



Guía 19

ESTUDIO DEL FALLO REPETIDO DE IMPLANTACIÓN Y SUS POSIBLES ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS (2017)

Autores: Isidoro Bruna Catalán; Judith Morraja Nadal; Oscar Collado Ramos.

Centro: HM FERTILITY CENTER. Hospital Universitario Madrid-Montepríncipe.

Aprobado por la Junta Directiva SEISEGO. 20 de Abril de 2017

I.- INTRODUCCIÓN Y DEFINICIONES:

El primer problema con el que nos encontramos ante el fallo repetido de implantación (FRI) es delimitar su concepto ajustándolo a los criterios en los que actualmente se desarrolla la medicina de la reproducción. Aunque el FRI clásicamente se ha definido como *“la no consecución de embarazo tras haber transferido ≥ 10 embriones de buena calidad”* (Tan, 2005) o *“tras ≥ 3 transferencias de embriones de buena calidad, procedentes de un ciclo de FIV o de donación de ovocitos, en mujeres de menos de 37 años ó ≥ 2 en mujeres de más de 37 años”* (ESHRE PGD Consortium, 2005; Recomendaciones SEF, 2007), estos criterios corresponden a una coyuntura histórica en la que se transfería un mayor número de embriones y los programas de criopreservación embrionaria no eran tan eficaces.

Es pues necesaria una nueva estandarización del FRI, lo que no es tarea fácil (4). Sí lo es, en cambio, excluir de la definición lo que tenemos constancia que NO debe ser considerado como un FRI. A saber:

- Fallos repetidos en mujeres con edad avanzada (>40 años)
- Fallos repetidos en mujeres con baja respuesta.

- Fallos repetidos en mujeres con patologías conocidas que inciden en el ámbito de la fertilidad (endometriosis, hidrosalpinx...).
- Fallos repetidos tras transferir embriones de mala calidad (categorías C y D de la Clasificación de ASEBIR).
- Fallos repetidos en mujeres con alteraciones de la cavidad uterina (miomas submucosos, pólipos endometriales, malformaciones uterinas...).
- Fallos repetidos en mujeres que desarrollan endometrios inadecuados.

El fallo de implantación se trata, por tanto, de un diagnóstico por exclusión. El “verdadero” FRI va más allá de las situaciones que acabamos de describir en las que la implantación tiene un compromiso acreditado y debe sustentarse en la tendencia a transferir cada vez un menor número de embriones. Dado lo obsoleto de las definiciones clásicas y a falta de que la ESHRE y la ASMR alcancen un consenso sobre una nueva definición más práctica, en consonancia con postulados más realistas y actualizados (como ya se realizara, por ejemplo, para definir el SOP), coincidimos con la sugerencia de Coughlan et al. (2014) y consideramos que una definición más razonable del **fallo repetido de implantación** debería estar próxima a:

La no consecución del embarazo en mujeres menores de 40 años, tras haber transferido al menos 4 embriones de buena calidad, en estadio de células, repartidos en un mínimo 3 transferencias (incluyendo tanto las realizadas en fresco como las de embriones criopreservados).

II.- POSIBLES CAUSAS SUTILES DEL FALLO REPETIDO DE IMPLANTACIÓN:

Es perfectamente conocido que el éxito de una implantación depende de:

- La calidad de los gametos masculinos y femeninos.
- La calidad embrionaria.
- La receptividad endometrial.
- Una técnica y un momento adecuados de transferencia embrionaria.
- Una correcta interacción entre los factores endometriales y embrionarios durante la ventana de implantación (“buen diálogo embrio-endometrial”).
- Un correcto soporte de fase lútea.

La transferencia no complicada de embriones viables con una buena calidad morfológica, en un útero anatómica y funcionalmente receptivo, es esencial para lograr el embarazo en los ciclos de fecundación in vitro. Por ello se hace necesario repasar algunos defectos “sutiles” que podrían estar en la causa o causas del FRI. De una manera didáctica, estos defectos sutiles podrían agruparse en tres apartados generales:

1º.- FRI subsidiario a una receptividad endometrial disminuida:

- Anomalías de la cavidad uterina.
- Endometrio poco proliferado.
- Expresión alterada del patrón de receptividad (genómico, molecular).
- Endometritis.
- Factores inmunológicos.
- Trombofilias.

