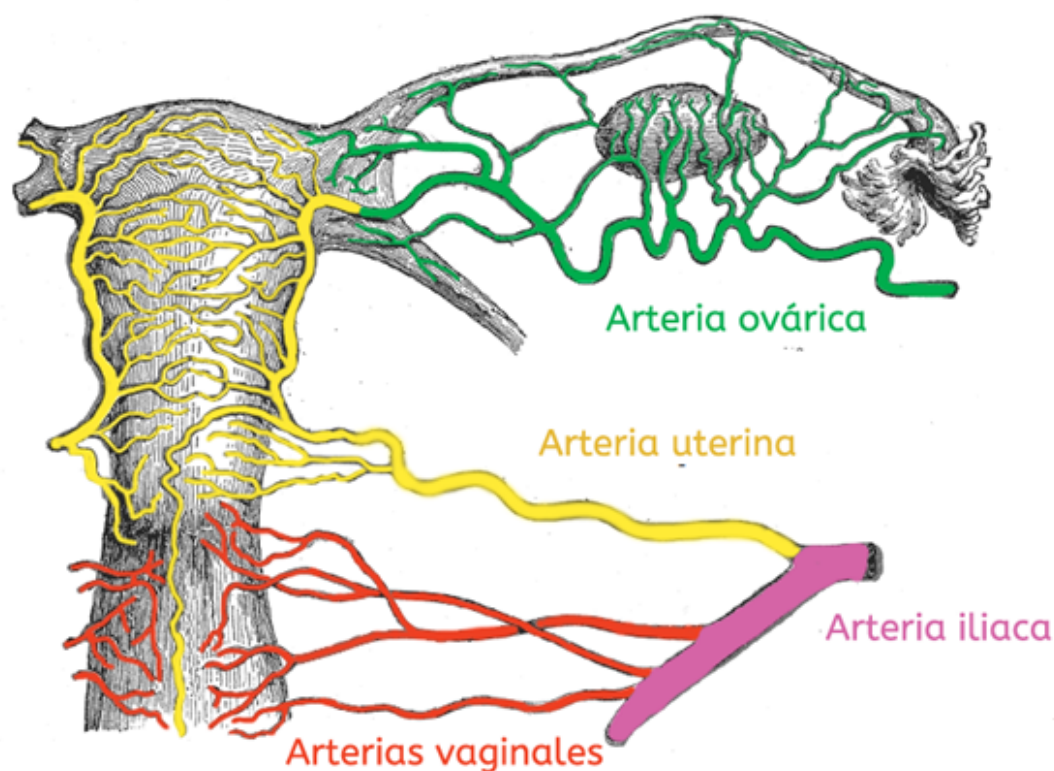


Figura 1 Arquitectura vascular utero-ovárica (Procedencia www.yeztli.com)

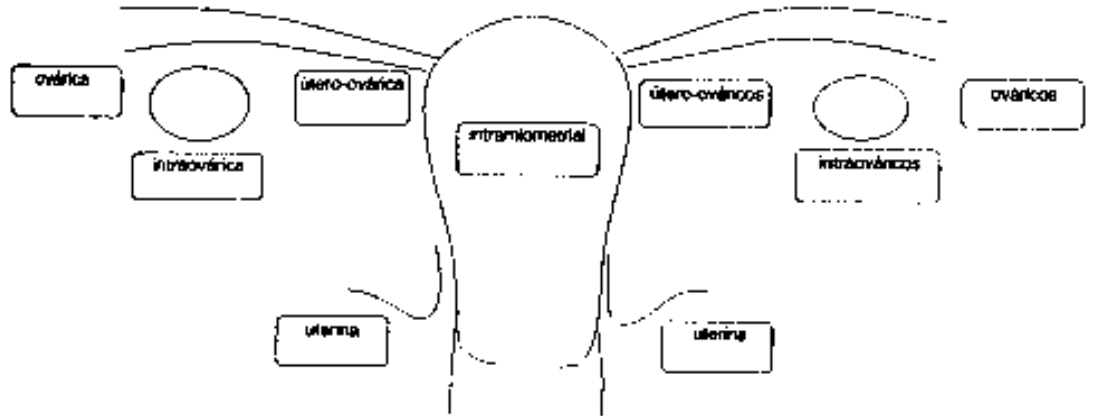


Figura 2 Diagrama para la recogida de los índices velocimétricos de la circulación utero-ovárica (Procedencia Luis T.Mercé Alberto)

CIRCUITO UTERINO

Corresponde a la arteria uterina, desde su trayecto ligamentario hasta el parauterino de su rama ascendente y sus ramas cervicales. Se describe esquemáticamente su localización y las características de la OVF.

- *Arteria uterina preuterina o ligamentaria*
 - OVF de alta Resistencia
 - Desplazar el volumen de muestra entre iliaca externa y útero (trayecto paralelo a la ilíaca externa)
- *Arteria uterina ascendente*
 - OVF de alta pulsatilidad
 - Cortes transversales ascendentes a partir de la confluencia de la arteria uterina con el cérvix.
- *Arteria uterina cervical*
 - OVF de alta resistencia
 - Cortes transversales, desplazando el cursor en la región cervical donde confluye la uterina con el ángulo cérvico-corporal a nivel del OCI. Se

desplaza el volumen de muestra en sentido centrípeto, buscando la señal de la uterina a 1 cm del borde de la serosa cervical.

- *Arterias cervicales*
 - OVF inferior y pulsatilidad mayor
 - Se desplaza el cursor caudalmente al pedículo de la uterina, por el borde externo del cérvix.
 - Hay una disminución en las resistencias en la onda de la arteria uterina ascendente respecto a la cervical

CIRCUITO INTRAMIOMETRIAL

Corresponde, fundamentalmente, al sistema de distribución de las arterias arcuatas y radiales. Se describe esquemáticamente su localización y las características de la OVF.

- OVF de pulsatilidad baja, perfiles suaves y velocidades bajas, con diástole ausente a veces.
- Obtener la OVF más próxima a endometrio.
- Cortes longitudinales, barrer el volumen de muestra (2-3 mm) el espacio miometrial entre la línea endometrial y la serosa uterina.
 - *Arteria radial*: próxima a la línea endometrial
 - *Arteria arcuata*: periféricamente
 - *Rama centripeta de la arcuata*: tiene mayor resistencia que la arcuata y velocidades menores que la uterina.

CIRCUITO OVÁRICO

Formado por la arteria preovárica, la arteria utero-ovárica y el sistema arterial de las espirales intraováricas. Se describe esquemáticamente su localización y las características de la OVF.

- *Arteria ovárica preovárica o infundibular*
 - OVF con alta resistencia, ausencia frecuente del flujo diastólico y a veces existe flujo reverso
 - Cursor en el polo externo del ovario o en el ligamento infundíbulo-pélvico.
- *Arteria intraovárica*
 - OVF de baja sístole, diástole presente y pendiente suave.

- Desplazar el volumen de muestra desde el centro a la periferia del parénquima ovárico hasta que se integre la señal.
- *Arteria utero-ovárica*
 - OVF semejante a la arteria uterina, con velocidades máximas sistólicas y diastólicas inferiores. Notch frecuente y ausencia de flujo diastólico frecuente.
 - Cortes transversales de útero hasta que ambos cuernos uterinos sean visibles. Colocar el volumen de muestra a 1 cm del cuerno uterino.

Técnicas de obtención de flujos para planimetría Doppler en la circulación utero-ovárica

Para asegurar la posibilidad de reproducir la exploración y así llegar a su valoración correcta se define la captación de flujos para planimetría:

FLUJO FOLICULAR:

- Plano de corte: diámetros foliculares máximos y máxima área color
- *Flujo folicular absoluto*: superficie del folículo y superficie del contorno vascular perifolicular hasta el límite externo de la señal color perifolicular.
- *Flujo folicular relativo*: superficie señal color/ superficie total (superficie folicular + contorno vascular color)

FLUJO OVÁRICO:

- *Flujo folicular total*: suma del área color relativa y absoluta de todos los folículos
- Área total de color: Plano de corte de máximos diámetros ováricos y máxima área de color

FLUJO ENDOMETRIAL:

Plano longitudinal de máximas medidas: superficie de endometrio y superficie de endometrio ocupada por señal color.

Aunque cuando no se conoce el ángulo de insonación, la medida absoluta de las velocidades puede ser errónea, se admite que dado que se exploran suficientes vasos con un ángulo cero o muy bajo, las velocidades máximas se obtienen y reproducen con un error mínimo (35,79,80)

Doppler color en la fertilización *in vitro* (FIV) como predictor

2) Doppler de la circulación ovárica y uterina durante el ciclo espontáneo.

Posibilidades y limitaciones actuales del estudio Doppler

Los actuales sistemas de Doppler color transvaginal permiten visualizar y evaluar el flujo sanguíneo de todos los vasos de la arcada ovárica (arterias ováricas, útero-ováricas, espirales y perifoliculares) y uterina (arterias uterinas, arcuatas, radiales y espirales). Las redes terminales, es decir las arterias espirales intraováricas foliculares y lúteas, y las arterias espirales endometriales son las que presentan cíclicamente el proceso de angiogénesis y los cambios vasculares más intensos (81,82). Parece por lo tanto lógico que su estudio debería ser el principal objetivo de nuestro estudio, sin embargo la exploración de estos vasos presenta a nuestro juicio algunos problemas importantes: 1) Su escaso o nulo desarrollo en la fase folicular precoz implica que no se reconozcan en este momento o se confundan con otros; 2) Tienen un calibre que impide su individualización con la ventana Doppler, lo que comporta en que sea extremadamente difícil reproducir los mismos vasos en sucesivas exploraciones; 3) Presentan velocidades sanguíneas bajas con señal color y espectro Doppler muy débil, aunque este inconveniente se puede salvar con la utilización del "Power Doppler". En el momento actual aunque prácticamente se ha generalizado el estudio de los vasos intraováricos, no ocurre aún con los endometriales, siendo en este caso el Doppler de la arteria uterina el más utilizado para la valoración de la perfusión uterina y endometrial.

El "Power Doppler Tridimensional" podría permitir valorar las redes terminales de forma volumétrica, dado que no parece verosímil que la resistencia más baja de un área vascular represente de forma adecuada su flujo sanguíneo total (83).

Hay que diferenciar varias etapas para una caracterización más detallada de los cambios del flujo sanguíneo.

2.1) Doppler de la fase folicular: crecimiento folicular

Flujo ovárico

El flujo sanguíneo ovárico participa en el “reclutamiento” y la “selección” del folículo dominante durante la fase folicular precoz. En este momento del ciclo ovárico, la resistencia vascular intraovárica se correlaciona con el número de folículos ováricos hasta que un único folículo es seleccionado (84). Cuando un folículo ovárico tiene un diámetro medio de 8 mm se produce un cambio en la trayectoria de su crecimiento y el cruce de los valores medios de los índices velocimétricos intraováricos (86). Estos datos habían sido comunicados muy precozmente por Taylor y cols. (87) y han sido corroborados en el trabajo de Vrtacnik-Bokal y Meden-Vrtovec (88).

Cuando el folículo seleccionado alcanza 10 mm de diámetro medio se convierte en dominante (84). El flujo sanguíneo intraovárico permanece estable a pesar de la disminución del número de folículos, lo que corrobora su importancia en el proceso de selección. Kupesic y cols. (89) también habían señalado que las señales Doppler sólo se pueden obtener a partir de un diámetro folicular de 10-12 mm. Sin embargo, hay que puntualizar que tanto la integración de las ondas de velocidad de flujo (OVF), como de las señales color se relacionan con la sensibilidad de los aparatos. En este sentido, Zaidi y cols. (90) aseguran que son capaces de detectar flujo sanguíneo perifolicular en folículos de 6 mm en el 5º día del ciclo ovárico.

Los estudios Doppler han puesto de manifiesto que el flujo sanguíneo aumenta en el ovario activo, portador del folículo dominante, durante la fase folicular (91-95). El aumento de flujo puede ser más evidente mediante la valoración de las velocidades medias y máximas que de los índices velocimétricos (79,95). Se observa tanto en la pared del folículo dominante, en el que progresivamente aparecen más áreas color, como en los vasos del estroma ovárico y en las arterias del hilio ovárico (79,95). Este aumento de flujo es más manifiesto cerca de la ovulación, cuando las diferencias se hacen significativas

con respecto al ovario inactivo o contralateral y a los valores de los días previos (86,91,93). El aumento del flujo sanguíneo también se produce en el árbol venoso (96).

Diversos estudios de experimentación animal interpretan que el aumento del flujo sanguíneo durante la fase folicular se debe esencialmente al crecimiento del folículo dominante (84). Weiner y cols. (97) observan una buena correlación entre el índice de pulsatilidad intraovárico y los folículos mayores de 15 mm en pacientes estimuladas con gonadotropinas. Balakier y cols. (98), demuestran una positiva y fuerte correlación entre el tamaño de los folículos ováricos y el pico sistólico de pacientes estimuladas para fertilización *in vitro*. Se ha visto (96) en ciclos unifoliculares estimulados con FSH que existe una correlación significativa entre el diámetro del folículo dominante y tanto la velocidad sistólica máxima como la velocidad venosa máxima perifolicular .

Aunque es clásicamente admitido la estrecha correlación entre el tamaño del folículo dominante y el estradiol sérico (99), no esta claramente demostrada la relación entre el flujo sanguíneo folicular y las tasas de estradiol. Weiner y cols. (97) observan una correlación negativa significativa entre el índice de pulsatilidad intraovárico y el estradiol sanguíneo en ciclos estimulados. También parece existir una clara dependencia entre el índice de pulsatilidad de la arteria ovárica y el estradiol en ciclos espontáneos (100). Por el contrario, Tan y cols. (95) no han objetivado una correlación significativa entre los valores de Doppler perifolicular y el estradiol en fase folicular. Según los estudios de experimentación animal, el flujo sanguíneo ovárico tiene una regulación multifactorial y han sido implicados muy diferentes mediadores (101).

Durante la fase folicular, el flujo sanguíneo en el ovario contralateral o inactivo se mantiene estable sin cambios significativos, aunque con cierta tendencia a la disminución (79,86,93).

Flujo uterino

El flujo sanguíneo de la arcada vascular uterina ha sido evaluado mediante Doppler en todas sus ramas: uterinas, arcuatas, radiales y espirales endometriales durante el ciclo normal (102,103), estimulado (102), patológico (104) y tras la menopausia (105). En general, en cualquier condición funcional, la resistencia vascular disminuye característicamente desde las arterias uterinas a las espirales endometriales y por el contrario la dificultad en obtener señales Doppler adecuadas para su valoración aumenta (102-105). También hay que considerar que el flujo de las arterias uterinas y espirales disminuye cuando las pacientes se encuentran de pie (106) y que se ha observado una variabilidad intraobservador de los índices velocimétricos entre 5-10% (107,108), aunque la vía vaginal resulta más reproducible (108).

El flujo de las arterias uterinas no sufre cambios característicos durante la fase folicular (79,104,109,110). Durante esta fase del ciclo, los índices velocimétricos no se modifican significativamente, ni existen diferencias significativas entre la arteria uterina dominante u homolateral al ovario dominante y su contralateral (79,95,109). Sin embargo, Tan y cols. (95) han observado un incremento gradual de la velocidad media de la arteria uterina dominante que, aunque no era estadísticamente significativo, no lo presentaba la arteria uterina no dominante. El flujo de las arterias radiales subendometriales se comporta de forma similar a las uterinas sin cambios significativos durante la fase folicular (79,104,110).

2.2) Doppler de la fase periovulatoria: ovulación

Flujo ovárico

El flujo intraovárico, valorado mediante índices velocimétricos, aumenta en el ovario dominante entre uno (86,93) y tres días (79) antes de la ovulación ecográfica. Este cambio es mas marcado en la pared del folículo preovulatorio que

en las arterias del estroma y del hilio ovárico (79,95). Un mismo grupo de investigadores en diferentes trabajos (111-113) ha comprobado que la velocidad máxima sanguínea de las arterias del folículo preovulatorio alcanza sus valores más altos justo antes de la ruptura folicular. La velocidad perifolicular aumenta desde 29 horas antes de la ruptura folicular, dando lugar a un pico que continua al menos 72 horas después de la formación del cuerpo amarillo (113).

Recientemente, Brännström y cols. han estudiado los cambios del flujo sanguíneo en diferentes partes del folículo preovulatorio durante el momento periovulatorio (114). Según estos autores, el flujo sanguíneo es similar en las diferentes partes del folículo preovulatorio antes del pico de LH. Sin embargo, en el periodo ovulatorio precoz (hasta 20 horas después del inicio del pico de LH), aumenta la velocidad sistólica máxima en la base del folículo, se mantiene en las zonas laterales y disminuye significativamente en la zona apical. En la fase ovulatoria tardía (más de 20 horas después del inicio del pico de LH) desaparece el flujo de la zona apical, manteniéndose elevado en su base y sin cambios significativos en las zonas laterales

Los cambios periovulatorios del flujo perifolicular se aprecian especialmente al estudiar la velocidad sanguínea, siendo poco llamativos en los índices velocimétricos (79, 94, 95,111-114). No se ha demostrado ningún ritmo circadiano de la velocimetría intraovárica durante el periodo periovulatorio (115). Al igual que la arterial, la velocidad máxima venosa también aumenta de forma progresiva en el folículo preovulatorio (96).

El aumento del flujo sanguíneo en el folículo preovulatorio se relaciona en el tiempo con los picos de LH y estradiol. En la experimentación animal, ambas hormonas aumentan directa o indirectamente el flujo ovárico (101). Tan y cols. han demostrado una buena correlación de la velocidad máxima perifolicular y estromal con los niveles séricos de FSH, LH y progesterona, no así con el estradiol (95). Al aumento de flujo ovárico periovulatorio también participa una intensa angiogénesis. En el folículo preovulatorio, la microscopía electrónica muestra una gran cantidad de vasos dilatados con aspecto sinusoidal y áreas avasculares debidas a la isquemia y a la aparición de shunts arteriovenosos (75).

Estos hallazgos apoyan el mecanismo vascular de la ovulación y explicarían el aumento de la velocidad sanguínea por la presencia de shunts y la desaparición apical de las señales Doppler por la trombosis e isquemia.

La ovulación culmina el proceso de angiogénesis, desarrollo y vasodilatación de la red vascular perifolicular. A partir de la ruptura folicular, los vasos tecales invaden las células de la granulosa con una intensa angiogénesis y aparición de amplias anastomosis arterio-venosas. Por otra parte, el crecimiento del ovario provoca un estiramiento de las arterias espirales, lo que compromete la estabilidad hemodinámica del sistema y origina un aumento de la turbulencia del flujo (84,86). Estos cambios en la histología y hemodinamia de los vasos intraováricos son los responsables de la “conversión lútea” o conjunto de cambios del Doppler intraovárico en la señal color, la morfología del espectro de la onda y la velocimetría que se producen a partir de la ovulación (84).

La importancia clínica de la “conversión lútea” reside en su valor diagnóstico de ovulación. Sólo se observa en el ovario dominante cuando la ovulación se ha producido. Jamás aparece en el ovario inactivo. Persiste durante toda la fase lútea, aunque suele ser menos evidente en los días premenstruales si no se ha producido la gestación. Es independiente de la presencia o morfología del cuerpo lúteo. Este punto tiene un gran interés dado que se ha comprobado tras analizar 217 ciclos ovulatorios que en un 25% de ellos no se evidencia ninguna imagen sugestiva de cuerpo lúteo. En 30% de los ciclos, el cuerpo lúteo es econegativo o ecopositivo lo que contribuye a su confusión con un folículo o con el parénquima ovárico. Sólo en un 45% de los ciclos, una morfología “en capas” o ecomixta sugiere la presencia de un cuerpo lúteo y diagnostica ovulación (96). Por otra parte, la morfología del cuerpo lúteo varía durante la fase lútea lo que añade una mayor dificultad diagnóstica a su imagen (84,85). Por lo tanto, la “conversión lútea” es un criterio Doppler de ovulación más preciso que la imagen de cuerpo lúteo, facilitando el diagnóstico de la disfunción ovárica que curse con anovulación (85,86,93).

La velocidad sanguínea (95,96) y el flujo en términos de resistencia vascular (79,86,93) aumentan significativamente con la ruptura folicular. El flujo

sanguíneo es más elevado en el cuerpo lúteo que en folículo preovulatorio. La conductancia diferencial intraovárica el día de la ovulación ecográfica es significativamente mayor a la del día -1 del pico de LH y a la que presenta el ovario contralateral. La velocidad del pico sistólico y la velocidad máxima venosa sólo aumentan significativamente cuando se produce la ovulación tras la administración de hCG (95). El aumento del flujo lúteo intraovárico también se manifiesta en las arterias espirales del estroma y del hilio ovárico (79) y en las arterias ovárica y útero-ovárica (84).

Flujo uterino

Durante el periodo periovulatorio, Zaidi y cols. (116) observaron que el flujo de las arterias uterinas presenta un ritmo circadiano independiente de la secreción hormonal con un índice de pulsatilidad significativamente disminuido a las 6 de la mañana. Esta circunstancia condiciona los resultados y obliga a realizar las determinaciones velocimétricas a la misma hora para evitar errores.

Los estudios sobre los cambios del flujo de las arterias uterinas durante el periodo periovulatorio ofrecen resultados contradictorios. Diferentes autores (79,109,117-119) han comunicado que la resistencia de las arterias uterinas aumenta en la fase periovulatoria. El índice de resistencia asciende progresivamente desde dos días antes de la ovulación ecográfica hasta el día siguiente a la ovulación en el que presenta la resistencia mayor (109). Scholtes y cols. (41), Steer y cols. (119) y Sladkevicius y cols (79) observan que la impedancia más elevada se produce dos días después de la ovulación. El flujo de las arterias radiales subendometriales se comporta de forma similar al uterino (79). Es difícil entender esta disminución de flujo, pero podría atribuirse a un aumento del tono uterino basal o de la contractibilidad uterina durante este periodo (79).

Kupesic y Kurjak (102) y más recientemente Bourne y cols. (110) han comprobado que tanto el flujo sanguíneo de las arterias uterinas (102,110), radiales (102,110) subendometriales (110) y espirales (102) aumenta durante el

periodo periovulatorio desde el pico de LH (110). El IP más bajo ocurre 9 días después del pico de LH (119), indicando que la perfusión uterina máxima ocurre durante el momento esperado para la implantación. Se ha medido el IR el día de la transferencia en ciclos de FIV y es más bajo en las que quedan gestantes. Esta mejora no se produce en los ciclos inducidos, por lo que se podría deducir que la receptividad uterina en los ciclos ovulatorios espontáneos es mejor que en los inducidos (102).

Existe un acuerdo en que no existen diferencias significativas entre ambas arterias uterinas en este periodo (79,100,102,109,110,118,119). Steer y cols. (119) observaron una correlación negativa entre el estradiol sérico y el flujo sanguíneo, es decir una mayor tasa de estradiol se acompaña de un índice de pulsatilidad más elevado. Sin embargo otros autores no han demostrado ninguna correlación con el estradiol (110) o por el contrario la encuentran positiva, es decir a más estradiol, más flujo uterino o menor resistencia vascular (95). Hay que tener en cuenta que la regulación del flujo uterino, al igual que ocurre con el ovárico, es de tipo multifactorial. Este dato puede explicar resultados ciertamente contradictorios al mediar otros factores vasoactivos, además de las hormonas esteroides (101).

2.3) Doppler de la fase lútea: cuerpo lúteo

Flujo ovárico

A partir de la ovulación, el flujo sanguíneo aumenta en el ovario dominante y se mantiene elevado hasta la fase lútea tardía. El flujo intraovárico del ovario dominante durante la fase lútea es significativamente superior al de la fase folicular y al del ovario inactivo para cualquiera de los parámetros velocimétricos de estudio (91-95, 104,118,120). El flujo sanguíneo se encuentra elevado durante esta fase en las arterias que rodean al cuerpo lúteo, pero también en las del estroma ovárico (79,95) y las del hilio ovárico (79). Todas las arterias del circuito ovárico, incluyendo la útero-ovárica y la ovárica presentan una resistencia

vascular disminuida (84,86). La velocidad venosa lútea máxima también es significativamente superior a la folicular.

Este aumento de flujo se debe fundamentalmente al desarrollo de nuevos vasos en el ovario portador del cuerpo lúteo, pero también puede estar regulado por mediadores locales y generales. Durante la fase lútea, los índices velocimétricos correlacionan bien con el tamaño del cuerpo lúteo (86). Se ha demostrado (86) una correlación significativa entre la velocimetría y el estradiol en fase lútea de ciclos espontáneos e inducidos, aunque otros autores no la observan (95,100). Los estudios experimentales en animales sostienen que existe una buena correlación entre el flujo ovárico y la secreción de progesterona (84), sin embargo algunos autores no han podido demostrar esta correlación en la mujer (86,97,100). Más recientemente varios grupos han comunicado una correlación significativa entre la progesterona en diferentes momentos de la fase lútea y las tasas sanguíneas de progesterona (95,104,120,121). Existe una correlación significativa entre la progesterona en fase mesolútea y la velocidad venosa máxima intraovárica (96). Estas nuevas relaciones entre progesterona y velocimetría Doppler pueden sentar las bases para el diagnóstico Doppler de la insuficiencia lútea.

A partir del noveno día postovulatorio, el flujo intraovárico disminuye de forma progresiva hasta la menstruación. La conversión lútea de la OVF y la señal color se hacen menos evidentes de forma gradual. En el ovario inactivo, el flujo sanguíneo disminuye de forma muy poco marcada durante toda la fase lútea (79,86,92,93,120). Durante la menstruación sólo se observa una disminución de la velocidad media en las arterias del hilio ovárico (122).

Flujo uterino

Durante la fase lútea, el flujo sanguíneo de todo el árbol vascular uterino, desde las arterias uterinas hasta las espirales endometriales, aumenta con respecto a la fase folicular de un modo significativo (79,102-104,110). A medida que avanza el ciclo menstrual, pero sobre todo durante la fase lútea, las señales

color de los vasos intramiometriales y endometriales aumentan en número e intensidad. Es posible observar la señal color de las espirales endometriales hasta la vecindad del canal endometrial.

Los diferentes parámetros velocimétricos utilizados muestran que el flujo lúteo de las arterias uterinas es significativamente más alto (79,92,95,99,110,118). Las diferencias entre los parámetros velocimétricos de la arteria uterina dominante y no dominante no suelen ser significativas excepto para unos pocos días de la fase mesolútea (47,79,95,118). El flujo sanguíneo intramiometrial subendometrial se comporta de forma similar y paralela al de las arterias uterinas (79,104,110).

Aunque en algunos trabajos se ha encontrado una correlación positiva significativa entre el flujo de las arterias uterinas y la progesterona (95,119), otros grupos no demuestran una asociación significativa (100,110). Strigini y cols. (123) han observado que la administración de progesterona durante la fase lútea produce un descenso del índice de pulsatilidad de las arterias uterinas. Por el contrario, Marsh y cols. (124) han demostrado que los preparados gestagénicos provocan la disminución del flujo de las arterias uterinas cuando se añaden al tratamiento hormonal sustitutivo con estradiol transdérmico. Es muy posible que las variaciones del flujo uterino durante la fase lútea se asocien más adecuadamente con la relación estrógeno/progesterona en sangre periférica que con la concentración de cada una de estas hormonas por separado (47), probablemente debido a que la progesterona antagoniza el efecto vasodilatador de los estrógenos (125). En 161 ciclos de pacientes estériles en programa de estimulación ovárica e inseminación intrauterina no se pudo demostrar una correlación significativa entre el índice de pulsatilidad de las arterias uterinas e intramiometriales con el estradiol, progesterona o el cociente P/E_2 durante la fase mesolútea. Sin embargo, si parece existir cierta relación entre los valores medios del índice de pulsatilidad uterino e intramiometrial y las tasas hormonales que presentan los diferentes patrones funcionales ováricos (47).

La perfusión uterina parece mejorar con la menstruación según demuestra la disminución del índice de pulsatilidad y el aumento de la velocidad media de las arterias uterinas (122). Estos cambios deben estar mediados por la acción general

o local de diferentes componentes vasoactivos como las prostaglandinas, la oxitocina y la vasopresina (122).

3) Doppler de la circulación ovárica y uterina durante el ciclo estimulado.

3.1) Doppler y predicción de respuesta ovárica (126)

En la actualidad, la estimulación del crecimiento folicular es mandatorio en la aplicación de cualquier técnica de reproducción asistida. Sin embargo, la respuesta de los ovarios a las gonadotropinas no es dosis-dependiente ni siquiera siempre idéntica ni homogénea. Frente a pacientes que se caracterizan por una respuesta exagerada, con riesgo asociado de hiperestimulación ovárica, tenemos otras con muy baja respuesta que implicará muchas veces la cancelación del ciclo. Por lo tanto determinar la reserva ovárica y establecer la dosis de gonadotropinas, especialmente en el primer ciclo, tiene una enorme importancia para evitar sorpresas innecesarias.

Aumentar el conocimiento sobre los mecanismos de envejecimiento ovárico (cuantificación de folículos, medidas endocrinas y test genéticos), puede mejorar la prevención del fallo ovárico prematuro (183).

Una posibilidad futura sería que los primeros cuidados médicos, endocrinológicos y oncológicos pudieran valorar rápidamente una disfunción ovárica y la reserva ovárica de forma más segura que la FSH. Para las mujeres, la posibilidad de conocer la duración de su esperanza de vida reproductiva le permitiría redefinir el significado de la planificación familiar (185).

Edad

La edad de la paciente ha sido el parámetro que tradicionalmente se ha tomado como predictor de la respuesta ovárica a la estimulación. Sin embargo hay mujeres mayores de 40 años que pueden tener una respuesta normal, mientras otras muy jóvenes tendrán una baja respuesta, incluso con ciclos menstruales aparentemente normales, en lo que se ha denominado "fallo ovárico oculto". Por

lo tanto parece muy conveniente establecer otros parámetros de respuesta ovárica.

Parámetros hormonales

Durante los últimos años se han investigado diversos parámetros hormonales y pruebas dinámicas.

La determinación basal de FSH en el 3º día del ciclo menstrual es mejor predictor de la respuesta ovárica que la edad y es independiente de ésta. También se ha demostrado que las tasas elevadas de estradiol en situación basal predicen una baja respuesta ovárica y aumentan el riesgo de cancelación del ciclo. Los niveles basales disminuidos de inhibina B también se han relacionado con una baja respuesta ovárica. Más recientemente se ha incorporado la valoración de la hormona antimülleriana (AMH) ha demostrado, al menos, el mismo nivel de seguridad y valor clínico de predicción de baja respuesta y no gestación que el RFA (149). Para otros autores, la AMH y RFA son los predictores más significativos de baja respuesta en técnicas de reproducción asistida, solos (199, 200, 201, 202 a favor de AMH, 203, 204, 205, 206, 207 a favor de RFA) o en combinación o similares (208, 209, 210, 211, 212, 213), pero no predicen la no gestación que depende de la edad (150, 203). Incluso ha surgido la picoAMH, con un umbral de detección más bajo. Se correlaciona con RFA ($R=0,61$), un nivel de pico AMH > 500 pg/mL tiene una sensibilidad de 83,3% y 70,8% de especificidad para detectar las pacientes a las que la obtención de ovocitos es exitosa, si el nivel es <100 pg/mL, no se consiguen ovocitos (214). Broer y cols (200) apuntan que la AMH tiene valores distintos en función de distintas situaciones clínicas, Bentzen y cols (215) refieren que la AMH disminuye con el uso de anticonceptivos orales y no es un buen predictor y Li y cols (201) indican que en PCOS sólo indica el exceso folicular, no el reposo ovárico.

Entre los tests dinámicos se han utilizado el test de clomifeno, el test de EFORT o estimulación ovárica con FSH, el test de GnRH y el test de hMG, aunque ninguno de ellos ha demostrado una mejor sensibilidad que las determinaciones basales de FSH y estradiol. En general, los parámetros hormonales son adecuados para indicarnos una respuesta ovárica disminuida, y

algunos autores (200, 209, 210) nos indican la posibilidad de utilizar una dosis de inicio o protocolos individualizados utilizando AMH y RFA, maximizando la probabilidad de embarazo, eliminando la yatrogenia y evitando los riesgos de la hiperestimulación (184). Oliveira y cols (216) validan un índice nuevo de predicción de respuesta ovárica (ORPI) para poder individualizar el control de la estimulación de la ovulación. El valor se calcula multiplicando AMH (ng/ml) por RFA (2-9 mm) y el resultado es dividido por la edad ($ORPI = (AMH \times RFA) / \text{edad}$).

Parámetros ecográficos

Los parámetros ecográficos que pueden utilizarse para predecir la respuesta ovárica son el volumen ovárico y el recuento folicular en situación basal.

El volumen ovárico fue el primer parámetro utilizado, comprobándose que su medida en fase lútea media, previa a la desensibilización hipofisaria con análogos de la GnRH, era un buen predictor de la respuesta ovárica y de las tasas de embarazo en un programa de fertilización *in vitro* (FIV). Con independencia de la edad, el volumen ovárico se relacionó con las tasas de estradiol, número de ovocitos, número de embriones y embarazos. Las tasas de cancelación aumentaron a medida que disminuía el volumen ovárico. Las pacientes con un volumen ovárico inferior a 3 ml tienen un riesgo superior al 50% de suspender el ciclo, aunque se aumente la dosis de gonadotropinas.

El recuento de los folículos entre 2 y 5 mm en situación basal (**Figura 3**), después de la supresión hipofisaria, permite clasificar los ovarios en: normales, cuando tienen entre 5 y 15 folículos; inactivos, si tienen menos de 5 folículos; y poliquísticos, si el número de folículos es mayor de 15. Broekmans y cols (212) nos ofrece unas recomendaciones prácticas para el recuento de folículos y poder mejorar en el futuro la realización de trabajos y la actividad clínica.

El número de folículos es un marcador de la respuesta ovárica y del número de ovocitos recuperados mejor que la edad y el volumen ovárico. Después de controlar los efectos de la edad y las tasas de FSH se ha demostrado que el recuento folicular es un buen predictor de número de ovocitos recuperados. Un número de folículos igual o menor de tres implica dos terceras partes de ciclos

cancelados por baja respuesta. La tasa de embarazo mejora cuando encontramos folículos entre 5 y 10 mm, mientras que la presencia de folículos mayores de 11 mm se asocia con un mayor número de ciclos cancelados debido a la baja respuesta ovárica.

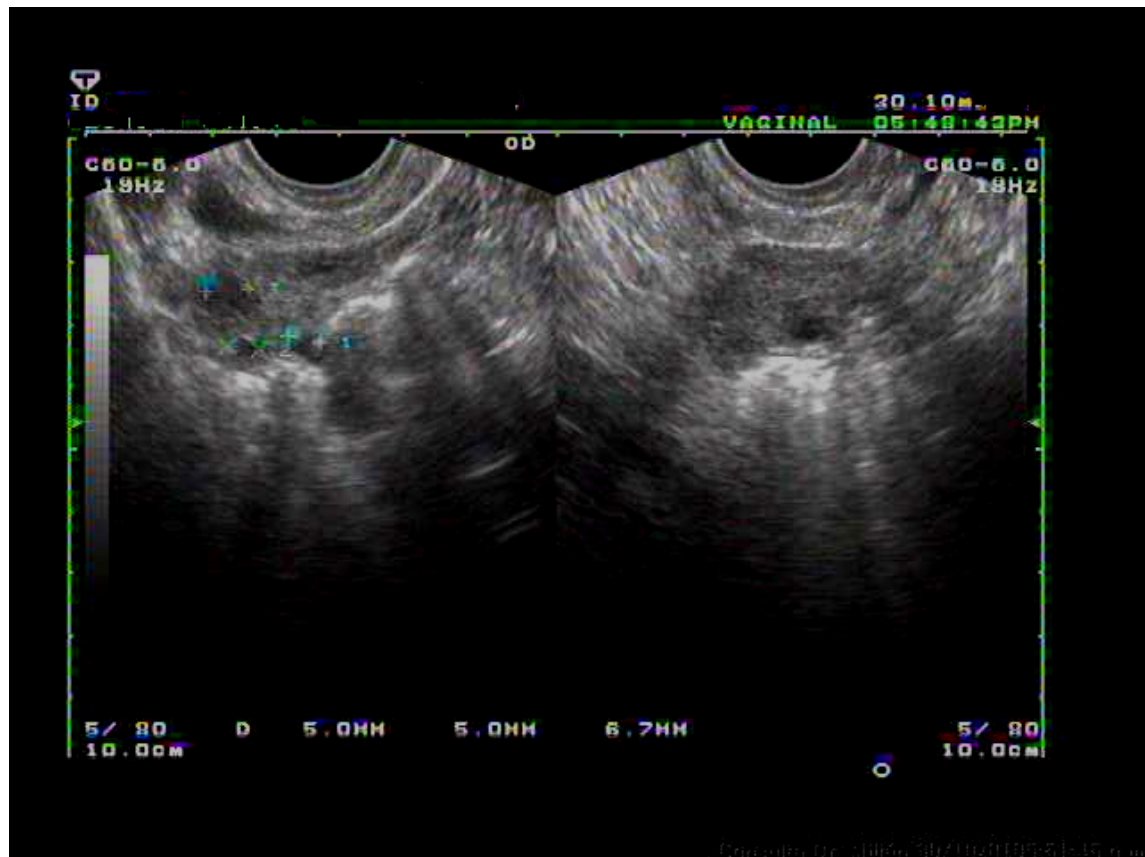


Figura 3 Recuento de folículos antrales (RFA) (Procedencia del autor)

El recuento folicular en fase folicular precoz puede ser un buen marcador de la reserva ovárica, dado que se ha comprobado que el número de folículos disminuye proporcionalmente con la edad de la paciente y el aumento de las tasas sanguíneas de FSH.

Los folículos en crecimiento proceden de una reserva de folículos primordiales constituida precozmente. A parte de esta reserva pre-establecida, se forma una segunda reserva ovárica que consiste en los pequeños folículos antrales que responden a las gonadotropinas, la cual es una reserva dinámica para la ovulación. Kerr y cols (217) discuten el concepto de oogénesis postnatal,

Doppler color en la fertilización *in vitro* (FIV) como predictor

una población de células madre de oogonias que contribuyen a dar nuevos ovocitos para compensar parcialmente la disminución de la reserva de los folículos primordiales. El tamaño de la reserva, valorado directamente mediante RFA o mediante marcadores endocrinos, determina el éxito de las técnicas de reproducción asistida. Hay una gran evidencia que demuestra la relación funcional entre las dos reservas. El tamaño de ambas reservas es variable entre individuos de la misma edad y el equilibrio de la reserva dinámica es específica de cada individuo y resulta de la regulación de dos vías, la fosfatasa y el homólogo de la tensina. Las mutaciones de los genes que codifican los ligandos, receptores o señalan los efectores de estas vías pueden acelerar o modular el final de la reserva ovárica, produciendo fallo ovárico prematuro o aumentando la longevidad reproductiva, respectivamente. Con el envejecimiento femenino, la disminución del número de los folículos primordiales es paralela a la disminución en el tamaño de la reserva dinámica de folículos antrales pequeños y el deterioro de la calidad ovocitaria. El conocimiento de las vías y su control hormonal y ambiental durante la vida adulta y fetal abre nuevas perspectivas para manejar la reserva ovárica (181).

Se ha comprobado que las bajas respondedoras con niveles normales de FSH presentan un número de folículos entre 2 y 5 mm significativamente disminuido con respecto al grupo normal, mientras aumentan aquellos entre 8 y 10 mm a la par que disminuyen la concentración sérica de AMH y el volumen ovárico (208). Brink y cols (218) hacen referencia a la mayor tendencia a la poliovlación en la oleada de la fase folicular a medida que aumenta la edad.

En pacientes con reserva ovárica normal, se ha demostrado que el ovario derecho contiene mayor número de folículos antrales que el izquierdo (221) y se produce un reclutamiento folicular compensatorio durante la estimulación ovárica para una FIV en el ovario que permanece tras una ooforectomía unilateral (222). Richardson y cols (219) y Peck y cols (223) demuestran una asociación entre factores del estilo de vida y la edad espontánea de menopausia, en particular en relación con el tabaquismo. Cedars y cols (220) dispone de datos que sugieren que las mujeres con baja reserva representan un grupo único que puede tener un

riesgo aumentado de padecer, a largo plazo, efectos sobre la salud más allá de la pérdida de la fertilidad. Benaglia y cols (204) revisa el comportamiento del RFA en pacientes con endometriomas o cirugía por endometriosis con la misma validez y Parker y cols (205) con el uso de anticonceptivos orales en obesas, donde se produce un aumento de RFA por sincronización de los mismos mientras que Ben Haroush y cols (206) y Bentzen y cols (215) con anticonceptivos orales encuentran no sólo una disminución del RFA sino también del volumen ovárico, además del número y la calidad de embriones (206), por lo que no se considera seguro el RFA como predictor de la respuesta ovárica (215).

Además, se ha diseñado la escala STRAW+10 (Taller de los Estadios del Envejecimiento Reproductivo revisado en 2011) para estadificar el envejecimiento ovárico. Esta escala podría permitir la comparación entre estudios en mujeres de edad media y provee bases más comprensibles para valorar la edad reproductiva en contextos clínicos y de investigación y para la toma de decisiones (224). Se ha encontrado una asociación significativa entre FSH, estradiol, volumen ovárico, RFA y estado de menopausia, lo que da soporte al uso de este sistema (225,226). La progresión en los estadios se define por las características del ciclo menstrual asociada a un descenso significativo del número de folículos primordiales (226). Se han descrito nomogramas validados relacionados con la edad tanto de RFA (227) como del volumen ovárico (175) (indica reserva ovárica, alteraciones en la pubertad y de la función reproductiva y el cáncer está en investigación).

El Doppler pulsado y color pueden predecir la respuesta ovárica a la estimulación mediante la evaluación del flujo del estroma ovárico en situación basal

La velocidad del pico sistólico estromal en la fase folicular precoz o en el ovario inactivo tras supresión hipofisaria se relaciona estrechamente con el número de folículos en crecimiento, siendo un predictor de la respuesta ovárica mejor que la edad y los niveles basales de FSH y estradiol.

Un flujo estromal disminuido es responsable de una baja respuesta ovárica, mientras cuando excede de 10 cm/s se obtiene un número elevado de ovocitos y una mejor tasa de embarazo. También se ha observado que una resistencia

intraovárica aumentada, antes de iniciar la estimulación, condiciona un mayor número de días de tratamiento y un menor número de ovocitos recuperados. Por otra parte, una respuesta excesiva con riesgo de hiperestimulación ovárica se producirá en mujeres con un flujo estromal basal elevado. Las mujeres con ovario poliquístico (POC) se caracterizan por presentar un flujo ovárico estromal elevado en situación basal, no obstante la respuesta ovárica se relaciona directamente con el flujo estromal aún después de controlar la edad de la paciente y los ovarios POC. También se ha demostrado una estrecha correlación entre la gravedad del síndrome de hiperestimulación y la resistencia intraovárica.

La relación entre el flujo estromal y la respuesta folicular se explicaría desde un punto de vista fisiológico por la facilidad que esta situación ofrece al transporte y distribución de las gonadotropinas sobre las células ováricas diana para la estimulación del crecimiento folicular. Por otra parte existe una estrecha relación entre el flujo ovárico, la expresión y secreción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la posibilidad de que se produzca un síndrome de hiperestimulación ovárica.

3.2) Relación del Doppler con la secreción hormonal y otros factores reguladores del flujo útero-ovárico

Regulación del flujo utero-ovárico

Entre las sustancias que se han implicado en la regulación del flujo utero-ovárico se encuentran:

Hormonas proteicas

La administración de LH aumenta el porcentaje de gasto cardiaco destinado a los ovarios.

El tratamiento con análogos de la GnRH descende los niveles de flujo ovárico durante la fase lútea.

La oxitocina produce una importante reducción del flujo uterino en la mujer, tanto en la fase folicular como en la lútea.

La vasopresina o ADH disminuye intensamente tanto el flujo ovárico, como el uterino.

La ACTH provoca un aumento del flujo ovárico que puede estar mediado por prostaglandinas. Esta hormona también modifica el flujo uterino, sin embargo, este incremento parece secundario al ovárico, ya que, aisladamente, el flujo uterino no parece modificarse.

Hormonas esteroideas

Se ha comprobado que la administración de estrógenos aumenta el flujo uterino entre 10 y 50 veces, se mantiene durante un intervalo de tiempo y, posteriormente, desciende a su situación basal. El incremento de flujo está relacionado como el tipo de estrógeno administrado. La potencia vasodilatadora máxima corresponde al 17β - estradiol y la mínima a la estrona. El estriol tiene una potencia similar a la del 17β - estradiol, mientras que el estetrol tiene entre 15 y 30 veces menos capacidad vasodilatadora que el anterior.

El flujo ovárico también aumenta tras la administración de progesterona. La progesterona parece tener un efecto antagonista sobre el flujo uterino. Los niveles sanguíneos de progesterona son inversamente proporcionales a este flujo durante el ciclo menstrual. Además, la administración de esta hormona suprime el efecto vasodilatador de los estrógenos.

Prostaglandinas

La administración de $\text{PGF}_{2\alpha}$ provoca una disminución del flujo ovárico y uterino. Este efecto vasoconstrictor ha sido implicado en su posible acción luteolítica. También se ha propuesto su mediación en la redistribución del flujo ovárico.

La PGE_1 y la PGE_2 tienen efectos vasodilatadores y se ha evidenciado, tras su administración, un aumento del flujo ovárico y del uterino.

La prostaciclina o PGI_2 se comporta como un potente vasodilatador en la circulación uterina de la oveja no gestante.

Otros mediadores

Los inhibidores de las prostaglandinas no suprimen el aumento de flujo uterino inducido por los estrógenos, que si es disminuido por los corticoides.

B. MARCADORES ECOGRÁFICOS Y DOPPLER DE LA IMPLANTACIÓN

1) Marcadores de implantación

1.1) Implantación humana

Las modernas técnicas de reproducción asistida, especialmente la fertilización *in vitro*, han permitido abordar el conocimiento del proceso de implantación desde la perspectiva de su eficacia. Hoy conocemos que la consecución de embarazo tras una transferencia embrionaria se encuentra estrechamente relacionada con la calidad del embrión, la receptividad uterina o endometrial y, por supuesto, la propia transferencia.

Los factores vasculares de receptividad uterina han sido los primeros en estudiarse y aplicarse clínicamente, posiblemente porque también las alteraciones del flujo sanguíneo uterino fueron las primeras en relacionarse directamente con el fracaso gestacional. Dada la importancia del embrión en la consecución de embarazo, no es de extrañar que recientemente los investigadores traten de encontrar criterios indirectos de madurez ovocitaria, con los que aproximarnos a la predicción de la calidad del embrión. De esta forma el estudio vascular mediante Doppler se convierte en una exploración esencial con capacidad de predicción sobre los dos factores en los que se fundamente el éxito de la implantación.

Tras la implantación se produce la placentación. Alrededor de un 20% de las pérdidas gestacionales ocultas se producen por el fracaso de la placentación antes de la falta de la regla. Este dato habla por sí sólo de la importancia de esta etapa. Sin embargo, los datos sobre esta época aún son escasos y probablemente la sutileza de los cambios vasculares precise de una tecnología mucho más sensible para poder valorarlos adecuadamente. Por el contrario, la placentación inicial tras la aparición ecográfica del saco gestacional está experimentando un intenso debate con ideas encontradas sobre el momento de

establecerse la comunicación entre las circulaciones materna y fetal a través del espacio intervilloso.

1.2) ¿Qué es un marcador de implantación?. Marcadores no ecográficos

La fertilización del ovocito por los espermatozoides ocurre en la región ampullar de la trompa. Mediante el estudio de embriones humanos que se han recuperado antes de la implantación, parece que el embrión tarda tres días en atravesar la trompa (127). Durante este tiempo, en el cigoto se producen una serie de divisiones mitóticas desarrollándose hasta un estadio de 12-16 células que se conoce como mórula precoz. Según los clásicos trabajos de Hertig y cols. (12,13) la implantación se produce 5 ó 6 días después de la ovulación, por lo que el embrión permanece libre en la cavidad uterina durante 2-3 días. En este periodo, el embrión continúa dividiéndose. La compactación de la mórula se produce cuando alcanza 32 blastómeros. Posteriormente se forma el blastocisto mediante acumulo de líquido en el interior de la mórula, estadio en el que se produce la implantación (1-2). En ciclos naturales, Buster y cols. (3) ha recuperado blastocistos de la cavidad uterina 4,5 días después de la ovulación, dato que corrobora que la implantación se produce hacia el 5º o 6º día de vida embrionaria.

La implantación es la penetración del blastocisto a través del endometrio con erosión de las células epiteliales, debida probablemente a las enzimas proteolíticas de la masa celular externa del blastocisto o trofoblasto. La implantación es un fenómeno muy complejo en el que intervienen una gran variedad de mecanismos interactivos entre el embrión y la madre. Aunque la información aún es incompleta, cada día conocemos un poco más sobre los procesos celulares y moleculares que intervienen (4-6). La implantación implica siempre una precisa sincronización entre el estadio de desarrollo del embrión y la receptividad uterina. A este tiempo de sincronización se conoce como "ventana de implantación" y es muy variable en las diferentes especies de animales. Mientras algunos autores opinan que en la mujer, la ventana implantación depende fundamentalmente de la edad embrionaria y es independiente del estado de

maduración endometrial (7), otros creen que es la “receptividad uterina” la que marca esencialmente el tiempo de implantación, lo que se demuestra por la aparición de “pinópodos” (ver más adelante) en el epitelio endometrial (8-10). Desde el primer momento, los fenómenos vasculares están presentes en la anidación del embrión. En los roedores se ha comprobado que 24 horas antes del contacto entre el blastocisto y el endometrio se produce un aumento de la permeabilidad capilar en el lugar en el que se producirá la invasión por mediación local de las prostaglandinas (11). Entre el 6º y 12 º postovulatorio los capilares endometriales se dilatan progresivamente adquiriendo un aspecto sinusoidal, mientras el sincitiotrofoblasto penetra en el endometrio. Hacia el 11º-12º día, la circulación útero-placentaria queda completamente establecida al confluir las lagunas trofoblásticas con los sinusoides vasculares maternos (12,135).

Muy probablemente el fracaso de la implantación es la causa más importante de la baja tasa de fertilidad de la especie humana. Hertig y cols. (13) estimaron que un 30% de los embriones no se implantan y que un 30% presentan una implantación morfológicamente anormal. También se ha demostrado que una vez se inicia la implantación y el blastocisto produce hCG, alrededor de un 20% (intervalo de confianza: 11-28) se perderán antes de que se inicie la menstruación (14-15). Con el desarrollo de las técnicas de reproducción asistida se ha comprobado que el éxito de la implantación depende fundamentalmente de la eficiencia de la transferencia, la calidad del embrión y la receptividad uterina (16). Sin embargo, la contribución de la receptividad endometrial al éxito de la implantación parece ser mayor (31% al 64%) que la calidad del embrión (21% al 32%) (17).

Marcadores no ecográficos (128,147)

Sería de gran utilidad en los tratamientos de reproducción asistida, conocer con precisión la función y mecanismo de los marcadores que intervienen durante la ventana de implantación, tanto los morfológicos (pinópodos) como los bioquímicos (integrinas y mucinas), como los genéticos. Esta búsqueda ha venido ocupando las últimas dos décadas (187).

Doppler color en la fertilización *in vitro* (FIV) como predictor

a. Marcadores Morfológicos: Pinópodos

El endometrio presenta diversos cambios histológicos: vascularización y edema estromal, actividad secretora glandular y aparición de pinópodos en la superficie luminal del epitelio.

Pinópodos

Son largas proyecciones citoplasmáticas del epitelio, cuya aparición coincide con la ventana de implantación. En los ciclos naturales, los pinópodos se desarrollan antes que en los ciclos de estimulación y después que en los ciclos de sustitución hormonal. La aparición de pinópodos está regulada hormonalmente, ya que se ve afectada por niveles elevados de estradiol, inhibiendo su formación, en cambio los pinópodos ya desarrollados varía de una paciente a otra, con diferencias que no se correlacionan con el nivel de estradiol o progesterona. Por tanto, la detección de los pinópodos en ciclos de reproducción asistida podría ayudar a asegurar la receptividad en la transferencia embrionaria (188, 189), pero estas proyecciones ectoplásmicas epiteliaes no son específicas del estado receptivo (190).

b. Marcadores Bioquímicos: Integrinas y mucinas

Integrinas

Son proteínas integrales bifuncionales: en su lado intracelular interactúan con el citoesqueleto, mientras que en el lado extracelular tienen receptores para una matriz de proteínas como el colágeno, laminina, fibronectina y vitronectina. Las integrinas son moléculas de adhesión que pertenecen a una familia de moléculas que está codificada por un grupo de genes que tiene cierta homología, lo que indica un gen ancestral común como en la familia de las inmunoglobulinas. La familia de las integrinas está formada por un grupo de cerca de 30 proteínas con homología estructural que promueven las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular.

Todas las integrinas son heterodímeros compuestas por dos cadenas unidas de manera no covalente, α y β (la α de 120 a 200 Kd, la β de 90 a 110 Kd). La posición aminoterminal constituye un dominio globular que funciona uniendo ligandos específicos e interactuando entre sí con el resto de cadenas. Este

dominio contiene subdominios catiónicos de uniones divalentes esenciales para su función como receptor; esta porción extracelular interactúa con varios ligandos incluyendo la matriz extracelular (glicoproteínas) y proteínas en la superficie de otras células. Durante la ventana de implantación se expresan las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 4$ (su desaparición cierra la ventana) y $\beta 3$ (su aparición abre la ventana).

Mucinas

Son glicoproteínas voluminosas, altamente glicosiladas, que constituyen el mayor componente del moco. Son moléculas de antiadhesión (inhibidores de la unión célula-célula y célula sustrato). En mujeres con abortos de repetición se ha visto que los niveles de *mucina-1* (muc-1) son más bajos de lo normal, lo que permitiría la implantación de embriones “defectuosos” que no pueden terminar su desarrollo. Durante las etapas de división embrionaria se produce un aumento de muc-1 en el epitelio materno, mientras que en las etapas de adhesión se observa una pérdida local de dicha molécula, lo que sugiere que la muc-1 puede que actúe como barrera para la implantación.

c. Marcadores Genéticos

Se están realizando estudios del perfil genético global mediante microarray de alta densidad durante la ventana de implantación en pacientes con fallo de implantación reiterados en FIV frente a mujeres fértiles, usando la transcriptómica y el estudio del perfil genético de 238 genes (191). Es más seguro que el estudio histológico y reproducible (hasta 40 meses después) (192). Permite encontrar una ventana de implantación personalizada (193, 194) Además, se está intentando validar la expresión genética seleccionada media PCR cuantitativa en tiempo real. Estos estudios han objetivado cientos de expresiones genéticas diferenciadas que son potenciales marcadores. El objetivo es conseguir biomarcadores seguros y reproducibles que puedan ayudar a la identificación clínica de la ventana de implantación. Se han identificado trece miRNA en muestras de endometrio de mujeres con fallo de implantación que supuestamente regulan la expresión de 3800 genes. Diez miRNAs se sobreexpresaban (incluyendo miR 145, 23b y 99a) mientras que tres se infraexpresaban. Una de las posibles terapias del fallo de

implantación podría incluir la modificación directa de las proteínas endometriales disreguladas o de los factores de transcripción (147).

Regulación de la implantación

La implantación es un proceso regulado por multitud de moléculas, de las cuales en muchos casos no conocemos su función exacta. Las moléculas más importantes que intervienen en la regulación de la implantación las podemos resumir en el siguiente listado:

- **Mediadores locales de acción preponderante durante la fase proliferativa:**

- factor de crecimiento epidérmico (EGF)
- factor de crecimiento insulínico tipo 1 y 2 (IGF-1, IGF-2)
- factor de crecimiento fibroblástico (FGF)
- factor de crecimiento vasculo-endometrial (VEGF).

- **Señales locales que actúan durante la fase secretora:**

- factor de crecimiento queratinocítico (KGF)
- interferón gamma (IFN)
- factor de necrosis tumoral (TNF- α)
- factor estimulador de colonias tipo 1 (CSF-1).

- **Señales locales que actúan durante la implantación:**

- factor de crecimiento epidérmico ligador de heparina (HB-EGF)
- factor inhibidor de leucocitario (LIF)
- la interleuquina 1 (IL-1).

- **Señales locales que actúan al final de la implantación:**

- factor de crecimiento transformante β (TGF- β)
- proteína ligadora del factor de crecimiento insulínico tipo-1 (IGF-BP-1).

De estos factores, los más importantes para la regulación de la implantación son:

El ***factor de crecimiento epidérmico*** (EGF), tiene un factor crítico en el desarrollo del blastocisto. Se observó que los blastocistos podían realizar la eclosión, pero fallaba la aposición. Aunque los trofoblastos invadían la decidua, la masa celular

interna era muy reducida, y los fetos morían a mitad de gestación con placentas defectuosas.

El *factor inhibidor leucocitario* (LIF) es una citosina que tiene efectos de proliferación, de diferenciación y de supervivencia celular. Estos efectos están relacionados con el desarrollo del blastocisto, la implantación y el mantenimiento inicial del embarazo.

Podemos analizar las secreciones endometriales, es menos invasivo que la biopsia y quizás nos de información molecular que refleje los cambios en la fisiopatología específica del endometrio en un día del ciclo. Se han investigado potenciales marcadores de receptividad endometrial mediante transcriptómica (195, 196), clasificando en dos grupos (estado pre-receptivo y receptivo) capaces de predecir la implantación. Describen la expresión de 245 genes diferente en el día séptimo postpunción y 53 son candidatos para la implantación. No se han llevado a cabo más estudios de seguimiento. La proteómica de las secreciones es complicada al contener un 90% de seroproteínas (albúmina, globulina, hemoglobina). También se ha investigado la metabolómica y en particular la lipidómica (197). Numerosos investigadores han focalizado su atención en el componente inmunológico, con un aumento del número o la actividad de las natural killer, de ahí el uso de terapias inmunomoduladoras con inmunoglobulinas intravenosas y prednisona. Sin embargo, una revisión reciente y un metanálisis no apoya el uso de tratamientos adyuvantes en estos casos (198). Debidamente validados, los resultados supondrían un avance en el desarrollo de las herramientas diagnósticas en la receptividad endometrial. Se está probando aditivos en el cultivo embrionario o lavados intrauterinos con factores que promueven la adhesión para mejorar la tasa de implantación y otras opciones terapéuticas para tratar la disfunción endometrial y de esa manera mejorar la tasa de embarazo. La terapia génica endometrial y la estimulación local del endometrio podrían formar parte de la rutina clínica (147).

2) Marcadores de ecografía en modo B

2.1) Línea endometrial, grosor endometrial y 3D

Generalmente se acepta que las posibilidades de gestación son prácticamente nulas si el endometrio es menor de 6 mm de grosor, y/o el IP de la arteria uterina es > 3 . Sin embargo, el valor predictivo de la evaluación Doppler sola es pobre (129) y hasta cierto punto otros parámetros requieren consideración tales como el aspecto del endometrio y/o el número de embriones transferidos (130). Aún hoy se sigue debatiendo la relación entre grosor endometrial, morfología e implantación embrionaria. Mientras que algunos autores han hallado una relación entre el grosor y la morfología, otros no han podido demostrarla tanto en fase proliferativa como en fase secretora (144). Incluso en los programas de donación de ovocitos no se ha encontrado una vinculación entre grosor (siempre que supere los 6 mm), producción de estradiol e implantación. Algunos autores, por el contrario, han podido relacionar un grosor endometrial de 9-14 mm el día de la suplementación con progesterona asociado a una tasa de implantación y embarazo más altas comparadas con un endometrio de 7-8 mm (145). Incluso ha sido posible prolongar la ventana de implantación hasta 3 meses (131).

La ecografía representa uno de los mejores métodos de investigación clínica que puede darnos información acerca del pronóstico preimplantacional. Recientemente se ha establecido la valoración morfológica de la receptividad endometrial mediante la evaluación de los siguientes parámetros **morfológicos** (132):

Grosor endometrial

Aunque su valor pronóstico parece ser controvertido, podría no existir una correlación lineal entre éste y el éxito de implantación (148). Sin embargo, no ocurren embarazos sin un valor umbral mínimo de 6 a 8 mm de grosor endometrial. Senturk y cols (186) revisa el efecto de la administración de aspirina a baja dosis, estrógenos, sildenafil vaginal, pentoxifilina, vitamina E y análogos de

la GnRH sobre el endometrio con el ánimo de aumentar la tasa de embarazo e implantación en las técnicas de reproducción asistida.

Morfología ecográfica del endometrio

Las diferencias son semejantes y los estudios son controvertidos. Algunos autores dicen que la hiperecogenicidad endometrial es incompatible con un embarazo. Sin embargo, el endometrio hipoecogénico con 5 capas bien delimitadas es un factor pronóstico excelente, es evidente que la existencia de una imagen trilaminar es la más aproximada a la receptividad endometrial. Las tasas de embarazo basadas en la morfología endometrial no fueron significativamente diferentes, siendo 17,6% para un endometrio tipo A (hiperecoico), 33,3% para un endometrio tipo B (isoecoico) y 35,6% para un endometrio tipo C (trilaminar). Gingold y cols (148) encuentra que un patrón hiperecogénico valorado el día de la transferencia sugiere un cierre prematuro de la ventana de implantación, coincidiendo con un incremento del nivel sérico de progesterona y disminuyendo la tasa de implantación.

En 8 pacientes no se detectó flujo color subendometrial ni vascularización intraendometrial. Esta ausencia de flujo sanguíneo se asoció con fallo de implantación. Las tasas de embarazo relacionadas a las zonas de penetración vascular dentro de las regiones subendometrial y endometrial fueron 26,7% para la zona 1 (subendometrial), 36,4% para la zona 2 (zona hiperecogénica externa) y 37,9% para la zona 3 (zona hipoecogénica interna), sin mostrar diferencias significativas. De los ciclos con endometrio tipo A, el 3,5% tuvo ausencia de color subendometrial, lo cual fue mayor que la frecuencia de ausencia color en el endometrio tipo C (4,1%, $p = 0,03$).

Contrariamente a estos datos, otros estudios no encontraron correlación entre grosor endometrial, patrón endometrial e implantación (266).

Volumen endometrial

Realizado mediante ecografía tridimensional. No se ha demostrado ninguna ventaja de estos parámetros sobre el grosor endometrial, aunque las tasas de embarazo disminuyen significativamente con volúmenes inferiores a 2 ml (133).

3) Marcadores Doppler

3.1) Marcadores de la receptividad uterina

a. Arterias uterinas

Parámetros **funcionales** (132) (con Doppler, evaluación de la vascularización uterina):

El Doppler color pulsado permite una evaluación funcional del útero. La tasa de embarazos es inversamente proporcional al IP. Hay consenso de acuerdo a un valor umbral de IP en arteria uterina con el cual la tasa de embarazo cae significativamente (valores > 3). La presencia de una muesca protodiastólica y la ausencia de un flujo sanguíneo diastólico final (al final de la diástole) tienen mal pronóstico. La presencia o no de un flujo sanguíneo subendometrial podría ser el parámetro pronóstico más importante. No podrían ocurrir embarazos con ausencia de estos flujos.

El trabajo pionero de Goswamy, Williams y Steptoe (18) demostró palpablemente que el flujo sanguíneo de las arterias uterinas condicionaba el éxito de la transferencia en un programa de fertilización *in vitro*. Pero además estos autores comunicaron que la receptividad uterina mejoraba al aumentar la perfusión uterina mediante tratamiento hormonal sustitutivo. Desde este primer estudio, se ha publicado un numeroso grupo que coincide esencialmente en afirmar que la resistencia vascular, en general de las arterias uterinas, evaluada en diferentes momentos, se encuentra significativamente disminuida en las pacientes que quedan gestantes mediante una técnica de reproducción asistida, normalmente fertilización *in vitro*, frente a las que no (19-22). A partir de aquí, se propone su utilización clínica esencialmente a la hora de diferir la transferencia embrionaria cuando la resistencia vascular se encuentra muy elevada. Por el contrario, otro numeroso grupo de autores (33-40) no observa estas diferencias y en general estima, salvo matizaciones, que en el momento actual el Doppler no es una técnica adecuada para valorar la receptividad endometrial y por lo tanto no debe utilizarse en las decisiones clínicas.

Steer y cols. (24) y, más recientemente, Zaidi y cols. (29) con pacientes en un programa de fertilización *in vitro* y Tsai y cols. (30) con pacientes sometidas a inseminación intrauterina observan que la impedancia de las arterias uterinas con una receptividad uterina óptima se produce cuando el índice de pulsatilidad promedio de ambas arterias se encuentra entre 2 y 3 en el día de la transferencia (24) o de la administración de hCG (29,30). Sin embargo, el hallazgo con más interés clínico es que la tasa de implantación y de embarazo se encuentra significativamente disminuida cuando el índice de pulsatilidad es superior a 3 (24,29), incluso no obteniendo ningún embarazo (30). La disminución de la tasa de embarazo en relación con un índice de pulsatilidad uterino elevado ha sido corroborada con pequeñas diferencias por otros autores. Así el grupo de Coulam y cols. (26,27,34) no consiguen embarazos con un índice de pulsatilidad superior a 3,3 en pacientes en programa de transferencia de embriones tras fertilización *in vitro* (26), criopreservación (34) o donación de ovocitos (27). Favre y cols. establecen un límite del índice de pulsatilidad mejor de cualquiera de las arterias uterinas en el día de la transferencia de 3,55 (33). Deichert y cols. (41) y Tekay y cols. (37,42) toman como límite un índice de pulsatilidad de 4. Otro parámetro morfológico que también se ha propuesto es la ausencia del flujo diastólico en la onda de velocidad de flujo de las arterias uterinas, que Goswamy y cols. (18) denominaron onda tipo 0 (37,41,42).

Indudablemente el establecimiento de los límites mencionados, al igual que otros resultados del Doppler, están condicionados por algunos sesgos metodológicos. Entre estos destaca la técnica de estimulación utilizada. Algunas autores han demostrado que la resistencia vascular es más baja en ciclos estimulados que en espontáneos (34,37), aunque recientemente Brown y cols. no la observan (43). Favre y cols. (33) comprobaron que los ciclos frenados con análogos de la LHRh presentan una pulsatilidad uterina menor que cuando éstos no se utilizan en el protocolo de estimulación. Otra fuente de error importante es el momento en que se realice el estudio Doppler, así mientras algunos autores lo valoran el día de la administración de hCG (19,22,25,28-30,34,36,40), otros lo hacen el día de la punción para la recuperación ovocitaria (19,26,31,35,36) o en el

día de la transferencia (21,26,33,35,36,37,39). Coulam y cols. (22) no encuentran diferencias significativas entre el día de la punción y el día de la transferencia, aunque el índice de pulsatilidad fue más bajo el día de la recuperación ovular, por lo que estos autores son de la opinión que la predicción de la receptividad endometrial mediante el estudio Doppler debería realizarse el día de la punción. Por el contrario, Bassil y cols. (36) observan que la administración de hCG provoca un significativo aumento de la resistencia en las arterias uterinas durante un plazo de 48 horas, lo que sin duda artefactaría su valoración el día de la punción.

La principal aplicación clínica que proponen todos los autores al definir un límite alto de pulsatilidad de las arterias uterinas es obtener un parámetro fiable que nos indique cuando conviene suspender la transferencia, criopreservar los embriones y mejorar las condiciones de receptividad vascular uterina con objeto de aumentar las tasas de implantación y embarazo. Si se establece un límite alto, la predicción de un útero no-receptivo tiene una alta especificidad (96-100%) y valor predictivo positivo (88-100%) aunque la sensibilidad (13-35%) y el valor predictivo negativo (44-56%) son bajos (32), aun con todo son mejores que los encontrados con otros parámetros ecográficos propuestos como el grosor endometrial (44). Es decir un flujo sanguíneo uterino inadecuado impide la implantación, aunque una buena perfusión uterina no siempre se acompaña de gestación. Bassil y cols. (36) no creen que el Doppler de las arterias uterinas pueda predecir el estado de receptividad endometrial, sin embargo opinan que un índice de resistencia superior a 0,79 antes de iniciar la estimulación ovárica con gonadotropinas indica una pobre vascularización uterina y es necesario aumentar la dosis de gonadotropinas con objeto de prevenir la inmadurez endometrial.

Bloechle y cols. (40) también en pacientes de programa de fertilización *in vitro* observaron que las velocidades máximas sistólicas y diastólicas promedio de las arterias uterinas doce días después de la transferencia uterina se encontraban significativamente aumentadas en el grupo que consiguió gestación. Estas diferencias también se demostraron para los índices de resistencia y pulsatilidad en este momento y en el inicio de la estimulación ovárica. Aunque no definitivos,

estos resultados también apoyarían el aumento del flujo de las arterias uterinas durante la placentación inicial.

b. Arterias endometriales: velocimetría, color y 3D

Serafini y cols., en un estudio prospectivo, mediante análisis de regresión logística, demostraron que el patrón endometrial (predominantemente el patrón trilaminar) junto al flujo sanguíneo diastólico subendometrial son marcadores predictivos de gestación clínica y embarazo a término. Se ha publicado que un grosor endometrial ≥ 10 mm es favorable para la implantación embrionaria. Sin embargo, muchas mujeres de programas de reproducción asistida con adecuado grosor endometrial no logran una implantación satisfactoria. Para ello Yang y cols. evaluaron la vascularización intraendometrial con Doppler sólo en mujeres que tenían una línea endometrial (LE) ≥ 10 mm, excluyendo pacientes con aparente patología endometrial. Las mujeres con un área de Doppler intraendometrial < 5 mm² lograron tasas de embarazo (23,5% versus 47,5%) e implantación (8,1% versus 20,2%) significativamente menores que las que tenían un área ≥ 5 mm². Concluyeron entonces que, además del grosor endometrial, el área de Doppler intraendometrial podría servir como un factor indicativo de receptividad endometrial. Las pacientes con un adecuado grosor endometrial pero con área pequeña tenderían a tener un desfavorable resultado reproductivo. Zaidi y cols. estudiaron 96 mujeres a las que se les realizó FIV mediante ecografía transvaginal con Doppler pulsado y color el día de la administración de la HCG. Evaluaron el grosor y la morfología endometriales, la presencia o ausencia del flujo color subendometrial o intraendometrial, la penetración vascular intraendometrial y la velocimetría del flujo sanguíneo subendometrial. Los resultados obtenidos se relacionaron con las tasas de embarazo. No encontraron diferencias entre el grupo de embarazadas y no embarazadas en cuanto a grosor endometrial, velocidad pico del flujo sanguíneo sistólico subendometrial (Vmax) o IP subendometrial (132).

Aunque probablemente son los vasos que tienen más interés a la hora de valorar con detalle el estado de perfusión sanguínea endometrial y, por lo tanto, la

receptividad uterina, aun son pocos los trabajos que han evaluado esta vascularización (32,35).

Applebaum (45) diferencia cuatro tipos de mapa color en un típico endometrio proliferativo tardío o en “triple capa” o Tipo C: Zona 1, cuando sólo se visualizan los vasos dentro del miometrio, rodeando al endometrio pero sin alcanzarlo; Zona 2, si los vasos penetran en el borde hiperecogénico endometrial; Zona 3, cuando los vasos alcanzan la zona hipoeecogénica endometrial interna y, finalmente, Zona 4, si los vasos llegan a la cavidad endometrial. El mapa color se encuentra directamente relacionado con la sensibilidad del equipo e incluso el ángulo de emisión, por lo que conviene utilizar siempre las mismas características, sobre todo en cuanto a la velocidad mínima de registro. Por este motivo, técnicamente puede tener una mayor fiabilidad la utilización del “Power Doppler” o el sistema de Doppler energía dado que con él podemos detectar flujos más bajos y carece de las limitaciones en cuanto a la pérdida de información por una emisión ultrasónica perpendicular a la dirección del flujo. Ambos sistemas tienen en común como principal inconveniente hoy por hoy, que no pueden cuantificarse.

Zaidi y cols. (28) valoran la presencia de mapa color subendometrial y la penetración vascular endometrial en el día de la administración de HCG según la clasificación expuesta de Applebaum y comprueban que la ausencia de mapa color a nivel endometrial e intramiometrial subendometrial indica un fracaso total de la implantación, no consiguiendo ningún embarazo en los ocho casos que así ocurrió. Además la tasa de embarazo se relacionó directamente con las zonas de penetración endometrial, con un número de embarazos superior cuando los vasos alcanzan la Zona 3. Sin embargo, estos autores no encontraron diferencias significativas ni para los parámetros velocimétricos ni para el grosor endometrial. Según estos autores, cuando sea detectable el flujo subendometrial, la morfología endometrial tiene menos importancia que la que normalmente se le concede (28).

Battaglia y cols (31), valoran en el día de la recuperación ovular la penetración vascular endometrial mediante el mapa color, pero también el índice de pulsatilidad de las arterias espirales. Los valores de este índice fueron significativamente más bajos en las pacientes que quedaron gestantes tanto en

las arterias uterinas como en las arterias espirales. Además la penetración endometrial de las arterias espirales fue más intensa en el grupo de las gestantes. La perfusión en las arterias radiales subendometriales había mejorado en todos los casos salvo en dos que finalizaron en implantación ectópica y aborto. Esto no ocurrió ni con las arterias uterinas ni con el resto de parámetros que tuvieron un comportamiento más errático. El inconveniente del estudio Doppler en fase mesolútea es que el valor predictivo de receptividad uterina se obtiene cuando ya se está produciendo la implantación, por lo que sólo podemos actuar clínicamente mejorando las condiciones hormonales de la paciente. Sin embargo, la ventaja de esta valoración es que nos puede indicar que la implantación está fracasando a pesar de las medidas adoptadas con anterioridad. Por eso, actualmente, somos partidarios de realizar el estudio Doppler el día de la administración de hCG y entre siete y nueve días más tarde.

El flujo de las arterias espirales endometriales y, en general, el flujo sanguíneo de la circulación intrauterina (arcuatas y radiales) debe mantenerse elevado en la fase lútea tras la implantación y durante la placentación inicial. Se ha comunicado un aumento de la intensidad del mapa color de esta circulación como signo de gestación (134). Este signo que debe ser más fácil de reconocer mediante power Doppler esta sujeto a los errores debidos a la manipulación de las características del aparato y a lo subjetivo de su interpretación. En algunos se ha observado un aumento de las señales color endometriales con niveles positivos de hCG en sangre e incluso alguna señal aislada sin visualizarse aún el saco gestacional, aunque estos hallazgos no parecen reproducirse en todos los casos

La exploración Doppler nos permite evaluar la onda de velocidad de flujo de las arterias subendometriales y endometriales, pero también valorar el mapa color mediante ecografía bidimensional o tridimensional (135,136).

3.2) Marcadores foliculares y de competencia ovocitaria

a. Velocimetría y color perifolicular

La relación entre el estudio Doppler y la calidad de los óvulos y embriones sólo ha interesado a los investigadores recientemente, probablemente debido a

que la fertilización *in vitro* con transferencia embrionaria, técnica de reproducción asistida en la que con más frecuencia se ha utilizado esta exploración, posibilita evaluar en el laboratorio la “calidad” de los embriones que se conocerá antes de la transferencia y porque además, como hemos señalado, el éxito o fracaso de la técnica parece estar más relacionada con la receptividad uterina que con los embriones (17). Sin embargo, para otras técnicas de reproducción asistida como la inseminación intrauterina o la inducción de la ovulación, en las que no es posible acercarnos microscópicamente al óvulo o al embrión, abre nuevas puertas a la hora de predecir, junto a la receptividad endometrial, la posibilidad de embarazo.

La respuesta ovárica de crecimiento multifolicular a la estimulación con gonadotropinas parece relacionarse con el flujo ovárico basal (49) y este puede condicionar los días de estimulación y el número de ovocitos recuperados (50). Así, valorando el flujo estromal en el día 2º ó 3º de un ciclo de fertilización *in vitro*, Zaidi y cols. (49) comprobaron que la velocidad máxima del pico sistólico era significativamente más alta en los ciclos con respuesta normal (crecimiento de más de 6 folículos) frente a los que tuvieron una respuesta “pobre” (6 o menos folículos). Además hubo una significativa correlación entre la velocidad estromal máxima y el número de folículos desarrollados. Por otra parte, Bassil y cols. (50) observaron que los ciclos que necesitaban más de 14 días de estimulación tenían un índice de resistencia intraovárico significativamente mayor que los que necesitaban menos días y que cuando este índice, dos días antes de iniciar la estimulación, era igual o superior a 0,56 se necesitaban más ampollas de hMG y se recogían menos ovocitos. En el otro extremo de la problemática de la estimulación ovárica, Moohan y cols. (51) aseguran que existe una estrecha correlación entre la severidad del síndrome de hiperestimulación ovárica y el índice de resistencia intraovárico.

El tamaño folicular y la concentración sérica de estradiol han sido usados durante mucho tiempo como indicadores de madurez ovocitaria en las técnicas de reproducción asistida, aunque algunos autores no utilizan el estradiol en mujeres normorrespondedoras al obtener los mismos resultados sólo mediante ecografía,

disminuyendo las molestias para las pacientes y sólo realizándolo en mujeres con alto riesgo de desarrollar un síndrome de hiperestimulación ovárica (146). El tamaño folicular juega un papel vital para decidir el momento de la administración de hCG. Los folículos grandes, con un diámetro igual o superior a 16 mm (52,53) o con un volumen mayor de 1 ml (54,55) tienen una tasa de fertilización significativamente más alta que los pequeños. Sin embargo no es tan claro que esta diferencia también lo sea para la tasa de embarazo. Yding Anderson (56) demostró que los folículos que se siguen de embarazo tienen un diámetro significativamente mayor que los folículos con ovocitos que no implantan. De hecho no observó ninguna implantación en ovocitos obtenidos de folículos menores de 16 mm. Berg y cols. (53) también encuentran una tasa de embarazo significativamente superior en folículos iguales o mayores de 16 mm para la fertilización *in vitro* convencional. Por el contrario, no encontró diferencias en el grupo a los que se practicó inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) como técnica de fertilización. A la luz de estos resultados, los autores concluyen que la baja tasa de embarazo derivada de los folículos pequeños se debe a la presencia de un gran número de ovocitos inmaduros, que no pueden utilizarse para ICSI. En esta dirección, Salha y cols. (55) demuestran que la tasa de división, la calidad de los embriones y la tasa de embarazo es similar en folículos mayores y menores de 1 ml.

La ecografía 3D puede realizar la medida de la circunferencia folicular de forma manual mediante VOCAL (Virtual Organ Computer-Aided Analysis) (**Figura 4**) o mediante SonoAVC (Sonography-based Automated Volumen Calculation) una aplicación automática.

Tanto la medida manual como SonoAVC se correlaciona bastante bien con la valoración de la morfología folicular pero SonoAVC tiene una reproducibilidad intra e interobservador mayor que VOCAL y también puede usarse de forma intercambiable junto con la medición 2D convencional.

SonoAVC identifica automáticamente los límites de los folículos y provee de una estimación de su diámetro mayor en tres planos ortogonales (**Figura 5**). Esta tecnología implica manipulación y postprocesado de la imagen 3D. Cada folículo

individual se identifica con un color específico en una pantalla y después junto con otros folículos, con sus dimensiones y tamaños relativos calculados usando la fórmula ajustada de la esfera. El cálculo del volumen se basa en el recuento de voxel identificados dentro de la estructura hiperecoica y inicialmente representa una medida real del volumen folicular teniendo en cuenta la regularidad de la forma. Esto es una gran mejora en relación a la eco 2D, de hecho, cuando el folículo no es esférico, la evaluación del diámetro folicular medio puede estar sobreestimado y de hecho, los folículos en la hiperestimulación controlada suelen tener predominantemente forma elipsoide.

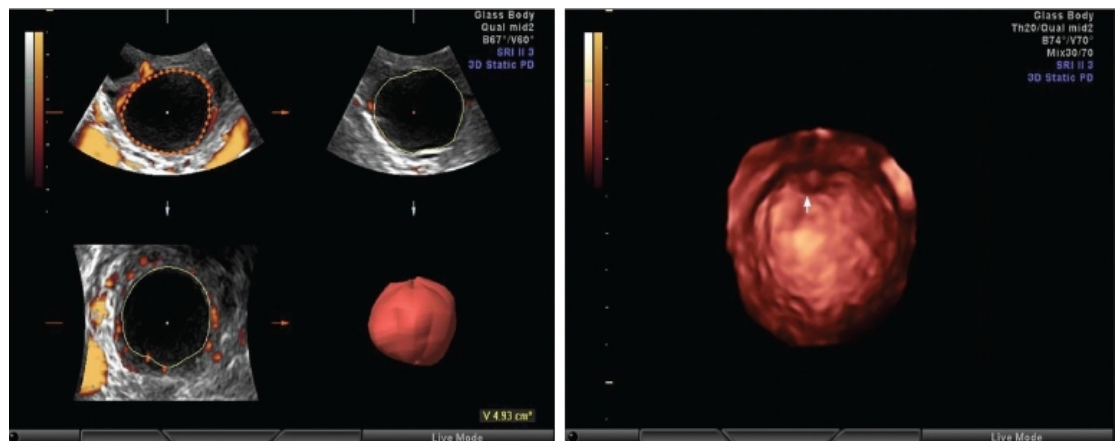


Figura 4 Folículo preovulatorio. Volumen follicular mediante Vocal y cúmulo ooforo (Procedencia Panchal S, Nagori CB. Pre-hCG 3D and 3D power Doppler assessment of the follicle for improving pregnancy rates in intrauterine insemination cycles. Donald School Journal of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology 2009; 2(2):62-7).

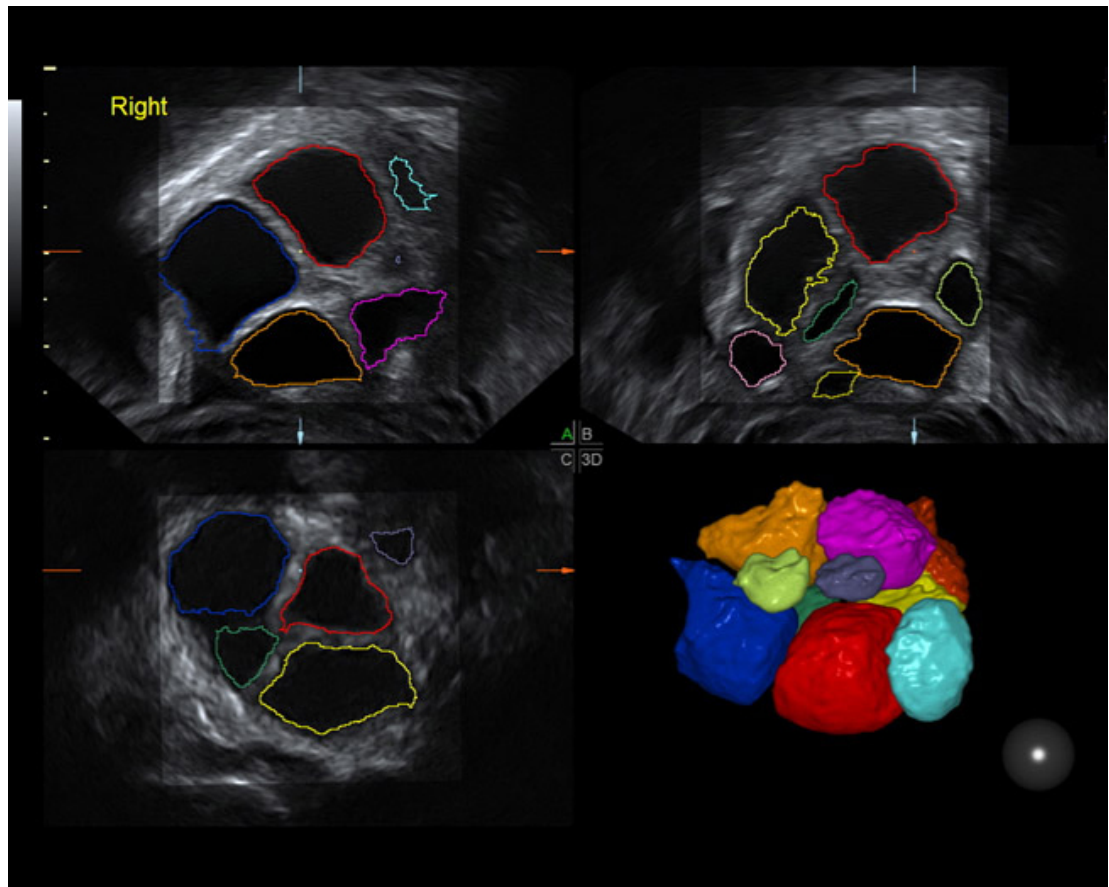


Figura 5 Medida folicular mediante SonoAVC (Procedencia www.volusonclub.net)

VOCAL y SonoAVC proporcionan una forma segura de medir el volumen folicular: se obtuvo un 95% de correspondencia entre la medición el volumen del fólculo obtenido midiendo el volumen de líquido folicular aspirado. Deutch observó un error $<0,02\text{ml}$ y Rousian infraestimaba algo el volumen (diferencia media $-0,63\text{ml}$).

Con toda probabilidad, la capacidad de fertilización, división y posibilidad de implantación de un ovocito dependa de otros factores. Oyesannya y cols. (57) y Nargund y cols. (58) han demostrado que la tasa de recuperación ovocitaria tras punción folicular se relaciona más estrechamente con su vascularización que con su tamaño. Existe una significativa correlación entre el índice de vascularización

Doppler color en la fertilización *in vitro* (FIV) como predictor

folicular (número de folículos vascularizados/número total de folículos) y la tasa de ovocitos recuperados (57). Nargund y cols. (58) también comprobaron que la probabilidad de recuperar un ovocito se relaciona con la presencia de flujo perifolicular, pero además cuando la velocidad del pico sistólico es superior a 10 cm/s tiene una probabilidad del 75% de producir un embrión con alta capacidad de implantación (Grados I y II).

Chui y cols. (59) usando "power Doppler" el día de la punción folicular han observado que el grado de vascularización folicular es independiente del tamaño. La tasa de fertilización aumenta con el grado de vascularización, a la vez que disminuye la tasa de triploidias embrionarias lo que conlleva a una mayor tasa de embarazo a partir de los folículos con una señal color ocupando el 100% de la circunferencia folicular (grado IV). Van Blerkom y cols. (60) han observado que los ovocitos con defectos citoplasmáticos y embriones con blastómeros multinucleados provienen predominantemente de folículos con hipoxia severa. La hipoxia produce una elevada frecuencia de organización anormal de los cromosomas. Por otra parte también han comprobado que existe una estrecha relación entre el contenido de oxígeno folicular, la concentración del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el flujo sanguíneo perifolicular estudiado con Doppler color en el día de la administración de hCG. Todas estas variables son independientes del tamaño folicular, de tal forma que folículos del mismo tamaño tiene contenidos de oxígeno muy diferentes. Por el contrario, un folículo con intensa señal color e un índice de resistencia perifolicular menor de 0,5 tiene un alto contenido de oxígeno. Gauden (61) sugirió que el origen de la hipoxia intrafolicular se debe a un defectuoso desarrollo de la red vascular perifolicular, lo que sería un problema común en mujeres mayores de 40 años. En conclusión parece ser que los parámetros vasculares, y específicamente una adecuada vascularización perifolicular, pueden ayudar a la identificación de los folículos con elevada probabilidad de contener un ovocito normal, con alta probabilidad de recuperarse, fertilizarse, dividirse, implantarse y finalizar con un recién nacido normal.

Algunos de los mencionados pasos pueden evaluarse *in vitro*, pero sólo en las técnicas de reproducción asistida que comporten transferencia embrionaria. En este sentido proponemos valorar conjuntamente los parámetros del estudio ecográfico y Doppler folicular y uterino en el día de la administración de hCG con objeto de predecir la posibilidad de embarazo a partir de la predicción conjunta de la ovulación, fertilización e implantación. El perfil uterino y endometrial se obtienen de modo similar a lo propuesto por Salle y cols. (32) utilizando aquellos parámetros que mejor precisión predictiva han mostrado hasta el momento. El perfil folicular se obtiene a partir del único folículo preovulatorio o del folículo mayor en aquellos casos en que hayan desarrollado menos de tres, por ejemplo en la estimulación ovárica con o sin inseminación intrauterina. Cuando se provoque un crecimiento multifolicular, por ejemplo en la fertilización *in vitro*, el perfil folicular se obtendrá por el cociente entre la suma de los puntos obtenidos por cada folículo y el número de folículos evaluados, limitándose normalmente a los seis de mayor tamaño.

III. HIPÓTESIS

Hipótesis nula

Los parámetros vasculares evaluados mediante Doppler y los no vasculares, de forma prospectiva, en las pacientes que concurren en un programa de fertilización *in vitro*, no son predictores de la respuesta ovárica ni de la competencia ovocitaria ni de la implantación embrionaria y gestación.

Hipótesis alternativa

Los parámetros vasculares evaluados mediante Doppler y los no vasculares, de forma prospectiva, en las pacientes que concurren en un programa de fertilización *in vitro*, son predictores de la respuesta ovárica, de la competencia ovocitaria y de la implantación embrionaria y gestación.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVOS PRIMARIOS

1. Estudiar la correlación de parámetros ecográficos vasculares como el flujo intraovárico, útero-ovárico y perifolicular, así como la superficie de color ovárica y perifolicular y no vasculares como la edad, FSH y estradiol basales, volumen ovárico y recuento de folículos antrales, con la respuesta ovárica.
2. Estudiar la correlación de parámetros vasculares útero-ovárico y foliculares y no vasculares como el volumen ovárico, recuento de folículos antrales y volumen por folículo, con la competencia ovocitaria y el desarrollo embrionario.
3. Estudiar los parámetros ováricos como predictores de la implantación y resultado de la gestación precoz.