2º.- FRI subsidiario a un desarrollo embrionario defectuoso:

- Anomalías cromosómicas (progenitores / gametos / embriones).
- Endurecimiento de la zona pelúcida.
- Condiciones subóptimas de cultivo.

3º.- FRI subsidiario a otras causas multifactoriales:

- Endometriosis.
- Hidrosalpinx.
- Estimulación folicular subóptima.

A continuación repasaremos de forma sucinta algunos de estos posibles aspectos causales.

II. 1º.- POSIBLES MECANISMOS IMPLICADOS EN LA RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL DISMINUIDA.

▪ **Anomalías de la cavidad uterina:**

La histeroscopia (HSC) es una de las pruebas diagnósticas más importantes en las pacientes con FRI en orden a descartar patologías intracavitarias que pudieran haber pasado inadvertidas con los medios diagnósticos convencionales (ecografía transvaginal 2D y 3D, histerosalpingografía e histerosonosalpingografía, resonancia magnética nuclear). Permite la confirmación visual del estado del canal cervical y de la cavidad uterina.

Hoy en día, la histeroscopia se considera como el estándar de oro para el diagnóstico de la patología intrauterina ya que presenta, además, una morbilidad intra y postoperatoria mínima (RECOMENDACIÓN GRADO A).

La evidencia disponible señala que en las mujeres con FRI, incluso aunque tengan histerosalpingografías normales, presentan entre un 12 y un 50% de hallazgos histeroscópicos patológicos (orgánicos y/o “sutiles”) (*Bozdog, 2008; Makrakis, 2009; Fatemi, 2010*). Los más frecuentes son los pólipos endometriales, pequeños miomas, úteros subseptos o bicornes, endometrios polipoideos o hiperplásicos, adherencias intracavitarias y endometritis,

Dos estudios prospectivos, aleatorizados y controlados (RCT) confirman el valor de la HSC en mujeres con FRI, demostrando un significativo incremento

de las tasas de embarazo clínico posteriores a la misma (Demiroglu y Gurgan, 2004; Rama Raju et al, 2006). Ambos estudios están recogidos en el meta-análisis de Bosteels et al (2010) donde se concluye la utilidad de la histeroscopia a la hora de incrementar las tasas de embarazo en pacientes subfértiles que no presentan otros síntomas ginecológicos (**Nivel de evidencia Ia**).

Por tanto, en el FRI, la histeroscopia incrementa las tasas de embarazo en pacientes subfértiles que no presentan otros síntomas ginecológicos (Nivel de evidencia Ia).

Otras patologías uterinas menos sutiles susceptibles de ser corregidas quirúrgicamente (del tipo las malformaciones uterinas o de los miomas submucosos) parece poco probable que puedan pasar inadvertidas con los medios diagnósticos convencionales. Sin embargo, el impacto que puedan tener los Miomas intramurales que no distorsionan la cavidad en el FRI es todavía motivo de controversia (Eldar-Geva et al, 1998; Donnez y Jadoul, 2002; Oliveira et al, 2004). Las asociaciones que no están basadas en argumentos biológicos claros, generalmente se explican más por los prejuicios que por la causalidad. Por desgracia no existe un mecanismo de certeza que pueda revelar la asociación entre la presencia de miomas intramurales o subserosos con la subfertilidad. A pesar de las limitaciones, se han propuesto varios mecanismos por los que los miomas pueden reducir la fertilidad. En el caso del FRI se ha postulado que una perfusión endometrial inadecuada, subsidiaria a la deformación miometrial, podría explicar la reducción en la tasa de implantación embrionaria (Ng et al, 2005).

Por otra parte, los resultados de los estudios experimentales son contradictorios. A favor de la no asociación de los miomas intramurales sobre las tasas de gestación está el estudio prospectivo de Somigliana et al. (2011), que compara los resultados de la FIV en 119 mujeres con miomas que no impactan en cavidad endometrial, frente a 119 controles, ofreciendo un 24% de embarazos clínicos en las mujeres con miomas subserosos e intramurales, frente a un 19% en las que no los tenían ($p=0,43$). Se objetivaron resultados similares cuando se analizaron solo las mujeres con miomas intramurales ($n=80$). No se constató una relación significativa entre los resultados clínicos y el número o el tamaño de los miomas, siendo su conclusión que, en las pacientes asintomáticas, los miomas pequeños que no invaden la cavidad endometrial, carecen de impacto sobre la tasa de éxito del de la FIV.

Sosteniendo la hipótesis contraria se encuentra el estudio de Kalaf et al (2006), cuyo objetivo es la evaluación del efecto de los pequeños miomas intramurales en la tasas acumuladas de embarazo clínico, de embarazo en curso y de nacidos vivos después de llevar a cabo tres ciclos de FIV (112 mujeres con miomas intramurales de ≤ 5 cm que no impactaban en cavidad endometrial, frente a 322 mujeres sin miomas). Los resultados fueron: 23,6% de tasa de embarazo, 18,8% de embarazo en curso y 14,8% de nacidos vivos en el grupo de estudio, en comparación con el 32,9%, 28,5% y 24% respectivos en el grupo control ($p<0,05$). El análisis de regresión de Cox mostró que la tasa de

embarazo por ciclo del grupo con miomas se redujo en un 39% (HR=0,61, IC95%=0.39-0.95; p=0,029) en comparación con el grupo control. La tasa acumulada de embarazo en curso se redujo en un 43% (HR=0,57, IC95%: 0.35-0.91; p=0,018), y la tasa acumulada de nacidos vivos se redujo en un 47% (HR=0,53, IC95%:0.32-0,87; p=0,013) en el grupo de estudio. Después de ajustar por variables de confusión, la presencia de miomas redujo significativamente la tasa de embarazo en curso por ciclo en un 40% (HR= 0,60, IC95%:0.36-0.99; p=0,048) y la tasa de nacido vivo por ciclo en un 45% (HR=0,55, IC95%:0.32-0.95; p=0,03). Por tanto, la conclusión de Kalaf et al. es que la presencia de pequeños miomas intramurales se asocia con una reducción significativa de las tasas acumuladas de embarazo, de embarazo en curso y de nacidos vivos tras la realización de tres ciclos de FIV / ICSI.

En este mismo sentido, Bulletti et al. (2004) evalúan el impacto de la resección quirúrgica de los miomas en la fertilidad posterior de las pacientes sometidas a TRA. Comparan una serie de 84 pacientes con miomas que no deforman la cavidad, a las que se somete a miomectomía, frente a un grupo control de 84 pacientes con las mismas características que no son sometidas a cirugía. Tanto la tasa acumulada de embarazo posterior a cirugía (28% vs 13%; p<0,05), como la tasa de gestación a término (25% vs 12%; p<0,05) ofrecieron diferencias significativas, No se constataron diferencias significativas en la tasa de aborto entre los dos grupos.

Finalmente, el meta-análisis de Sunkara et al. (2010), sobre la base de 19 estudios observacionales metodológicamente correctos, que comprenden 6.087 ciclos de FIV, señala el impacto negativo en la tasa de nacidos vivos de las mujeres con miomas que no distorsionan la cavidad sometidas a FIV, frente a aquellas sin miomas (RR=0,79, IC95%: 0,70-0,88; p <0,0001). Este impacto negativo se constata en tanto en el global de resultados en todas las edades, como en el subgrupo de mujeres con edad inferior a 37 años (**Nivel de evidencia Ib**).

En conclusión, los miomas intramurales que no distorsionan la cavidad no deben ser considerados de entrada como causa de un FRI, pero si tras la evaluación global del resto de las pruebas diagnósticas no se encuentran otros motivos, debe valorarse su extirpación quirúrgica (RECOMENDACIÓN GPP).

- **Endometritis Crónica (EC):**

Los mediadores inflamatorios tipo citoquinas y agentes quimiotácticos, así como los propios microorganismos pueden provocar la apoptosis de las células del trofoblasto impidiendo la correcta implantación del embrión (Romero et al, 2004). Diversos estudios (*Johnston-MacAnanny, 2010; Ciccinielli, 2015*), llegan a diagnosticar una endometritis crónica (EC) en el 30,3% al 57,5% de las pacientes con FRI. Así mismo objetivan significativas menores tasas de implantación en los grupos con EC confirmada tras biopsia histeroscópica que

en los grupos en los que la biopsia no objetivó patología endometrial o que en los grupos control. Los autores no encuentran diferencias significativas en las tasas de implantación posteriores entre los grupos con EC y los grupos control, una vez tratada la EC con antibioticoterapia específica.