OBJETIVO SECUNDARIO

4. Estudiar los parámetros uterinos como predictores de la implantación y resultado de la gestación precoz.

V. MATERIAL Y METODOS

A. MATERIAL

1) Pacientes

1.1) Características de las pacientes

Se evaluaron pacientes estériles (n=62) que se incorporaron a un programa de FIV, preferentemente procedentes de esterilidad de origen masculino o de causa tubárica. La respuesta ovárica disminuye con la edad, por lo que se establece un límite superior de 40 años para su inclusión.

Las exploraciones y analíticas se llevaron a cabo en el Centro Ginecológico de Santander, con pacientes que se someten a tratamiento mediante técnicas de reproducción asistida en el CER (Centro de Estudios de Reproducción). El estudio se inició el mes de febrero de 2000 y se concluyó en el mes de noviembre de 2001.

A todas las pacientes que acudían para un programa FIV se les realizó el protocolo de estudio endocrino, habitual en nuestra estimulación ovárica (que se expondrá más adelante), y fueron informadas expresamente de la realización de un protocolo de estudio ecográfico ampliado al objeto de realizar el presente estudio, para lo que se obtuvo su conformidad mediante un consentimiento informado verbal del procedimiento antes de su inclusión.

De todas las pacientes se recogieron los datos de filiación y el resto de antecedentes de interés, así como el peso, talla e índice de masa corporal. Se confeccionó una ficha de recogida de los datos de filiación, antecedentes y exploración básica de cada paciente.

1.2) Causas de esterilidad:

a. Etiología

La etiología de la esterilidad fue de origen masculino (35,48%), femenino por factor tubárico principalmente (22,58%) y mixta (41,94%).

Mención especial merecen los PCO, los cuales son una característica ecográfica morfológica que se detecta en mujeres con ciclos menstruales normales en las cuales no existen síntomas o signos de hiperandrogenismo.

b. Primaria, secundaria y años de esterilidad.

2) Estudios básicos

- 2.1) Analítica hormonal en fase folicular precoz (2º-5º): FSH, LH, Estradiol, TSH y PRL. Test de reserva ovárica.
- 2.2) Ecografía morfológica basal en fase folicular precoz.
- 2.3) Seguimiento ecográfico del ciclo ovárico basal y Progesterona en fase mesolútea
- 2.4) Histeroscopia diagnóstica en 2ª fase de ciclo
- 2.5) Histerosalpingografía y/o laparoscopia
- 2.6) Seminograma. Estudio hormonal del varón cuando estuvo indicado. Cariotipo.

3) Protocolo de estimulación

- 3.1) Frenación larga: Decapeptyl 0,1 mg diario
- 3.2) Estimulación: FSH recombinante, y HMG cuando fue necesario
- 3.3) Administración de HCG
- 3.4) Apoyo de fase lútea con progesterona

Todas las pacientes serán estudiadas mediante un único ciclo.

Se adoptó un protocolo de frenación larga con administración diaria de análogo de GnRH (Triptorelina, DECAPEPTYL 0,1 mg diario ®; Ipsen Pharma) desde la fase mesolútea de un ciclo ovulatorio (confirmado por ecografía y Doppler).

La estimulación bajo frenación se realizó con FSH, preferiblemente recombinante, con una pauta inicial de 150 UI (Folitropina β , PUREGON ®; NV Organon, Oss, the Netherlands) durante cinco días y ajustes cada dos días posteriores según controles ecográficos y tasas séricas de estradiol. La dosis puede ajustarse inicialmente según las necesidades de la paciente. Se añadió en algunos casos, fundamentalmente por problemas económicos del coste de la medicación, HMG (Gonadotrofina menopáusica humana, HMG LEPORI 75/75 UI ®; Farma-Lepori).

La tecnología del ADN recombinante, en combinación con el uso de células de mamíferos para la producción de proteínas complejas, más puras e idénticas a las naturales, han aportado al clínico la última de las herramientas de la que disponemos en este campo, la FSH recombinante. Ya se dispone de la LH recombinante y de la HCG recombinante. De esta forma la tecnología del ADN recombinante sustituye a los procesos de extracción de proteínas complejas de los tejidos humanos, sangre u orina, permitiendo obtener productos más seguros y puros, ofreciendo la posibilidad de producir proteínas a gran escala, siendo respetuosos para con el entorno. Además los sistemas de células de mamíferos garantizan una identidad estructural y biológica total entre las proteínas producidas y nativas.

La punción se indicó siempre que hubiera tres o más folículos mayores de 18 mm de diámetro medio (entre 18 y 22 mm). Se debe procurar que los acompañantes superen los 14 mm. Se considerará baja respuesta la presencia de menos de tres folículos con probabilidad de recuperarse un ovocito. El riesgo de hiperestimulación, aunque debe apoyarse en la exploración ecográfica (> 25 folículos de diferentes tamaños), se fundamentó sobre todo por la presencia de una tasa de estradiol sérico superior a 4000 pg/ml.

La maduración ovocitaria se realizó con 10.000 UI de HCG. La fase lútea se apoyó únicamente con 300 mg/8 horas de Progesterona natural administrada por vía vaginal.

B. MÉTODOS

El método fundamental para la ejecución del trabajo y la consecución de los objetivos fue el Doppler color transvaginal de los vasos uterinos y ováricos añadido al protocolo básico de seguimiento ecográfico en una fertilización *in vitro*. En este estudio la valoración indirecta del flujo sanguíneo uterino y ovárico se realizó mediante dos métodos semicuantitativos diferentes y complementarios:

Velocimetría Doppler

Se aplicó a los grandes vasos, arterias uterinas y útero-ováricas, pero también a las espirales intraováricas (estromales y perifoliculares) y las radiales más próximas al endometrio o subendoteliales.

Sobre un mínimo de tres ondas de buena calidad se obtuvo las velocidades máximas sistólicas (S o pico sistólico), telediastólica (D) y medias (M) y se aplicó la debida fórmula para calcular el índice de pulsatilidad (IP).

Planimetría color

La planimetría color se aplicó para cuantificar el flujo relativo total ovárico, folicular y lúteo, y endometrial.

A partir de software informático que permite evaluar áreas se evaluó la superficie del folículo y del contorno vascular perifolicular en un plano de corte ecográfico de diámetros folicular máximos y de máxima área color. El flujo folicular se calculó relativamente por la superficie ocupada por la señal color con respecto a la superficie total. El flujo ovárico se calculó por el flujo folicular total y por el área total de color obtenida en un plano de corte de máximos diámetros ováricos, de forma similar al flujo folicular. La evaluación planimétrica durante la fase

postpunción se realizó de igual forma, valorando el área color relativa del contorno de los quistes tecaluteínicos y el área total de color de ambos ovarios.

Para valorar el flujo endometrial se calculó la superficie de endometrio y la superficie de éste ocupada por señal color en un plano longitudinal de máximas medidas.

Otros métodos que se utilizaron fueron:

Estudio ecográfico

Además del estudio Doppler se evaluó en modo B el tamaño folicular y el grosor endometrial.

El tamaño folicular se determinó por el diámetro medio de los dos diámetros máximos obtenidos del corte ecográfico mayor. El grosor endometrial se obtuvo entre ambas líneas de unión mio-endometrial en un corte longitudinal con máximo grosor endometrial.

Estudio hormonal

Se realizó un estudio hormonal básico: FSH, LH, Estradiol, TSH y PRL basales. Todos los días en que se realice el estudio ecográfico se determinó el estradiol sérico. Durante la fase postpunción se determinó el estradiol y la progesterona en todos los días en que se realizó el estudio. La hCG se determinó los días +14, +21 y +28 postpunción.

Se confeccionó una ficha de recogida de datos que agrupaba todos los obtenidos a partir del estudio Doppler, planimétrico, ecográfico y hormonal para cada uno de los ciclos evaluados.

1) Estudio ecográfico Doppler

1.1) Características del ecógrafo, Doppler pulsado y Doppler color

Se ha utilizado en el estudio un equipo de la marca Toshiba modelo ECCOCEE (Toshiba Medical Co., Tokyo, Japan), con sonda vaginal

multifrecuencia de tipo convexo, con imagen modo B, Doppler color, Power Doppler y Doppler pulsado con análisis espectral.

a. Características del modo B o “tiempo real”

Entre las características que ofrece el equipo para la obtención de imágenes en modo B o “tiempo real”, hay que destacar las siguientes:

- Escala de grises con 256 niveles
- Multifrecuencia de transmisión (resolución, normal y penetración)
- Profundidad de campo de exploración entre 0 y 24 cm.
- Focalización ajustable en 8 pasos.
- Zoom de imagen.
- Monitor de 15 pulgadas.
- Las mediciones se efectuaron sobre la pantalla mediante una función multicalibrador de cuatro canales, accionados mediante un “trackball”, lo que posibilita la obtención simultánea de cuatro mediciones. Las medidas se obtienen en milímetros, con aproximaciones a las décimas. En el presente estudio se han realizados mediciones de distancias lineales, áreas y perímetros.

b. Características del modo Doppler pulsado

Para la obtención de las ondas de velocidad de flujo (OVF) el equipo consta de las siguientes peculiaridades:

- Análisis espectral de información Doppler en tiempo real mediante “Fast Fourier Transform” (FFT) (Transformada rápida de Fourier) por microprocesador.
- Frecuencias de repetición de pulsos (PRF) seleccionables entre 3 y 12 KHz.
- Medición del volumen de muestra con una amplitud ajustable de 1 a 10 mm.
- Calibrador de ángulo de incidencia y ajuste de la ganancia Doppler.
- Inversión de representación de flujo.
- Filtro Doppler: 50 a 400 Hz.
- Desplazamiento de la línea base.
- Representación de la información Doppler mediante gráfico velocidad-tiempo, con funciones de medición de los siguientes parámetros:

- Velocidad en cualquier punto del espectro
- Tiempo entre dos puntos
- Aceleración
- Índice de resistencia
- Índice de pulsatilidad
- Frecuencia cardíaca
- Medición mediante trazado automático del perfil de la curva espectral Doppler de velocidad máxima, velocidad mínima, velocidad media, velocidad en sístole, velocidad en diástole e índices de pulsatilidad y resistencia.

Las velocidades son expresadas en m/s y las frecuencias en Hertzios y KiloHertzios.

c. Características del modo Doppler color:

Representación mediante mapas convencionales de velocidad/dispersión, potencia, dispersión, velocidad, color persistente, color capturado y color con perspectiva, así como un modo especial COLOR POWER (Modo de presentación de flujos en color que en vez de cuantificar la variación en frecuencia como hace el Doppler color convencional tiene en cuenta la amplitud de la señal recibida. Es, por tanto, ángulo independiente y mucho más sensible a la captación de flujos débiles.) Cada uno de ellos puede ser modificado en inversión de dirección, contraste, persistencia, frecuencia de repetición de pulsos (PRF entre 3 y 12 KHz) y filtro.

- Presentación de color: Por medio de "ROI" (región de interés)
- Ganancia de color: 0 -30 dB
- Presentación simultánea: Doppler Color, Imagen B/N y M.
Doppler Color, B/N, M y PW.
Triple Modo. Imagen modo B, Color y PW
en tiempo real.

El aparato reúne los requisitos recomendados por la FDA en cuanto a la emisión de ultrasonidos, tanto en el modo B o "tiempo real" como en el modo Doppler pulsado, color y Power Doppler.

Doppler color en la fertilización *in vitro* (FIV) como predictor

Transductor

Transductor endovaginal modelo PVF-621VT de tipo convexo electrónico y multifrecuencia (5.00 - 6.00 y 7.00 MHz). Ángulo de visión de 121º, para aplicaciones obstétrico-ginecológicas.

Salidas

RGB, Vídeo compuesto color, Vídeo S-VHS

Características técnicas empleadas en las exploraciones:

De las opciones técnicas expuestas se aplicaron de forma constante las siguientes:

En imagen bidimensional y Doppler pulsado

- Frecuencia de transmisión: 6 MHz
- Frecuencia de repetición de pulsos: entre 4,5 KHz y 7 KHz
- Volumen de muestra: 2 a 4 mm.
- Filtro de pared: 70 Hz
- Potencia acústica emitida por el transductor seleccionada automáticamente por el equipo según las condiciones de trabajo y sin superar 80mW/cm² en ninguna circunstancia.

En Doppler color

Se ha utilizado el mapa de velocidad, así como el mapa especial Power color.

- Frecuencia de repetición de pulsos : entre 4 KHz y 7 KHz
- Filtro de pared: entre 39 y 136 Hz.

1.2) Técnica de exploración

Antes de iniciar el estudio se exploraron pacientes con la finalidad de adquirir adiestramiento, lo que permite reducir el tiempo medio de exploración situándolo entre 8 y 30 minutos.

Todas las exploraciones ecográficas y Doppler se realizan siempre por el mismo investigador (RMR-M), disminuyendo la variabilidad intraobservador.

La paciente permanece en posición de litotomía con una elevación de la cabeza de 45° sobre la horizontal.

a. Biometría: ovárica y uterina, folicular y endometrial.

Se evaluó en modo B el tamaño ovárico, el tamaño folicular, el tamaño uterino y el tamaño endometrial.

- El tamaño ovárico se determinó por el diámetro medio de los dos diámetros máximos obtenidos del corte ecográfico mayor y también mediante la media de los diámetros longitudinal, antero-posterior y transversal en dos cortes perpendiculares. Con estos tres diámetros se obtiene el volumen del ovario. En el corte ecográfico mayor se obtiene el área y el perímetro ovárico.
- El tamaño folicular se determinó por el diámetro medio de los dos diámetros máximos obtenidos del corte ecográfico mayor y también mediante la media de los diámetros longitudinal (DL), antero-posterior (DAP) y transversal (DT) en dos cortes perpendiculares (**Figura 6**). Con estos tres diámetros se obtiene el volumen del folículo. En el corte ecográfico mayor se obtiene el área en mm² y el perímetro folicular en mm.

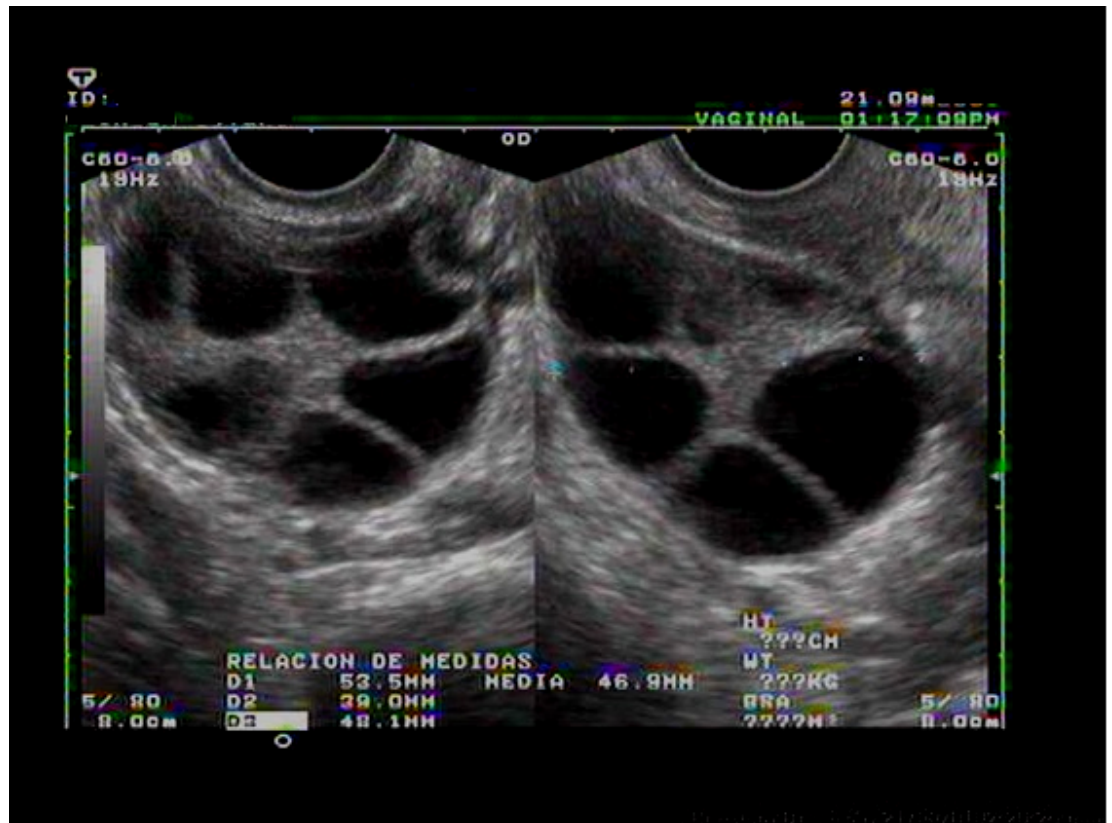


Figura 6 Medida del tamaño folicular (Procedencia del autor)

- El grosor endometrial se obtuvo entre ambas líneas de unión mio-endometrial en un corte longitudinal con máximo grosor endometrial. Se obtuvo en el mismo corte el área y el perímetro. Además, con un corte transverso de máximo grosor endometrial se obtuvo la media de los diámetros longitudinal, antero-posterior y transverso y el volumen.
- El grosor uterino se obtuvo entre los límites externos del miometrio en un corte longitudinal con máximo grosor endometrial. Se obtuvo en el mismo corte el área y el perímetro. Además, con un corte transverso de máximo grosor endometrial se obtiene la media de los diámetros longitudinal, antero-posterior y transverso y el volumen.

El cálculo del área se efectuó mediante la fórmula de la elipse:

$$\text{Area} = \pi \times \frac{1}{2} \text{DL} \times \frac{1}{2} \text{DAP}$$

El cálculo del volumen se efectuó mediante la fórmula simplificada del esferoide:

$$\text{Volumen} = 0,5233 \times \text{DL} \times \text{DAP} \times \text{DT}$$

b. Planimetría color y Power Doppler: ovárica y uterina, folicular y endometrial.

Obtención de las señales Doppler

- El flujo folicular se obtiene en un plano de corte de diámetros foliculares máximos y máxima área color.
- En el ovario el plano de corte es aquél de máximos diámetros ováricos y máxima área de color (**Figura 7**).

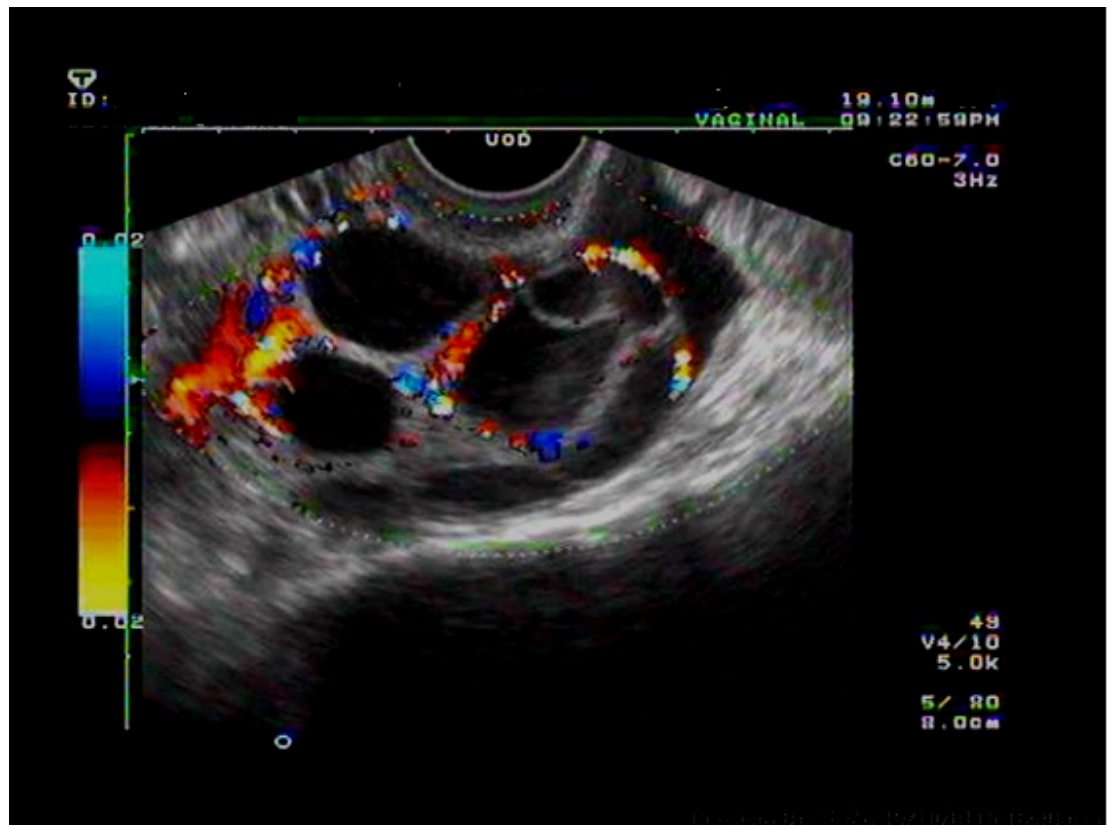


Figura 7 Doppler color folicular (Procedencia del autor)

- La superficie de endometrio ocupada por señal color se determinó en el plano longitudinal de máximas medidas (**Figura 8**).

Doppler color en la fertilización *in vitro* (FIV) como predictor

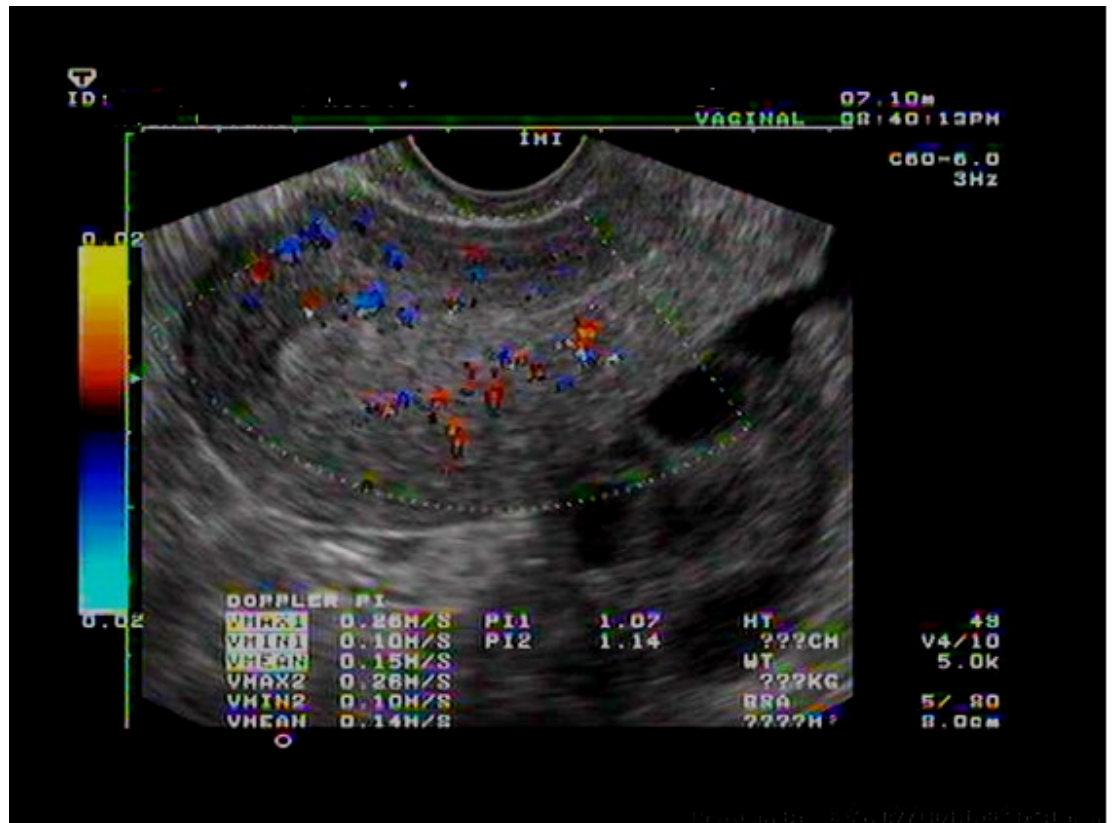


Figura 8 Doppler color endometrial (Procedencia del autor)

- La superficie de utero ocupada por señal color se hallará en el plano longitudinal de máximas medidas.

Procesamiento de la señal Doppler

- Análisis de la señal

A partir de software informático que permite la captura digitalizada de imágenes ecográficas (Pegasus CapturePROv2.0), se realizó tratamiento informático de las mismas mediante el programa Adobe Photoshopv6.0 de forma que permitiera evaluar áreas

- Cuantificación de la señal

La planimetría color se aplicó para cuantificar el flujo relativo total ovárico, folicular y lúteo, y endometrial.

- El flujo ovárico se calculó por el flujo folicular total (suma del área de color relativa y absoluta de todos los folículos) y por el área total de color obtenida en un plano de corte de máximos diámetros ováricos, de forma similar al flujo folicular. La evaluación planimétrica durante la fase postpunción se realizó de igual forma, valorando el área color relativa del contorno de los quistes teca-luteínicos y el área total de color en ambos ovarios.
- Se evaluó la superficie del folículo y del contorno vascular perifolicular (hasta el límite externo de la señal color perifolicular existente) en un plano de corte ecográfico de diámetros foliculares máximos y de máxima área color. El flujo folicular se calculó relativamente por la superficie ocupada por la señal color con respecto a la superficie total (superficie folicular + contorno vascular color).
- Para valorar el flujo endometrial se calculó la superficie de endometrio y la superficie de éste ocupada por señal color en un plano longitudinal de máximas medidas.
- Para valorar el flujo uterino se calculó la superficie de útero y la superficie de éste ocupada por señal color en un plano longitudinal de máximas medidas.

c. Velocimetría Doppler:

- Arcada ovárica: OVF estromal ovárica, perifolicular, lútea y útero-ovárica.
- Arcada uterina: OVF uterina, intramiométriales- subendométriales y endométriales.

Obtención de las señales Doppler

Se aplicó a los grandes vasos, arterias uterinas u útero-ováricas, pero también a las espirales intraováricas (estromales y perifoliculares) y a las radiales más próximas al endometrio o subendométriales, en los siguientes puntos de los circuitos uterino, intramiométrial y ovárico:

- Las arterias uterinas (UT) se obtuvieron en un punto inmediatamente anterior a la confluencia de la arteria con el istmo uterino (**Figura 9**).

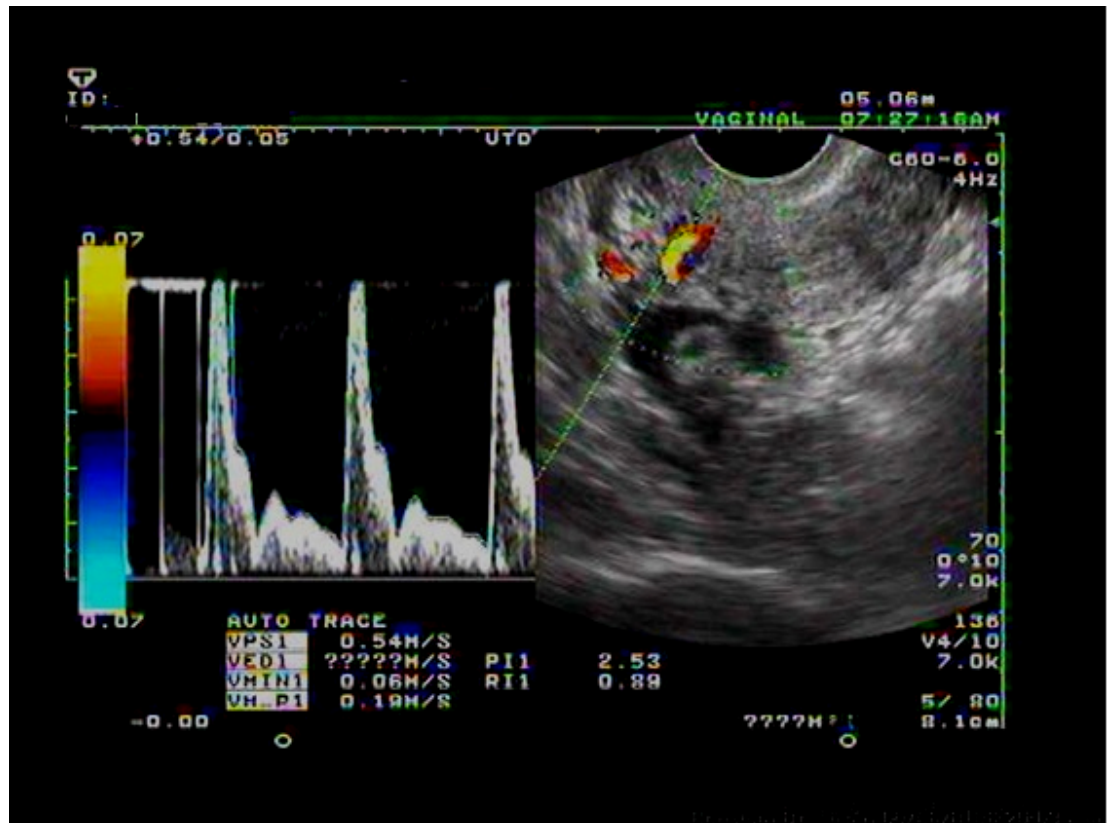


Figura 9 OVf característica de arteria uterina (Procedencia del autor)

- La señal de las útero-óvaricas (UO) se recogió en el punto inmediatamente posterior a su divergencia del cuerno uterino correspondiente (**Figura 10**)

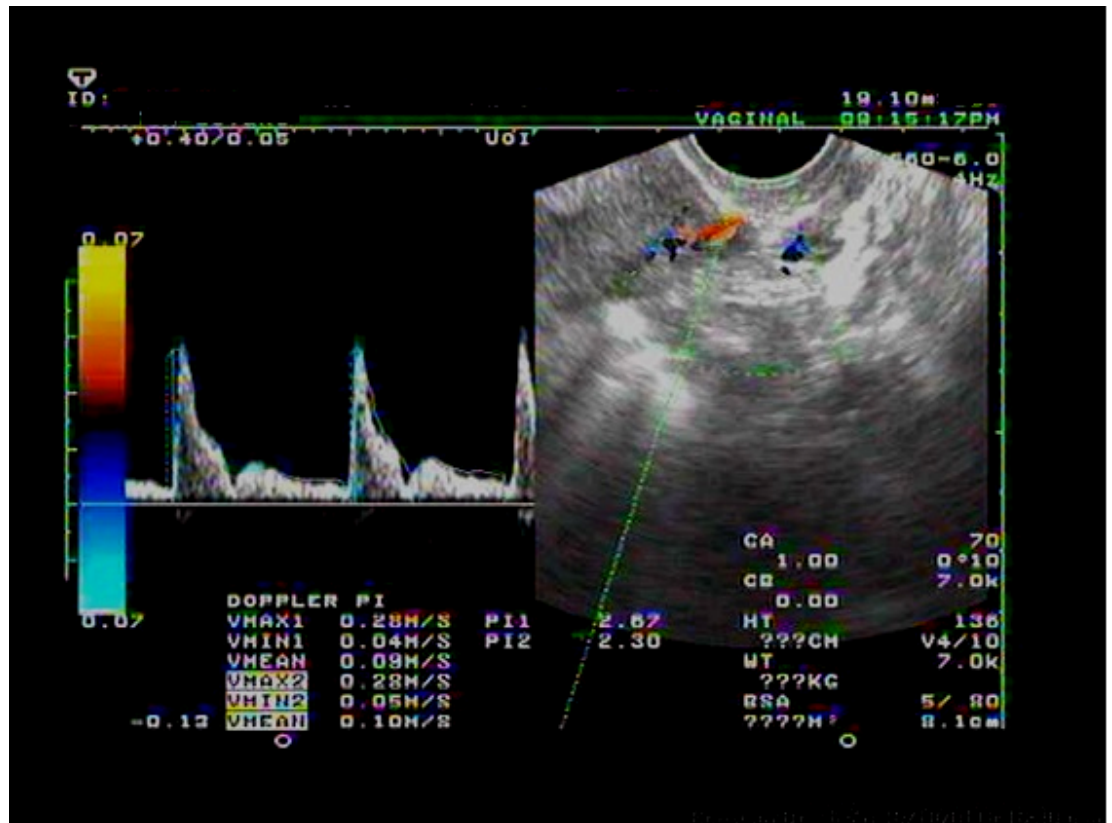


Figura 10 OVf característica de arteria utero-ovárica (Procedencia del autor)

- La señal intraovárica estromal (IOE) se obtuvo en el centro del ovario donde el mapa color sea más intenso. La perifolicular (PF) y lútea (CL) en la señal color perifolicular o perilútea que muestra una menor resistencia con velocidades más elevadas (Figura 11).

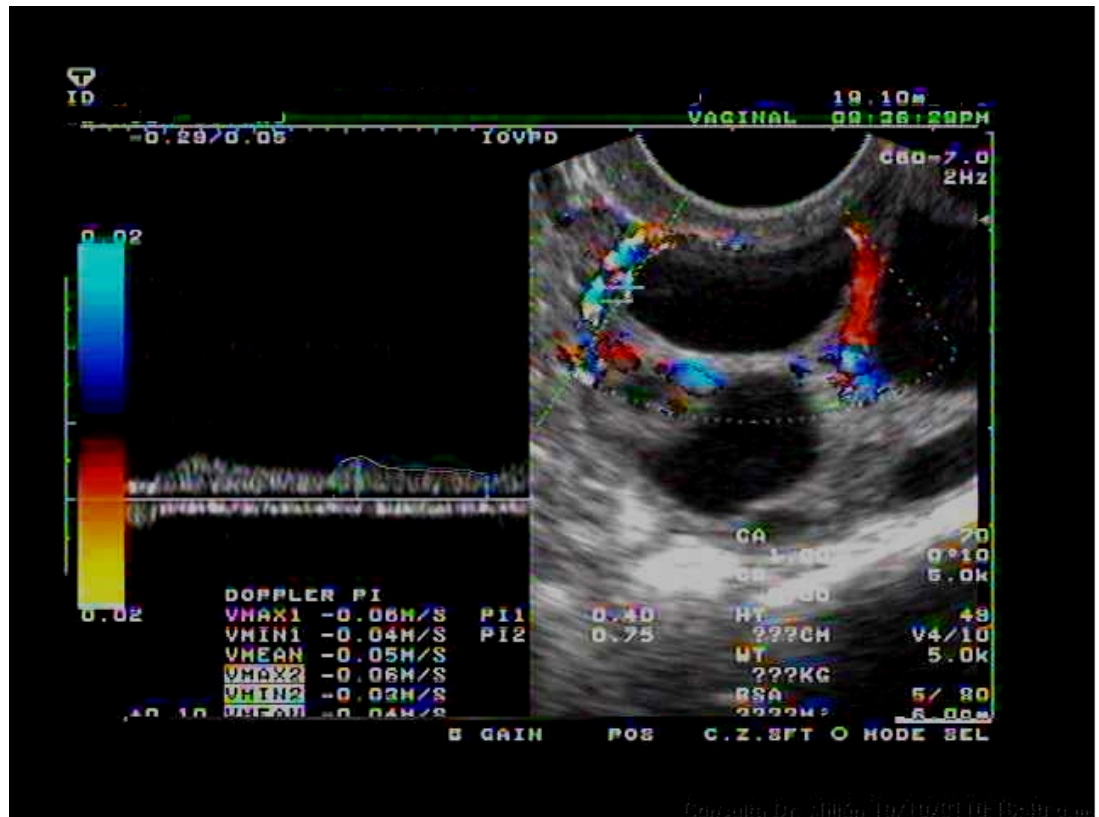


Figura 11 OVF característica de arteria perifolicular (Procedencia del autor)

- Las arterias subendometriales (SE) se obtuvieron mediante la OVF endometrial más próxima a la línea central. Se señala la localización (periférica (P), media (M), central (C)).
- Las arterias intramiometriales (IMI) se obtuvieron mediante la OVF miometrial más próxima al endometrio. Se señala la localización (1/3 externo (E), 1/3 medio (M), 1/3 interno (I)) (**Figura 12**).

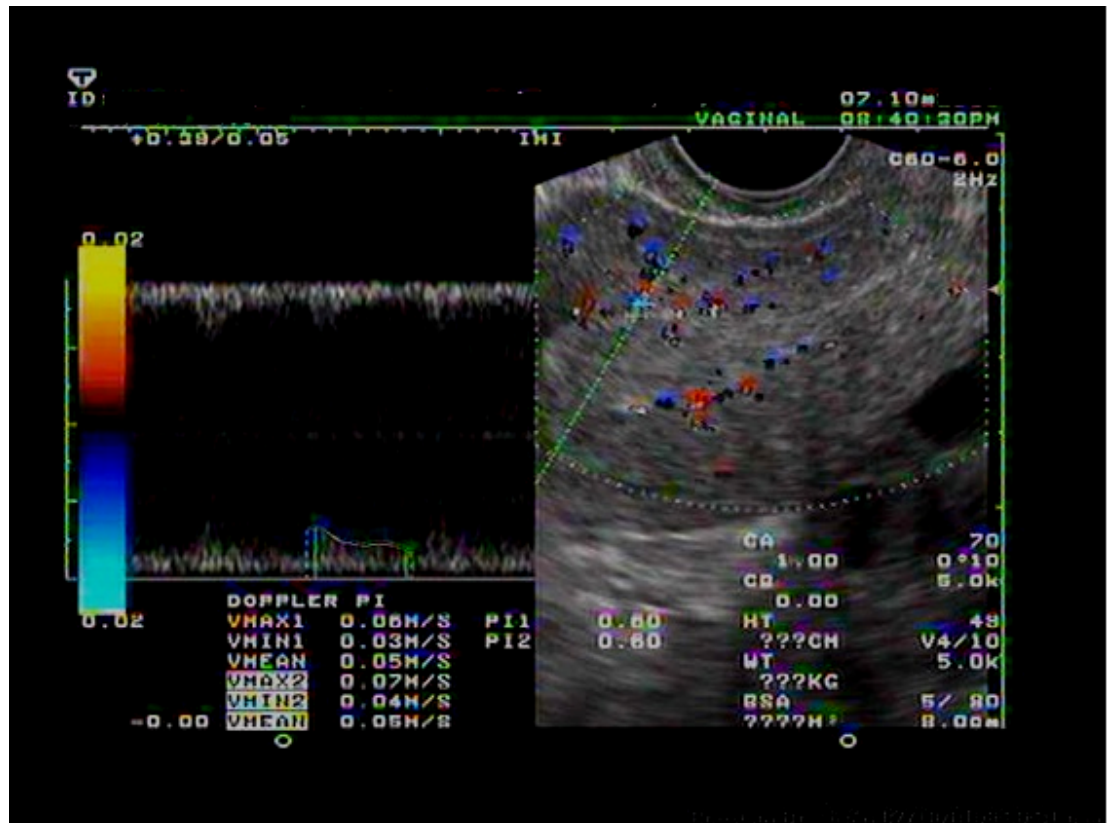


Figura 12 OVF característica de arterias intramiometriales (Procedencia del autor)

Si había señal color endometrial, debería obtenerse la OVF endometrial más próxima a la línea central y la OVF miometrial más próxima al endometrio.

Si no hubiera señal endometrial: sólo se obtuvo la miometrial más próxima al endometrio.

En el caso de arterias únicas y dobles (uterinas e útero-ováricas) también se calculó el valor promedio de ambos vasos (derecha e izquierda) (UTM, UOM).

Mediante el Doppler color se localizaron los vasos referidos con velocidad más elevada, desplazándose a continuación la ventana de Doppler pulsado para obtener las ondas de velocidad de flujo y proceder a su estudio cuantitativo. En

cada área de color evaluada se fue cambiando el ángulo de la sonda con objeto de obtener la mejor y más elevada señal de Doppler pulsado.

Procesamiento de la señal Doppler

Los sistemas electrónicos que llevan incorporados los equipos someten a las señales captadas por el cristal receptor a una serie de procesos o transformaciones que hacen posible su análisis.

- Análisis de la señal

De cada vaso estudiado se registraron una media de tres ondas consecutivas de buena calidad, calculando la onda promedio que resulta de la suma de las diversas velocidades y de dividir las por 3. A mayor número de ondas medidas, menor es el error intraobservador.

Las mediciones se realizaron directamente en el monitor, sobre la curva espectral o de máximas frecuencias. Así se obtuvieron diversas velocidades:

S o A: velocidad en el pico sistólico

D o B: velocidad al final de la diástole

M: representa la velocidad media en todo el ciclo.

- Cuantificación de la señal: índices velocimétricos

En el estudio semicuantitativo de las ondas registradas se utilizaron los siguientes índices velocimétricos:

- Índice de Resistencia o de POURCELOT (IR): $S-D/S$ (Planiol, Pourcelot, 1974).

Se aproxima a 1.00 cuando la velocidad diastólica es muy baja y entonces refleja el debilitamiento relativo del flujo por la elevada resistencia.

- Índice de Pulsatilidad (IP): $S-D/M$ (Gosling, King, 1974).

Se calculó el coeficiente de variación de todos los índices velocimétricos en los vasos estudiados a partir de tres registros consecutivos en diez pacientes.

2) Estudio Hormonal: determinaciones hormonales, técnica y fiabilidad

2.1) Estradiol (VIDAS Estradiol II de BioMérieux S.A.)

2.2) Progesterona (VIDAS Progesterona de BioMérieux S.A.)

- 2.3) HCG (VIDAS FSH de BioMérieux S.A.)
- 2.4) FSH (VIDAS FSH de BioMérieux S.A.)
- 2.5) LH (VIDAS LH de BioMérieux S.A.)
- 2.6) TSH (VIDAS TSH de BioMérieux S.A.)
- 2.7) PRL ((VIDAS PRLde BioMérieux S.A.)

Los test de VIDAS son test cuantitativos automatizados en el sistema VIDAS que permite la determinación inmunoenzimática de la hormona en el suero o plasma humano (heparina) por técnica ELFA (Enzyme Linked Flourescent Assay).

El principio de determinación asocia el método inmunoenzimático sandwich con una detección final por fluorescencia (ELFA). Se utiliza anticuerpos monoclonales anti-FSH o anti- prolactina o anti-TSH o anti-HCG o anti-LH marcados con fosfatasa alcalina. No hay influencia significativa de la hemólisis, la lipemia ni la bilirrubinemia. Como límites del método están las muestras procedentes de pacientes que hayan recibido preparaciones de anticuerpos monoclonales de ratón, en función del diagnóstico o del tratamiento, pueden contener anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA). Estas muestras pueden presentar concentraciones falsamente elevadas o bajas cuando se analizan con equipos de determinación que utilicen anticuerpos de ratón.

La **FSH** es producida de manera pulsátil por las células gonadotropas de la hipófisis anterior bajo el control del hipotálamo.

La **PRL** (prolactina) se sintetizada por el lóbulo anterior de la hipófisis y es secretada de manera pulsátil (cada 20 minutos) siguiendo un ritmo circadiano, los niveles más elevados se producen durante el sueño.

La **TSH** es producida por las células tiotropas de la hipófisis anterior. Su secreción a la circulación sanguínea sigue un ritmo circadiano cuyo máximo se encuentra entre 1 hora y 2 horas de la mañana.

La biosíntesis de la **HCG** está asegurada principalmente por el sincitiotrofoblasto placentario. Durante los tres primeros meses del embarazo, la concentración sérica de la HCG se eleva progresivamente hasta alcanzar un máximo.

La HCG puede estar producida igualmente por ciertos tejidos tumorales principalmente los de origen trofoblástico (coriocarcinoma...).

Resultados positivos con VIDAS HCG se han señalado en pacientes tratados con un derivado del ácido retinoico, principalmente isotretinina. Así pues es conveniente en esta circunstancia confirmar este resultado con una nueva muestra o con la ayuda de otra técnica.

La LH es producida de manera pulsátil por las células gonadotropas de la hipófisis anterior bajo el control del hipotálamo. Una regulación negativa está asegurada por las hormonas esteroideas de las que la LH estimula la producción: testosterona en el hombre, estradiol en la mujer.

El estradiol es secretado principalmente por los folículos ováricos durante el ciclo menstrual de la mujer, y por la placenta en el curso del embarazo. En menor grado la producción está asegurada por las glándulas suprarrenales, testículos y por la conversión periféricas de los andrógenos.

Los receptores estrogénicos se encuentran en numerosos tejidos (huesos, glándulas mamarias, hígado, endometrio...). La síntesis y secreción de estradiol están estrechamente controladas por el eje hipófisis-hipotálamo, mediante la acción intermedia de la LHRH, de la LH y de la FSH.

Se produce una competición entre el estradiol presente en el suero y un derivado de estradiol marcado con fosfatasa alcalina en función de los anticuerpos específicos antiestradiol. Se aconseja no utilizar sueros altamente lipémicos, ictericos y hemolizados. En algunos casos algunos activadores de la coagulación pueden interferir con el test.