Al igual que se ha expuesto para los miomas intramurales, de no encontrarse otros agentes sugestivos de estar en el origen del FRI, parece razonable intentar descartar una Endometritis Crónica y, de confirmarse, tratarla de forma específica (RECOMENDACIÓN GPP).

▪ **Receptividad endometrial disminuida:**

La implantación natural del embrión humano es un proceso sucesivo de tres etapas (aposición, adhesión e invasión) con la participación sincrónica de un endometrio receptivo y de un blastocisto. Este fenómeno, dependiente de los esteroides ováricos, sólo puede tener lugar durante la “ventana de implantación”, un período de tiempo auto-limitado que acece entre los días 20 a 24 del ciclo menstrual. La implantación supone una compleja secuencia de eventos de señalización, consistente en la adquisición de los ligandos de adhesión, junto a la pérdida de componentes inhibitorios, cruciales para el establecimiento del embarazo. En el momento actual la evaluación histológico-clínica del endometrio añade poca información significativa, por lo que ha sido sustituida por investigaciones más sofisticadas y funcionales. Se han identificado hasta la fecha un gran número de mediadores moleculares del proceso de receptividad endometrial, lo que incluye moléculas de adhesión, citoquinas, factores de crecimiento, lípidos y otros.

Se han postulado diversos mecanismos que podrían estar implicados en el desarrollo de un endometrio con menor receptividad. Así, mientras Margalioth et al. (2006) señalan la posible disregulación local en la expresión de ciertas citoquinas como posible origen del FRI, Stern et al. (1998) apuntan a que la presencia de Ac β 2-Glicoproteína-I podía estar relacionada con el fallo de implantación, pero dos estudios prospectivos han demostrado la ausencia de esta asociación (Denis et al, 1997; Eldar-Geva et al, 1999). También Matteo et al. (2007) señalan un incremento de la actividad de las NK en sangre periférica (CD 56dim CD 16+ CD 69+) en las mujeres con FRI, pero el meta-análisis de Tang (2011) cuestiona el valor de mensurar pNK o uNK, ya que, en el momento actual, carecen de valor pronóstico. Este meta-análisis señala la necesidad de más estudios para confirmar o refutar la función de las células NK como prueba predictiva en la detección de las mujeres con FRI que pudieran beneficiarse de un tratamiento de inmuno-modulación.

Finalmente, el propósito de las nuevas líneas de investigación que han abierto las “ómicas” (genómica, proteómica, transcriptómica, metabolómica, secretómica) no es sólo la de describir los diferentes actores del proceso de implantación, sino también intentar retratar la relación entre estos factores y su cronología funcional durante la ventana de implantación **Hoy se entiende el proceso de implantación embrionaria como un equilibrio de genes**

expresados y reprimidos, bajo el control de las hormonas esteroideas y de otros factores reguladores locales paracrinicos y autocrinos (Achache, 2006; Horcajadas, 2006 y 2007). La tecnología de microarrays ya permite estudiar de forma global la regulación transcripcional de este proceso biológico e intentar indagar sobre patrones de expresión génica endometrial alterados. Gracias a estos estudios sabemos, por ejemplo, que los perfiles de expresión génica del endometrio en fase receptiva son distintos en el ciclo natural que en el de estimulación ovárica controlada, así como que la estimulación folicular induce un retraso en la expresión de determinados genes, lo que puede ofrecer implicaciones clínicas potenciales (Horcajadas, 2005 y 2008).. Los resultados de estos estudios proporcionan una nueva información sobre genes y pathways que pueden tener importancia en cuanto a la receptividad funcional endometrial en las pacientes con FRI, en aras a buscar el mejor tratamiento de estimulación ovárica en términos de impacto mínimo sobre el endometrio o de buscar el momento óptimo de receptividad de la ventana de implantación para realizar transferencias embrionarias personalizadas (Díaz-Gimeno, 2011).

También en este sentido, los dos meta-análisis de Venetis et al (2013 y 2015), el primero de ellos basado en más de 60.000 ciclos de FIV-ICSI, concluyen que los niveles séricos elevados de Progesterona el día de la administración de la hCG se asocian a una reducción de las tasas de embarazo (y de nacidos vivos) cuando se realiza una transferencia en fresco. La primera revisión sistemática de Venetis (2013) pone también de manifiesto que el efecto adverso de la elevación sérica de Progesterona no se manifiesta en los ciclos de criotransferencia, ni en los de donante/receptora.

De esta observación se infiere que el efecto deletéreo de los niveles elevados de Progesterona al final del ciclo de hiperestimulación ovárica controlada (HOC) solo puede deberse al desarrollo concurrente de un endometrio menos receptivo en los ciclos con transferencia en fresco (Nivel de Evidencia Ia).

Tres estudios (Labarta et al, 2011; Van Vaerenbergh et al, 2011; Li et al, 2011) identifican alteraciones significativas en el perfil de expresión génica a nivel endometrial en aquellos casos con elevaciones de la progesterona al final de la HOC, independientemente del análogo de GnRH empleado. Estos genes se relacionan con la adhesión celular, los procesos de desarrollo y el sistema inmunológico, todos los cuales son necesarios para el desarrollo normal de la implantación embrionaria. También Koler et al (2009), estudiando específicamente el perfil de expresión génica de mujeres con FRI, diseñó un estudio experimental que compara el endometrio en día LH+7 de 20 mujeres con FRI frente al de 10 mujeres fértiles, objetivando una disregulación en 313 genes (92% regulados a la baja y 8% sobre-expresados en las mujeres con FRI respecto al perfil endometrial de las fértiles).

En base también a la necesidad de contar con muestras procedentes de biopsias endometriales para ser procesadas en estos estudios, se ha producido un repunte en lo que se denomina “endometrial scratching” (daño local del

endometrio), como procedimiento empírico que parece incrementar la receptividad endometrial en las pacientes con FRI. Aunque todavía carecemos de una metodología contrastada (desconocemos cuántas biopsias son necesarias realizar en el ciclo natural previo a la estimulación, cuál sería el momento más adecuado para llevarlas a cabo o si una sola sería suficiente), diversos estudios señalan que el “scratching” induce un incremento significativo de macrófagos (células HLA-DR+, CD11c+), de citoquinas proinflamatorias, TNF- α , oncogenes GRO- α , IL-15 y Proteínas inflamatorias de macrófagos 1B (MIP-1B), que producen un efecto estimulante directo, con una correlación positiva sobre la probabilidad de embarazo. En conclusión, la respuesta inflamatoria inducida por la biopsia podría facilitar la preparación del endometrio para la una mejor implantación embrionaria.

Dos meta-análisis (*El-Touky et al, 2012; Potdar et al, 2012*) señalan un incremento significativo de las tasas de embarazo tras la realización del scratch (tanto si éste se realiza guiado por HSC como si no). Sin embargo ambos meta-análisis pueden estar sesgados por algunos factores de confusión (scratch bajo control histeroscópico o no, mezcla de estudios prospectivos y retrospectivos, realización del scratch en distintas fases del ciclo previo e, incluso, en el mismo ciclo de la punción endometrial, poblaciones de estudio reducidas, no distinción entre transferencias en fresco y de embriones congelados...). Aún así, en el meta-análisis de Potdar (7 estudios controlados realizados sobre 2.062 pacientes con FRI a las que se les ha realizado una lesión local del endometrio mediante HSC o scratch endometrial en el ciclo previo a la estimulación ovárica para FIV-ICSI, excluyendo los estudios retrospectivos, los que se realizaban en el primer ciclo de FIV/ICSI y los que la intervención se practicó en el mismo ciclo o más de un mes antes de la estimulación ovárica), los datos son favorables al grupo sometido a la lesión endometrial de forma estadísticamente significativa. Sin embargo la combinación de ambas técnicas (HSC + scratch endometrial) no obtuvo significación estadística, con una tasa de gestación clínica combinada del 36.8% versus 23.1% (RR 1.71; IC95%: 1.44–2.02), lo que sugiere un cierto grado de heterogeneidad.