Los valores de estradiol obtenidos deben utilizarse como complemento de otra información recogida por el médico (encuesta, tratamiento con medicamentos, ecografía, observaciones clínicas, otros exámenes....)

En caso de tratamiento con estrógenos y en particular con tratamientos hormonales sustitutivos (menopausia) se pueden obtener resultados sobrestimados.

La determinación de estradiol puede estar prescrita en niños cuando se sospecha una anomalía hormonal.

La progesterona es una de las principales hormonas esteroideas secretadas en la mujer por el ovario. Su nivel aumenta en el momento de la ovulación, hasta alcanzar su máximo en la fase luteínica. De esta forma prepara al útero para la implantación de un óvulo fecundado.

Pueden observarse, en efecto, concentraciones anormalmente bajas de progesterona en casos de funcionamiento anómalo del cuerpo amarillo, de ausencia de ovulación o de ciclo corto.

El principio de dosificación asocia el método inmunoenzimático con una detección final por fluorescencia (ELFA).

Se aconseja no utilizar sueros altamente lipémicos, ictericos y hemolizados.

En caso de tratamiento con esteroides y en particular con progesterona micronizada, pueden obtenerse a veces resultados sobreestimados.

Se recogieron los resultados de un estudio hormonal básico: FSH, LH, Estradiol, TSH y PRL basales. En caso de presentar un valor de FSH basal ≥ 11 mUI/ml, se ha complementado el estudio con un test de reserva ovárica: Test EFORT (140) (*Exogenous follicle stimulating hormone ovarian reserve test*), consiste en administrar a la paciente 300 UI de FSH en el día 3º del ciclo y se hace una medición de los niveles de estradiol sérico al siguiente día. El test normal muestra el día 4º un incremento del estradiol mayor a 30 pg/ml con respecto al día anterior y un descenso de la FSH.

Todos los días en que se realizó el estudio ecográfico se determinó el estradiol sérico. Durante la fase postpunción se determinó el estradiol y la progesterona en los días de la transferencia, +7 y +14. La HCG se determinó el día +14 postpunción.

3) Seguimiento propiamente dicho

3.1) Día del inicio de frenación (22º)

Utilizamos los criterios de **clasificación del cuerpo lúteo** de Nakata (141):

- A. Grosor de pared < 3 mm, hipocogénico.
- B. Grosor de pared < 3 mm, hiperecogénico.

- C. Grosor de pared > 2.9 mm, hipoecogénico.
- D. Grosor de pared > 2.9 mm, hiperecogénico.

- 3.2) Día de la supresión
- 3.3) 6º de estimulación
- 3.4) Cada 48 horas hasta día de HCG.
- 3.5) Día de HCG
- 3.6) Día de la Punción
- 3.7) Día de la transferencia
- 3.8) Día +7 postpunción
- 3.9) Día +14 postpunción

4) Técnicas de Laboratorio de Reproducción: Clasificación embrionaria

- 4.1) Punción folicular y recuperación de ovocitos

Mediante aspiración guiada por ecografía transvaginal con sedación a las 37 horas después de la administración de hCG.

- 4.2) Estudio de la madurez ovocitaria y clasificación

Una vez que se recuperan los ovocitos, la primera acción que se debe llevar a cabo es la valoración de la maduración ovocitaria y mantenimiento de las condiciones necesarias que aseguren la normal fecundación y posterior desarrollo. De la calidad ovocitaria dependerá en gran medida la calidad embrionaria y la consecución de embarazos.

Actualmente se considera que los ovocitos son maduros cuando presentan el cúmulus expandido y la corona en forma uniformemente radiada; los inmaduros tienen generalmente una matriz del cúmulus más compacta y ausencia de expansión del cúmulus junto a una corona inapreciable. Los ovocitos maduros en metafase II se caracterizan por la presencia del primer corpúsculo polar, el cual

sirve como depósito del material cromosómico extra que es expulsado del ovocito después de la telofase de la primera división meiótica.

Grado de madurez nuclear:

- Grado 1: corona expandida y laxa (MII)
- Grado 2: cúmulo en estado intermedio entre compacto y laxo (MI)
- Grado 3: cúmulo muy compactado (Vesícula germinal (VG))

4.3) Seguimiento de la fertilización y división embrionario

En la preparación del semen para FIV, éste debe ser capacitado por diferentes métodos, separando posteriormente el mayor número posible de espermatozoides que cumplan los requisitos de motilidad y normalidad estructural. La preparación y mejora del semen se desarrolla mediante la sedimentación en gradientes discontinuos de percoll.

Cuando tenemos recuperados los ovocitos maduros y preparado el semen se realiza la inseminación de los ovocitos.

El diagnóstico de la fecundación se realizó entre las 16-20 horas post-ICSI, en base al número de pronúcleos y/o corpúsculos polares:

- Presencia de 2PN (pronúcleos) entre 17 y 20 horas después de la inseminación.
- Visualización de 2 corpúsculos polares (PB) en el espacio perivitelino.

La transferencia embrionaria se realiza 48 horas después de la fecundación, cuando los embriones presentan entre dos y cuatro blastómeras.

4.4) Clasificación embrionaria

Inmediatamente antes de la transferencia los embriones se clasificaron siguiendo el **criterio de Veek** (142) (Clasificación morfológica embrionaria), en base al número y tamaño de las blastómeras así como la presencia de fragmentos citoplasmáticos. Se transfirieron un máximo de 4 embriones en función de su cronología de desarrollo y calidad embrionaria.

Doppler color en la fertilización *in vitro* (FIV) como predictor

Todos los embriones deben ser examinados y clasificados de acuerdo a las siguientes 8 preguntas:

1. Es un embrión sincrónico en su clivaje? (2, 4 u 8 células)
2. Son sus blastómeras de forma regular?
3. Son sus blastómeras de tamaño regular?
4. Esta el embrión libre de fragmentos?
5. Esta el citoplasma claro y parejo? (no granuloso, ni oscuro)
6. Sus membranas son suaves, refringentes y definidas?
7. El embrión llena la zona? (no esta contraído)
8. Es apropiada la división celular para el tiempo? (4 células-48 horas) (8 células-72 horas)

Las características que influyen más directamente en el pronóstico de la gestación:

- Número de blastómeras (velocidad de división): a > número de células, mejor pronóstico.
- Proporción de fragmentos extracelulares: a > fragmentación, peor pronóstico.

El embrión más perfecto sería aquel que presentara blastómeras de igual tamaño, sin fragmentación. Los embriones con mayor número de blastómeras, tienen más probabilidades de implantación cuando son transferidos. Lo mejor sería seleccionar los embriones que a las 48 horas post-inseminación presentan al menos dos divisiones (4 células).

Así, los embriones fueron evaluados dos días después de la fecundación y clasificados en función de los grados determinados por Veek (143):

- Grado 1: embriones perfectamente simétricos sin fragmentación.
- Grado 2: perfectamente simétricos con una ligera fragmentación (<20% fragmentación respecto al volumen embrionario total).
- Grado 3: blastómeras desiguales sin fragmentación.
- Grado 4: blastómeras desiguales con gran fragmentación.

Los embriones de grado 1 y 2 fueron considerados de alta calidad.

5) Registro de Datos

Los datos de cada paciente se recogieron en fichas diseñadas a tal efecto.

FICHA A (Datos de filiación)

Recoge los datos de filiación, características individuales y curso del ciclo actual.

FICHA B (Datos eco-Doppler y hormonales)

Recoge los datos hormonales, ecográficos en tiempo real, planimetría Doppler, velocimetría Doppler y aquellos referentes a calidad embrionaria, agrupados según el momento de la exploración dentro del ciclo.

6) Análisis estadístico

Se llevó a cabo mediante una base de datos, en la que se aplicaron una serie de test estadísticos y finalmente se construyeron las gráficas correspondientes.

BASE DE DATOS

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó la Base de Datos del programa The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, versión 15.0 para Windows; SPSS Inc., Chicago, IL).

TEST ESTADÍSTICOS

- Análisis descriptivo

Se realizó un análisis descriptivo de cada una de las variables objeto del estudio. Para la descripción de las variables cualitativas se utilizó la frecuencia absoluta y la frecuencia relativa (porcentaje) y de las variables cuantitativas: media ($\bar{X}$), desviación estándar (SD), mínimo, máximo y número de casos.

Todos los valores que aparecen por escrito en el estudio se expresan por su media y desviación estándar.

La diferencia de medias se determina mediante Comparaciones Múltiples de Bonferroni.

- Correlación de variables

La relación entre las distintas variables se estudió mediante regresión lineal. El grado de significación se obtiene mediante el desarrollo de correlaciones bivariantes de Pearson.

La significación se consideró estadísticamente valorable cuando el valor de $p < 0,05$.

GRÁFICAS

Las gráficas se han elaborado mediante la base de tratamiento gráfico de SPSS y Microsoft PowerPoint.

VI. RESULTADOS

1. Estudio de los parámetros vasculares y no vasculares predictores de la respuesta ovárica en un ciclo de FIV.

Se estudió qué parámetros vasculares (mediante doppler pulsado y mapa color) y no vasculares predicen la respuesta ovárica (folículos (RF) observados el día de la administración de la hCG), el número de ovocitos totales y el número de ovocitos obtenidos en estadio MII a la estimulación en un programa de FIV evaluados en la fase inicial (antes de iniciar la frenación con análogos de la GnRH (fase mesolútea), en el control de la frenación y tras el reclutamiento (+ 5 días de estimulación)) y el día de la administración de la hCG y de la punción.

1.1 Parámetros vasculares predictores de repuesta ovárica.

1.1.1 Velocimetría Doppler intraovárica (estroma ovárico) promedio y en el ovario portador del cuerpo lúteo (O.A.) y contralateral (O.I.).

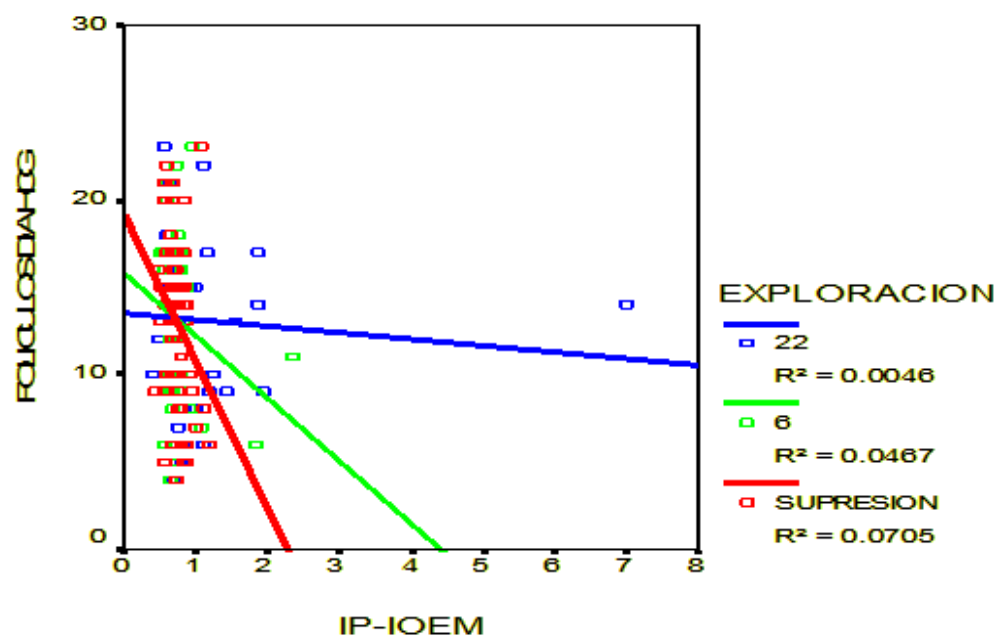
El flujo estromal se valoró por el índice de pulsatilidad promedio de las arterias intraováricas estromales (IP-IOE). Se realizó la misma valoración considerando los parámetros provenientes del ovario portador del cuerpo lúteo (O.A.) y el contralateral (O.I.).

El IP-IOE es predictor de la respuesta ovárica (RF) el día de la supresión hipofisaria y del número de ovocitos y ovocitos en metafase II en todos los días estudiados (Tabla 1 y gráficas 1, 2 y 3).

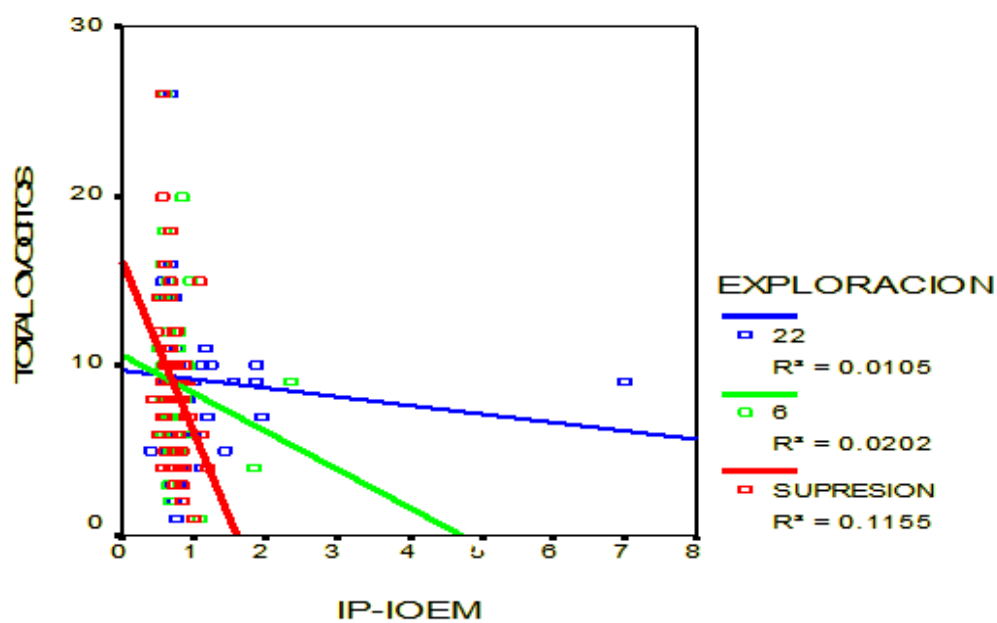
<i>IP-IOE</i>	INICIO aGn-RH		SUPRESION		DIA +6		HCG		PUNCION	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
RF DIA hCG	0,068	0,612	0,266*	0,040	0,216	0,100				
Nº OVOCITOS	0,103	0,444	0,340**	0,008	0,142	0,283	0,088	0,497	0,374**	0,003
Nº OVOC MII	0,119	0,375	0,368**	0,004	0,094	0,479	0,045	0,727	0,299*	0,018

(** p<0,01 * p<0,05)

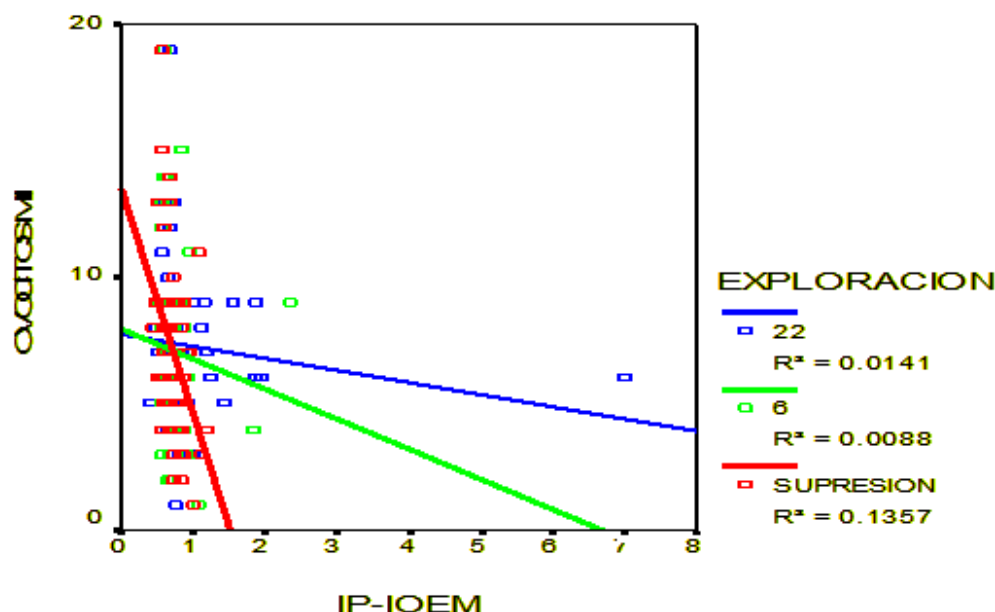
Tabla 1



Gráfica 1 Recta de regresión del RF el día de la hCG en relación al IP-IOE



Gráfica 2 Recta de regresión del total de ovocitos en relación al IP-IOE



Gráfica 3 Recta de regresión del total de ovocitos MII en relación al IP-IOE

El IP de la arteria intraovárica estromal del O.I. es un predictor de la respuesta ovárica el día de la supresión hipofisaria (**Tabla 2**).

IP-IOE	INICIO aGn-RH				SUPRESION				DIA +6			
	O.I.		O.A.		O.I.		O.A.		O.I.		O.A.	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
RF DIA hCG	-0,16	0,28	-0,16	0,29	-0,11	0,49	-0,25	0,11	-0,10	0,55	-0,13	0,41
Nº OVOCITOS	-0,20	0,20	-0,13	0,40	-0,43**	0,00	-0,02	0,91	-0,28	0,07	0,14	0,36
Nº OV. MII	-0,17	0,27	-0,08	0,60	-0,39**	0,01	-0,08	0,60	-0,18	0,26	0,16	0,30

(** p<0,01 * p<0,05)

Tabla 2

1.1.2 Velocimetría de la arteria útero-ovárica

El flujo ovárico se valoró por el índice de pulsatilidad promedio de las arterias útero-ováricas (IP-UO).

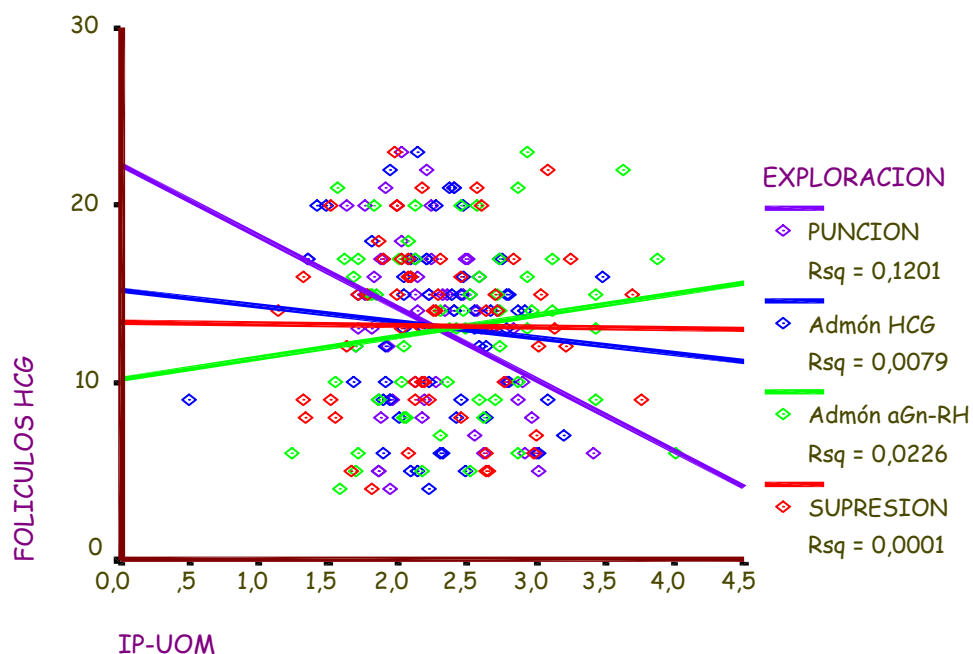
El IP-UO el día de la captación ovocitaria se correlaciona significativamente con el número de folículos (RF), el número total de ovocitos y el número de maduros (**Tabla 3 y gráficas 4, 5 y 6**).

IP-UO	INICIO aGn-RH		SUPRESION		DIA +6		HCG		PUNCION	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
RF DIA hCG	0,150	0,255	0,012	0,093	0,023	0,857	0,089	0,501	0,347**	0,007
Nº OVOCITOS	0,029	0,826	0,108	0,416	0,088	0,495	0,027	0,835	0,348**	0,007
Nº OVOCITOS MII	0,039	0,771	0,088	0,509	0,010	0,941	0,039	0,768	0,399**	0,002

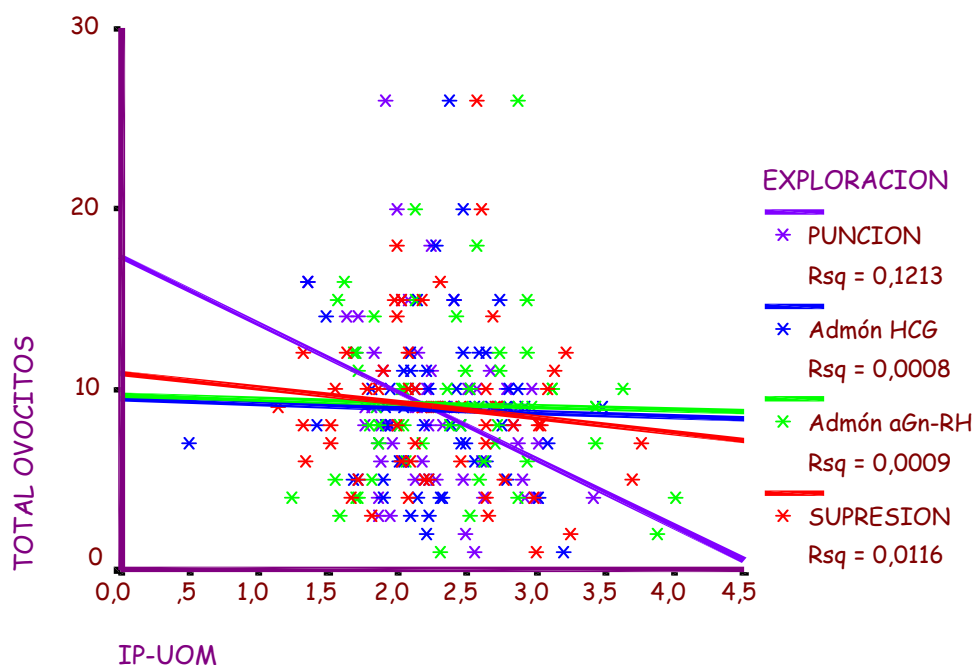
Doppler color en la fertilización *in vitro* (FIV) como predictor

(** p<0,01 * p<0,05)

Tabla 3

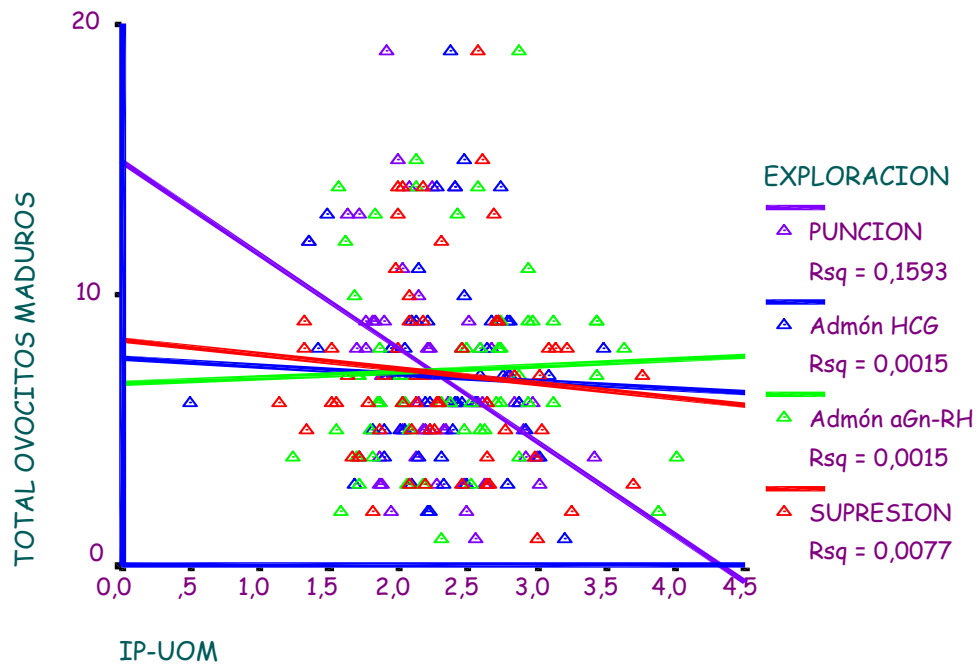


Gráfica 4 Recta de regresión del RF el día de la hCG en relación al IP-UOM



Gráfica 5 Recta de regresión del total de ovocitos en relación al IP-UOM

Doppler color en la fertilización *in vitro* (FIV) como predictor



Gráfica 6 Recta de regresión del total de ovocitos MII en relación al IP-UOM

1.1.3 Velocimetría perifolicular

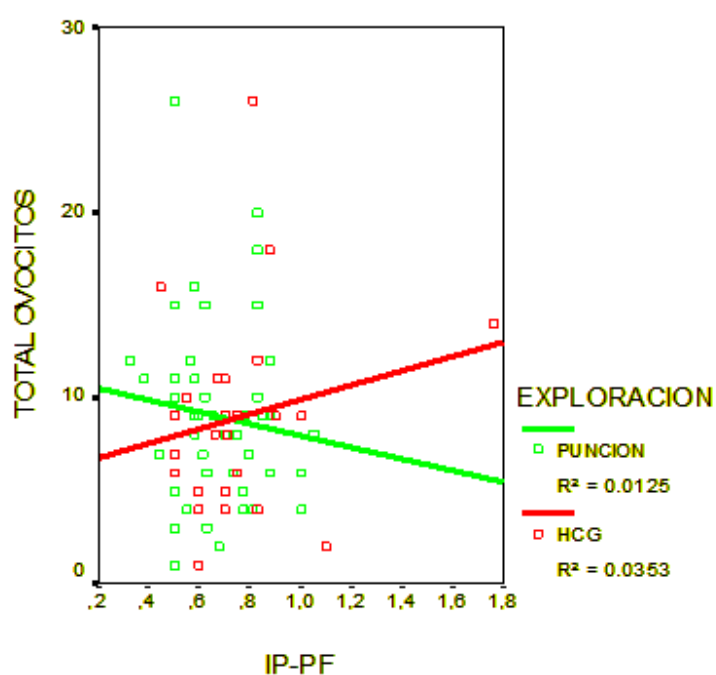
El flujo folicular se valoró por el índice de pulsatilidad perifolicular (IP-PF) en aquellos folículos ≥ 14 mm.

El IP perifolicular (IP-PF) de los folículos ≥ 14 mm valorados el día de la captación ovocitaria no se correlaciona con el número total de ovocitos y el número de ovocitos maduros (Tabla 4 y gráficas 7 y 8).

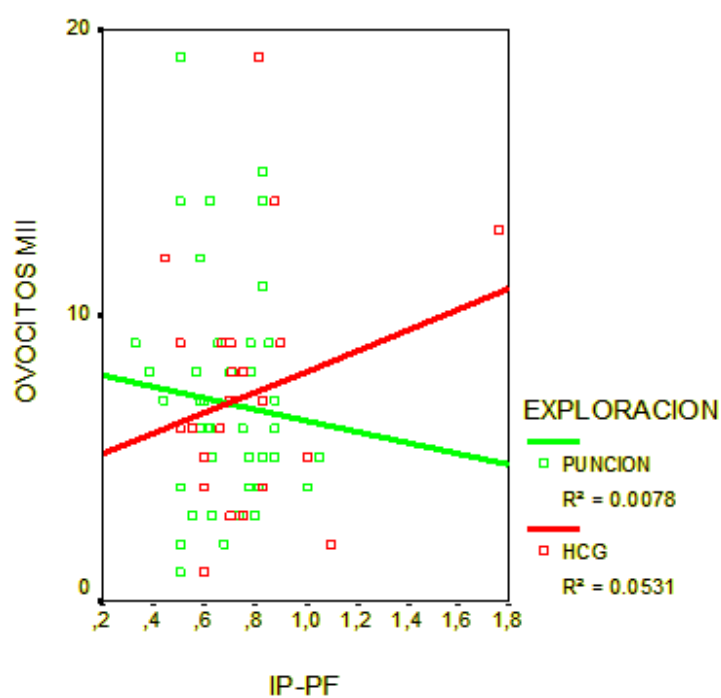
IP-PF	HCG		PUNCIÓN	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Nº OVOCITOS	0,188	0,369	0,112	0,435
Nº OVOC. MII	0,231	0,268	0,088	0,538

(** $p < 0,01$ * $p < 0,05$)

Tabla 4



Gráfica 7 Recta de regresión del total de ovocitos en relación al IP-PF



Gráfica 8 Recta de regresión del total de ovocitos MII en relación al IP-PF

1.1.4 Planimetría color ovárica

El flujo ovárico se valoró por el promedio del porcentaje de color ovárico mediante Doppler color en el plano de corte de máximos diámetros ováricos y máxima área de color, así como por el promedio del porcentaje de superficie de color ovárica absoluta y relativa al área ovárica mediante Doppler color (SCOM) (ICOM) y Power Doppler (SWOM) (IWOM).

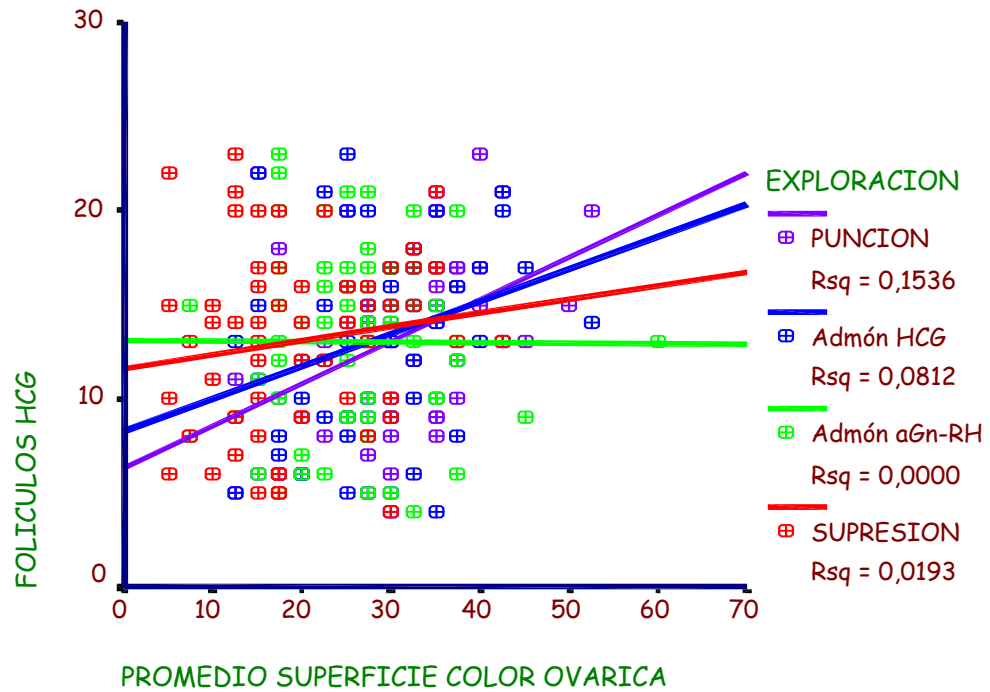
También se analizaron los mismos parámetros considerando los provenientes del ovario portador del cuerpo lúteo (O.A.) y el contralateral (O.I.).

SCOM obtenido el día de la administración de la hCG y el día de la captación ovocitaria se correlaciona de forma significativa con el número de folículos (RF), pero también con el número total de ovocitos y el número de maduros en el día de la punción (Tabla 5 y gráficas 9, 10 y 11).

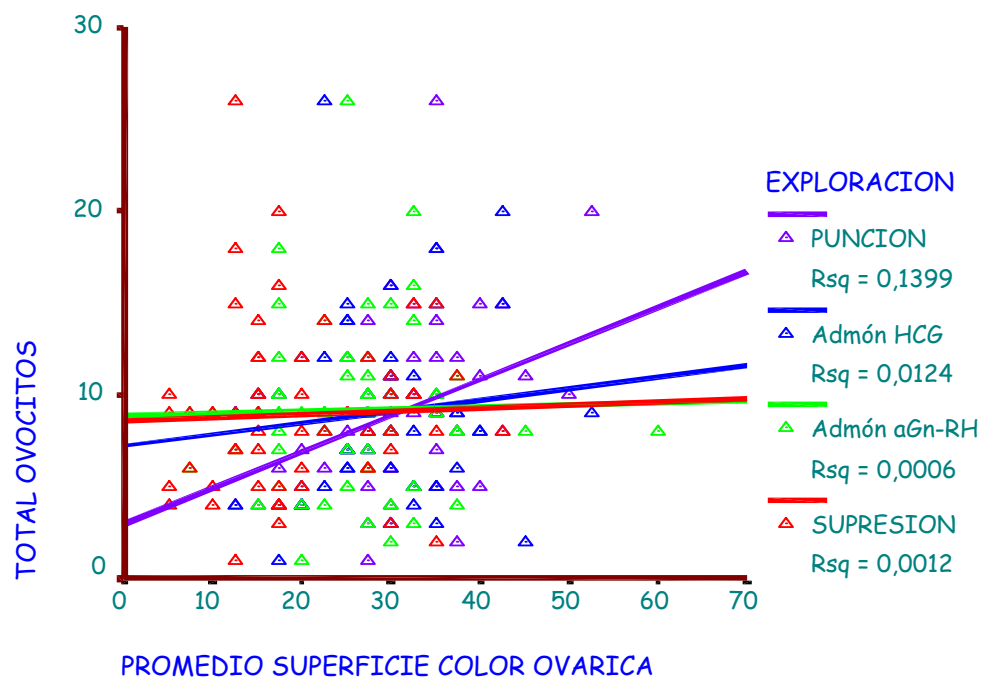
SCOM	INICIO aGn-RH		SUPRESION		HCG		PUNCION	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
RF DIA hCG	0,006	0,962	0,139	0,290	0,285*	0,025	0,392**	0,002
Nº OVOCITOS	0,025	0,852	0,035	0,790	0,111	0,388	0,374**	0,003
Nº OVOC. MII	0,012	0,926	0,003	0,979	0,049	0,707	0,286*	0,024

(** p<0,01 * p<0,05)

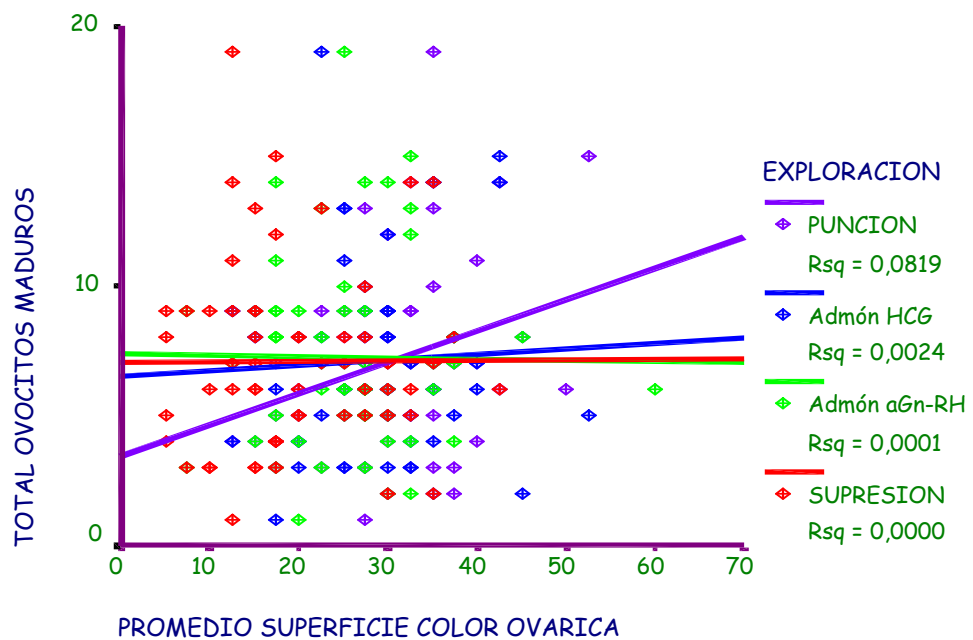
Tabla 5



Gráfica 9 Recta de regresión del RF el día de la hCG en relación al SCOM



Gráfica 10 Recta de regresión del total de ovocitos en relación al SCOM



Gráfica 11 Recta de regresión del total de ovocitos MII en relación al SCOM

En relación a los índices, el IC y el IW promedio ovárico son predictores de la respuesta ovárica el día sexto de estimulación.

El número total de ovocitos se correlaciona con el promedio de la superficie color ovárica relativa (ICOM) el día sexto de estimulación.

El número total de ovocitos se correlaciona con el promedio de la superficie power ovárica relativa (IWOM) el día de la administración del aGn-RH y el día sexto de estimulación (**Tabla 6**).

RF DIA hCG	INICIO aGn-RH		SUPRESION		DIA +6	
	r	p	r	p	r	p
SCOM	0.04	0.81	0.07	0.65	0.18	0.23
SWOM	-0.29	0.09	0.06	0.73	0.15	0.35
ICOM	-0.24	0.12	-0.11	0.47	-0.38*	0.01
IWOM	-0.41*	0.02	-0.15	0.36	-0.45**	0.01

Nº OVOCITOS	INICIO aGn-RH		SUPRESION		DIA +6	
	r	p	r	p	r	p
SCOM	0.00	0.99	0.03	0.83	0.09	0.55
SWOM	-0.22	0.21	0.03	0.87	0.06	0.74
ICOM	-0.25	0.12	-0.11	0.49	-0.33*	0.03
IWOM	-0.34*	0.05	-0.10	0.54	-0.40**	0.01

Nº OVOCITOS MII	INICIO aGn-RH		SUPRESION		DIA +6	
	r	p	r	p	r	p
SCOM	0.03	0.86	0.03	0.83	0.08	0.60
SWOM	-0.17	0.34	0.03	0.84	0.08	0.65
ICOM	-0.26	0.09	-0.11	0.49	-0.34*	0.03
IWOM	-0.36*	0.03	-0.09	0.61	-0.42**	0.01

(** p<0,01 * p<0,05)

Tabla 6

El SW, IC y el IW promedio ovárico del OI son predictores de la respuesta ovárica el día sexto de estimulación (Tabla 7).

RF DIA hCG	INICIO aGn-RH				SUPRESION				DIA +6			
	O.I.		O.A.		O.I.		O.A.		O.I.		O.A.	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
SCO	0,12	0,45	-0,21	0,16	0,04	0,79	0,05	0,75	0,17	0,26	0,19	0,22
SWO	0,06	0,71	-0,35*	0,04	0,10	0,57	-0,10	0,54	0,04	0,83	0,35*	0,03
ICO	-0,01	0,94	-0,33*	0,03	-0,09	0,58	-0,26	0,10	-0,27	0,10	-0,34*	0,03
IWO	-0,11	0,54	-0,37*	0,03	-0,19	0,28	-0,32	0,06	-0,40*	0,02	-0,33*	0,05

Nº OVOCITOS	INICIO aGn-RH				SUPRESION				DIA +6			
	O.I.		O.A.		O.I.		O.A.		O.I.		O.A.	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
SCO	-0,01	0,94	-0,14	0,36	0,04	0,81	-0,12	0,44	-0,14	0,36	0,11	0,48
SWO	-0,17	0,33	-0,12	0,51	-0,05	0,77	-0,18	0,31	-0,31	0,07	0,28	0,10
ICO	-0,20	0,22	-0,23	0,14	-0,13	0,41	-0,29	0,06	-0,50**	0,00	-0,25	0,11
IWO	-0,29	0,10	-0,20	0,24	-0,21	0,23	-0,26	0,13	-0,62**	0,00	-0,26	0,12

Nº OVOCITOS MII	INICIO aGn-RH				SUPRESION				DIA +6			
	O.I.		O.A.		O.I.		O.A.		O.I.		O.A.	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
SCO	0.00	0.99	-0.06	0.69	0.02	0.89	-0.06	0.72	-0.21	0.17	0.09	0.56
SWO	-0.08	0.63	-0.01	0.96	-0.01	0.97	-0.04	0.81	-0.47**	0.00	0.31	0.06
ICO	-0.19	0.22	-0.18	0.25	-0.04	0.79	-0.24	0.13	-0.52**	0.00	-0.26	0.10
IWO	-0.27	0.12	-0.12	0.51	-0.11	0.54	-0.18	0.29	-0.73**	0.00	-0.22	0.20

(** p<0,01 * p<0,05)

Tabla 7

Doppler color en la fertilización *in vitro* (FIV) como predictor

1.1.5 Planimetría perifolicular

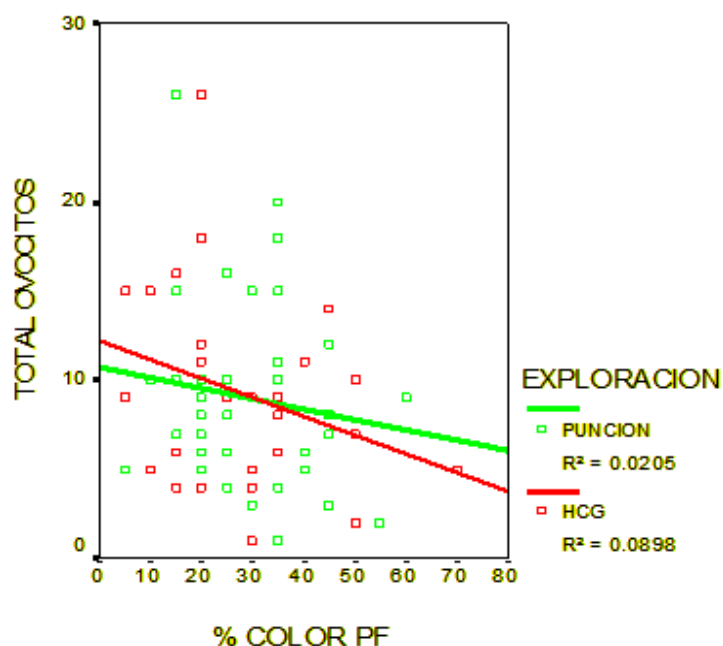
El flujo folicular se valoró por el porcentaje de color perifolicular mediante Doppler color en aquellos folículos ≥ 14 mm (SFxColor).

SFxColor ≥ 14 mm valorado el día de la captación ovocitaria no se correlaciona con el número total de ovocitos y el número de ovocitos maduros (Tabla 8 y gráficas 12 y 13).

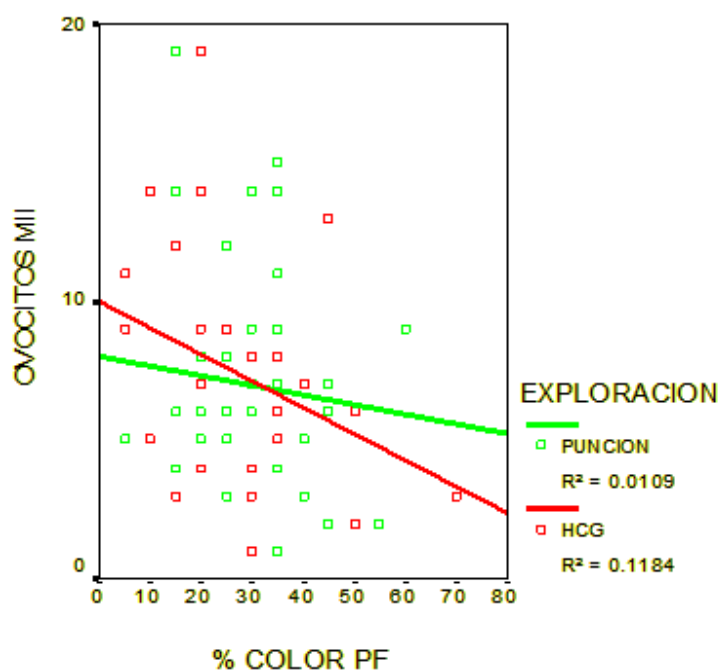
SFxColor	HCG		PUNCION	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Nº OVOCITOS	0,300	0,129	0,143	0,327
Nº OVOC. MII	0,344	0,079	0,105	0,474

(** p<0,01 * p<0,05)

Tabla 8



Gráfica 12 Recta de regresión del total de ovocitos en relación al SFxColor



Gráfica 13 Recta de regresión del total de ovocitos MII en relación al SFxColor

1.2 Parámetros no vasculares predictores de repuesta ovárica.

1.2.1 Edad, FSH y estradiol basales del estudio

La edad y la FSH basal son predictoras de los folículos (RF) el día de la administración de la HCG, pero no del número de ovocitos maduros.

El estradiol es predictor de la respuesta ovárica durante los tres días estudiados en la fase inicial (**Tabla 9**).