Sea como fuere, la revisión sistemática publicada en la Cochrane Library por Nastri (2012) señala que:

“El daño endometrial realizado en el ciclo previo al que se va a realizar la transferencia embrionaria incrementa las tasas de embarazo clínico y de nacidos vivos”, apuntando también que se debe evitar realizar el scratch el día de la punción folicular ya que reduce significativamente las tasas de embarazo clínico y de embarazo en curso (Nivel de evidencia Ia).

- **Síndrome Antifosfolípido y Trombofilias:**

El screening del Síndrome Anti-Fosfolípido (SAF) y de las trombofilias en el fallo de Implantación sigue suscitando algunas controversias. Tradicionalmente las trombofilias se han asociado con complicaciones durante el embarazo y con

los abortos de repetición. La revisión sistemática de Di Nisio et al. (2011), evalúa la posible asociación entre la trombofilia y el FRI. Analizan un total de 33 estudios (23 sobre anticuerpos antifosfolípido, 5 sobre trombofilias heredadas y 5 sobre ambos) que abarcan a 6.092 pacientes. Los resultados combinados de los estudios caso-control mostraron que las mutaciones del factor V Leiden fueron significativamente más frecuentes entre las mujeres con FRI, en comparación con las mujeres fértiles que tuvieron hijos o aquéllas que lograron el embarazo después de TRA (OR=3,08; IC95%: 1,77-5,36). La mutación del gen de la protrombina, de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), la deficiencia de proteína S, proteína C ó Antitrombina III no se asociaron con el FRI. Las mujeres con FRI presentaron una mayor frecuencia de anticuerpos anti-fosfolípido (OR=3,33; IC95%: 1,77-6,26) aunque se objetivó un alto grado de heterogeneidad entre los estudios ($I^2=75\%$; $p<0,00001$). Los estudios de cohortes prospectivos no mostraron asociaciones significativas entre la trombofilia y los resultados de los TRA. Aunque los estudios caso-control sugieren que las mujeres con FRI presentan con mayor frecuencia mutaciones del factor V Leiden y positividad de anticuerpos antifosfolípido, la evidencia no es concluyente y no está respaldada por los estudios de cohortes.

En cualquier caso, coincidimos con la sugerencia de Stern y Chamlev (2006), de que en las pacientes con FRI se debe descartar la presencia de:

- **Ac Antitiroideos**
- **Anticuerpos Antifosfolípido**
- **Trombofilias**

Así mismo, el grupo de Qublan (2006) sugiere que en los casos de FRI se debe solicitar:

- **Cariotipo en ambos miembros de la pareja.**
- **Estudio de trombofilias: la prevalencia aproximada en la población europea es del 15%, siendo la causa más frecuente la resistencia a la proteína C activada por la mutación del Factor V leyden. Pueden existir:**
 - **Mutaciones en genes específicos que originan un cambio en la actividad enzimática o en la cantidad de proteína, como la mutación del Factor V de Leiden, del gen de la Protrombina, de la proteína C y S, y la Antitrombina III.**
 - **Polimorfismos, como el del inhibidor del activador del Plasminógeno tipo 1 (PAI-1).**
 - **Anticuerpos contra las proteínas de la coagulación y otras condiciones adquiridas, como la hiperhomocisteinemia.**

PANEL DE ESTUDIO BÁSICO DE TROMBOFILIAS:

- Mutación G1691A en gen de factor V Leiden.
- Mutación C677T homocigota en gen de Metilen Tetrahidrofolato Reductasa (MTHFR)
- Mutación G20210A en gen de protrombina.
- Déficit de Antitrombina III.
- Déficit de Proteína C funcional.
- Déficit de proteína S libre.
- Resistencia a Proteína C activada.
- Anticoagulante lúpico.
- Anticuerpos anticardiolipina Ig G e Ig M.

PANEL DE ESTUDIO DE TROMBOFILIAS DE SEGUNDA LÍNEA:

- Factor VIII Coagulante.
- Detección del polimorfismo inhibidor del PAI-1.
- Homocisteinemia homocigota.
- ADMA (Dimetil Arginina Asimétrica).
- Ac. Anti B2 Glicoproteínas Ig G e Ig M.
- Polimorfismo de la Enzima Convertidora de la Angiotensina (ECA).