RF DIA hCG	INICIO aGn-RH		SUPRESION		DIA +6	
	r	p	r	p	r	p
EDAD	-0.37*	0.01	-0.38**	0.01	-0.37*	0.01
FSH mUI/ml	-0.38**	0.01	-0.37*	0.01	-0.38**	0.01
ESTRADIOL pg/ml	-0.35*	0.02	-0.34*	0.03	-0.35*	0.02

Nº OVOCITOS	INICIO aGn-RH		SUPRESION		DIA +6	
	r	p	r	p	r	p
EDAD	-0.18	0.22	-0.18	0.22	-0.18	0.22
FSH mUI/ml	-0.20	0.17	-0.20	0.18	-0.20	0.18
ESTRADIOL pg/ml	-0.41**	0.01	-0.39*	0.01	-0.39**	0.01

Nº OV. MII	INICIO aGn-RH		SUPRESION		DIA +6	
	r	p	r	p	r	p
EDAD	-0.17	0.24	-0.17	0.25	-0.17	0.25
FSH mUI/ml	-0.27	0.07	-0.27	0.07	-0.27	0.07
ESTRADIOL pg/ml	-0.32*	0.04	-0.31*	0.04	-0.31*	0.04

(** p<0,01 * p<0,05)

Tabla 9

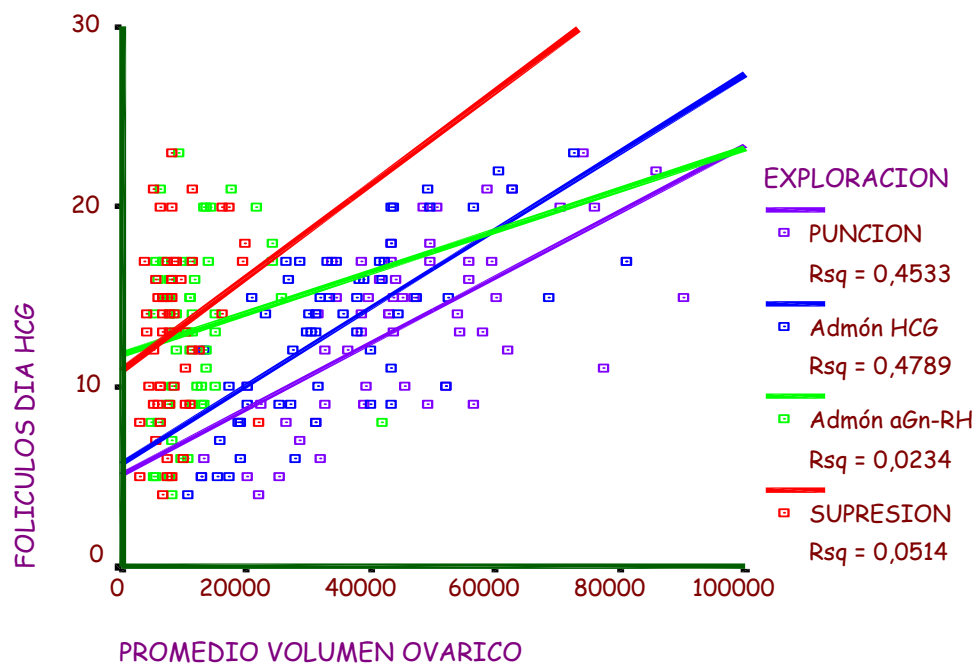
1.2.2 Volumetría ovárica

El promedio del volumen ovárico (VOM) valorado el día sexto de la estimulación, el día de administración de la hCG y el día de la captación ovocitaria se correlaciona de forma significativa con el número de folículos (RF), el número de ovocitos recuperados y con los que se encuentran en metafase II (Tabla 10 y gráficas 14, 15 y 16)

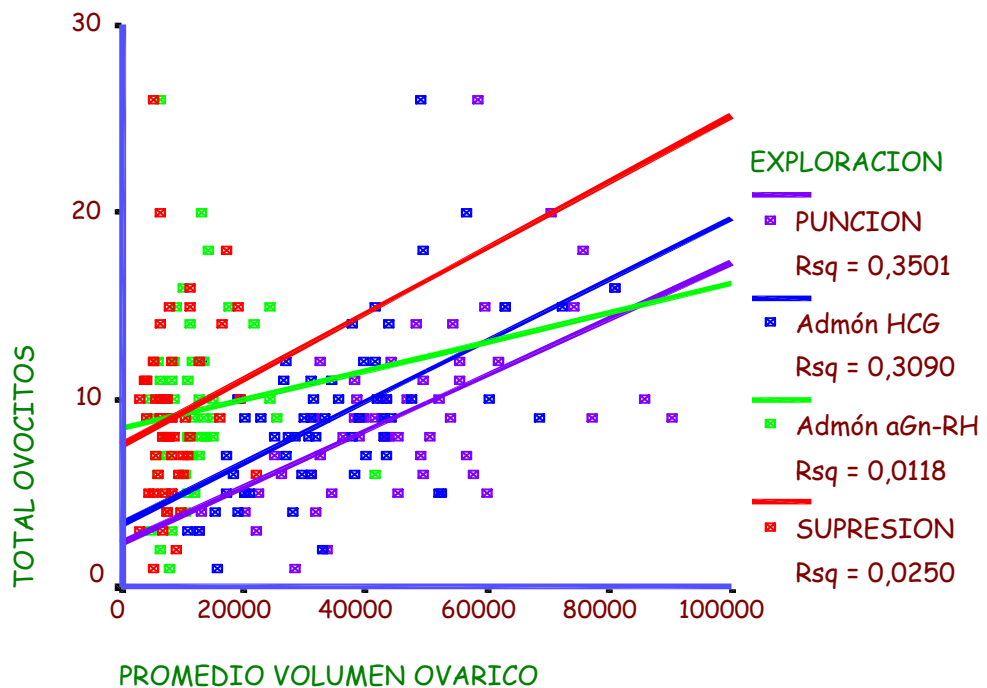
VOM	INICIO aGn-RH		SUPRESION		DIA +6		HCG		PUNCION	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
RF DIA hCG	0,15	0,27	0,23	0,10	0,43**	0,00	0,69**	0,00	0,67**	0,00
Nº OVOCITOS	0,11	0,43	0,16	0,25	0,33*	0,03	0,56**	0,00	0,59**	0,00
Nº OV. MII	0,17	0,21	0,23	0,09	0,42**	0,00	0,55**	0,00	0,60**	0,00

(** p<0,01 * p<0,05)

Tabla 10

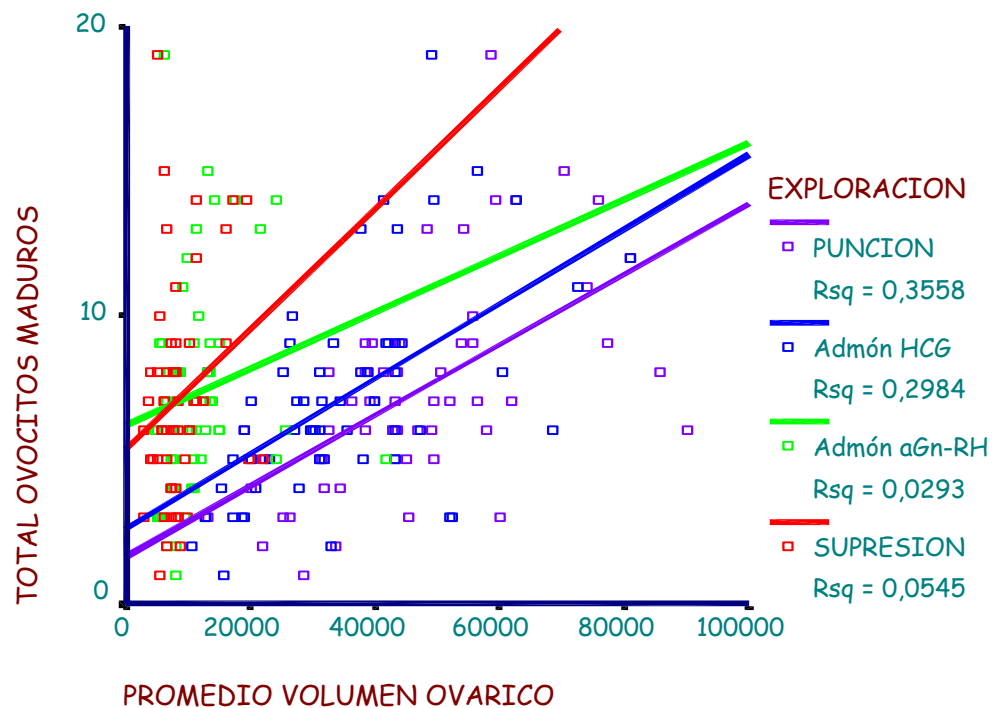


Gráfica 14 Recta de regresión del RF el día de la hCG en relación al VOM



Gráfica 15 Recta de regresión del total de ovocitos en relación al VOM

Doppler color en la fertilización *in vitro* (FIV) como predictor



Gráfica 16 Recta de regresión del total de ovocitos MII en relación al VOM

1.2.3 Recuento de folículos antrales

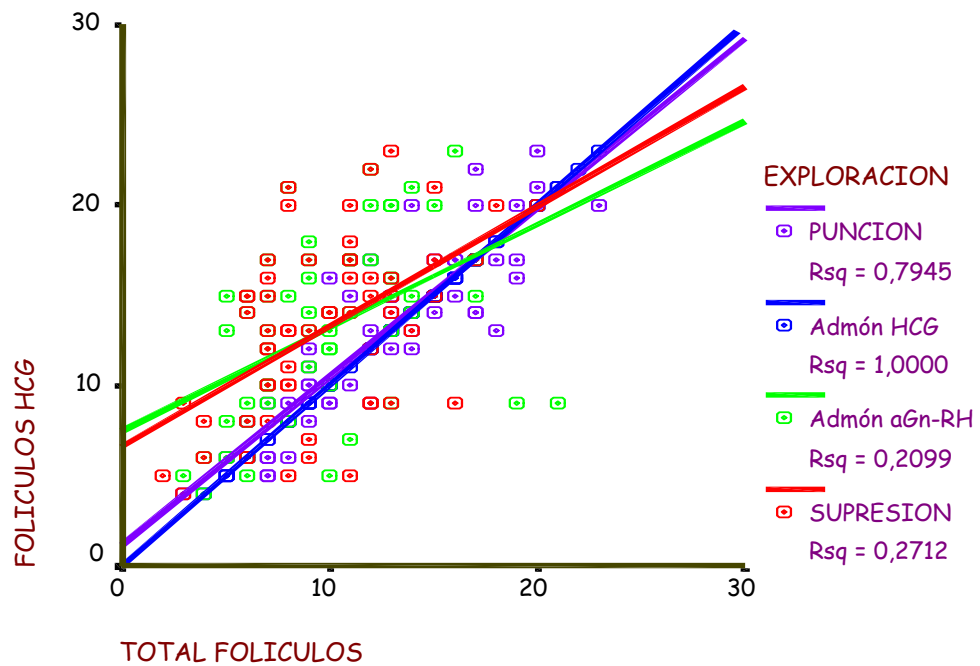
Se evaluó mediante ecografía el número de folículos (RFA) y se correlacionó con los observados (RF) el día de la administración de la hCG, el número de ovocitos totales y el número de ovocitos obtenidos en estadio MII.

El recuento de los folículos antrales (RFA) en cualquier momento del seguimiento ecográfico, especialmente en el día de la supresión hipofisaria, es un predictor estadísticamente significativo de la respuesta ovárica (Tabla 11 y gráficas 17, 18 y 19).

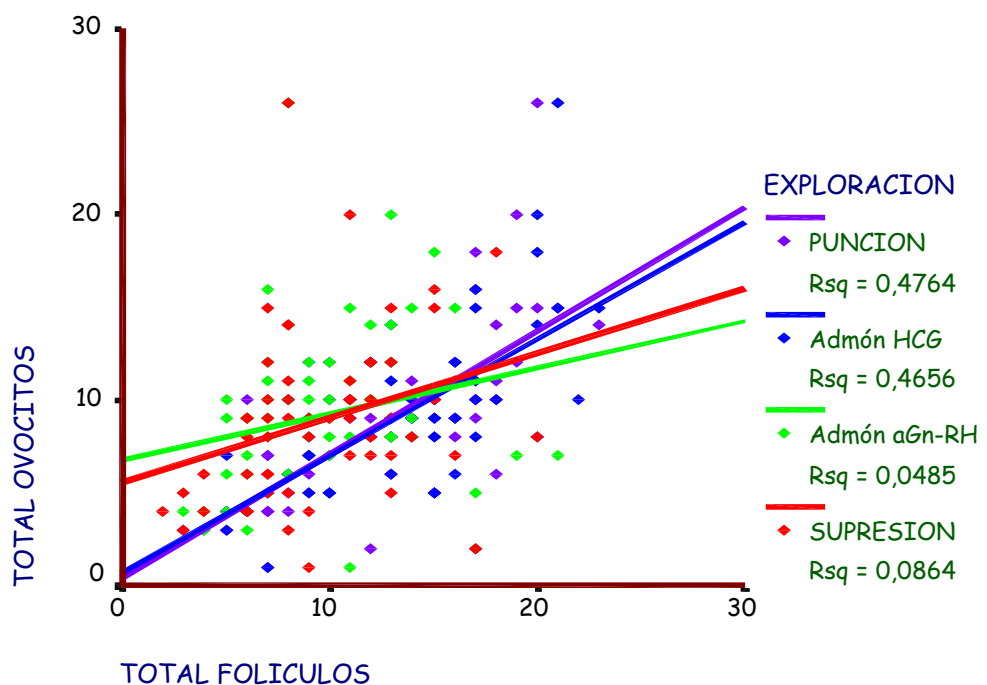
RFA	INICIO aGn-RH		SUPRESION		DIA +6		HCG		PUNCION	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
RF DIA hCG	0,46**	0,00	0,52**	0,00	0,45**	0,00	1,00**	0,00	0,89**	0,00
Nº OVOCITOS	0,40**	0,01	0,29*	0,02	0,43**	0,00	0,68**	0,00	0,69**	0,00
Nº OV. MII	0,43**	0,00	0,33*	0,04	0,41**	0,00	0,67**	0,00	0,69**	0,00

(** p<0,01 * p<0,05)

Tabla 11

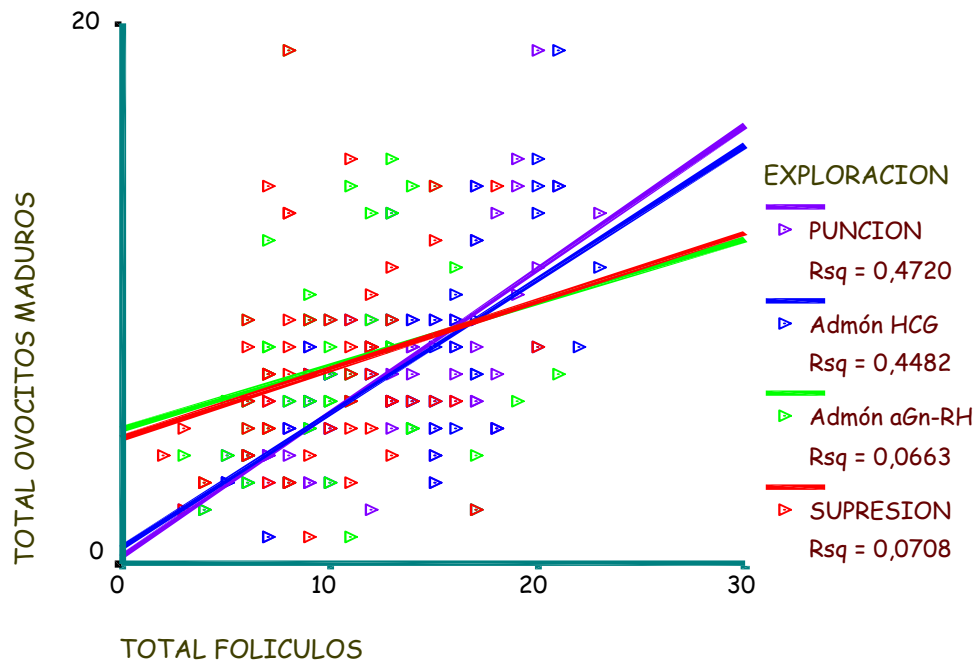


Gráfica 17 Recta de regresión del RF el día de la hCG en relación al RFA



Gráfica 18 Recta de regresión del total de ovocitos en relación al RFA

Doppler color en la fertilización *in vitro* (FIV) como predictor



Gráfica 19 Recta de regresión del total de ovocitos MII en relación al RFA

Por tanto, como **marcadores precoces de respuesta ovárica** se encuentra el recuento folicular (RFA), es el predictor más precoz de la respuesta ovárica y el número de ovocitos recuperados, así como el IP promedio de las arterias intraováricas estromales (IP-IOE) siendo significativo el día del control de la supresión hipofisaria (**Tabla 12**).

Como **marcadores tardíos de respuesta ovárica** se encuentra el volumen ovárico (VOM), el IP promedio de las arterias útero-ováricas (IP-UO) y el mapa color (SCOM) se relacionan tardíamente con el número de folículos presentes en el día de la administración de hCG (**Tabla 12**).

	IP-IOE	IP-UO	SCOM	SFxCOLOR	VOM	RF
	r	r	r	r	r	r
RF DIA HCG	0,27 (a)	0,35 (c)	0,29 (b)	NS	0,69 (b)	0,52 (a)
Nº OVOCITOS	0,34 (a)	0,35 (c)	0,37 (c)	NS	0,56 (b)	0,29 (a)
Nº OVOCITOS MII	0,37 (a)	0,40 (c)	0,29 (c)	NS	0,55 (b)	0,33 (a)

IP-IOE= índice de pulsatilidad promedio de las arterias intraováricas estromales; IP-UO= índice de pulsatilidad promedio de las arterias útero-ováricas; SCOM= mapa color promedio ovárico; SFxCOLOR= señal color por folículo; VOM= volumen ovárico promedio; RF= número de folículos. (a) = día de la supresión hipofisaria; (b)= día de la administración de hCG; (c)= día de la punción ovárica. Todos los valores de r presentaron $p < 0,05$

Tabla 12

2. Estudio de los parámetros vasculares y no vasculares ováricos y foliculares como marcadores de competencia ovocitaria y desarrollo embrionario en un ciclo de FIV.

Se estudió qué parámetros vasculares mediante doppler pulsado y mapa color (útero-ovárico y planimetría ovárica) y folicular (perifolicular y planimetría folicular) y no vasculares (volumen ovárico y folicular) predicen la **tasa de fertilización** (porcentaje de ovocitos en estadio MII que fecundan) y de la **tasa de división embrionaria** (porcentaje de embriones que se dividen) y la **tasa de implantación** (número de sacos gestacionales observados/ número de embriones transferidos) en un programa de FIV, evaluados en la fase inicial (antes de iniciar la frenación con análogos de la GnRH (fase mesolútea) y en el control de la frenación) y el día de la administración de la hCG y de la captación ovocitaria.

No existe relación entre la vascularización ovárica valorada mediante Doppler y la **tasa de fertilización ovocitaria**.

El volumen ovárico (VOM) y el recuento folicular (RF) no se relacionan con la tasa de fertilización ovocitaria (**Tabla 13**).

TASA FERTILIZACION	INICIO aGn-RH		SUPRESION		HCG		PUNCION	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
IP-UO	0,009	0,945	0,112	0,398	0,050	0,707	0,113	0,396
SCOM	0,248	0,056	0,180	0,169	0,189	0,141	0,226	0,077
SFxColor	0,103	0,433	0,089	0,501	0,108	0,404	0,086	0,509
VOM	0,249	0,067	0,092	0,504	0,156	0,237	0,204	0,121
RF	0,106	0,418	0,159	0,226	0,221	0,085	0,174	0,175
V/F	0,199	0,146	0,101	0,465	0,188	0,153	0,109	0,412

(** p<0,01 * p<0,05)

Tabla 13

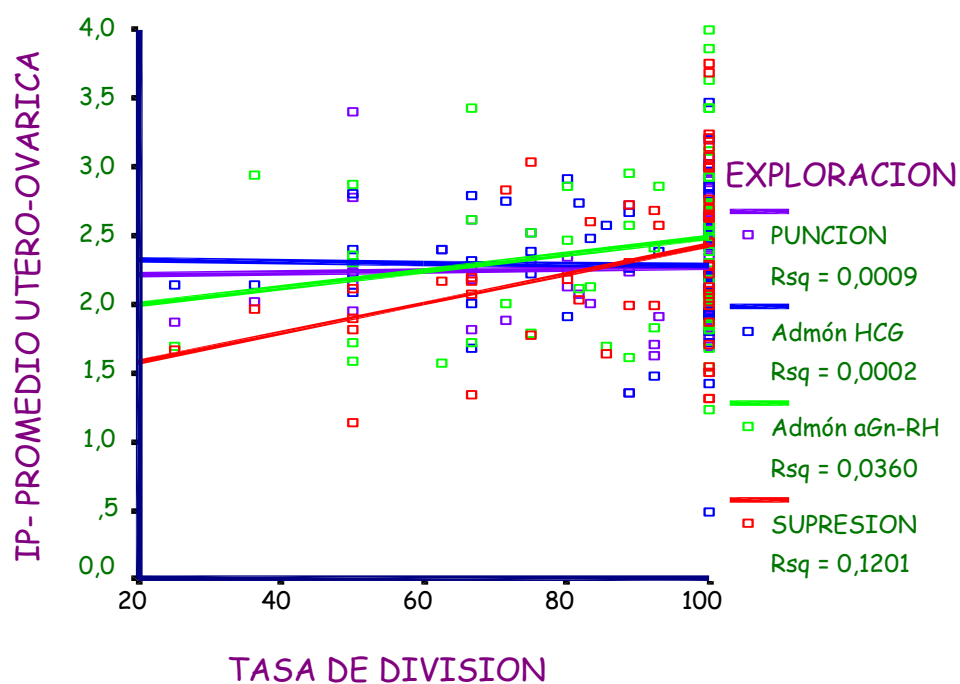
El porcentaje relativo de señal color por folículo (SFxColor) y el IP promedio de las arterias útero-ováricas (IP-UO) son predictores significativos de la **tasa de división embrionaria** el día de la supresión hipofisaria.

El volumen ovárico por folículo (V/F) en el día de la supresión hipofisaria es un predictor significativo de la tasa de división embrionaria (**Tabla 14** y **gráficas 20, 21 y 22**).

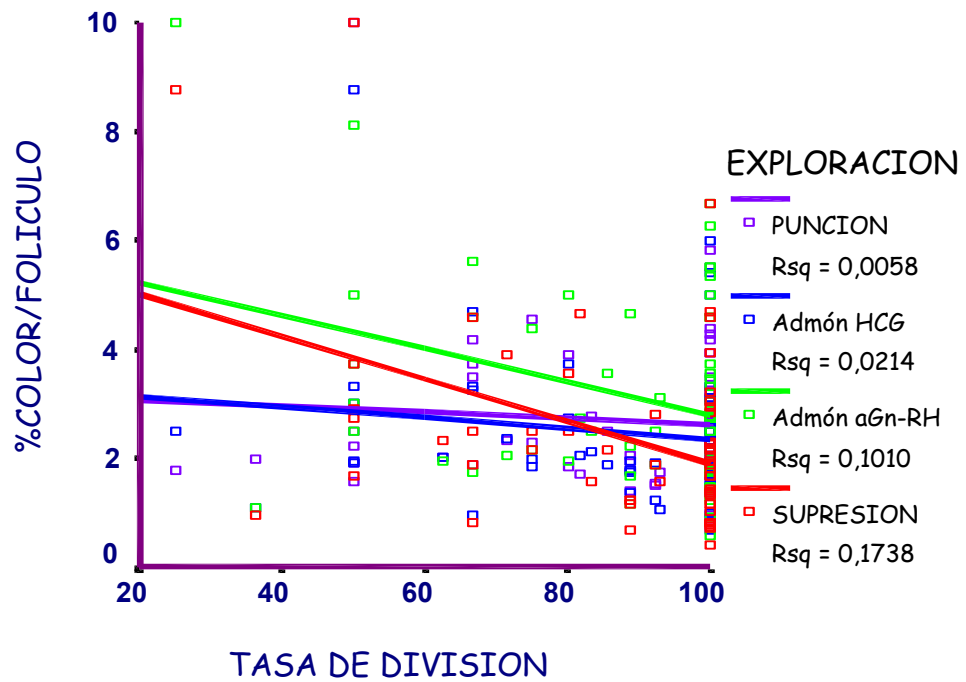
TASA DIVISION	INICIO aGn-RH		SUPRESION		HCG		PUNCION	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
IP-UO	0,190	0,150	0,347**	0,007	0,015	0,910	0,030	0,819
SCOM	0,007	0,959	0,121	0,359	0,004	0,973	0,104	0,420
SFxColor	0,318	0,013	0,417**	0,001	0,146	0,256	0,076	0,555
VOM	0,042	0,761	0,026	0,850	0,064	0,629	0,006	0,966
RF	0,185	0,158	0,253	0,051	0,070	0,586	0,077	0,552
V/F	0,191	0,162	0,379**	0,004	0,128	0,335	0,111	0,401

(** p<0,01 * p<0,05)

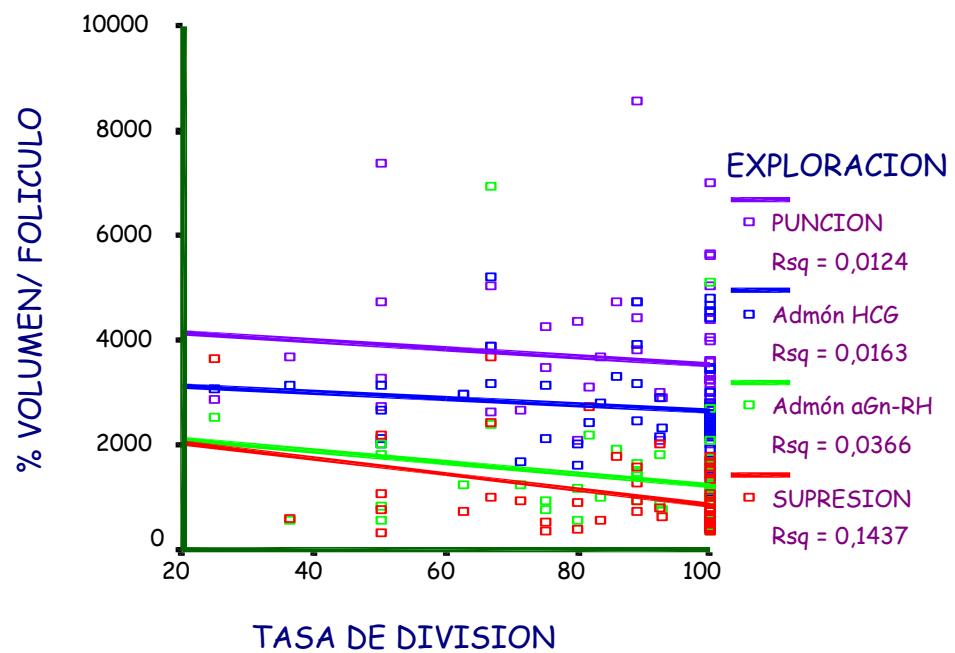
Tabla 14



Gráfica 20 Recta de regresión de la tasa de división en relación al IP-UO



Gráfica 21 Recta de regresión de la tasa de división en relación al SFxColor



Gráfica 22 Recta de regresión de la tasa de división en relación al V/F

El porcentaje de señal color ovárica (SCOM) y el IP promedio de las arterias útero-ováricas (IP-OU) son predictores significativos de la **tasa de implantación** el día de la administración de hCG.

La superficie de color por folículo predice la tasa de implantación en el día de la punción.

El volumen ovárico en el día de la administración de la hCG y el día de la captación ovocitaria es un predictor significativo de la tasa de implantación embrionaria (**Tabla 15**).

TASA IMPLANTACION	HCG		PUNCION	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>IP-UO</i>	0.13**	0.00	0.08*	0.05
<i>SCOM</i>	0.11*	0.01	-0.04	0.37
<i>SFxColor</i>	0.04	0.38	0.08*	0.04
<i>VOM</i>	-0.11*	0.01	-0.18**	0.00

Tabla 15

Por tanto, existe una relación significativa entre la tasa de división embrionaria y el volumen ovárico por folículo y señal color relativa para cada folículo, así como el flujo utero-ovárico, lo que sugiere que estos parámetros pueden utilizarse como **marcadores de la competencia ovocitaria** (**Tabla 16**).

	<i>IP-UO</i>	<i>SCOM</i>	<i>SFxColor</i>	<i>VOM</i>	<i>RF</i>	<i>V/F</i>
	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>
TASA FERTILIZACION	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TASA DIVISION	0,35 (a)	NS	0,42 (a)	NS	NS	0,38 (a)
TASA IMPLANTACION	0.13 (b)	0.11 (b)	0.08 (c)	0.11 (b)	-	-

IP-UO= índice de pulsatilidad promedio de las arterias útero-ováricas; SCOM= mapa color promedio ovárico; SFxColor= señal color por folículo; VOM= volumen ovárico promedio; RF= número de folículos; V/F= volumen ovárico por folículo. (a) = día de la supresión hipofisaria; (b)= día de la administración de hCG; (c)= día de la punción ovárica. Todos los valores de *r* presentaron *p* < 0,01

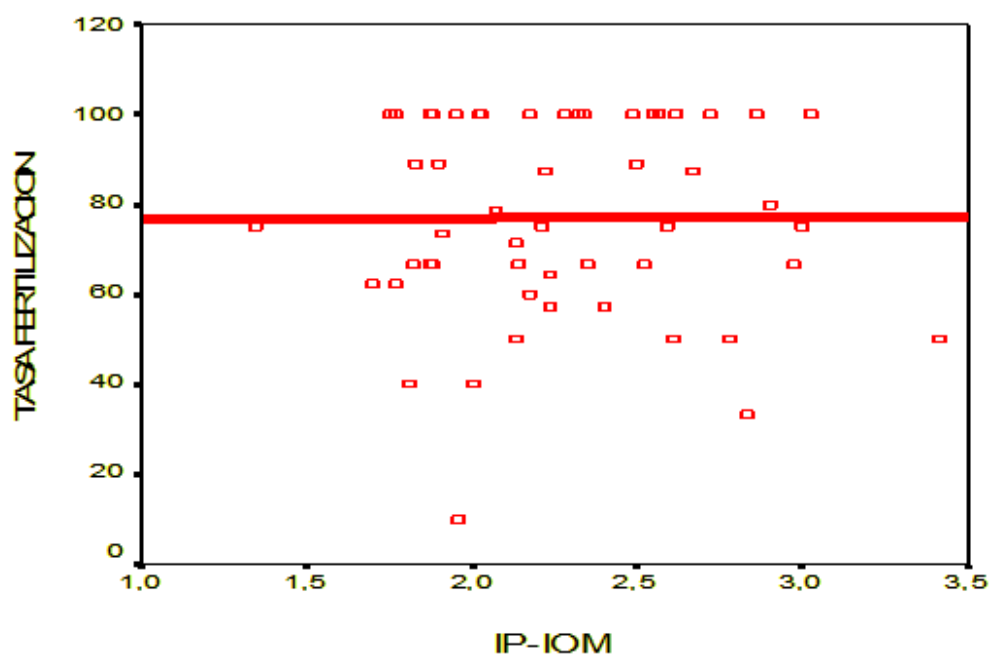
Tabla 16

No encontramos correlación entre el estudio Doppler ovárico y folicular el día de la punción con los marcadores de desarrollo pero sí con la implantación embrionaria (**Tabla 17 y gráficas 23 y 24**).

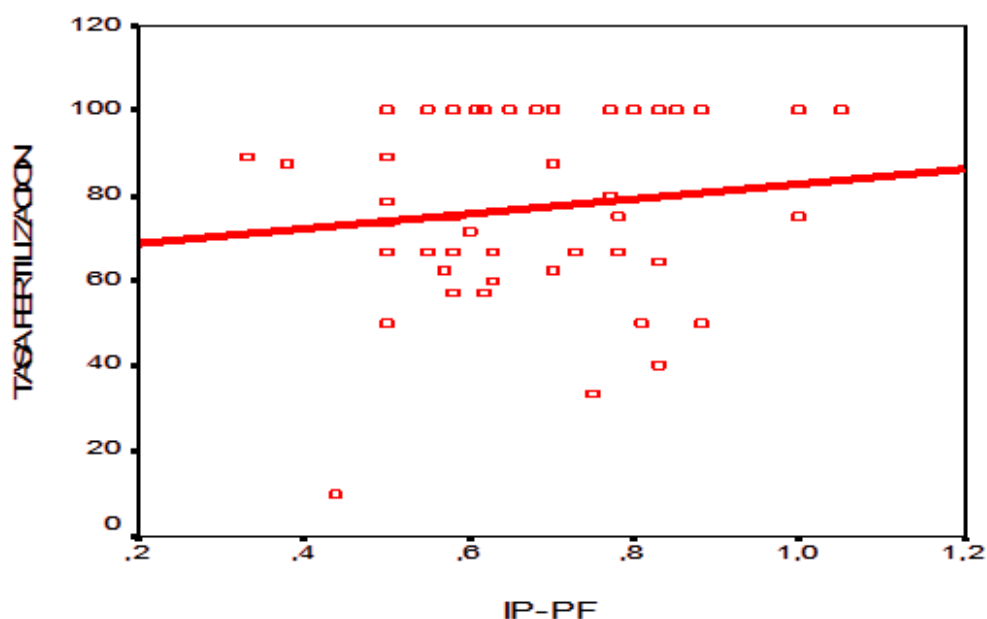
	<i>IP-UO</i>		<i>SCOM</i>		<i>IP-PF</i>		<i>SFxColor</i>	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
TASA FERTILIZAC.	0,073	0,575	0,225	0,098	0,133	0,352	0,018	0,909
TASA DIVISION	0,018	0,892	0,036	0,792	0,025	0,864	0,188	0,216
TASA IMPLANTAC.	0,08*	0,05	-0,04	0,37	0,030	0,838	0,08*	0,04
CALIDAD EMB.	0,187	0,282	0,143	0,467	0,077	0,667	0,026	0,896

(** p<0,01 * p<0,05)

Tabla 17



Gráfica 23 Recta de regresión de la tasa de fertilización en relación al IP-UO



Gráfica 24 Recta de regresión de la tasa de fertilización en relación al IP-PF

3. Estudio de parámetros ováricos como predictores de la implantación y resultado de la gestación precoz.

Se realiza un estudio en 62 pacientes. En 20 se consiguió **gestación clínica**, 7 fueron **gestaciones bioquímicas** y 35 no consiguieron **gestación**.

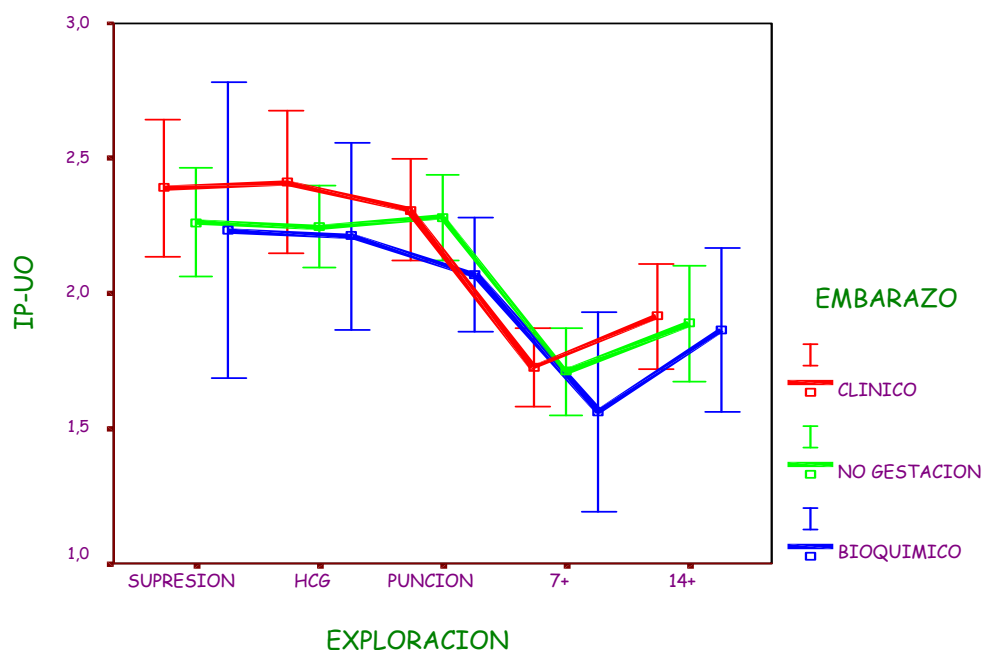
Se estudió qué parámetros vasculares mediante doppler pulsado y mapa color (útero-ovárico y planimetría ovárica) y no vasculares (volumen ovárico) predicen la implantación y el resultado de la gestación precoz en un programa de FIV, evaluados en el control de la frenación, el día de la administración de hCG, de la captación ovocitaria, 7º día postpunción y 14º postpunción cuando se determinó la β -hCG sérica.

El IP promedio de las arterias útero-ováricas (IP-UO) disminuye progresivamente durante la fase lútea, aunque no presenta diferencias significativas entre grupos.

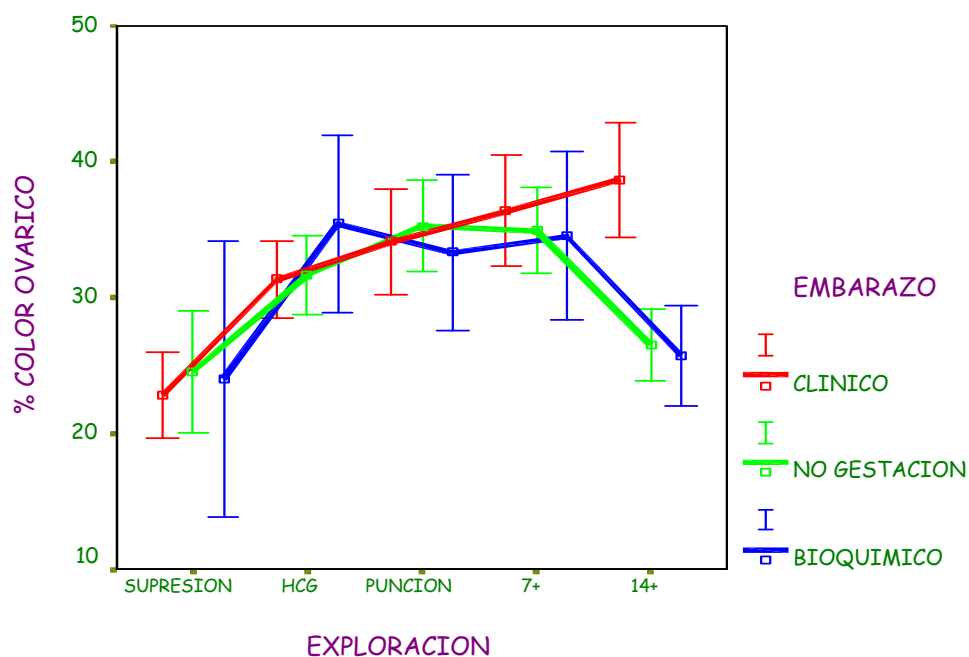
El porcentaje de color ovárico (SCOM) aumenta durante la fase lútea, disminuyendo el día catorce postpunción en los ciclos sin gestación o con gestación bioquímica. Por el contrario sigue elevado, con diferencia significativa, en los ciclos con gestación (**Tabla 18 y gráficas 25 y 26**).

IP-UO	aGn-RH	HCG	PUNCION	7° DIA	βHCG
Gestacion CLINICA	2,39± 0,57	2,41± 0,57	2,31±0,41	1,73± 0,33	1,91± 0,42
Gestación BIOQ	2,23± 0,73	2,21± 0,46	2,07± 0,28	1,56± 0,45	1,87± 0,40
NO Gestación	2,26± 0,57	2,25± 0,45	2,28± 0,45	1,71± 0,48	1,89± 0,61
SCOM					
Gestacion CLINICA	23± 6	31± 6	34± 8	36± 9	39± 9
Gestación BIOQ	24± 11	35± 8	33± 7	35± 7	26± 5
NO Gestación	25± 11	32± 8	35± 9	35± 9	26± 7

Tabla 18



Gráfica 25 Comportamiento del IP-UO en un ciclo de FIV en relación a la gestación

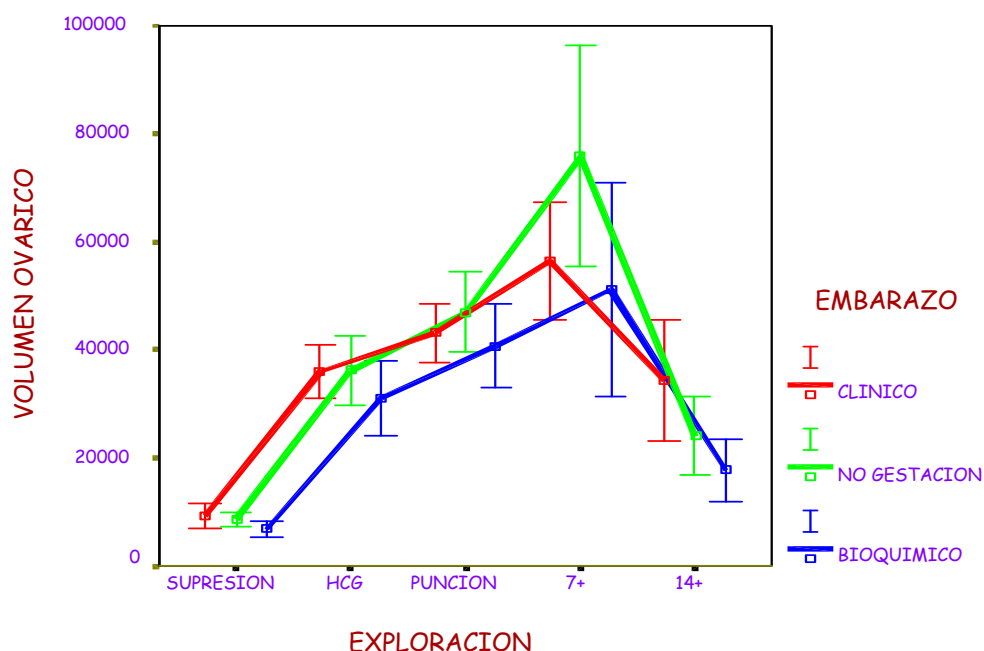


Gráfica 26 Comportamiento de la SCOM en un ciclo de FIV en relación a la gestación

El volumen ovárico (VOM) aumenta durante el periodo de estudio, siendo mayor durante la fase mesolútea, sin diferencias entre los ciclos con y sin concepción (Tabla 19 y gráfica 27).

VOM	aGn-RH	HCG	PUNCION	7° DIA	βHCG
Gestación CLINICA	9,3± 5	36± 11	43,1± 12	56,4± 24,4	34,4± 24,7
Gestación BIOQ	6,9± 1,9	31± 8,4	40,7± 9,6	51,2± 24,1	17,8± 7,6
NO Gestación	8,5± 3,9	35,8± 18	46,9± 21	75,8± 57,8	24± 20,4

Tabla 19



Gráfica 27 Comportamiento del VOM en un ciclo de FIV en relación a la gestación

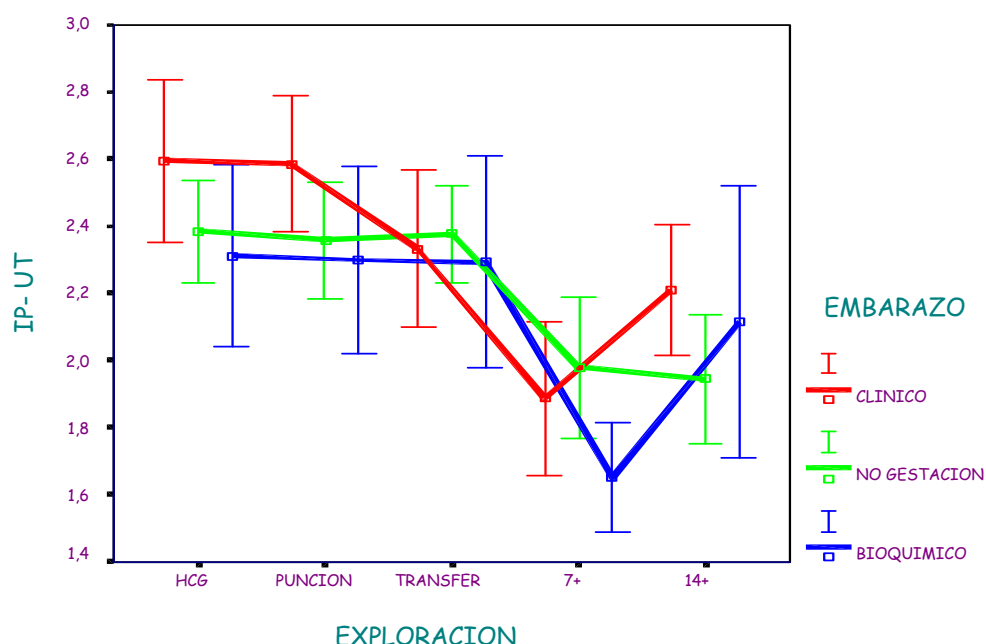
4. Estudio de parámetros uterinos como predictores de la implantación y resultado de la gestación precoz.

Se estudió qué parámetros vasculares mediante doppler pulsado y mapa color (uterinos, endometriales y planimetría endometrial) predicen la implantación y el resultado de la gestación precoz en un programa de FIV, evaluados el día de la administración de hCG, el día de la captación ovocitaria, el día de la transferencia embrionaria, 7º día postpunción y 14º postpunción cuando se determinó la β -hCG sérica.

El índice de pulsatilidad de las arterias uterinas (IP-UT) disminuye después de la transferencia embrionaria, aunque sin diferencias significativas entre los diferentes grupos evaluados (Tabla 20 y gráfica 28)

IP-UT	HCG	PUNCION	TRANSFER	7º DIA	β HCG
Gestación CLINICA	2,60± 0,55	2,57± 0,46	2,33± 0,53	1,89± 0,51	2,21± 0,42
Gestación BIOQ	2,31± 0,36	2,30± 0,34	2,29± 0,42	1,65± 0,19	2,11± 0,54
NO Gestación	2,39± 0,45	2,36± 0,51	2,38± 0,43	1,98± 0,62	1,95± 0,56

Tabla 20



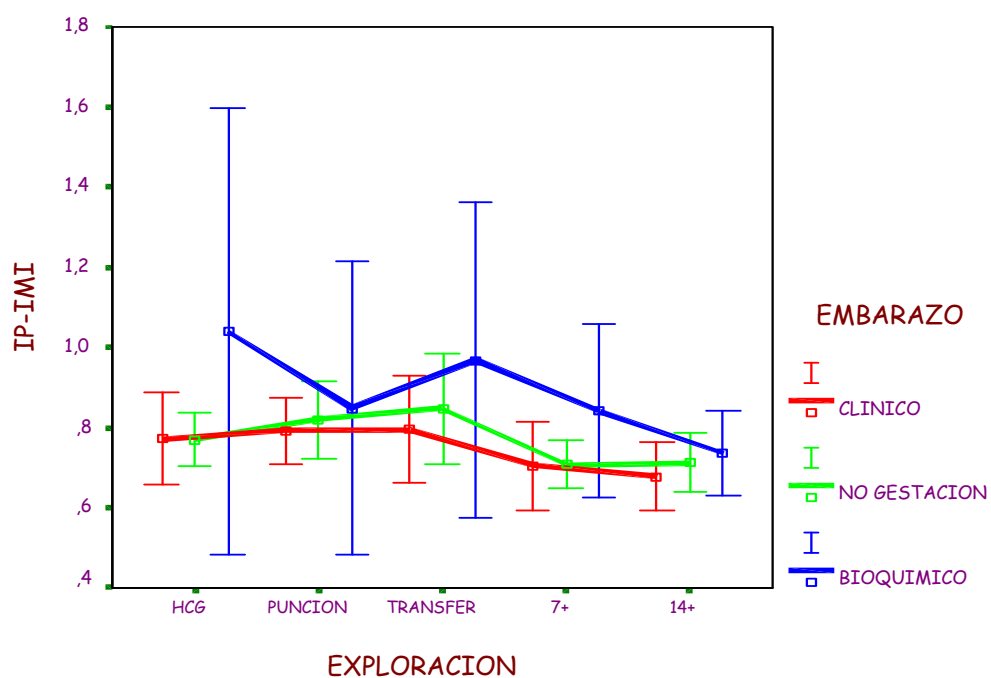
Gráfica 28 Comportamiento del IP-UT desde el día de la administración de la hCG en un ciclo de FIV en relación a la gestación

Los ciclos con gestación clínica presentan un IP intramiometrial (IP-IMI) menor con respecto a los ciclos sin gestación o gestación bioquímica.

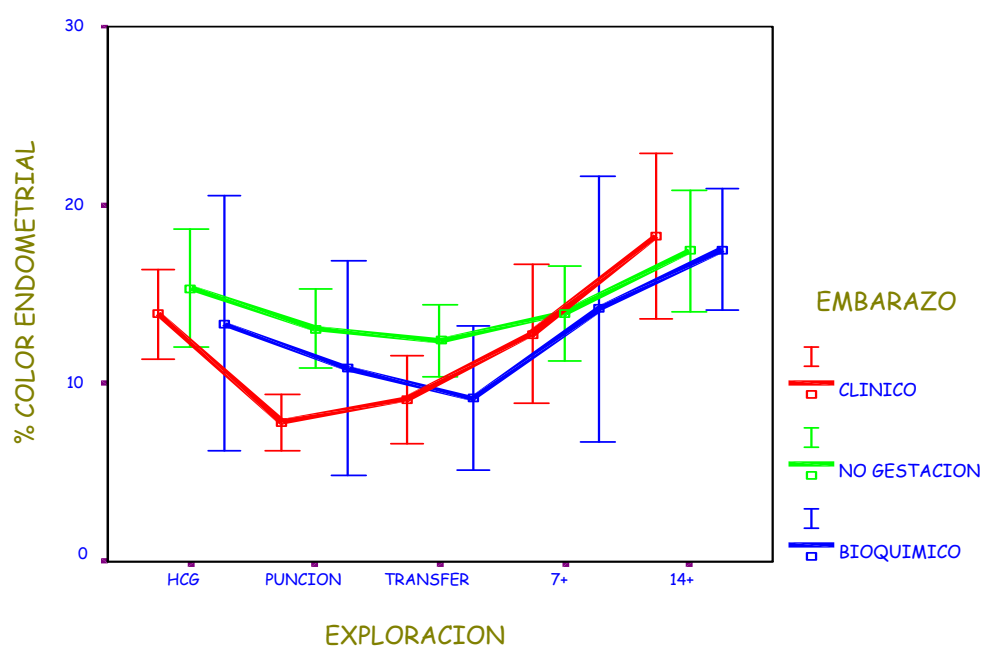
El porcentaje de color endometrial (SExColor) no presenta diferencias significativas entre los grupos de estudio (Tabla 21 y gráficas 29 y 30).

IP-IMI	HCG	PUNCION	TRANSFER	7° DIA	βHCG
Gestacion CLINICA	0,77± 0,25	0,79± 0,18	0,80± 0,28	0,71± 0,23	0,68± 0,18
Gestación BIOQ	1,04± 0,74	0,85± 0,45	0,97± 0,52	0,84± 0,29	0,74± 0,14
NO Gestación	0,77± 0,19	0,82± 0,29	0,85± 0,41	0,71± 0,18	0,71± 0,21
SExColor					
Gestacion CLINICA	14± 5	8± 3	9± 5	13± 8	18± 9
Gestación BIOQ	13± 9	11± 7	9± 5	14± 9	18± 4
NO Gestación	15± 9	13± 6	12± 6	14± 8	17± 10

Tabla 21



Gráfica 29 Comportamiento del IP-IMI desde el día de la administración de la hCG en un ciclo de FIV en relación a la gestación



Gráfica 30 Comportamiento de la SExColor desde el día de la administración de la hCG en un ciclo de FIV en relación a la gestación

Doppler color en la fertilización *in vitro* (FIV) como predictor

VII. DISCUSIÓN

La Discusión se ha estructurado según los objetivos propuestos:

1. Estudio de los parámetros vasculares y no vasculares predictores de la respuesta ovárica en un ciclo de FIV.

Mientras se están utilizando a menudo medidas ecográficas y hormonales de reserva ovárica para aconsejar a los pacientes sobre su potencial fertilidad, faltan datos normalizados de estos marcadores para la población general. La mayoría de los estudios son transversales y en subpoblaciones. RFA y AMH parecen ser los mejores indicadores de la reserva folicular y disminuyen con la edad. El volumen ovárico, la inhibina B, el estradiol y la FSH son de menos ayuda. Nuestra pretensión es utilizar la ecografía como método no invasivo. De ahí la necesidad de realizar estudios longitudinales para estos biomarcadores en población joven, sana, de distintas etnias y así valorar la presencia de cofactores (180).

1.1 Parámetros vasculares predictores de repuesta ovárica.

1.1.1 Velocimetría Doppler intraovárica (estroma ovárico) promedio y en el ovario portador del cuerpo lúteo (O.A.) y contralateral (O.I.).

El flujo estromal en la fase folicular precoz o en el ovario inactivo tras supresión hipofisaria se relaciona estrechamente con el número de folículos en crecimiento, siendo un predictor de la respuesta ovárica mejor a veces que la edad y los niveles basales de FSH y estradiol.

El estudio Doppler estromal en fase folicular inicial se correlaciona con la respuesta ovárica. Estos resultados son iguales a los obtenidos por Jadaon y cols (151) y Weiner y cols (97).

Zaidi (49) encontró un flujo ovárico menor en las bajas respondedoras en relación a la velocidad absoluta de flujo dentro de los vasos, pero el IP fue similar en los dos grupos. La definición de

baja respuesta usada por este autor fue de seis o menos folículos de distintos tamaños el día de la punción en lugar del corte más extendido de cancelación o punción con tres o menos ovocitos.

Younis y cols (152) no demostraron diferencias en el flujo estromal entre pacientes normovuladoras y aquellas con ovarios poliquísticos, aunque otros autores sí encontraron diferencias (178). Battaglia y cols (178) objetivaron una resistencia vascular menor y un aumento del flujo estromal en las portadoras de ovarios poliquísticos, además considera que el IP estromal es un buen predictor de hiperandrogenemia e hirsutismo. Estos hallazgos se pueden explicar por un mecanismo de neovascularización o activación de factores vasoactivos que pudieran influir en la síntesis de andrógenos en el ovario. Los índices 3D, por el contrario, carecen de significación estadística como predictores de hipendrogenemia.

En nuestro estudio no se han estudiado las posibles diferencias entre distintos grupos de respuesta ovárica.

Estos hallazgos no han sido corroborados mediante el uso de 3D y no parece aportar beneficio (233). Shaban y cols (153) encuentran una correlación débil entre el índice vascular (VI) (determina la densidad vascular, expresado en porcentaje, mide el número de voxels de color en el volumen estudiado, representando los vasos sanguíneos dentro de un tejido), el índice de flujo (FI) (determina la densidad de flujo, es el valor de color de todos los voxels de color, representando la intensidad de color media), y el índice vascular /flujo (VFI) (determina la perfusión, es el valor medio de color de todos los voxels gris y de color, representando a la vez el flujo sanguíneo y la vascularización) que constituyen los índices Power Doppler 3D (3DPD) en su estudio sobre marcadores ováricos de reserva y la vascularización estromal. Jayaprakasan K y cols (154) estudian mediante 3DPD en la fase inicial del ciclo encontrando que fueron similares en normo y baja respondedoras y aunque el flujo

sanguíneo ovárico medido por 3D es menor en la baja respondedora, no es predictivo de baja respuesta. Este estudio tiene sus limitaciones al iniciar con distintas dosis de gonadotropinas, la duración de la estimulación y que la dosis total fue significativamente más elevada en las bajas respondedoras.

Mercé (173) evaluó la vascularización ovárica usando 3DPD antes de la estimulación, en dosis decrecientes y aunque había una significación positiva con los coeficientes de correlación de Pearson entre los índices vasculares ováricos y la respuesta ovárica considerando el número de folículos de > 10 mm el día de la hCG y el número de ovocitos recuperados, ninguno de esos índices fueron predictores independientes. Younis y cols (152) revisa los hallazgos obtenidos mediante 3D y tampoco son uniformes, mientras unos estudios demuestran mayor vascularización en el estroma ovárico de las mujeres con ovarios poliquísticos (139,169, 170,178), otros no lo logran (171,172).

Engmann y cols (234) y Kupesic y cols (235) confirmaron mejores respuestas ováricas, con más ovocitos maduros y más tasa de embarazo cuando la VPS estromal ovárica es ≥ 10 cm/s. Esta diferencia se atenúa después de la supresión hipofisaria (236), en otros trabajos no encuentran diferencia (206, 237).

Tras efectuar revisión bibliográfica, todos los autores hacen referencia a la reserva ovárica, pero es escaso el número de los que hacen referencia al número de ovocitos maduros (173, 234, 235), siendo éste uno de los puntos originales del presente trabajo.

1.1.2 Velocimetría de la arteria útero-ovárica

Sólo hemos encontrado dos estudios en referencia a este parámetro. Uno de ellos es de Giugliano y cols (161), realizaron la valoración en el segundo día del ciclo menstrual en lugar del día de la punción como hemos encontrado relación en nuestro trabajo, y extrapola el estudio que realiza entre gestantes y no gestantes para concluir que

el Doppler de las arterias ováricas no añade información significativa en relación a la reserva ovárica. Lamazou y cols (174) insisten en la necesidad de más estudios al no quedar claro el papel de las arterias ováricas en la valoración de la reserva ovárica.

Tampoco hay estudios que relacionen el estudio de las arterias utero-ováricas con el número de ovocitos en metafase II.

1.1.3 Velocimetría perifolicular

Este estudio no aporta predicción sobre la respuesta ovárica evaluado el día de la punción, en contra de la bibliografía revisada (57, 58). No hemos encontrado más estudios que realicen esta valoración, por lo que no es posible establecer otras comparaciones.

1.1.4 Planimetría color ovárica

Jadaeon y cols (151) encuentra diferencia entre la ausencia de señal Doppler color en uno o ambos ovarios más frecuente en mujeres con baja respuesta (31%) que en aquellas con respuesta normal (16%). En la misma dirección apuntan nuestros resultados como predictores de respuesta ovárica en fase folicular precoz a nivel de los índices de color relativo, y en forma más tardía (día de la hCG y punción) como superficie de color total.

Battaglia y cols (178) valoran la ecogenicidad estromal, encontrando que es mayor en las pacientes con ovarios poliquísticos. Mediante 2D, este parámetro es subjetivo y de difícil reproducibilidad, por lo que consideran la 3D un método objetivo de cuantificación mediante el cálculo de la media de la señal de la intensidad de los voxels de gris recogido como el valor medio de grises, siendo mayor que en las normoovuladoras, a diferencia de Lam y cols (170).

1.1.5 Planimetría perifolicular

En nuestro trabajo, en contra de la bibliografía revisada (57, 58) no encontramos relación entre el porcentaje de color perifolicular valorado el día de la captación ovocitaria y la respuesta ovárica.

1.2 Parámetros no vasculares predictores de respuesta ovárica.

1.2.1 Edad, FSH y estradiol basales del estudio

Ben-Haroush y cols (206) correlaciona la edad y el RFA. Chen y cols (179) demuestran que la combinación de RFA y edad es el mejor predictor de respuesta ovárica en FIV. La edad tiene un valor predictivo mayor para la tasa de gestación que el RFA. RFA influye principalmente en la cantidad mientras que la edad afecta también la calidad del ovocito. Este mismo dato es aportado por Mutlu y cols (203) en un análisis multivariante donde la edad era el único predictor independiente de niño vivo en FIV, pero no es el mejor predictor de baja respuesta, siendo peor que el RFA (único parámetro independiente) y AMH. En nuestro trabajo la edad no se relaciona con el número de ovocitos maduros y sí con la reserva, a la inversa que en los estudios de más arriba.

La Marca y cols (228) mediante una función cúbica, establecen una relación significativa entre el número medio de ovocitos y la edad, para predecir la edad de menopausia en función del número de ovocitos obtenidos en ciclos de FIV (para una determinada edad, cuantos menos ovocitos se obtengan, más temprana será la edad de menopausia).

Jayaprakasan K y col (154) encuentra que la FSH es predictora junto con el RFA mediante regresión múltiple, pero no de forma independiente. Lo mismo es apoyado por Giugliano y cols (161) donde la FSH se correlacionaba con los marcadores ecográficos, pero no como variable independiente. Hendriks y cols (156) mediante su metaanálisis demostraron que la FSH es predictiva al igual que nosotros. Una objeción es que se ha detectado un grado significativo de variabilidad para la FSH entre ciclos (155).

La Marca y cols (229) estudian los parámetros para valorar la reserva ovárica, entre los cuales incluye la FSH, AMH e inhibina B. También tienen un papel RFA, la vascularización y el volumen

ováricos. No encuentra lugar para los métodos dinámicos (test de clomifeno EFORT, etc).

Al igual que otros autores, el estradiol es predictor de la respuesta ovárica desde la fase inicial, pero encontramos posturas controvertidas en relación a la utilidad del estradiol. Jayaprakasan K y cols (154) encuentran que los niveles de estradiol medido el quinto día de estimulación y el día de la administración de la hMG en bajas respondedoras, se acompaña de forma significativa tanto de una disminución del número de folículos como del número de ovocitos. Sin embargo (146), la medición de estradiol es un método invasivo y en normorrespondedoras los resultados de implantación, embarazo y síndrome de hiperestimulación ovárica son similares cuando son controlados sólo con ecografía, disminuyendo molestias a las pacientes y sólo parece necesaria la determinación de los niveles de estradiol en mujeres con alto riesgo de desarrollar un síndrome de hiperestimulación ovárica.

Geber S y cols (230), sustituye el uso del estradiol aunque, esta vez no como predictor de respuesta ovárica sino de control de la supresión hipofisaria conseguida con la administración de aGn-RH al correlacionar el IP de las arterias uterinas y el grosor endometrial con el estradiol para simplificar el control.

Otro punto de vista es el aportado por Broekmans y cols (231) en su metanálisis, donde demuestra que los marcadores bioquímicos (FSH; estradiol, inhibina B, AMH) son indirectos y aunque existen correlaciones entre ellos y la respuesta ovárica, su sensibilidad y especificidad individualmente son débiles para predecir la respuesta del ovario y el resultado de gestación.

1.2.2 Volumetría ovárica

Jadaon y cols (151) correlaciona el volumen ovárico con la respuesta pero de forma más precoz que en nuestro estudio, donde encontramos correlación desde el día sexto de estimulación hasta el

día de la punción. Shaban y cols (153) también encuentra una correlación fuerte entre volumen ovárico y respuesta.

El volumen ovárico es un indicador indirecto útil de la reserva ovárica en la mujer en edad reproductiva, en el diagnóstico y manejo de numerosas patologías de la función reproductiva tanto en edad adulta como en la pubertad, y está en investigación como herramienta de cribado en el cáncer de ovario. Kelsey (175) propone un modelo, el primero validado desde la concepción hasta la menopausia, que muestra que el 69% de la variación del volumen se debe solo a la edad, de forma que la edad cronológica se relaciona de forma inversa con el volumen ovárico (208). El volumen medio ovárico fué significativamente menor en el grupo de pacientes con fallo ovárico prematuro (238).

Otros autores (176) incorporan este parámetro junto al número de folículos como marcador de síndrome de ovario poliquístico, o en regresión múltiple (177), pero en este último caso no mejora al RFA. Se ha descrito un grado moderado de confianza interobservador en la medida del volumen ovárico en 2D y 3D, aunque las medidas mediante 3D del volumen ovárico son más fiables entre observadores que las realizadas en 2D y además la 3D ofrece la ventaja de realizarse en un tiempo menor (155). En nuestro trabajo se ha eludido la variabilidad interobservador. Leonhardt y cols (239) utilizan resonancia magnética 2D, el volumen ovárico mediante resonancia 2D es menor que la referencia estandarizada de la eco 2D. Con resonancia 3D es similar a eco 2D. La reproducibilidad y grado inter-observador de la resonancia 2D para medir volumen ovárico es bueno.

La medida del volumen ovárico mediante 3D es un indicador reproducible (232) que parece predictivo de mala respuesta ovárica y/o de la cancelación de una estimulación, pero con un valor predictivo más débil que el RFA (233). Por el contrario,

Jayaprakasan K y cols (154), también mediante 3D en la fase inicial, encuentra que el volumen ovárico fue significativamente menor en las mujeres con baja respuesta pero no alcanza a ser predictor. Este parámetro también predice el riesgo del síndrome de hiperestimulación ovárica en ciclos FIV, cuando se ha valorado mediante volumetría tridimensional en el primer día de estimulación.

Battaglia y cols (178) estudia dos índices: estroma ovárico/área ovárica mediante 2D y estroma ovárico/volumen ovárico mediante 3D, siendo éste último mayor en las portadoras de ovarios poliquísticos y el marcador más seguro de hiperandrogenemia e hirsutismo (corte ≥ 0.32). El volumen ovárico medio y el número medio de folículos supracasuales pequeños medidos en 2D y 3D fueron mayores en pacientes con PCOS. Ng y cols (172) no encontraron diferencias en el flujo ovárico en pacientes que no tenían hiperandrogenismo clínico ni bioquímico.

Ben-Haroush y cols (206) correlaciona el RFA con el volumen ovárico, el número de ovocitos conseguidos, el número de embriones de buena calidad y el número de embriones congelados. De forma marginal se correlaciona con el número de ovocitos inmaduros aspirados. Este es el único trabajo que correlaciona con el volumen, no sólo la cantidad sino también, la calidad de los ovocitos, al igual que en nuestra investigación conseguimos correlacionar el volumen con el número de ovocitos y el número de ovocitos MII, siendo original en esta valoración.

1.2.3 Recuento de folículos antrales

Nuestros resultados considerando el recuento de los folículos antrales (RFA) predictor de la respuesta ovárica en cualquier momento del seguimiento ecográfico, especialmente en el día de la supresión hipofisaria concuerdan con múltiples autores. Giugliano y cols (161) y Hendriks y cols (156) mediante su metaanálisis demostraron que RFA es el marcador más predictivo.

Para Jayaprakasan K y cols (154) el RFA es el único y mejor predictor de baja respuesta ovárica y cancelación como parámetro único, siendo el corte óptimo menor de once folículos. La edad cronológica se relaciona de forma inversa el RFA totales. El número de folículos antrales entre 2-4 y 5-7 mm disminuyen según aumenta la edad, mientras que los de 8-10 mm aumentan con el edad (208). El RFA fué significativamente menor en el grupo de pacientes con fallo ovárico prematuro (238). Mutlu y cols (203) realizan un análisis multivariante, el RFA era el mejor y único parámetro independiente para predecir la baja respuesta, y a su vez, la AMH era mejor que la edad y la FSH basal. Kim y cols (240) establecen una nueva definición para “respuesta ovárica pobre”, similar a los criterios de Bolonia, como aquella ≤ 2 ovocitos o ≤ 1 ovocitos maduros en el ciclo previo o AMH ≤ 0.76 ng/mL, también mejor que FSH y edad.

Ya habíamos comentado que Chen y cols (179) obtienen el mejor predictor de respuesta ovárica en FIV mediante la combinación de RFA y edad. El mejor modelo pronóstico para predecir la baja respuesta incluye RFA y edad y el mejor para hiperrespuesta incluye RFA y longitud del ciclo (241).

En este sentido, Hendriks y cols (156) determinan que el RFA es predictivo de baja respuesta ovárica pero no de la tasa de gestación. Un RFA anormal (12% de los casos en los estudios) anuncia una mala respuesta a la estimulación en el 70% de los casos. El RFA puede iniciar la exploración de toda infertilidad pero no excluye las pacientes de ciertas técnicas de reproducción asistida (233).

La reproducibilidad del RFA y otros marcadores convencionales de reserva ovárica es importante al considerar que se les aconseja a las parejas en relación a una sola medida de esas variables. Se ha detectado un grado significativo de variabilidad debida a la variabilidad entre observadores para el RFA entre ciclos con 2D, más que debida a la variación biológica entre ciclos (155). En

nuestro trabajo, la variabilidad interobservador ha quedado eliminada. Jayaprakasan K y cols (155) demostró que RFA valorado mediante 3D en la fase inicial demuestra una variabilidad interciclo menor que el volumen ovárico y el nivel de FSH y tiene el mismo valor para los seis meses siguientes.

También se ha usado la 3D para monitorizar la estimulación (158). La ventaja del SonoAVC sobre la 2D es la posibilidad de obtener la medida de los folículos de forma automática y por tanto más rápido (243) y con poca variabilidad interobservador, frente a la falta de estandarización de la 2D que representa una importante limitación. Algunas limitaciones también están presentes usando 3D como el coste de los ecógrafos 3D y si la calidad de la imagen no es buena hay que realizar una eco 2D (158).

Hay una buena correspondencia entre la medición del tamaño folicular mediante 2D y SonoAVC y reduce mucho el tiempo de exploración (158, 242).

Leonhardt y cols (239) utilizan resonancia magnética 2D objetivando más folículos antrales, sobre todo de pequeño tamaño que la ecografía 3D. La reproducibilidad y grado inter-observador de la resonancia 2D para medir RF es bueno.

Deb S y cols (157) realizaron un estudio para demostrar diferencias entre los marcadores ecográficos 3D de reserva ovárica entre ambos ovarios en una misma paciente, objetivando la máxima variación entre los folículos que miden más de 6.0 mm como corte, medidos mediante sonoAVC. La variación es menos evidente en los folículos pequeños (≤ 6 mm) que son los que se correlacionan con la AMH y refleja con mayor exactitud la reserva ovárica. Jayaprakasan K y cols (154) utilizando 3D en fase inicial encuentran que el RFA era significativamente menor en las mujeres con baja respuesta.

Ben-Haroush y cols (206) correlaciona el RFA con el número de ovocitos conseguidos, el número de embriones de buena calidad y el

número de embriones congelados. Shaban y cols (153) también encuentra una correlación fuerte entre RFA y número de ovocitos maduros. Mercé y cols (246) estudiaron el número de folículos detectando que era predictor independiente del número de ovocitos conseguidos, maduros y fertilizados y el número de embriones. Son los únicos estudios que notifican correlación con la madurez ovocitaria, al igual que en el nuestro.

En los últimos años se ha introducido un nuevo concepto en el recuento de folículos y es el FORT (244) calculado como el ratio entre el recuento de los folículos preovulatorio el día de la estimulación $\times 100$ / recuento folículos antrales (3-10 mm) basales. FORT ha sido considerado como indicador pronóstico de la respuesta a la FSH y de competencia en FIV (244). Genro y cols (245) establecen que la AMH se correlaciona con el número de folículos antrales pequeños basales y con los folículos preovulatorios el día de administración de la hCG. El porcentaje de folículos que responden a la FSH (FORT) fue $47.5 \pm 1.4\%$ y no se vió influenciado por la edad de paciente, IMC, estradiol basal y FSH. Por el contrario, mediante regresión múltiple, se demostró que FORT se correlacionaba de forma negativa con la AMH, duración del uso de contracepción oral y dosis total de FSH. El porcentaje de folículos que efectivamente responden a la FSH alcanzando maduración preovulatoria se correlaciona de forma negativa e independiente con la AMH. Aunque los mecanismos subyacentes no están claros, se sospecha que la AMH inhibe la sensibilidad folicular a la FSH. Entre normorrespondedoras el número de ovocitos conseguidos aumentaban progresivamente con FORT (244).

2. Estudio de los parámetros vasculares y no vasculares ováricos y foliculares como marcadores de competencia ovocitaria y desarrollo embrionario en un ciclo de FIV.

La disminución del número de folículos se acompaña de una reducción de la calidad, incluyendo las principales anomalías del núcleo (cromatina dispersa, decondensación de cromosomas y anomalías relacionadas con el huso). Esto conduce al fracaso reproductivo debido a una gametogénesis anómala, el proceso de fertilización, el desarrollo temprano del embrión y la implantación anómala (182).

Aumentar el conocimiento sobre los mecanismos de envejecimiento ovárico (cuantificación de folículos, medidas endocrinas y test genéticos), puede mejorar la prevención del fallo ovárico prematuro (183).

Por otro lado, nuestro objetivo debe estar en individualizar el tratamiento de FIV para cada paciente, maximizando la probabilidad de embarazo, eliminando la yatrogenia y evitando los riesgos de la hiperestimulación (184).

Una posibilidad futura sería que los primeros cuidados médicos, endocrinológicos y oncológicos pudieran valorar rápidamente una disfunción ovárica y la reserva ovárica de forma más segura que la FSH. Para las mujeres, la posibilidad de conocer la duración de su esperanza de vida reproductiva le permitiría redefinir el significado de la planificación familiar (185).

2.1 Parámetros vasculares marcadores de competencia ovocitaria.

2.1.1 Velocimetría de la arteria útero-ovárica

Hemos encontrado correlación entre IP-UO y la tasa de división embrionaria el día de la supresión hipofisaria y de la tasa de implantación el día de la administración de hCG, pero en este aspecto no hemos encontrado estudios con los que poder realizar comparación.

2.1.2 Velocimetría perifolicular

No encontramos correlación entre el estudio Doppler folicular el día de la punción con los marcadores de desarrollo e implantación embrionaria, a diferencia de otros autores (57, 58, 59, 60, 61, 162). Sin embargo, concordamos con los resultados de Battaglia y cols (252) lo cuales miden, en un grupo de normorrespondedoras, las arterias perifoliculares de aquellos folículos mayores de 10 mm en el día de la punción. La vascularización perifolicular fue similar en ambos grupos. El número y la calidad de los ovocitos conseguidos y la tasa de fertilización y el número de embriones transferidos fueron iguales entre grupos. Si consideramos los folículos mayores de 17 mm, los IP perifoliculares fueron más bajos en el grupo con IP-UT $\leq$ 2.5 el día de la supresión, los cuales tuvieron una tasa de gestación por ciclo y por transfer significativamente más alta.

Riad y cols (162) estudiaron mediante Doppler el flujo perifolicular en fase folicular avanzada (desde el día 9 hasta la administración de hCG) y en su trabajo los IR-PF fueron significativamente inferiores en caso de implantación.

2.1.3 Planimetría color ovárica

En nuestro trabajo, el porcentaje de señal color ovárica (SCOM) es predictor significativo de la tasa de implantación el día de la administración de hCG. Con parcialmente asimilable, Mercé y cols (246) objetivaron que los índices 3DPD ováricos, fueron más elevadas en las gestantes. El número de embriones de grado 1 depende del número de folículos y de VI. El FI ovárico y el número de embriones transferidos grado 1 puede predecir la gestación en el 76% de las FIV. Un FI bajo y la no transferencia de embriones grado 1 se asocia a la ausencia de embarazo.

2.1.4 Planimetría perifolicular

Se ha correlacionado el flujo perifolicular y el nivel de oxigenación perifolicular y la recuperación del ovocito, constituyendo un buen

marcador de competencia, calidad embrionaria, potencial de implantación y embarazo (59,60,61). Todos los parámetros mejoran cuando se usan ovocitos obtenidos de folículos con un grado alto de vascularización perifolicular (159). En nuestro trabajo encontramos coincidencia con esta valoración, pero ya en fase folicular inicial, aumentando la tasa de división embrionaria el día de la supresión hipofisaria de forma significativa en relación al porcentaje relativo de señal color por folículo (SFxColor). El trabajo de Palomba y cols (159) consiste en un estudio prospectivo, randomizado y controlado en mujeres mayores de 40 años en protocolo largo y con FSHr para valorar la eficacia de la vascularización perifolicular usando Power Doppler el día de la punción como un criterio adicional al morfológico para elegir los ovocitos más competentes. Sin embargo, encuentra que la FSH es el principal factor que influye en la tasa de embarazo, situando el corte en 10,9 UI/L, sugiriendo que la valoración de la vascularización perifolicular puede ser una herramienta para mejorar los criterios morfológicos de selección ovocitaria en las mujeres con buena reserva, pero no parece ser útil en aquellas con baja reserva. Wakeman y cols (160) no correlacionaron el flujo perifolicular con el resultado quizás porque se realizó la ecografía en el día 11 o 12 en lugar del día de la hCG o de la ovulación, donde se han demostrado diferencias en relación a la gestación en otros trabajos realizado en ciclos de FIV y varios han demostrado asociación entre grados altos de vascularización perifolicular y mayor frecuencia de gestación (59), coincidiendo con nuestros resultados que correlacionan el SFxColor con la tasa de implantación el día de la punción.

2.2 Parámetros no vasculares marcadores de competencia ovocitaria.

2.2.1 Volumetría ovárica

En nuestro trabajo, el volumen ovárico (VOM) no se relaciona con la tasa de fertilización ovocitaria, afirmación que va en el mismo

sentido que la observada por otros autores (233) al encontrar que el volumen ovárico mediante 3D no es predictivo de embarazo (233). No hay trabajos que correlacionen el volumen 2D con la competencia ovocitaria.

Mercé y cols (246) estudiaron el volumen ovárico y encontraron que era más elevado en las gestantes, pero no era predictor de embarazo.

2.2.2 Recuento folículos (RF)

Revelli y cols (158) realizan una revisión de la literatura disponible en los quince últimos años en relación a la estimación del tamaño folicular y el volumen mediante 2D y 3D para valorar la maduración y competencia de los ovocitos y mejorar el resultado de la FIV. El objetivo es conocer si la eco 2D de los folículos cuyos ovocitos están creciendo dentro es útil para:

- a) Identificar los folículos que contienen los mejores ovocitos
- b) Elegir el mejor momento para administrar la hCG o el bolo de GnRH

Se mide los dos diámetros mayores de cada folículo y se calcula el diámetro medio. Un detalle técnico importante es el método de medida. Algunos estudios definen la competencia como una combinación del grado de maduración del folículo (definido como el número de células y el aspecto morfológico del complejo del cúmulo ovocitario y la dimensión folicular).

El estudio morfológico del folículo usando 2D se usa de rutina en las unidades de FIV. Por su tolerabilidad, resultados en tiempo real, constituye la herramienta ideal para obtener indicaciones útiles sobre la competencia ovocitaria. Desafortunadamente, la evidencia disponible falla para indicar el rango de tamaño dentro de los cuales se contienen ovocitos de buena calidad y sólo da ideas aproximadas. Los ovocitos maduros y competentes se obtienen de folículos con diámetro medio entre 16 y 22 mm cuando se administra

hCG. A veces se obtiene ovocitos fertilizables de folículos más pequeños pero tienen menor potencial de implantación. Los datos disponibles sobre competencia y tamaño folicular son bastante inconsistentes por ser estudios de pequeño tamaño y retrospectivos, distintos protocolos de estimulación, los posibles “artefactos biológicos” para valorar maduración folicular así como limitaciones intrínsecas de la técnica 2D, de forma que no podemos tener una idea clara de cuando inducir la ovulación o esperar y en que folículos aspirar o no por sus características 2D.

Hendriks y cols (156) indican que el RFA es predictivo de baja respuesta ovárica pero no de la tasa de gestación. Carrera-Rotllan y cols (143) indican que entre las variables con mayor poder de predicción sobre las probabilidades de gestación son: niveles de estradiol, número de folículos, FSH en tercer día del ciclo y la edad de la mujer. Pero sería necesario contemplar la mala respuesta ovárica en el plano cuantitativo, pues tener un RFA bajo no significa que la calidad folicular esté alterada (247). Chen y col (179) obtienen que la edad tiene un valor predictivo mayor para la tasa de gestación que el RFA, pues la edad afecta también la calidad del ovocito. Nuestros resultados coinciden con estos autores al no poder relacionar el RF con la tasa de fertilización ovocitaria.

Revelli y cols (158) objetivaron que ninguno de los estudios correlacionó los resultados de la FIV, el tamaño folicular y la edad de las pacientes (muchos estudios tiene edad media de 34-35 $\pm$ 4-5 años, lo cual extiende la edad de la población de 30 a 40 años, con resultados muy diferentes. Además, ningún estudio correlaciona el tamaño folicular con los días de estimulación para alcanzar la maduración, y esto se podría correlacionar con la edad de la mujer y la tasa de ovocitos MII recuperados.

Los defectos intrínsecos de la técnica de ecografía (158) que pueden contribuir son la falta de estandarización de la medida ecográfica

entre miembros de un equipo o el uso de diferentes ecógrafos y configuraciones. La monitorización manual mediante ecografía 2D del crecimiento folicular tiene limitaciones importantes cuando muchos folículos crecen simultáneamente en cada ovario, pues se asume que el objeto tiene forma regular y subroga la estimación del tamaño real a la medición de dos ejes, esto es un inconveniente para los folículos con formas irregulares. Además, se sabe que la medida del volumen ovárico y el RFA pierden precisión en presencia de alteraciones anatómicas como endometriomas y quistes como el cuerpo lúteo. Además, realizar las medidas lleva tiempo, conduciendo a realizarlas más rápidamente y con menos precisión para no alargar la espera de las pacientes. El resultado final es que la variación intra e interobservador se ha estimado alrededor del 20% cuando están presentes varios folículos.

Se puede realizar la medición mediante 3D, pero ninguno de los estudios realizados se diseñó para que la 3D pudiera mejorar el éxito del FIV, de hecho en estos estudios, la administración de la hCG se realiza como siempre (en relación al tamaño medio del diámetro del folículo mayor) y no atendiendo al volumen medido mediante 3D (158). El único resultado que compara los resultados entre mujeres monitorizadas con 2D y SonoAVC mostró un número similar de ovocitos recogidos y tasas de fertilización y gestación (158). Mercé y cols (246) estudiaron el número de folículos detectando que era predictor independiente del número de ovocitos maduros y fertilizados y el número de embriones. El número de embriones de grado 1 depende del número de folículos y de VI.

Jayaprakasan y cols (249) mediante 3D estudia distintos niveles de recuento de folículos antrales para predecir la tasa de niño nacido vivo y el riesgo de baja respuesta o hiperestimulación en FIV. Aunque la edad y el RFA se correlacionan con tasa de niño nacido vivo, el RFA tiene una correlación más fuerte.

Se objetivan conflictos (158), así cuando se valoraba la vascularización y algunos autores relacionaban el resultado de FIV y los parámetros Power Doppler, se sugería que era necesario estandarizar la técnica e integrarla con la 2D antes de introducirla en la práctica clínica. De forma similar, aun se necesita realizar nuevos estudios en la medición del volumen folicular mediante 3D antes de constituirlo como nuevo criterio para administrar hCG.

Se observa relación entre el resultado del ciclo de FIV y el porcentaje de folículos antrales que responden a la administración de FSH (Follicular Output RaTe) alcanzando maduración preovulatoria, lo que sugiere que FORT (Follicular Output RaTe) puede ser un reflejo cuantitativo de la competencia folicular ovárica (248)

El estudio de Zhang y cols (244) valora FORT como indicador pronóstico de la competencia reproductiva en FIV. Se definieron los valores de los grupos de FORT bajo, medio y altos (244).

En pacientes que no eran PCOS, el número de embriones transferidos, tasa de embriones de buena calidad, tasa de implantación y de embarazo aumentaban progresivamente con FORT. En pacientes con PCOS, FORT fue significativamente más bajo en las pacientes que consiguieron gestación y la tasa de fertilización y embriones de buena calidad conseguidos fue significativamente más elevada en las pacientes con FORT medio. FORT medio en las pacientes con PCOS y alto en pacientes sin PCOS puede predecir mejores resultados en FIV.

Ben-Haroush y cols (206) correlaciona el RFA el número de ovocitos conseguidos, el número de embriones de buena calidad y el número de embriones congelados. De forma marginal se correlaciona con el número de ovocitos inmaduros aspirados.

2.2.3 Volumen ovárico relativo para cada folículo (V/F)

El volumen ovárico por folículo (V/F) es un predictor de la competencia ovocitaria tanto en fase inicial como el día de la administración de la hCG y el día de la captación ovocitaria. Estos hallazgos coinciden con Mercé y cols (246). Estos autores (246) estudiaron el volumen folicular y encontraron que era más elevado en las gestantes y era uno de los predictores independientes del número de ovocitos conseguidos, maduros y fertilizados y el número de embriones

Yavas y cols (250) presenta un modelo matemático que describe la relación entre el diámetro folicular 2D, el volumen folicular 3D, y el área de la superficie folicular mediante 3D para el crecimiento y la maduración folicular tridimensional. El aumento gradual de estradiol (maduración folicular) se correlaciona con el incremento gradual del área de la superficie del folículo.

3. Estudio de parámetros ováricos como predictores de la implantación y resultado de la gestación precoz.

3.1 Parámetros vasculares ováricos predictores de implantación.

3.1.1 Velocimetría de la arteria útero-ovárica

Giugliano y cols (161) valoraron en el segundo día del ciclo menstrual el Doppler de ambas arterias ováricas, comparando gestantes y no gestantes. Encontraron que la velocimetría ovárica era igual entre los dos grupos. Entre los parámetros para predecir gestación se encuentra el IR-UO (con baja especificidad, 53%, para considerarlo cribado), por lo que el Doppler de las arterias ováricas no añade información significativa. Lo cual coincide con nuestros resultados.

El IP e IR medio de arterias ováricas antes de la transferencia fueron similares aunque el grupo gestante mostró IP e IR más bajo que en

las no gestantes 5-6 días después de la transferencia, al igual que nuestros resultados (251).

3.1.2 Planimetría color ovárica

Jadaon y cols (151) no observa diferencia en el flujo estromal estudiado al inicio del ciclo entre las pacientes que consiguen o no gestación. Chien y cols (251) objetivaron una VPS elevada de vasos intraováricos en las gestantes 5-6 días después del transfer, lo cual está en la línea de nuestros resultados donde el porcentaje de color ovárico aumenta en la fase lútea y se mantiene elevado catorce días postpunción en los ciclos con gestación.

Jadaon y cols (151) encuentran correlación entre los índices vasculares estromales basales y la FSH, pero no con la edad.

Mediante 3D en fase inicia, Jayaprakasan y cols (154) ponen en duda su capacidad para predecir la concepción en un programa de FIV.

Mercé y cols (246) determina que los índices 3DPD ováricos, fueron más elevados en las gestantes. Sin embargo, el número de embriones de grado 1 depende del número de folículos y de VI. El FI ovárico y el número de embriones transferidos grado 1 pueden predecir la gestación en el 76% de las FIV. Un FI bajo y la no transferencia de embriones grado 1 se asocia no gestación.

3.2 Parámetros no vasculares ováricos predictores de implantación.

3.2.1 Volumetría ovárica

No encontramos diferencias en el volumen ovárico (VOM). Por el contrario, Giugliano y cols (161) encuentran que los mejores parámetros para predecir gestación son el volumen ovárico medio y el recuento de folículos antrales. Es de la misma opinión Jayaprakasan K y cols (154), encuentran que las tasas de gestación clínica y de gestación evolutiva fueron significativamente menores en las bajas respondedoras ($p < 0,001$).

El tamaño folicular y el volumen del líquido folicular fueron dos de los cuatro parámetros que resultaban predictivos de gestación (158).

Mercé y cols (246) determina que el volumen ovárico fue más elevado en gestantes.

4. Estudio de parámetros uterinos como predictores de la implantación y resultado de la gestación precoz.

4.1 Parámetros vasculares uterinos predictores de implantación.

4.1.1 Velocimetría de la arteria uterina

Con un útero normal, el final es la valoración de la receptividad endometrial, para lo que aún se están desarrollando tests. Se han propuesto distintos parámetros ecográficos para valorar la receptividad endometrial, incluyendo las arterias uterinas (253) que a menudo se correlacionan con diferentes resultados y esta heterogenicidad debilita sustancialmente la validez de las conclusiones obtenidas (187).

Isaksson y cols (254) demostraron que el IP e IR de la arteria uterina el día de la transferencia no tenía relación con el riesgo de aborto o embarazo ectópico. Ng y cols (255) confirmaron estos hallazgos, no hubo diferencias entre IP e IR de uterinas. Ng y cols en otro estudio (256) relacionan la ausencia de diferencia con el hecho que el flujo de la arteria uterina no es un reflejo del flujo subendometrial durante ciclos naturales y estimulados. Sin embargo, Habara y cols (257) encuentran que el flujo uterino fue más elevado en no gestantes y Nakatsuka y col (258) en gestantes con aborto de repetición.

Hoozemans y cols (163) encuentran que el IP-UT no es un marcador del fallo de implantación (baja sensibilidad y especificidad) siendo similar en pacientes con embarazo, aborto o no embarazo, pero sí mostró una relación entre embarazo y algunas características de la

paciente y el ciclo. No había diferencias entre los grupos excepto en la calidad de los embriones transferidos.

Kupesic y Kurjak (102) y Bourne y cols. (110) han comprobado que el flujo sanguíneo de las arterias uterinas (102,110), radiales (102,110) subendometriales (110) y espirales (102) aumenta durante el periodo periovulatorio desde el pico de LH (110). Esta mejora no se produce en los ciclos inducidos, por lo que se podría deducir que la receptividad uterina en los ciclos ovulatorios espontáneos es mejor que en los inducidos (102). Nosotros, al ser ciclos inducidos, objetivamos la misma observación.

Wakeman y cols (160) monitorizan durante la fase folicular en ciclo natural y en ciclo con 100 mg de clomifeno. En la fase folicular tardía del ciclo natural con gestación se producía un incremento de la VPS de la arteria uterina comparado con las no gestantes. Opina que el flujo de la arteria uterina es probablemente un factor influyente en la receptividad uterina y el lugar para su medida en tratamiento de infertilidad aún no está claro. En nuestro trabajo no hemos valorado la fase folicular. En los ciclos de clomifeno no hubo ninguna diferencia.

Coulam y cols (34), mostró una reducción en IP-UT en los ciclos gestantes en el día de la ovulación, este mismo hecho se produce en nuestro trabajo. En el día 12 no se produjeron diferencias en el IP-UT.

Ivanovski y cols (165) estudiaron IP, IR y VPS de la arteria uterina el día de la administración de la HCG para valorar la capacidad de predicción de gestación. Los valores de IP e IR-UT fueron significativamente inferiores en el grupo de gestantes. En nuestro estudio tenemos el hallazgo inverso. El VPS de ambas arterias fue más elevado en las gestantes pero no alcanzó significación. La receptividad uterina óptima puede acompañarse por una reducción

de la resistencia vascular y un aumento del flujo sanguíneo que mejoraría el éxito para la gestación.

Kim y cols (166) estudia IP-UT, IR-UT, el día de la transferencia. Los grupos no se diferenciaban por parámetros vasculares de la arteria uterina.

Battaglia y cols (252) miden, en un grupo de normorrespondedoras, el valor medio de las arterias uterinas en el día 3 del ciclo anterior a la FIV, en la supresión, el día 8 de estimulación y el día de la punción. Se dividieron los grupos en función al IP-UT el día de la supresión en normal (≤ 2.5 ; Grupo I) y elevado ($IP > 2.5$; Grupo II). El valor más bajo de IP-UT se observó en el grupo I el día 8 y el día de la punción. La tasa de gestación por ciclo y por transfer fue significativamente más alta en las pacientes con menor IP en el día de la supresión. El IP de la arteria uterina se correlacionaba de forma inversa con el índice de sincronización del ovario y la tasa de embarazo. El IP-UT supone una medida indirecta de la receptividad endometrial. Se ha observado IP-UT más bajo en gestantes los días de administración de hCG, el día de la punción o antes de la transferencia. Estos datos no concuerdan con los nuestros, nuestras gestantes tenían valores más elevados el día de la administración de la hCG y el día de la punción. Las pacientes con IP-UT elevado el día de la supresión presentan peor respuesta, tasa de cancelación elevada y tasa de gestación baja. El IP e IR medio de arterias uterinas antes de la transferencia era significativamente más bajo en las gestantes lo que concuerda con nuestra gráfica de resultados. Estas diferencias no se encontraron 5-6 días después de la transferencia. La valoración de la arteria uterina puede ayudar a determinar la ventana de implantación (251).

Un índice de pulsatilidad elevado de las arterias uterinas se asocia con baja tasa de implantación y embarazo y una adecuada

velocimetría Doppler de las arterias uterinas es débilmente específico para predecir gestación (164).

Hay alguna correlación entre los resultados de Doppler de las arterias uterinas y los resultados 3DPD (167), pero no son tan fuertes como podrían haber sido, quizás sugiriendo que hay otros factores además del flujo de la arteria uterina que afectan el flujo endometrial.

Raine-Fenning y cols (253) en un artículo de revisión en relación a la velocidad de flujo sanguíneo o la impedancia al flujo de la arteria uterina opina que el consenso es que hay un aumento gradual y continuo de la velocidad de flujo sanguíneo en asociación con una disminución de la resistencia al flujo desde la fase folicular precoz y máxima en la implantación.

En resumen, la valoración del flujo uterino para predecir gestación es incierto. A pesar de ser reproducible y comparable, la valoración depende mucho del ecografista, la experiencia y la realización. Además los estudios incluyen poco pacientes, protocolos de estimulación distintos, diferentes grupos de estudio y diseño aumentando su heterogenicidad. La valoración del flujo uterino no se considera como de ayuda clínica o relevante debido a la falta de valor predictivo para el embarazo. Se han probado algunos tratamientos para mejorar el flujo de las arterias uterinas en pacientes con baja vascularización con resultados variables tanto a nivel de arterias uterinas como de las endometriales.

4.1.2 Velocimetría de las arterias endometriales

Los ciclos con gestación clínica presentan un IP intramiometrial (IP-IMI) menor con respecto a los ciclos sin gestación o gestación bioquímica.

Los parámetros ecográficos del endometrio y la evaluación del flujo uterino y endometrial se han considerado como marcadores de implantación en FIV y transferencia embrionaria. Sin embargo,

cuando se aplican como predictores, sus resultados son controvertidos. La receptividad uterina mejora cuando el flujo aumenta bajo terapia hormonal.

Un buen flujo endometrial el día del transfer podría asociarse con mayor tasa de embarazo porque es indicativo de receptividad endometrial.

El flujo endometrial refleja apropiadamente la receptividad endometrial porque el endometrio es el sitio donde tiene lugar la implantación. La ausencia de mapa color a nivel endometrial y subendometrial se relaciona con un descenso significativo de la tasa de implantación, mientras que la tasa de gestación aumenta cuando los vasos alcanzan el halo subendometrial y el endometrio.

Coulam y cols (34) en el día 12 no se produjeron diferencias en el IP-SE.

Riad y cols (162) estudiaron mediante Doppler el flujo endometrial en fase folicular avanzada (desde el día 9 hasta la administración de hCG) en ciclos de IUI. Los IR-SE fueron significativamente inferiores en caso de implantación, al igual que en nuestro estudio.

Ivanovski y cols (165) estudiaron IP, IR y VPS de la arteria arcuata el día de la administración de la hCG para valorar la capacidad de predicción de gestación. El IP de la arteria arcuata fue más bajo en las gestantes pero no alcanzó significación. La receptividad uterina óptima puede acompañarse por una reducción de la resistencia vascular y un aumento del flujo sanguíneo que mejoraría el éxito para la gestación.

Galliano y cols (187) valoraron la vascularización endometrial en los mismos tiempos del ciclo de FIV que la arteria uterina con datos contradictorios. Wang y cols (259) describieron un IP e IR y S/D más bajo de las arterias espirales 8 horas antes de administrar hCG en las gestantes comparadas con no gestantes o aborto bioquímico.

Se considera que existe un periodo de hipoxia e isquemia endometrial relativa asociada a la caída periovulatoria del estradiol, siendo el factor más determinante de la receptividad endometrial. Esta caída se puede detectar mediante 3DPD. El descenso de la concentración de oxígeno está presente en el blastocisto y la implantación y se relacionan con la expresión de VEGF (mitógeno endotelial célula-específico que aumenta con la hipoxia) (260). El IR de las arterias radiales está significativamente más elevado y el VEGF más disminuido en las pacientes con endometrio adelgazado. La impedancia elevada de las arterias radiales puede ser un desencadenante y menosacaba el crecimiento del epitelio glandular produciendo un descenso del nivel de VEGF en el endometrio. Un VEGF bajo produce un desarrollo vascular pobre, lo que disminuye el flujo en el endometrio. Este círculo vicioso conduce a un endometrio fino que disminuye la receptividad endometrial.

Vignal y cols (167) estudiaron el VFI endometrial en ciclos estimulados para IUI y comparar entre gestantes y no gestantes, mediante 3DPD (angiografía) en fase preovulatorio. Es más frecuente el descenso del VFI que el incremento y parece asociarse con mayor tasa de embarazo en ciclos con pico espontáneo de LH. Las mujeres con ciclo natural tienen un flujo endometrial mayor que el de los ciclos estimulados. Estudios recientes mediante eco 3D se demuestra un pico en las medidas de la vascularización endometrial y subendometrial 3 días antes de la ovulación en ciclos naturales (160).

Nandi y cols (168) estudian si los índices 3DPD a nivel endometrial y subendometrial de ciclos de transferencia con embriones congelados preparados artificialmente con dosis crecientes de estrógenos. Observaron el grado de cambio de la vascularización endometrial y subendometrial desde la fase folicular tardía hasta la fase lútea precoz y valorar su importancia para determinar la

receptividad endometrial. Encontraron cambios en los parámetros durante el seguimiento, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre gestantes o no. La angiografía 3DPD no es una herramienta suficientemente sensible como para predecir el resultado en transferencia de congelados.

Los estudios previos de Ng y cols, se realizaron en ciclos naturales de transferencia de embriones congelados. Ng y cols (269) siguen sin demostrar cambios comparando el último día de maduración folicular con el día de la transferencia. El grupo de Nandi y cols (168) y el trabajo de Raine-Fenning y cols (263) en ciclo natural no demostraron diferencias.

Este trabajo tiene sus limitaciones: tamaño de la muestra, no tuvo en cuenta la calidad embrionaria y no se examinaron las diferencias intra-interobservador por haberse confirmado en estudios previos.

3DPD tiene varias limitaciones metodológicas que deben ser consideradas y, en ausencia de una técnica estandarizada, la comparación de cambios individual o en grupo es más robusto científicamente que en un solo punto. Además, el método sufre interferencia por los ajustes de la máquina, la atenuación y la pulsatilidad arterial lo que produce que tenga una realización insuficiente. Se deben investigar nuevos métodos que carezcan de estas limitaciones.

Mercé et al.(164) encontró índices 3DPD más elevados en las gestantes. Los índices fueron mejores a nivel endometrial y subendometrial el día de administración de la hCG cuando se transfería uno o ningún embrión de grado 1. Si se transferían más de uno de buena calidad los índices fueron peores por lo que sólo servían en casos de baja calidad.

Kupesic (135) y Wu (264) demostraron que los índices de vascularización subendometrial eran factores predictivos de gestación el día de la transferencia y el día de la administración de la

hCG (135). Sin embargo, Järvelä (265) y Ng (262) no probaron que los índices 3D fueran buenos predictores de embarazo tras la estimulación con FSH o el día de la punción. En ciclos espontáneos, encontraron que los flujos endometriales y subendometriales experimentaban un pico 3 días antes de la ovulación y alcanzaban el punto más bajo 5 días después de la ovulación. De acuerdo con estos hallazgos, se sugirió que sería preferible evaluar los cambios del flujo endometrial y subendometrial de forma longitudinal en la fase folicular tardía y en la lútea precoz. La contradicción entre los resultados previos publicados y los resultados del estudio de Mercé y cols (164) pueden explicarse por muchas diferencias metodológicas, especialmente en el momento del ciclo donde se realizan las determinaciones y los parámetros VOCAL. También se puede aducir otros factores, incluyendo las diferencias de la población de estudio así como los protocolos de estimulación y transferencia embrionaria.

De forma similar, la ausencia de señal color sub o intraendometrial el día de la transferencia (267) y la reducción de la vascularización en la fase folicular media y tardía independiente de la concentración de estradiol y progesterona (263) se ha relacionado con reducción de la tasa de gestación. Ng y cols usaron 3DPD el día de la punción en ciclo estimulado (262, 255) o en transferencia de embriones congelados (255, 268) para predecir gestación (262) o feto vivo/aborto (255). Algunos índices se relacionaron más con resultados favorables, pero su valor predictivo era pobre.

Kim y cols (166) estudia los índices 3DPD en la región endometrial y subendometrial el día de la transferencia en ciclos en fresco. Concluye que la ecografía 3D es un método útil y efectivo para medir flujo endometrial en FIV. Las gestantes tenían índices 3DPD endometriales mayores, sin embargo estos parámetros a nivel subendometrial no observaron diferencias significativas entre

grupos. Ng y cols (255) muestran que el VI endometrial es el único factor predictivo.

4.1.3 Planimetría endometrial

Aunque el porcentaje de color endometrial (SExColor) no presenta diferencias significativas entre los grupos de nuestro estudio, observamos coincidiendo con otros autores que las gestantes tienen un flujo mayor endometrial y subendometrial que las que finalizan en aborto (255). Las pacientes con vascularización ausente endometrial y subendometrial tienen una reducción en la tasa de embarazo respecto a las que lo tienen presente (270), sin embargo, no es indicativo de endometrio no receptivo como sugiere Zaidi (28). Estas gestaciones terminan con más frecuencia en aborto espontáneo. Estos datos hacen pensar que el desarrollo de los vasos endometriales puede jugar un papale en mantener el embarazo en los estadios precoces.

La angiogénesis juega un papel en varios procesos reproductivos, como el desarrollo del folículo dominante, la formación del cuerpo lúteo, el crecimiento del endometrio, la implantación y el desarrollo de la placenta. Es posible que el flujo sanguíneo hacia el endometrio preimplantatorio tenga efectos sobre el aborto o gestación en un tratamiento de reproducción asistida. La información es pequeña en la literatura sobre el impacto de la vascularización en la pérdida gestacional que sigue a una FIV o transferencia de embriones congelados.

A pesar que encontraron diferencias significativas en la vascularización endometrial entre ciclos naturales y estimulados, se han encontrado diferencias significativas entre abortos y embarazos en transferencia de congelados (261).

Ng y cols (262) mostró, contradictoriamente, que la vascularización endometrial era menor en las embarazadas que en las no embarazadas. Demuestra mediante 3DPD una vascularización

endometrial menor en el grupo de gestantes en ciclos de FIV, sin embargo la vascularización endometrial y subendometrial es similar en ambos grupos en transferencia de embriones congelados.

Raine Fenning y cols (263) mediante 3DPD mostró que la vascularización endometrial y subendometrial aumentaba durante la fase proliferativa alcanzando un pico tres días antes de la ovulación para después disminuir hasta 5 días postovulación, este descenso se objetiva en nuestro estudio. Así hay un periodo de reducción relativa de la perfusión en el periodo postovulatorio durante el periodo de implantación en los ciclos espontáneos. Se propone que el grado de cambio desde la fase folicular tardía hacia la fase lútea temprana es el determinante más importante de la receptividad endometrial. Entonces, un flujo bueno hacia el endometrio en la fase folicular tardía, podría tener un papel en el subsiguiente embarazo o aborto mientras que un grado de cambio en la perfusión endometrial desde la fase folicular tardía hasta la fase lútea temprana es el determinante más importante de implantación. Por ello, se necesita realizar ecografías en distintos momentos y más estudios para predecir embarazo.

Kurjac (135) y Wu y cols (264) mediante 3DPD observaban que la vascularización endometrial era significativamente más elevada en las gestantes. Nuestros resultados muestran la misma tendencia.

VIII. CONCLUSIONES

1. El flujo intraovárico y la superficie de color ovárico medios, mediante el uso de índices, se correlacionan con la respuesta ovárica de forma precoz así como con el número de ovocitos maduros. Igualmente, estos parámetros se correlacionan para el ovario inactivo.
2. El flujo útero-ovárico se correlaciona con la respuesta ovárica y número de ovocitos maduros de forma tardía.
3. El flujo perifolicular y la superficie de color perifolicular no se correlacionan con la respuesta ovárica. El flujo perifolicular tampoco se correlaciona con la competencia ovocitaria valorada el día de la punción.
4. La edad y la FSH se relaciona con la respuesta ovárica pero no con el número de ovocitos maduros. El estradiol se correlaciona con la respuesta y en número de ovocitos maduros desde el inicio del ciclo.
5. El volumen ovárico se correlaciona con la respuesta ovárica y ovocitos maduros desde la fase folicular media.
6. El recuento de folículos antrales es el predictor más precoz de la respuesta ovárica y del número de ovocitos recuperados, pero no se correlaciona con la competencia ovocitaria.
7. El flujo útero-ovárico no se correlaciona con la tasa de fertilización, pero cuando se estima en el día de la supresión hipofisaria sí se correlaciona con tasa de división y estimado el día de la administración de la hCG y el día de la punción se correlaciona con la tasa de implantación.
8. La superficie de color ovárica el día de la administración de la hCG se correlaciona con la tasa de implantación.
9. La superficie de color perifolicular valorada el día de la supresión se correlaciona con la tasa de división y valorada el día de la administración de la hCG con la tasa de implantación.
10. El volumen ovárico el día de la administración de la hCG se correlaciona con la tasa de implantación y no con la competencia ovocitaria.

11. La ratio volumen ovárico/ folículo se correlaciona con la tasa de división el día de la supresión hipofisaria.
12. El flujo útero-ovárico y el volumen ovárico no son predictores del resultado de la gestación.
13. La superficie de color ovárica durante la fase lútea tardía es significativamente más alta en aquellas pacientes que consiguen gestación.
14. Ninguno de los parámetros uterinos estudiados son predictores del resultado de la gestación.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Ménézo Y, Renard J-P. La vie de l'oeuf avant l'implantation. En: Thibault C, Levasseur MC, eds. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Paris: INRA-Ellipses, 1991; 339-357.
2. Czyba JC, Montella A. Les deux premières semaines du développement embryonnaire. En: Czyba JC, Montella A, eds. Biologie de la reproduction humaine. Montpellier: Sauramps medical, 1993; 217-228.
3. Buster JE, Bustillo M, Rodi IA, Cohen SW, Hamilton M, Simon JA et al. Biologic and morphologic development of donated human ova recovered by nonsurgical uterine lavage. Am J Obstet Gynecol 1985; 153: 211-217.
4. Guillomot M, Fléchon J-E, Leroy F. Développement et implantation du blastocyste. En: Thibault C, Levasseur MC, eds. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Paris: INRA-Ellipses, 1991; 377-401.
5. Weitlauf HM. Biology of implantation. In: Knobil E, Neill JD, eds. The Physiology of Reproduction, second edition. New York: Raven Press, 1994; 391-440.
6. Simón C, Portolés E, Mercader A, Frances A, Remohi J. Implantación embrionaria. En: Remohi J, Simón C, Pellicer A, Bonilla-Musoles F, eds. Reproducción humana. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana, 1996; 70-76.
7. Bergh PA, Navot D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. Fertil Steril 1992; 58: 537-542.
8. Martel D, Malet C, Gautrey JP, Psychoyos A. Surface changes of the luminal uterine epithelium during the human menstrual cycle. In: de Brux J, Mortel R, Gautrey JP, eds. The Endometrium: Hormonal impacts. New York: Plenum Press, 1981; 15.
9. Psychoyos A, Nikas G. Uterine pinopodes as markers of uterine receptivity. Assist Reprod Rev 1994; 4: 26-32.

10. Nikas G, Drakakis P, Loutradis D, Mara-Skoufari C, Koumantakis E, Michalas S et al. Uterine pinopodes as markers of the “nidation window” in cycling women receiving exogenous oestradiol and progesterone. Hum Reprod 1995; 10: 1208-1213.
11. Psychoyos A, Martel D. Embryo-endometrial interactions at implantation. In: Edwards RG, Purdy JM, Steptoe PC, eds. Implantation of the human embryo. London: Academic Press, 1985; 197-219.
12. Hertig AT, Rock J, Adams EC. A description of 34 human ova within the first 17 days of development. Am J Anat 1956; 98: 435-493.
13. Hertig AT, Rock J, Adams EC, Menkin MC. Thirty-four fertilised human ova, good, bad and indifferent, recovered from 210 women of known fertility. A study of biologic wastage in early pregnancy. Pediatrics 1959; 23: 202-211.
14. Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE et al. Incidence of early loss of pregnancy. New Engl J Med 1988; 319: 189-194.
15. Ellish NJ, Saboda K, O'Connor J, Nasca PC, Stanek EJ, Boyle C. A prospective study of early pregnancy loss. Hum Reprod 1996; 11: 406-412.
16. Paulson RJ, Sauer MV, Lobo RA. Factors affecting embryo implantation after human *in vitro* fertilization: a hypothesis. Am J Obstet Gynecol 1990; 163: 2020-2023.
17. Rogers PA, Milne BJ, Trounson AO. A model to show human uterine receptivity and embryo viability following ovarian stimulation for *in vitro* fertilization. J In Vitro Fert Embryo Transf 1986; 3: 91-98.
18. Goswamy RK, Williams G, Steptoe PC. Decreased uterine perfusion-a cause of infertility. Hum Reprod 1988; 8: 955-959.
19. Sterzik K, Grab D, Sasse V, Hütter W, Rosenbusch B, Terinde R. Doppler sonographic findings and their correlation with implantation in an *in vitro* fertilization program. Fertil Steril 1989; 52: 825-828.

20. Strohmer H, Herczeg C, Plöckinger B, Kemeter P, Feichtinger W. Prognostic appraisal of success and failure in an *in vitro* fertilization program by transvaginal Doppler ultrasound at the time of ovulation induction. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1991; 1: 272-274.
21. Steer CV, Campbell S, Tan SL, Crayford T, Mills C, Mason BA, Collins WP. The use of transvaginal color flow imaging after *in vitro* fertilization to identify optimum uterine conditions before embryo transfer. *Fertil Steril* 1992; 57: 372-376.
22. Serafini P, Batzofin J, Nelson J, Olive D. Sonographic uterine predictors of pregnancy in women undergoing ovulation induction for assisted reproductive treatments. *Fertil Steril* 1994; 62: 815-822.
23. Wada I, Chin Hsu C, Williams G, Macnamee MC, Brinsden PR. The benefits of low-dose aspirin therapy in women with impaired uterine perfusion during assisted conception. *Hum Reprod* 1994; 9: 1954-1957.
24. Steer CV, Tan SL, Dillon D, Mason BA, Campbell S. Vaginal color Doppler assessment of uterine artery impedance correlates with immunohistochemical markers of endometrial receptivity required for the implantation of an embryo. *Fertil Steril* 1995; 63: 101-108.
25. Serafini P, Nelson J, Batzofin J, Olive D. Preovulatory Sonographic Uterine Receptivity Index (SURI): Usefulness as an indicator of pregnancy in women undergoing assisted reproductive treatments. *J Ultrasound Med* 1995; 14: 751-755.
26. Coulam CB, Stern JJ, Soenksen DM, Britten S, Bustillo M. Comparison of pulsatility indexes on the day of oocyte retrieval and embryo transfer. *Hum Reprod* 1995; 10: 82-84.
27. Bustillo M, Krysa LW, Coulam CB. Uterine receptivity in an oocyte donation programme. *Hum Reprod* 1995; 10: 442-445.
28. Zaidi J, Campbell S, Pittrof R, Tan SL. Endometrial thickness, morphology, vascular penetration and velocimetry in predicting implantation in an *in vitro* fertilization program. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1995; 6: 191-198.

29. Zaidi J, Pittrof R, Shaker A, Kyei-Mensah A, Campbell S, Tan SL. Assessment of uterine artery blood flow on the day of human chorionic gonadotropin administration by transvaginal color Doppler ultrasound in an *in vitro* fertilization program. Fertil Steril 1996; 65: 377-381.
30. Tsai Y-C, Chang J-C, Tai M-J, Kung F-T, Yang L-C, Chang S-Y. Relationship of uterine perfusion to outcome of intrauterine insemination. J Ultrasound Med 1996; 15: 633-636.
31. Battaglia C, Artini PG, Giulini S, Salvatori M, Maxia N, Petraglia F et al. Colour Doppler changes and thromboxane production after ovarian stimulation with gonadotrophin-releasing hormone agonist. Hum Reprod 1997; 11: 2477-2482.
32. 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; 13: 1669-1673.
33. Favre R, Bettahar K, Grange G, Ohl J, Arbogast E, Moreau L, Dellenbach P. Predictive value of transvaginal uterine Doppler assessment in an *in vitro* fertilization program. Ultrasound Obstet Gynecol 1993; 3: 350-353.
34. Coulam CB, Bustillo M, Soenksen DM, Britten S. Ultrasonographic predictors of implantation after assisted reproduction. Fertil Steril 1994; 62: 1004-1010.
35. Tekay A, Martikainen H, Jouppila P. Blood flow changes in uterine and ovarian vasculature, and predictive value of transvaginal pulsed colour Doppler ultrasonography in an *in-vitro* fertilization programme. Hum Reprod 1995; 10: 688-693.
36. Bassil S, Magritte JP, Roth J, Nisolle M, Donnez J, Gordts S. Uterine vascularity during stimulation and its correlation with implantation in *in-vitro* fertilization. Hum Reprod 1995; 10: 1497-1501.
37. Tekay A, Martikainen H, Jouppila P. Comparison of uterine blood flow characteristics between spontaneous and stimulated cycles before embryo transfer. Hum Reprod 1996; 11: 364-368.

38. Schwartz LB, Chiu AS, Courtney M, Krey L, Schmidt-Sarosi C. The embryo versus endometrium controversy revisited as it relates to predicting pregnancy outcome in in-vitro fertilization-embryo transfer cycles. Hum Reprod 1997; 12: 45-50.
39. Aytoz A, Ubaldi F, Tournaye H, Nagy ZP, Van Steirteghem A, Devroey P. The predictive value of uterine artery blood flow measurements for uterine receptivity in an intracytoplasmic sperm injection program. Fertil Steril 1997; 68: 935-937.
40. Bloechle M, Schreiner Th, Küchler J, Schürenkämper P, Lisse K. Colour Doppler assessment of ascendent uterine artery perfusion in an *in-vitro* fertilization-embryo transfer programme after pituitary desensitization and ovarian stimulation with human recombinant follicle stimulating hormone. Hum Reprod 1997; 12: 1772-1777.
41. Deichert U, Albrand-Thielman C, van de Sandt M. Doppler-sonographic pelvic blood flow measurements and their prognostic value in terms of luteal phase and implantation. Hum Reprod 1996; 11: 1591-1593.
42. Tekay A, Martikainen H, Jouppila P. The clinical value of transvaginal colour Doppler ultrasound in assisted reproductive technology procedures. Hum Reprod 1996; 11: 1589-1591.
43. Brown JM, Schwartz LB, Olive D, Lange R, Laufer N, Taylor KJW. Evaluation of Doppler ultrasonography as a means of monitoring *in vitro* fertilization and embryo transfer cycles: Preliminary results and findings. J Ultrasound Med 1997; 16: 411-416.
44. Friedler S, Schenker JG, Herman A, Lewin A. The role of ultrasonography in the evaluation of endometrial receptivity following assisted reproductive treatments: a critical review. Hum Reprod Update 1996; 4: 323-335.
45. 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 (2): 10.

46. Mercé LT, Moreno C, Bau S. Assessment of luteal and peri-implantation blood flow with color Doppler in A.I.H. In: Abstract Book of ESHRE Symposium on Reproductive Medicine. Valencia, 9-11 March, 1995; 12.
47. Mercé LT, Kupesic S. Normal and abnormal corpus luteum function. In: Kupesic S, de Ziegler D, eds. Ultrasound and Infertility. Lancs: The Parthenon Publishing Group, 1998 (in press).
48. Applebaum M. The uterine biophysical profile. Ultrasound Obstet Gynecol 1995; 5: 67-68.
49. Zaidi J, Barber J, Kyei-Mensah A, Bekir J, Campbell S, Tan SL. Relationship of ovarian stromal blood flow at the baseline ultrasound scan to subsequent follicular response in an *in vitro* fertilization program. Obstet Gynecol 1996; 88: 779-784.
50. Bassil S, Wyns C, Toussaint-Demyille D, Nisolle M, Gordts S, Donnez J. The relationship between ovarian vascularity and the duration of stimulation in an in-vitro fertilization. Hum Reprod 1997; 12: 1240-1245.
51. Moohan JM, Curcio K, Leoni M, Healy D, Hurley V. Low intraovarian vascular resistance: a marker for severe ovarian hyperstimulation syndrome. Fertil Steril 1997; 67: 728-732.
52. Dubey AK, Wang HA, Duffy P, Penzias AS. The correlation between follicular measurements, oocyte morphology, and fertilization rates in an *in vitro* fertilization program. Fertil Steril 1995; 64: 787-790.
53. Bergh C, Broden H, Lundin K, Hamberger L. Comparison of fertilization, cleavage and pregnancy rates of oocytes from large and small follicles. Hum Reprod 1998; 13: 1912-1915.
54. Wittmaack FM, Kreger DO, Blasco L, Tureck RW, Mastroianni L, Lessey BA. Effect of follicular size on oocyte retrieval, fertilization, cleavage, and embryo quality in *in vitro* fertilization cycles: a 6-year data collection. Fertil Steril 1994; 62: 1205-1210.
55. Salha O, Nugent D, Dada T, Kaufmann S, Levett S, Jenner L.. The relationship between follicular fluid aspirate volume and oocyte maturity in *in vitro* fertilization cycles. Hum Reprod 1998; 13: 1901-1906.

56. Yding Anderson C. Characteristics of human follicular fluid associated with successful conception after *in vitro* fertilization. J Clin Endocrinol 1993; 77: 1227-1234.
57. Oyesanya OA, Parsons JH, Collins WP, Campbell S. Prediction of oocyte recovery rate by transvaginal ultrasonography and color Doppler imaging before human chorionic gonadotropin administration in *in vitro* fertilization cycles. Fertil Steril 1996; 65: 806-809.
58. Nargund G, Doyle PE, Bourne TH, Parsons JH, Cheng WC, Campbell S. Ultrasound derived indices of follicular blood flow before hCG administration and the prediction of oocyte recovery and preimplantation embryo quality. Hum Reprod 1996; 11: 2512-2517.
59. Chui DKC, Pugh ND, Walker SM, Gregory L, Shaw RW. Follicular vascularity-the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an in-vitro fertilization programme: a preliminary study. Hum Reprod 1997; 12: 191-196.
60. Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. Hum Reprod 1997; 12: 1047-1055.
61. Gauden M. Maternal age effect: the enigma of Down syndrome and other trisomic conditions. Mutua Res 1992; 296: 69-88.
62. Ellinwood WE, Nett TM, Niswender GD. Ovarian vasculature: Structure and function. En: Jones, R.E., ed. The vertebrate ovary: comparative biology and evolution. New York: Plenum Press, 1978; 583-614.
63. Niswender GD, Moore RT, Akbar AM, Nett TM, Diekman MA. Flow of blood to the ovaries of ewes throughout the estrous cycle. Biol Reprod 1975; 13: 381-8.
64. Bruce NW, Moor RM. Ovarian follicular blood flow in the sheep. J. Reprod. Fertil 1975; 43: 392-3.

65. Garris DR, Foreman D. Follicular growth and atresia during the last half of the luteal phase of the guinea pig estrous cycle: Relation to serum progesterone and estradiol levels and utero-ovarian flow. *Endocrinology* 1984; 115: 73-7.
66. Niswender GD, Reiners TJ, Diekmann MA, Nett TM. Blood flow: A mediator of ovarian function. *Biol Reprod* 1976; 64-81.
67. Varga B, Greenwald GS. Cyclic changes in utero-ovarian blood flow and ovarian hormone secretion in the hamster: Effects of adrenocorticotropin, luteinizing hormones and follicle-stimulating hormones. *Endocrinology* 1979; 104: 1525-31.
68. Brown BW, Driancourt MA. Blood flow in the ovaries and ovarian follicle of romanov and prealpes-du-sud ewes. *J. Reprod. Fertil* 1989; 85: 317-42.
69. Carson R, Findlay J, Mattner P, Brown B. Relative levels of thecal blood flow in atretic and non-atretic ovarian follicles of the conscious sheep. *AusJ Exp Biol Med Sci* 1986; 64: 381-8.
70. Bruce NW, Gibbs CP. Ovarian blood flow in conscious and anesthetized pregnant rabbits nearterm and the influence of arterial blood gas tensions. *J Reprod Fertil* 1976; 47: 343-5.
71. Burr JH, Davies JL. The vascular system of the rabbit ovary and its relationship to ovulation. *Anat Rec* 1951; 11: 373-97.
72. Hunter RHF. Porcine ovulation after injection of human chorionic gonadotropin. *Vet Rec* 1967; July: 21-3.
73. Makinoda S. Hemodynamic and histological studies on ovarian blood flow during ovulation. *Hok Igā Zas* 1980; 55: 521-6.
74. Kanzaki H, Okamura H, Okuda Y, Takenaka A, Morimoto Y, Nishimura T. Scanning electron microscopic study of rabbit ovarian follicle microvasculature using resin injection-corrosion casts. *J Anat* 1982; 134: 697-705.

75. Kitai H, Yohimura Y, Wright KH, Santulli R, Wallich EE. Microvasculature of preovulatory follicles comparison of in situ and *in vitro* perfused rabbit ovaries following stimulation of ovulation. Am.J Obstet Gynecol 1985; 152: 889-95.
76. Kanzaki H, Okamura H, Okuda Y, Takenaka A, Morimoto K, Nishimira T. Scanning electron microscopic observations of microcorrosion casts for rabbit ovarian vasculature before ovulatory stimulus. Acta Obstet Gynaecol Jap 1981; 33: 11-8.
77. Blasco L, Wu CH, Flickinger GL, Pearlmutter, Mikhail G. Cardiac output and genital blood flow distribution during the preovulatory period in rabbits. Biol Reprod 1975; 13: 581-6.
78. Murdoch WJ, Nix KJ, Dunn TG. Dynamics of ovarian blood supply to periovulatory follicles of the ewe. Biol Reprod 1983; 28: 1001-6.
79. Sladkevicius P, Valentin L, Marsál K. Blood flow velocity in the uterine and ovarian arteries during the normal menstrual cycle. Ultrasound Obstet Gynecol 1993;3:199-208
80. Brannstrom M, Zackrisson U, Hagstrom H-G, Josefsson B, Hellberg P, Granberg S, et al. Preovulatory changes of blood flow in different regions of the human follicle. Fertil Steril 1998; 69:435-42.
81. Findlay JK. Angiogenesis in reproductive tissues. J Endocr 1986; 111: 357-366.
82. Reynolds LP, Redmer DA. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. J Anim Sci 1998; 76: 1671-1681.
83. Kurjak A, Kupesic S, Breyer B, Sparac V, Jukic S. The assessment of ovarian tumor angiogenesis: what does three-dimensional power Doppler add?. Ultrasound Obstet Gynecol 1998; 12: 136-146.
84. Mercé LT, Bau S. Velocimetría Doppler del ciclo ovárico. En: Bajo Arenas JM, de. Ultrasonografía y reproducción. Barcelona: Prous Science 1996; 37-66.

85. Mercé LT. Folículo luteinizado no roto (LUF syndrome). Progr Diag Pren 1998; 326-336.
86. Mercé LT. Velocimetría Doppler durante el ciclo ovárico normal. En: Mercé LT, ed. Ecografía Doppler en Obstetricia y Ginecología. Madrid: Interamericana-McGraw-Hill, 1993; 113-128.
87. Taylor KJW, Burns PN, Wells PNT, Conway DI, Hull MGR. Ultrasound Doppler flow studies of the ovarian and uterine arteries. Br J Obstet Gynaecol 1985; 92: 240-246.
88. Vrtacnik-Bokal E, Meden-Vrtovec H. Utero-ovarian arterial blood flow and hormonal profile in patients with polycystic ovary syndrome. Hum Reprod 1998; 13: 815-821.
89. Kupesic A, Kurjak A, Stilinovic K. The assessment of female infertility. In: Kurjak A, ed. An Atlas of transvaginal color Doppler. London: The Parthenon Publishing Group Ltd, 1994; 171-197.
90. Zaidi J, Jurkovic D, Campbell S, Collins W, McGregor A, Tan SL. Luteinized unruptured follicle: morphology, endocrine function and blood flow changes during the menstrual cycle. Human Reprod 1995; 10: 44-49.
91. Hata K, Hata T, Senoh D, Makihara K, Aoki S, Takamiya O et al. Change in ovarian arterial compliance during the human menstrual cycle assessed by Doppler ultrasound. Br J Obstet Gynaecol 1990; 97: 163-166.
92. Kurjak A, Kupesis-Urek S, Schulman H, Zalud I. Transvaginal color Doppler in the assessment of ovarian and uterine blood flow in infertile women. Fertil Steril 1991; 56: 870-873.
93. Mercé LT, Garcés D, Barco MJ, de la Fuente F. Intraovarian Doppler velocimetry in ovulatory, dysovulatory and anovulatory cycles. Ultrasound Obstet Gynecol 1992; 2: 197-202.
94. Aguirre J, Bajo J, Rodriguez R. Control ultrasonográfico del ciclo ovárico. Acta Gin 1994; 50: 320-326.
95. Tan SL, Zaidi J, Campbell S, Doyle P, Collins W. Blood flow changes in the ovarian and uterine arteries during the normal menstrual cycle. Am J Obstet Gynecol 1996; 175: 625-631.

96. Mercé LT: Doppler study of ovarian function: New aspects. XX Ian Donald School Course. Granada, September 1997 (Personal communication).
97. Weiner Z, Thaler I, Levron J, Lewit N, Itskovitz-Eldor J. Assessment of ovarian and uterine blood flow by transvaginal color Doppler in ovarian-stimulated women: correlation with the number of follicles and steroid hormone levels. *Fertil Steril* 1993; 59: 743-749.
98. Balakier H, Stronell RG. Color Doppler assessment of folliculogenesis in *in vitro* fertilization patients. *Fertil Steril* 1994; 62: 1211-1216
99. Hackelöer BJ, Fleming R, Robinson HP, Adam AH, Coutts JRT. Correlation of ultrasonic and endocrinologic assessment of human follicular development. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 135: 122-128.
100. Tinkanen H, Kujansuu E, Laippala P. The association between hormone levels and vascular resistance in uterine and ovarian arteries in spontaneous menstrual cycles. A Doppler ultrasound study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1995; 74: 297-301.
101. Mercé LT, Barco MJ. Estudio del flujo sanguíneo del aparato genital femenino durante el ciclo menstrual. *Rev Med Univ Navarra* 1994; 39: 25-32.
102. Kupesic S, Kurjak A. Uterine and ovarian perfusion during the periovulatory period assessed by transvaginal color Doppler. *Fertil Steril* 1993; 60: 439-443.
103. Galera F, Huertas MA, Mayoral M, Rojo JM, Bajo JM. Sonografía vaginal del endometrio en reproducción y su relación con la implantación. Velocimetría Doppler. En: Bajo Arenas JM, de. *Ultrasonografía y reproducción*. Barcelona: Prous Science 1996; 67-93.
104. Kupesic S, Kurjak A, Vujisic S, Petrovic Z. Luteal phase defect: comparison between Doppler velocimetry, histological and hormonal markers. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1997; 9: 105-112.
105. Kurjak A, Kupesic S. Ovarian senescence and its significance on uterine and ovarian perfusion. *Fertil Steril* 1995; 64: 532-537.

106. Dickey RP, Hower JF, Matulich EM, Brown GT. Effect of standing on non-pregnant uterine blood flow. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1994; 4: 480-487.
107. Tinkanen H, Kujansuu E. The reproducibility of the Doppler ultrasound measurement of the uterine artery vascular resistance. *Gynecol Obstet Invest* 1995; 39: 188-191.
108. Steer CV, Williams J, Zaidi J, Campbell S, Tan SL. Intra-observer, interobserver, interultrasound transducer and intercycle variation in colour Doppler assessment of uterine artery impedance. *Hum Reprod* 1995; 10: 479-481.
109. Mercé L, Barco MJ, Laparte C, Baldonado C, de la Fuente F. Velocimetría Doppler de las arterias uterinas durante el ciclo menstrual normal. Libro de Abstracts de la XIII Reunión de la Sección de Ecografía de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, 1990; pp 182.
110. Bourne TH, Hagström HG, Granberg S, Josefsson B, Hahlin M, Hellberg P et al. Ultrasound studies of vascular and morphological changes in the human uterus after a positive self-test for the urinary luteinizing hormone surge. *Hum Reprod* 1996; 11: 369-365.
111. Bourne TH, Jurkovic D, Waterstone J, Campbell S, Collins WP. Intrafollicular blood flow during human ovulation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1991; 1: 53-59.
112. Collins W, Jurkovic D, Bourne T, Kurjak A, Campbell S. Ovarian morphology, endocrine function and intra-follicular blood flow during the peri-ovulatory period. *Human Reprod* 1991; 3: 319-324.
113. Campbell S, Bourne TH, Waterstone J et al. Transvaginal color blood flow imaging of the periovulatory follicle. *Fertil Steril* 1993; 60: 433-438.
114. Brännström M, Zackrisson U, Hagström H-G, Josefsson B, Hellberg P, Granberg S et al. Preovulatory changes of blood flow in different regions of the human follicle. *Fertil Steril* 1998; 69: 435-442.
115. Zaidi J, Collins S, Campbell S, Pittrof R, Tan SL. Blood flow changes in the intraovarian arteries during the periovulatory period: relationship to the time of day. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1996; 7: 135-140.

116. Zaidi J, Jurkovic D, Campbell S, Pittrof R, McGregor A, Tan SL. Description of circadian rhythm in uterine artery blood flow during the peri-ovulatory period. *Hum Reprod* 1995; 10: 1642-1646.
117. Goswamy RK, Steptoe PC. Doppler ultrasound studies of the uterine artery in spontaneous ovarian cycles. *Hum Reprod* 1988; 3: 721-726.
118. Scholtes MCW, Wladimiroff JW, van Rijen HJM, Hop WCJ. Uterine and ovarian flow velocity waveforms in the normal menstrual cycle: a transvaginal study. *Fertil Steril* 1989; 52: 981-985.
119. Steer CV, Campbell S, Pampiglione JS, Kingsland CR; Mason BA, Collins WP. Transvaginal colour flow imaging of the uterine arteries during the ovarian and menstrual cycles. *Hum Reprod* 1990; 5: 391-395.
120. Bourne TH, Hagström H-G, Hahlin M, Josefsson B, Granberg S, Hellberg P. Ultrasound studies of vascular and morphological changes in the human corpus luteum during the menstrual cycle. *Fertil Steril* 1996; 65: 753-758.
121. Gloock JL, Brumsted JR. Color flow pulsed Doppler ultrasound in diagnosing luteal phase defect. *Fertil Steril* 1995; 64: 500-504.
122. Sladkevicius P, Valentin L, Marsál K. Blood flow velocity in the uterine and ovarian arteries during menstruation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1994; 4: 421-427.
123. Strigini FAL, Scida PAM, Parri C, Visconti A, Susini S, Genazzani AR. Modifications in uterine and intraovarian artery impedance in cycles of treatment with exogenous gonadotrophins: effects of luteal phase support. *Fertil Steril* 1995; 64: 76-80.
124. Marsh MS, Bourne TH, Whitehead MI, Collins WP, Campbell S. The temporal effect of progestogen on uterine artery pulsatility index in postmenopausal women receiving sequential hormone replacement therapy. *Fertil Steril* 1994; 62: 771-774.
125. Resnik R, Brink GW, Plumer MH. The effect of progesterone on estrogen-induced uterine blood flow. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 128: 251-254.

126. Mercé L.T. Aplicaciones actuales y futuras de la ecografía y doppler en reproducción. Revista Española de Ultrasonidos en Obstetricia y Ginecología.
127. Biggers JD. *In vitro* fertilization and embryo transfer in human beings. New Engl J Med 1981; 304: 336-342.
128. Bernabeu R1, Brotons A, Mendiola J, Guerrero J y Ten J. Estado actual del conocimiento de la implantación embrionaria humana. Revista Iberoamericana Fertilidad 2004; 21- 3:167-173
129. Contart P, Baruffi RL, Coelho J, Mauri AL, Petersen C, Franco JG.: Power Doppler endometrial evaluation as a meted for the prognosis of embryo implantation in an ICSI program. J Assist Reprod Genet 2000 Jul; 17 (6): 329-34.
130. Ardaens Y, Leroy M, Lefebvre C, Tomas P, Leroy JL, Dewailly D.: Color echo-Doppler and endometrial receptivity in *in vitro* fertilization. Contracept Fertil Sex, 1998, Jul-Aug; 26 (7-8): 485-91.
131. Bonilla-Musoles F, Raga F, Bailao LA, Osborne N, Machado LE, Bonilla F, Blanes J, Vergara F, Navarro J, Blanco J, Alvarez J.: Endosonografía y Doppler en Reproducción. En Ecografía Vaginal: Doppler y Tridimensión. Bonilla-Musoles F. Editorial Médica Panamericana, 2001; 571-604.
132. Rossal LP, Bellver Pradas J, Escudero E, Gaytán J, Pellicer A. "Ecografía-Doppler en el estudio de la Implantación". Revista Iberoamericanca de Fertilidad 2002; 19- 5: 309-317.
133. Raga F, Bonilla-Musoles F, Casan EM, Klein O, Bonilla F. Assessment of endometrial volume by three-dimensional ultrasound prior to embryo transfer: clues to endometrial receptivity. Hum Reprod 1999; 14: 2851-4.
134. Kupesic S. The assessment of human life from conception to implantation: transvaginal colour Doppler study. Inter-University School of Medical Ultrasound "Ian Donald", 16th Course. Granada, 1993. (Personal communication).

135. Kupesic S, Bekavac I, Bjelos D, Kurjak A. Assessment of endometrial receptivity by transvaginal color Doppler and three-dimensional power Doppler ultrasonography in patients undergoing *in vitro* fertilization procedures. J Ultrasound Med 2001; 20: 125-34.
136. Schild RL, Holthaus S, d'Alquen J, Fimmers R, Dorn C, van der Ven H, Hansmann M. Quantitative assessment of subendometrial blood flow by three-dimensional-ultrasound is an important predictive factor of implantation in an in-vitro fertilization programme. Hum Reprod 2000; 15: 89-94.
137. Franks S. Polycystic ovary síndrome: a changing perspective. Clin Endocrinol (Oxf) 1989; 31 (1): 87-120.
138. Conway GS, Honour JW, Jacobs HS. Heterogeneity of the polycystic ovary syndrome: clinical, endocrine and ultrasound features in 556 patients. Clin Endocrinol 1989; 30 (4): 459-470.
139. Zaidi J, Campbell S, Pittrof R, Kyei-Mensah A, Jacobs HS, Tan SI. Ovarian stromal bloodflow changes in women with polycystic ovaries. A posible new marker for ultrasound diagnosis?. Human Reproduction 1995; 10:1992-1996.
140. Fanchin R, de Ziegler D, Olivennes F, Taieb J, Dzik A, Frydman R. Exogenous follicle stimulating hormone ovarian reserve test (EFORT): a simple and reliable screening test for detecting "poor responders" in *in-vitro* fertilization. Hum Reprod 1994; 9: 1607-11.
141. Nakata N, Selstam G, Olofson J, Backstrom T. Investigation of the human corpus luteum by ultrasonography: a proposed scheme for clinical investigation. Ultr. Obstet. Gynecol. 1992 (2): 190-196.
142. Veek LL.: Evaluación de ovocitos y preembriones en el laboratorio de FIV. En Remohi, J.; Pellicer, A.; Bonilla-Musoles, F.; (Eds): Avances en reproducción asistida. Madrid Ediciones Diaz de Santos S.A.; 1992. Páginas 117-16.

143. Carrera-Rotllan J, Estrada-García L, Sarquella-Ventura J. Predicción de las probabilidades de gestación en los ciclos de Fecundación *in Vitro*. Revista Iberoamericana de Fertilidad 2008;25(6): 377-386.
144. Barker MA, Boehnlein LM, Kovacs P, Lindheim SR. Follicular and luteal phase endometrial thickness and echogenic pattern and pregnancy outcome in oocyte donation cycles. J Assist Reprod Genet 2009; 26(5):243-9.
145. El-Toukhy T, Coomarasamy A, Khairy M, Sunkara K, Seed P, Stat C, Khalaf Y, Braude P. The relationship between endometrial thickness and outcome of medicated frozen embryo replacement cycles. Fertil Steril 2008; 89; 832-9.
146. Garcia Aguirre S, González Hevia I, García-Carpintero G, Del Rosal MJ. ¿Es útil medir el nivel de estradiol plasmático en fecundación *in vitro*?. Revista Iberoamericana de Fertilidad 2010;27 (1): 43-49.
147. Revel A. Defective endometrial receptivity. Fertil Steril 2012; 97: 1029-32.
148. Gingold JA, Lee JA, Rodriguez-Purata J, Whitehouse MC, Sandler B, Grunfeld L, Mukherjee T, Copperman AB. Endometrial pattern, but not endometrial thickness, affects implantation rates in euploid embryo transfers. Fertil Steril 2015; 104(3): 620-628.
149. Broer SL, Willem B, Hendriks D, Broekmans FJM. The role of antimullerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. Revista Iberoamericana de Fertilidad 2009; 36 (3): 259-270.
150. Jayaprakasan K, Campbell B, Hopkisson J, Johnson I, Raine-Fenning N. A prospective, comparative analysis of anti-Müllerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation. Fertil Steril 2010, 93 (3) 855-864.
151. Jadaon JE, Ben-Ami M, Haddada S, Radina O, Bar-Amia S, Younis JS. Prospective evaluation of early follicular ovarian stromal blood flow in infertile women undergoing IVF-ET treatment. Gynecological Endocrinology 2012; 28,5: 356-359.

152. Younis JS, Jadaon JE, Haddad S, Izhaki I Ben-Ami M. Prospective evaluation of basal stromal Doppler studies in women with good ovarian reserve and infertility undergoing *in vitro* fertilization-embryo transfer treatment: patients with polycystic ovary syndrome versus ovulatory patients. *Fertil Steril* 2011; 95 (5):1754-1758.
153. Shaban MM, Fattah GA, Moety A. Role of ultrasonographic markers of ovarian reserve in prediction of IVF and ICSI outcome. *Gynecological Endocrinology* 2014; 30: 290-293
154. Jayaprakasan K, Al-Hasie H, Jayaprakasan R, Campbell B, Hopkisson J, Johnson I, Raine-Fenning N. The three-dimensional ultrasonographic ovarian vascularity of women developing poor ovarian response during assisted reproduction treatment and its predictive value. *Fertil Steril* 2009; 92:1862-9.
155. Jayaprakasan K, Campbell B, Hopkisson J, Clewes J, Johnson I, Raine-Fenning N. Establishing the intercycle variability of three-dimensional ultrasonographic predictors of ovarian reserve. *Fertility Steril* 2008; 90:2126-2132.
156. Hendriks MJ, Mol BW, Bancsi LF, te Velde ER, Broekmans MJ. Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volumen and antral follicle count. *Fertil Steril* 2007; 87:764-75.
157. Deb S, Jayaprakasan K, Bruce K, Campbell BK, Clewes JS, Raine-Fenning NJ. The interovarian variation in the three-dimensional ultrasound markers of ovarian reserve in women undergoing baseline investigation for subfertility. *Fertil Steril* 2011; 95:667-72
158. Revelli A, Martiny G, Delle Piane L, Benedetto C, Rinaudo P, Tur-Kaspa I. A critical review of bi-dimensional and three-dimensional ultrasound techniques to monitor follicle growth: do they help improving IVF outcome?. *Reprod Biology Endocrinology* 2014;12:107

159. Palomba S, Russo T, Orio F, Falbo A, Tolino A, Zullo F. Perifollicular vascularity assessment for selecting the best oocytes for *in vitro* fertilization programs in older patients. *Fertil Steril* 2008 (90); 4:1305-1309.
160. Wakeman S, Benny MB. Is it possible to predict a fertile cycle? Uteroovarian blood flow parameters in conception versus nonconception cycles. *Fertil Steril* 2009; 91: 2726-2731.
161. Giugliano E, Cagnazzo E, Giuliano B, Vesce F, Caserta D, Moscarini M, Marci R. Can Doppler study of the ovarian artery predict the fertility outcome of intrauterine insemination? *J. Clin Ultrasound* 2014; 42: 331-5.
162. Riad ON, Hak AA. Assessment of endometrial receptivity using Doppler ultrasonography in infertile women undergoing intrauterine insemination. *Gynecological Endocrinology* 2014;30,1; 70-73
163. Hoozemans DA, Schats R, Lambalk NB, Homburg R, Hompes PG. Serial uterine artery Doppler velocity parameters and human uterine receptivity in IVF/ICSI cycles. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 31 (4); 432-8.
164. Mercé LT, Barco MJ, Bau S, Troyano J. Are endometrial parameters by three-dimensional ultrasound and power Doppler angiography related to *in vitro* fertilization/embryo transfer outcome? *Fertil Steril* 2008;89(1):111-117
165. Ivanovski M, Damcevski N, Radevska B, Doicev G. Assessment of uterine artery and arcuate artery blood flow by transvaginal color Doppler ultrasound on the day of human chorionic gonadotropin administration as predictors of pregnancy in an *in vitro* fertilization program. *Akush Ginekol (Sofia)*. 2012; 51(2):55-60.
166. Kim A, Hyuk J, Choi WJ, Hong SN, Kim HY. Detection of endometrial and subendometrial vasculature on the day of embryo transfer and prediction of pregnancy during fresh *in vitro* fertilization cycles. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* 2014; 53:360-365.
167. Vignal P, Cohen-Bacrie P, Sedbon E. Flow Index Vascularization dynamics in the preovulatory phase of controlled ovarian hyperstimulation: profile and relationship with conception rate. *Gynecol Obstet Fertil*. 2012; 40(2):99-103.

168. Nandi A, Martins WP, Jayaprakasan K, Clewes JS, Campbell BK, Raine-Fenning NJ. Assessment of endometrial and subendometrial blood flow in women undergoing frozen embryo transfer cycles. *Reproductive BioMedicine Online* 2014; 28: 343-351.
169. Battaglia C., Artini P., D'Ambrogio G., Genazzani A., and Genazzani A.: The role of color Doppler imaging in the diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172:108-113
170. Lam P., Johnson I., and Raine-Fenning N.: Three-dimensional ultrasound features of the polycystic ovary and the effect of different phenotypic expressions on these parameters. *Hum Reprod* 2007; 22: 3116-3123
171. Järvelä I.Y., Mason H.D., Sladkevicius P., Kelly S., Ojha K., Campbell S., et al: Characterization of normal and polycystic ovaries using three-dimensional power Doppler ultrasonography. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19: 582-590
172. Ng E.H., Chan C.C., Yeung W.S., and Ho P.C.: Comparison of ovarian stromal blood flow between fertile women with normal ovaries and infertile women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2005; 20: 1881-1886
173. Mercé LT, Barco MJ, Bau S, Troyano JM. Prediction of ovarian response and IVF/ICSI outcome by three-dimensional ultrasonography and power Doppler angiography. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007; 132: 93-100.
174. Lamazou F, Letouzey V, Arbo E, Grynberg M, Levailant JM, Frydman R, Fanchin R. The role of ultrasound examination to evaluate ovarian reserve of infertile patients. *Gynecol Obstet Fertil* 2009; 37(5):425-31.
175. Kelsey TW, Dodwell SK, Wilkinson AG, Greve T, Andersen CY, Anderson RA, Wallace WH. Ovarian volume throughout life: a validated normative model. *PLoS One* 2013; 8(9): e71465.
176. Christ JP, Willis AD, Brooks ED, Vanden Brink H, Jarrett BY, Pierson RA, Chizen DR, Lujan ME. Follicle number, not assessments of the ovarian stroma, represents the best ultrasonographic marker of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2014; 101(1): 280-287.

177. Kwee J, Elting ME, Schats R, McDonnell J, Lambalk CB. Ovarian volume and antral follicle count for the prediction of low and hyper responders with *in vitro* fertilization. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; 15: 5-9.
178. Battaglia C, Battaglia B, Morotti E, Paradisi R, Zanetti I, Meriggiola MC, Venturoli S. Two- and three-dimensional sonographic and color Doppler techniques for diagnosis of polycystic ovary syndrome. The stromal/ovarian volume ratio as a new diagnostic criterion. *J Ultrasound Med.* 2012; 31(7):1015-24.
179. Chen SL, Xia R, Chen X, Luo YQ, Wang LL, Wu YQ, Shi XY, Zheng HY. Prediction of ovarian reserve, poor response and pregnancy outcome based on basal antral follicle count and age in patients undergoing *in vitro* fertilization-embryo transfer. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2011; 31(4):572-7.
180. Dillon KE, Gracia CR. What is normal ovarian reserve?. *Semin Reprod Med.* 2013; 31(6):427-36.
181. Monniaux D, Clément F, Dalbiès-Tran R, Estienne A, Fabre S, Mansanet C, Monget P. The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link?. *Biol Reprod.* 2014 25; 90(4):85.
182. Szafarowska M, Jerzak M. Ovarian aging and infertility. *Ginekol Pol* 2013; 84(4):298-304.
183. Li Q, Geng X, Zheng W, Tang J, Xu B, Shi Q. Current understanding of ovarian aging. *Sci China Life Sci* 2012; 55(8):659-69.
184. La Marca A, Sunkara SK. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. *Hum Reprod Update* 2014; 20(1):124-40.
185. Nelson SM. Biomarkers of ovarian response: current and future applications. *Fertil Steril* 2013; 99(4):963-9.
186. Senturk LM, Erel CT. Thin endometrium in assisted reproductive technology. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008 Jun; 20(3):221-8.

187. Galliano D, Bellver J, Díaz-García C, Simon C, Pellicer A. ART and uterine pathology: how relevant is the maternal side for implantation? Human Reproduction Update 2015; 21 (1): 13-38.
188. Nikas G. Cell-surface morphological events relevant to human implantation. Hum Reprod 1999; 14(Suppl 2):37-44.
189. Nikas G, Psychoyos A. Uterine pinopodes in peri-implantation human endometrium: clinical relevance. Ann N Y Acad Sci 1997; 816:129-142
190. Quinn CE, Casper RF. Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity. Hum Reprod Update 2009; 15: 229-236
191. Díaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Alama P, Pellicer A, Simón C. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. Fertil Steril 2011; 95: 50-60.
192. Díaz-Gimeno P, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Bosch N, Martínez-Conejero JA, Alama P, Garrido N, Pellicer A, Simón C. The accuracy and reproducibility of the endometrial receptivity array is superior to histology as a diagnostic method for endometrial receptivity. Fertil Steril 2013; 99:508-517.
193. 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;100:818-824
194. Ruiz-Alonso M, Galindo N, Pellicer A, Simón C. What a difference two days make: 'personalized' embryo transfer (pET) paradigm. Hum Reprod 2014; 29:1244-1247.
195. Cheong Y, Boomsma C, Heijnen C, Macklon N. Uterine secretomics: a window on the maternal-embryo interface. Fertil Steril 2013; 99:1093-1099.
196. Chan C, Virtanen C, Winegarden NA, Colgan TJ, Brown TJ, Greenblatt EM. Discovery of biomarkers of endometrial receptivity through a minimally-invasive approach: a validation study with implications for assisted reproduction. Fert Steril 2013; 100: 810-817.

197. Vilella F, Ramirez LB, Simon C. Lipidomics as an emerging tool to predict endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2013; 99:1100-1106.
198. Polanski LT, Barbosa MAP, Martins WP, Baumgarten MN, Campbell B, Brosens J, Quenby S, Raine-Fenning N. Interventions to improve reproductive outcomes in women with elevated natural killer cells undergoing assisted reproduction techniques: a systematic review of literatura. *Hum Reprod* 2014; 29:65-75.
199. Nelson SM, Klein BM, Arce JC. Comparison of antimüllerian hormone levels and antral follicle count as predictor of ovarian response to controlled ovarian stimulation in good-prognosis patients at individual fertility clinics in two multicenter trials. *Fertil Steril*. 2015; 103(4):923-930.
200. Broer SL, Broekmans FJ, Laven JS, Fauser BC. Anti-Müllerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications. *Hum Reprod Update*. 2014; 20(5):688-701.
201. Li J, Li R, Yu H, Zhao S, Yu Y, Qiao J. The relationship between serum anti-Müllerian hormone levels and the follicular arrest for women with polycystic ovary syndrome. *Syst Biol Reprod Med* 2015; 61(2):103-9.
202. Fouquet A, Catteau-Jonard S, Peigné M, Pigny P, Dewailly D. Usefulness and indications of AMH assay in women. *Ann Biol Clin* 2014; 72(6):681-8.
203. Mutlu MF, Erdem M, Erdem A, Yildiz S, Mutlu I, Arisoy O, Oktem M. Antral follicle count determines poor ovarian response better than anti-Müllerian hormone but age is the only predictor for live birth in in vitro fertilization cycles. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30(5):657-65.
204. Benaglia L, Candotti G, Busnelli A, Paffoni A, Vercellini P, Somigliana E. Antral follicle count as a predictor of ovarian responsiveness in women with endometriomas or with a history of surgery for endometriomas. *Fertil Steril* 2015; 103(6):1544-50.
205. Parker AK, Grindler NM, Jungheim ES, Odem RR, Ratts VS, Cooper AR. Antral follicle count is increased in obese women placed on oral contraceptive pills. *J Reprod Med* 2015; 60(3-4):155-9.

206. Ben-Haroush A, Farhi J, Zahalka Y, Sapir O, Meizner I, Fisch B. Correlations between antral follicle count and ultrasonographic ovarian parameters and clinical variables and outcomes in IVF cycles. *Gynecol Endocrinol* 2012; 28(6):432-5.
207. Himabindu Y, Sriharibabu M, Gopinathan K, Satish U, Louis TF, Gopinath P. Anti-mullerian hormone and antral follicle count as predictors of ovarian response in assisted reproduction. *J Hum Reprod Sci.* 2013; 6(1):27-31.
208. Bentzen JG, Forman JL, Johannsen TH, Pinborg A, Larsen EC, Andersen AN. Ovarian antral follicle subclasses and anti-mullerian hormone during normal reproductive aging. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(4):1602-11.
209. Lan VT, Linh NK, Tuong HM, Wong PC, Howles CM. Anti-Müllerian hormone versus antral follicle count for defining the starting dose of FSH. *Prod Biomed Online* 2013; 27(4):390-9.
210. La Marca A, Sunkara SK. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. *Hum Reprod Update.* 2014; 20(1):124-40.
211. La Marca A, D'Ippolito G. Ovarian response markers lead to appropriate and effective use of corifollitropin alpha in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2014; 28(2):183-90.
212. Broekmans FJ, de Ziegler D, Howles CM, Gougeon A, Trew G, Olivennes F. The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. *Fertil Steril* 2010; 94(3):1044-51.
213. Panchal S, Nagori C. Comparison of anti-mullerian hormone and antral follicle count for assessment of ovarian reserve. *J Hum Reprod Sci* 2012; 5(3):274-8.
214. Burks HR, Ross L, Oppen N, Paulson E, Stanczyk FZ, Chung K. Can highly sensitive antimüllerian hormone testing predict failed response to ovarian stimulation? *Fertil Steril* 2015; 104(3):643-8.

215. Bentzen JG, Forman JL, Pinborg A, Lidegaard Ø, Larsen EC, Friis-Hansen L, Johannsen TH, Nyboe Andersen A. Ovarian reserve parameters: a comparison between users and non-users of hormonal contraception. *Reprod Biomed Online* 2012; 25(6): 612-9.
216. Oliveira JB, Baruffi RL, Petersen CG, Mauri AL, Nascimento AM, Vagnini L, Ricci J, Cavagna M, Franco JG Jr. A new ovarian response prediction index (ORPI): implications for individualised controlled ovarian stimulation. *Reprod Biol Endocrinol* 2012 (21);10:94
217. Kerr JB, Myers M, Anderson RA. The dynamics of the primordial follicle reserve. *Reproduction* 2013; 146: 205-215.
218. Brink HV, Chizen D, Hale G, Baerwald A. Age-related changes in major ovarian follicular wave dynamics during the human menstrual cycle. *Menopause* 2013; 20(12):1243-54.
219. Richardson MC, Guo M, Fauser BC, Macklon NS. Environmental and developmental origins of ovarian reserve. *Hum Reprod Update* 2014; 20(3):353-69.
220. Cedars MI. Biomarkers of ovarian reserve--do they predict somatic aging? *Semin Reprod Med* 2013; 31(6):443-51.
221. AlSerri A, Kuriya A, Holzer H, Tulandi T. Lateralization of ovarian follicles. *Gynecol Obstet Invest* 2014; 77(2):117-20.
222. Khan Z, Gada RP, Tabbaa ZM, Laughlin-Tommaso SK, Jensen JR, Coddington CC 3rd, Stewart EA. Unilateral oophorectomy results in compensatory follicular recruitment in the remaining ovary at time of ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2014; 101(3):722-7.
223. Peck JD, Quaas AM, Craig LB, Soules MR, Klein NA, Hansen KR. Lifestyle factors associated with histologically derived human ovarian non-growing follicle count in reproductive age women†. *Hum Reprod.* 2016; 31(1):150-7.

- 224. Harlow SD, Gass M, Hall JE, Lobo R, Maki P, Rebar RW, Sherman S, Sluss PM, de Villiers TJ; STRAW+10 Collaborative Group (39 Collaborators). Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop +10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. *Climacteric*. 2012; 15(2):105-14.
- 225. Sun N, Lin SQ, Lin HJ, He Z, Wang YH, Zhang Y, Chen FL, Jiang Y. Comparison of follicle-stimulating hormone, estradiol, ovarian volume, and antral follicle count, based on the Stages of Reproductive Aging Workshop system, among community-based women in China. *Menopause* 2013; 20(7):736-41.
- 226. Hansen KR, Craig LB, Zavy MT, Klein NA, Soules MR. Ovarian primordial and nongrowing follicle counts according to the Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW) staging system. *Menopause* 2012; 19(2):164-71.
- 227. Castro EC, Florêncio R de S, Monteiro Filho G, Amaral WN. Correlation between age and antral follicles count in infertile women. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2012; 34(4):184-8.
- 228. La Marca A, Dondi G, Sighinolfi G, Giulini S, Papaleo E, Cagnacci A, Faddy MJ. The ovarian response to controlled stimulation in IVF cycles may be predictive of the age at menopause. *HumanReproduction* 2014; 9:1-6.
- 229. La Marca A, Argento C, Sighinolfi G, Grisendi V, Carbone M, D'Ippolito G, Artenisio AC, Stabile G, Volpe A. Possibilities and limits of ovarian reserve testing in ART. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13(3):398-408.
- 230. Geber S, Vaintraub MT, Rotschild G, Sampaio M. Doppler of the uterine arteries combined with endometrial thickness correlate well with the degree of pituitary suppression in women treated with long-acting GnRH agonists. *Arch Gynecol Obstet* 2013; 287(2):369-73.
- 231. Bancsi LF, Broekmans FJ, Mol BW, Habbema JD, te Velde ER. Performance of basal follicle-stimulating hormone in the prediction of ovarian response and failure to become pregnant after in vitro fertilization: A meta-analysis. *Fertil Steril* 2003; 79:1091-100.

- 232. Mercé LT, Gómez B, Engels V, Bau S, Bajo JM. Intra-observer and inter-observer reproducibility of ovarian volumen, antral follicle count, and vascularity indices obtained with transvaginal 3 dimensional ultrasonography, power Doppler angiography, and the virtual organ computer-aided analysis imaging program. J Ultrasound Med 2005; 24: 1279-87.
- 233. Lamazou F, Letouzey V, Arbo E, Grynberg M, Levailant JM, Frydman R, Fanchin R. The role of ultrasound examination to evaluate ovarian reserve of infertile patients. Gynecol Obstet Fertil. 2009; 37(5):425-31.
- 234. Engmann L, Sladkevicius P, Agrawal R, Bekir JS, CampbellS, Tan SL. The pattern of changes in ovarian stromal and uterine blood flow velocities duringin vitro fertilization treatment and its relationship with outcome of the cycle. Ultrasound Obstet Gynecol 1999; 13:26-33.
- 235. Kupesic S, Kurjak A, Bjelos D, Vujisic S. Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro fertilization outcome are related to age. Fertil Steril 2003; 79:190-197.
- 236. Engmann L, Sladkevicius P, Agrawal R, Bekir JS, CampbellS, Tan SL. Value of ovarian stromal blood flow velocity measurement after pituitary suppression in the prediction of ovarian responsiveness and outcome of in vitro fertilization treatment. Fertil Steril 1999; 71:22-9.
- 237. Chatillon-Boissier K, Genod A, Denis-Belicard E, Felloni B, Chene G, Seffert P, Chauleur C. Prospective randomised study of long versus short agonist protocol with poor responder patients during in vitro fertilization. Gynecol Obstet Fertil 2012; 40(11):652-7.
- 238. Qin CR, Chen SL, Chen X, Xia R, Luo YQ Clinical features of women with idiopathic premature ovarian failure. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao 2011; 31(5):886-9.
- 239. Leonhardt H, Gull B, Stener-Victorin E, Hellström M. Ovarian volume and antral follicle count assessed by MRI and transvaginal ultrasonography: a methodological study. Acta Radiol 2014; 55(2):248-56.

- 240. Kim SK, Lee JR, Jee BC, Suh CS, Kim SH. What Number of Oocytes Is Appropriate for Defining Poor Ovarian Response?. *Yonsei Med J* 2015; 56(2):482-489.
- 241. la Cour Freiesleben N, Gerds TA, Forman JL, Silver JD, Nyboe Andersen A, Popovic-Todorovic B. Risk charts to identify low and excessive responders among first-cycle IVF/ICSI standard patients. *Reprod Biomed Online*. 2011; 22(1):50-8.
- 242. Ata B, Seyhan A, Reinblatt SL, Shalom-Paz E, Krishnamurthy S, Tan SL. Comparison of automated and manual follicle monitoring in an unrestricted population of 100 women undergoing controlled ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod*. 2011; 26(1):127-33.
- 243. Deb S, Campbell BK, Clewes JS, Raine-Fenning NJ. Quantitative analysis of antral follicle number and size: a comparison of two-dimensional and automated three-dimensional ultrasound techniques. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010; 35(3):354-60.
- 244. Zhang N, Hao CF, Zhuang LL, Liu XY, Gu HF, Liu S, Chen ZJ. Prediction of IVF/ICSI outcome based on the follicular output rate. *Reprod Biomed Online* 2013; 27(2):147-53.
- 245. Genro VK, Grynberg M, Scheffer JB, Roux I, Frydman R, Fanchin R. Serum anti-Müllerian hormone levels are negatively related to Follicular Output RaTe (FORT) in normo-cycling women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod*. 2011; 26(3):671-7.
- 246. Mercé LT, Bau S, Barco MJ, Troyano J, Gay R, Sotos F, Villa A. Assessment of the ovarian volume, number and volume of follicles and ovarian vascularity by three-dimensional ultrasonography and power Doppler angiography on the HCG day to predict the outcome in IVF/ICSI cycles. *Hum Reprod*. 2006; 21(5):1218-26.
- 247. van Rooij IA, Broekmans FJ, Hunault CC, Scheffer GJ, Eijkemans MJ, de Jong FH y cols. Use of ovarian reserve tests for the prediction of ongoing pregnancy in couples with unexplained or mild male infertility. *Reprod Biomed Online* 2006; 12:182-90.

- 248. Gallot V, Berwanger da Silva AL, Genro V, Grynberg M, Frydman N, Fanchin R. Antral follicle responsiveness to follicle-stimulating hormone administration assessed by the Follicular Output RaTe (FORT) may predict in vitro fertilization-embryo transfer outcome. Hum Reprod 2012; 27(4):1066-72.
- 249. Jayaprakasan K, Chan Y, Islam R, Haoula Z, Hopkisson J, Coomarasamy A, Raine-Fenning N. Prediction of in vitro fertilization outcome at different antral follicle count thresholds in a prospective cohort of 1,012 women. Fertil Steril. 2012; 98(3):657-63.
- 250. Yavas Y, Selub MR. Ovarian follicular volume and follicular surface area are better indicators of follicular growth and maturation, respectively, than is follicular diameter. Fertil Steril 2009; 91:1299-302.
- 251. 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; 23(5):496-500.
- 252. Battaglia C, Persico N, Mancini F, De Iaco P, Busacchi P, Facchinetti F, de Aloysio D. Uterine vascularization and pregnancy outcome in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection: The role of nitric oxide. J Assist Reprod Genet 2006; 23(5): 213-222.
- 253. Raine-Fenning N. Doppler assessment of uterine artery blood flow for the prediction of pregnancy after assisted reproduction treatment. Ultrasound Obstet Gynecol 2008;31(4):371-5.
- 254. Isaksson R, Tiitinen A, Cacciatore B. Uterine artery impedance to blood flow on the day of embryo transfer does not predict obstetric outcome. Ultrasound Obstet Gynecol 2000; 15: 527-530.
- 255. Ng EHY, Chan CCW, Tang OS, Yeung WSB, Ho PC. Endometrial and subendometrial vascularity is higher in pregnant patients with livebirth following ART than in those who suffer a miscarriage. Human Reprod 2006; 22 (4):1134-1141.

256. Ng EHY, Chan CCW, Tang OS, WSB Yeung, Ho PC. Relationship between uterine blood flow and endometrial and subendometrial blood flow during stimulated and natural cycles. *Fertil Steril* 2006;85: 721-727.
257. Habara T, Nakatsuka M, Konishi H, Asagiri K, Noguchi S, Kudo T. Elevated blood flow resistance in uterine arteries of women with unexplained recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 2002; 17: 190-194.
258. Nakatsuka M, Habara T, Noguchi S, Konishi H, Kudo T. Impaired uterine arterial blood flow in pregnant women with recurrent pregnancy loss. *J Ultrasound Med* 2003; 22:27-31.
259. 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.
260. Miwa I, Tamura H, Takasaki A et al. Pathophysiologic features of 'thin' endometrium. *Fertil Steril* 2009; 91 (4):998-1004.
261. Ng EHY, Chan CCW, Tang OS, Yeung WSB, Ho PC. Comparison of endometrial and subendometrial blood flow measured by three-dimensional power Doppler ultrasound between stimulated and natural cycles in the same patients. *Hum Reprod* 2004;19:2385-2390
262. Ng EHY, Chan CCW, Tang OS, WSB Yeung, Ho PC. The role of endometrial and subendometrial blood flow measured by three-dimensional power Doppler ultrasound in the prediction of pregnancy during in vitro fertilization treatment. *Hum Reprod* 2006; 21:164-170.
263. Raine-Fenning NJ, Campbell BK, Kendall NR, Clewes JS, Johnson IR. Quantifying the changes in endometrial vascularity throughout the normal menstrual cycle with three-dimensional power Doppler angiography. *Hum Reprod* 2004;19: 330-338
264. Wu HM, Chiang CH, Huang HY, Chao AS, Wang HS, Soong YK. Detection of the subendometrial vascularization flow index by three-dimensional ultrasound may be useful for predicting the pregnancy rate for patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 2003; 79: 507-511.

- 265. Järvelä IY, Sladkevicius P, Nelly S, Ojha K, Campbell S, and Nargung G. Evaluation of endometrial receptivity during in-vitro fertilization using three-dimensional power Doppler ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005; 26:765-769.
- 266. Ivanovski M, Lazarevski S, Popovik M. Assessment of endometrial thickness and pattern in prediction of pregnancy in an in vitro fertilization an embryo transfer cycles after ovarian stimulation. *Macedonian Medical Review* 2007;4-6:117-124.
- 267. Maugey-Laulom B, Commenges-Ducos M, Jullien V, Papaxanthos-Roche A, Scotet V, Commenges D. Endometrial vascularity and ongoing pregnancy after IVF. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 104: 137-143.
- 268. Ng EHY, Chan CCW, Tang OS, WSB Yeung, Ho PC. Factors affecting endometrial and subendometrial blood flow measured by three-dimensional power Doppler ultrasound during IVF treatment. *Hum Reprod* 2006; 21:1062-1069.
- 269. Ng EHY, Chan CCW, Tang OS, WSB Yeung, Ho PC. Changes in endometrial and subendometrial blood flow in IVF. *Reprod Biomed Online* 2009; 18: 269-275.
- 270. Chien LW, Au HK, Chen PL, Xiao J,Tzeng CR. Assessment of uterine receptivity by the endometrial-subendometrial blood flow distribution pattern in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 2002; 78: 245-251.

X. SIGLAS Y ABREVIATURAS

A

A= S: Velocidad o frecuencia máxima sistólica

A: Área (mm²)

AMH: Hormona Antimülleriana

α : Ángulo de insonación (ángulo formado por el haz de ultrasonidos y la dirección de la sangre)

B

B=D: Velocidad o frecuencia mínima diastólica

C

C: Velocidad de transmisión del ultrasonido en el cuerpo humano: 1540m/s

CL: Arteria intraovárica lútea

C/F: Señal color por folículo

D

D=B: Velocidad o frecuencia al final de la diástole

DAP: Diámetro antero-posterior

DL: Diámetro longitudinal

DT: Diámetro transversal

E

E: Estradiol

F

fD: Frecuencia Doppler

FI: Índice de Flujo

FIV: Fecundación *in vitro*

fo: Frecuencia de emisión del ultrasonido

FSH: Hormona Folículoestimulante

FSHr: Hormona Folículoestimulante recombinante

FUR: Fecha de última regla

G

gr: gramos

H

Hz: Hertzios

HCG: Gonadotrofina Coriónica Humana

HMG: Gonadotrofina menopáusica humana

I

IC: Índice de Conductancia

ICOM: Promedio de la superficie ovárica color relativa

ICSI: Microinyección espermática

Id Fol: Identificación del folículo

IMC: Índice de masa corporal

IMI: Arteria intramiometrial

IMI E: Arteria intramiometrial localizada en el tercio externo

IMI I: Arteria intramiometrial localizada en el tercio interno

IMI M: Arteria intramiometrial localizada en el tercio medio

Índice S/D: Índice o razón S/D

IOED: Arteria intraovárica estromal derecha

IOEI: Arteria intraovárica estromal izquierda
IOEM: Valor promedio de las arterias intraováricas estromales derecha e izquierda
IP: Índice de Pulsatilidad
IR: Índice de Resistencia o de Pourcelot
IWOM: Promedio de la superficie ovárica power doppler relativa

K

KHz: Kilohertzios

L

L: Longitud o perímetro (mm)

LH: Hormona Luteinizante

LE: Línea endometrial

M

M: Velocidad o frecuencia media en todo el ciclo

MHz: Megahertzios

M2: Diámetro medio de los dos diámetros máximos obtenidos del corte ecográfico mayor

M3: Diámetro medio de los diámetros longitudinal, antero-posterior y transversal.

ml: mililitros

mm: milímetros

min: minutos

mUI: miliunidades internacionales

MII: Metafase II

N

n: Nº de casos

ng: nanogramos

O

OVF: Onda de velocidad de flujo

OD: Ovario derecho

OI: Ovario izquierdo

O.A.: Ovario activo (portador de cuerpo lúteo)

O.I.: Ovario Inactivo

P

π : Constante

PB: Corpúsculo polar

pg: picogramo

PCO: ovarios poliquísticos

PCOS: síndrome de los ovarios poliquísticos

PF: Arteria intraovárica perifolicular

PN: Pronúcleo

PRL: Prolactina

PROG: Progesterona

PRF: Frecuencia de repetición de pulsos

Q

Q: Flujo sanguíneo que circula en un determinado vaso

R

r: Radio

RF: Recuento folicular
RFA: Recuento de folículos antrales

S

s: Superficie de sección del vaso
SCO: Promedio superficie de color máxima con Doppler color
SCx Color= SCO: Superficie de color máxima con Doppler color
SCx Power= SWO: Superficie de color máxima con Power Doppler
SD: Desviación estándar
S/D: Índice o razón S/D
SE: Arteria subendometrial
SE C: Arteria subendometrial en localización central
SE M: Arteria subendometrial en localización media
SE P: Arteria subendometrial en localización periférica
SEM: Error estándar medio
SEx Color= Superficie endometrial máxima con Doppler color
SEx Power= Superficie endometrial máxima con Power Doppler
SFx Color= Superficie folicular máxima con Doppler color
SFx Power= Superficie folicular máxima con Power Doppler
SLx Color= Superficie de cuerpo lúteo máxima con Doppler color
SLx Power= Superficie de cuerpo lúteo máxima con Power Doppler
SOx Color= Superficie ovárica máxima con Doppler color
SOx Power= Superficie ovárica máxima con Power Doppler
SUx Color= Superficie uterina máxima con Doppler color
SUx Power= Superficie uterina máxima con Power Doppler
SWOM: Promedio superficie de color máxima con Power Doppler

T

TM: Tiempo movimiento
TESA: Microinyección con espermatozoides de testículo

U

UI: Unidades Internacionales
UOD: Arteria utero-ovárica derecha
UOI: Arteria utero-ovárica izquierda
UOM: Valor promedio de las arterias utero-ováricas derecha e izquierda
UTD: Arteria uterina derecha
UTI: Arteria uterina izquierda
UTM: Valor promedio de las arterias uterinas derecha e izquierda

V

v: velocidad media de la sangre en el vaso estudiado
VOM: volumen promedio de ambos ovarios (VOM).
VF: Volumen folicular
VFI: Índice vascular/flujo
VI: Índice vascular
V/F: Volumen ovárico por folículo

X

X: Media

XI. ANEXOS

ANEXO 1

FICHA A (Datos de filiación)

Datos de filiación

1. Nombre y dos apellidos de la gestante
2. N° de caso
3. N° de Historia clínica
4. Fecha

Características individuales

Hace referencia a fórmula de fertilidad, antecedentes, datos antropométricos, origen de la esterilidad, datos hormonales y datos del tratamiento.

5. Edad: años
6. Menarquia: años
7. Fórmula menstrual: días
8. Tiempo de esterilidad: años
9. Fórmula de fertilidad: consta de 3 cifras que hacen referencia sucesivamente a: n° de gestaciones previas, n° de abortos previos, n° de partos o cesáreas.
10. Antecedentes
11. Peso: Kilogramos
12. Talla: metros
13. Índice de masa corporal: mediante la siguiente fórmula:
$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso}}{\text{Talla}^2}$$
14. Origen de la esterilidad: primaria o secundaria
15. Etiología esterilidad

16. FSH= mUI/ml, LH= mUI/ml, PRL= ng/ml, TSH= microUI/ml, Estradiol= pg/ml, Progesterona= ng/ml
17. Test de reserva ovárica
18. Protocolo largo: DECAPEPTYL 0.1 mg/día
19. Dosis diaria inicial de FSH recombinante
20. Dosis media diaria de FSH recombinante
21. Otras gonadotropinas añadidas
22. Dosis total de gonadotropinas
23. Dosis media diaria de gonadotropinas
24. Días de estimulación ovárica
25. Días de supresión hipofisaria
26. Técnica realizada: FIV, FIV con donante, ICSI, ICSI+TESA.
27. Progesterona: 300mg/8 horas

ANEXO 2

FICHA B (Datos eco-Doppler y hormonales)

ANALITICA HORMONAL

E22					
E0					
E6					
E8					
E10					
E11					
E12					
E HCG					
E PUNCION					
E TRANSF		PROG TRANSF			
E +7		PROG +7			
E +14		PROG +14		HCG	

1- 22°

- E₂ = pg/ml
- Número de folículos en cada ovario y el tamaño, señalando el mayor y menor

	Nº Foliculos	Tamaño máximo	Tamaño mínimo
OD			
OI			

- Doppler y Planimetria:

OVARIO

	DL	DAP	DT	M3	A	L	V	SOx Color	SOx Power	SCx Color	SCx Power
OD											
OI											
UOD											
UOI											
UOM											
IOED											
IOEI											
IOEM											
	S	D	M	IP	IR						

Doppler color en la fertilización *in vitro* (FIV) como predictor

CUERPO LÚTEO

	DL	DAP	DT	M3	A	L	V	SLx Color	SLx Power	SCx Color	SCx Power	Nakata
CL												
DOPPLER												
	S	D	M	IP	IR							

2- SUPRESIÓN

- E_2 = pg/ml
- Número de folículos en cada ovario y el tamaño, señalando el mayor y menor

	Nº de folículos	Tamaño máximo	Tamaño mínimo
OD			
OI			

- Doppler y Planimetría:

OVARIO

	DL	DAP	DT	M3	A	L	V	SOx Color	SOx Power	SCx Color	SCx Power
OD											
OI											
UOD											
UOI											
UOM											
IOED											
IOEI											
IOEM											
	S	D	M	IP	IR						

3- 6º

- E_2 = pg/ml

ENDOMETRIO

	DL	DAP	DT	A	L	V
ENDOMET						

- Doppler y Planimetría:

OVARIO

	DL	DAP	DT	M3	A	L	V	SOx Color	SOx Power	SCx Color	SCx Power
OD											
OI											
UOD											
UOI											
UOM											
IOED											
IOEI											
IOEM											
	S	D	M	IP	IR						

FOLICULO (Sólo planimetría folicular si diámetro $\geq 14\text{mm}$)

F1D	DL	DAP	DT	M2	M3	A	L	V	SFx Color	SFx Power	SCx Color	SCx Power
PF												
	S	D	M	IP	IR							

4- 8° (diámetro del folículo/s dominante/s $\geq 14\text{mm}$)

- $E_2 = \text{pg/ml}$

ENDOMETRIO

	DL	DAP	DT	A	L	V
ENDOMET						

- Doppler y Planimetría:

OVARIO

	DL	DAP	DT	M3	A	L	V	SOx Color	SOx Power	SCx Color	SCx Power
OD											
OI											
UOD											
UOI											
UOM											
IOED											
IOEI											
IOEM											
	S	D	M	IP	IR						

FOLICULO (Sólo planimetría folicular si diámetro $\geq 14\text{mm}$)

F1D	DL	DAP	DT	M2	M3	A	L	V	SFx Color	SFx Power	SCx Color	SCx Power
PF												
	S	D	M	IP	IR							

5- 10°

- $E_2 = \text{pg/ml}$

ENDOMETRIO

	DL	DAP	DT	A	L	V
ENDOMET						

- Doppler y Planimetría:

OVARIO

	DL	DAP	DT	M3	A	L	V	SOx Color	SOx Power	SCx Color	SCx Power
OD											
OI											
UOD											
UOI											
UOM											
IOED											
IOEI											
IOEM											
	S	D	M	IP	IR						

FOLICULO (Sólo planimetría folicular si diámetro $\geq 14\text{mm}$)

F1D	DL	DAP	DT	M2	M3	A	L	V	SFx Color	SFx Power	SCx Color	SCx Power
PF												
	S	D	M	IP	IR							

6- HCG si ≥ 3 folículos maduros

- $E_2 = \text{pg/ml}$
- Doppler y planimetría:

ENDOMETRIO

	DL	DAP	DT	M3	A	L	V	SEx Color	SEx Power	SCx Color	SCx Power
ENDOMET											
SE											
IMI											
	S	D	M	IP	IR			LOCAL			

UTERO

	DL	DAP	DT	M3	A	L	V	SUx Color	SUx Power	SCx Color	SCx Power
UTERO											
UTD											
UTI											
UTM											
	S	D	M	IP	IR						

OVARIO

	DL	DAP	DT	M3	A	L	V	SOx Color	SOx Power	SCx Color	SCx Power
OD											
OI											
UOD											
UOI											
UOM											
IOED											
IOEI											
IOEM											
	S	D	M	IP	IR						

FOLICULO (Sólo planimetría folicular si diámetro $\geq 14\text{mm}$)

F1D	DL	DAP	DT	M2	M3	A	L	V	SF _x Color	SF _x Power	SCx Color	SCx Power
PF												
	S	D	M	IP	IR							

7- **PUNCION (0)**

- E₂ = pg/ml
- Doppler y planimetría:

ENDOMETRIO

	DL	DAP	DT	M3	A	L	V	SE _x Color	SE _x Power	SCx Color	SCx Power
ENDOMET											
SE											
IMI											
	S	D	M	IP	IR			LOCAL			

Doppler color en la fertilización *in vitro* (FIV) como predictor

UTERO

	DL	DAP	DT	M3	A	L	V	SUx Color	SUx Power	SCx Color	SCx Power
UTERO											
UTD											
UTI											
UTM											
	S	D	M	IP	IR						

OVARIO

	DL	DAP	DT	M3	A	L	V	SOx Color	SOx Power	SCx Color	SCx Power
OD											
OI											
UOD											
UOI											
UOM											
IOED											
IOEI											
IOEM											
	S	D	M	IP	IR						

FOLICULO (Sólo planimetría folicular si diámetro $\geq 14\text{mm}$)

F1D	DL	DAP	DT	M2	M3	A	L	V	SF _x Color	SF _x Power	SC _x Color	SC _x Power
PF												
	S	D	M	IP	IR							

EMBRIONES

Id Fol	Ovulo	PN	PB	Células	Puntos	Insemin	% Fertil	% Divis	Transf	Cong

8- *TRANSFER*

- E₂ = pg/ml
- Progesterona= ng/ml
- Doppler y planimetría:

ENDOMETRIO

	DL	DAP	DT	M3	A	L	V	SEx Color	SEx Power	SCx Color	SCx Power
ENDOMET											
SE											
IMI											
	S	D	M	IP	IR			LOCAL			

UTERO

	DL	DAP	DT	M3	A	L	V	SUx Color	SUx Power	SCx Color	SCx Power
UTERO											
UTD											
UTI											
UTM											
	S	D	M	IP	IR						

OVARIO

	DL	DAP	DT	M3	A	L	V	SOx Color	SOx Power	SCx Color	SCx Power
OD											
OI											

9- + 7:

- E₂ = pg/ml
- Progesterona= ng/ml
- Doppler y planimetría:

ENDOMETRIO

	DL	DAP	DT	M3	A	L	V	SEx Color	SEx Power	SCx Color	SCx Power
ENDOMET											
SE											
IMI											
	S	D	M	IP	IR			LOCAL			

UTERO

	DL	DAP	DT	M3	A	L	V	SUx Color	SUx Power	SCx Color	SCx Power
UTERO											
UTD											
UTI											
UTM											
	S	D	M	IP	IR						

OVARIO

	DL	DAP	DT	M3	A	L	V	SOx Color	SOx Power	SCx Color	SCx Power
OD											
OI											
UOD											
UOI											
UOM											
	S	D	M	IP	IR						

10- +14:

- β - HCG= mUI/ml
- E_2 = pg/ml
- Progesterona= ng/ml
- Doppler y planimetría:

ENDOMETRIO

	DL	DAP	DT	M3	A	L	V	SEx Color	SEx Power	SCx Color	SCx Power
ENDOMET											
SE											
IMI											
	S	D	M	IP	IR			LOCAL			

Doppler color en la fertilización *in vitro* (FIV) como predictor

UTERO

	DL	DAP	DT	M3	A	L	V	SUx Color	SUx Power	SCx Color	SCx Power
UTERO											
UTD											
UTI											
UTM											
	S	D	M	IP	IR						

OVARIO

	DL	DAP	DT	M3	A	L	V	SOx Color	SOx Power	SCx Color	SCx Power
OD											
OI											
UOD											
UOI											
UOM											
	S	D	M	IP	IR						