Aunque el Síndrome antifosfolípido (SAF) permanece como un enigma parcial para los especialistas, la existencia de Ac. antifosfolípido, como el antifosfatidilinositol, antiacidofosfatídico y anticardiolipinas, generalmente asociados a la presencia de anticoagulante lúpico, ha sido vinculada al aborto recurrente y a la toxemia gravídica hipertensiva. Ahora bien, no pasa de ser una relación causal y no hay posibilidad de asegurar con certeza que su tratamiento permita el normal desarrollo del embarazo. La documentación científica entre SAF y FRI es contradictoria, sin que se hayan obtenido los resultados terapéuticos que se previeron al vincular este fallo inmunológico con el fallo reproductivo. En cualquier caso, el estudio de Sauer et al. (2010) muestra que en las mujeres con FRI existe un incremento en la prevalencia de: Ac Anticardiolipina (CL), Ac Antifosfatidil-etanolamina (PE), Ac Antifosfatidilinositol, Ac Acido Antifosfatidico (PA), Ac Antifosfatidil-glicerol (PG), Ac Antifosfatidil-colina (PC) y Ac Antifosfatidil-serina (PS).

El diagnóstico del Síndrome Antifosfolípido (SAF) requiere de la presencia de **al menos un criterio clínico y un criterio de laboratorio** (*Levine et al, 2002*):

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DEL SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO:

Criterios Clínicos:

- 1 ó + trombosis arteriales o venosas.
- 1 ó + abortos inexplicables después de la semana 10
- 1 ó + nacimiento prematuro antes de la semana 34
- 3 ó + abortos espontáneos antes de 10ª semana

Criterios de laboratorio:

- Anticuerpos anticardiolipina Ig G o Ig M en títulos moderados a altos en 2 ó más ocasiones, con un intervalo de al menos 6 semanas.
- Anticuerpos anticoagulante lúpico positivo en 2 ó más ocasiones, con un intervalo de al menos 6 semanas.

II.- 2º.- DESARROLLO EMBRIONARIO DEFECTUOSO.

El supuesto de que las aneuploidías embrionarias sean la causa principal del FRI permanece controvertido. Hoy por hoy carecemos de un cuerpo de evidencia que indique que los embriones de las mujeres con FRI tengan un mayor porcentaje de aneuploidías. La frecuencia de aneuploidías en embriones de mujeres con FRI es del 67% en el estudio de Pehlivan et al. (2003), similar al ofrecido por Baart et al. (2006) en población sin esa condición (64%). Aún así, otros autores sugieren a las anomalías cromosómicas como posible etiología del FRI, a través de la disregulación de las secuencias normales de replicación y segregación cromosómicas durante las fases embrionarias precoces (*Margalioth et al, 2006; Platteau et al, 2006*). El trabajo de Taranissi et al. (2005) apunta a que el PGS con FISH, analizando 9 cromosomas (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y), objetiva un porcentaje de blastómeras aneuplóides mayor en el FRI (54-57%) que en los diversos grupos controles (34-36 %).

Así mismo se ha sugerido que un endurecimiento de la zona pelúcida en los embriones generados por pacientes con FRI, lo que se asociaría a una menor tasa de implantación, al verse afectada la eclosión (*De Vos, 2000*).

Finalmente, Aoki et al. (2005), señalan que unas condiciones subóptimas de cultivo también podrían estar en el origen del FRI. Los autores apuntan a que no todos los medios de cultivo son equivalentes, especialmente en aquellos casos en los que se ha llevado a cabo una ICSI.

II.- 3º.- OTRAS CAUSAS MULTIFACTORIALES DEL FRI:

Existiría, finalmente, un último apartado de posibles causas que pueden haber pasado inadvertidas durante los primeros ciclos fallidos de FIV-ICSI, y que pueden tener su influencia en algunos casos de FRI. Entre ellas cabe señalar:

- **Endometriosis:** todos los biomarcadores del proceso reproductivo, incluyendo la respuesta ovárica, la calidad embrionaria, las tasas de implantación y las tasas de embarazo, están reducidas en la endometriosis (especialmente en la enfermedad grave) (*Barhart et al, 2002; Kuivasaari et al, 2005; Tomassetti et al 2006*).
- **Hidrosalpinx:** los fluidos alcalinos del hidrosalpinx contienen citoquinas, prostaglandinas y otras moléculas proinflamatorias. Estos compuestos pueden ejercer una toxicidad embrionaria directa o afectar adversamente el endometrio (*Saito et al, 2000; Loutradis, 2005*). No siempre es posible descartar un hidrosalpinx mediante ecografía, por lo que en caso de duda o sospecha es conveniente indicar una laparoscopia.
- **Estimulación folicular subóptima:** como ya se ha expuesto, una HOC que se acompañe de niveles elevados de progesterona sérica en el día de la administración de hCG, con independencia del análogo de GnRH

utilizado, se asocia a una reducción de las tasas de embarazo en curso si se realiza la transferencia en fresco (Bosch et al, 2010; Venetis et al, 2013 y 2015).

III.- POSIBILIDADES DE INTERVENCIÓN EN EL FRI:

Evidentemente, si tras los estudios diagnósticos expuestos se logra encontrar una causa que justifique el FRI (lesiones endometriales sutiles tras la histeroscopia, trombofilias, etc...) la actuación terapéutica irá encaminada a aplicar los tratamientos específicos más adecuados. Pero dado que en la mayoría de los casos de FRI desconocemos su origen exacto, las posibilidades de intervención nunca estarán exentas de un cierto grado de empirismo. De una forma resumida diríamos que estas medidas podrían agruparse en:

1º.- Actuaciones sobre la receptividad endometrial.

2º.- Actuaciones sobre los gametos o los embriones.

3º.- Otras actuaciones.

III. 1º.- Actuaciones para intentar mejorar la RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL:

Scratch endometrial: realizar una o más biopsias endometriales ("scratching endometrial") durante el ciclo natural previo al ciclo estimulado. Aunque como ya quedó reflejado, hoy por hoy desconocemos cuántas biopsias son necesarias o cuál es el momento del ciclo más adecuado para llevarlas a cabo, puede favorecer la receptividad endometrial en el ciclo posterior.

Histeroscopia diagnóstica (HSC): realizar una histeroscopia diagnóstica, con corrección quirúrgica si procede de una patología intracavitaria que haya podido pasar desapercibida en la histerosalpingografía (HSG) y en los estudios ecográficos. En este sentido, además de los estudios clínicos ya señalados con anterioridad, Karayalcin et al. (2010) tras la revisión de 2.500 histeroscopias, describen un porcentaje del 22,9% de lesiones endometriales sutiles: pólipos endometriales (7,7%), septos (5,2%), miomas (3,8%), úteros bicornes (1,1%), endometriosis polipoideos (1,2%), adherencias intracavitarias (1,1%), hiperplasia endometrial (0,9%), endometritis (0,5%), pólipos cervicales (0,5%) y estenosis cervicales (0,1%).

Así mismo, existen dos estudios prospectivos randomizados sobre el papel de la histeroscopia previa al ciclo y su influencia en el éxito final (Demiroglu y Gurgan, 2004; Rama Raju et al, 2006). Ambos utilizan la misma sistemática, comparando tres subgrupos de pacientes: un primero en el que no se realiza histeroscopia previa al ciclo de FIV; un segundo en el que se realiza histeroscopia previa en la que no se objetivan hallazgos patológicos; y un tercer grupo en el que la histeroscopia revela lesiones sutiles susceptibles de ser corregidas. El estudio de Rama Raju et al. abarca a 520 pacientes con histerosalpingografía y ecografía transvaginal normales prospectivamente aleatorizadas. Tanto en el

subgrupo con HSC normal, como en el de HSC con hallazgos patológicos que fueron corregidos, las tasas de embarazo clínico fueron significativamente superiores al del subgrupo en el que la HSC no se llevó a cabo (44,4%; 39,55%; 26,2%, respectivamente; $p < 0.05$).

Finalmente el estudio de Demiroglu y Gurgan investiga específicamente a 421 pacientes con FRI, prospectivamente aleatorizadas en los mismos 3 subgrupos mencionados en el párrafo anterior. De nuevo las tasas de embarazo clínico de los subgrupos con HSC normal (32,5%) y HSC patológica con hallazgos corregidos (30,4%) fueron significativamente superiores a las del grupo en el que no se llevó a cabo la HSC (21,6%) ($p < 0.05$).

Miomectomía: aunque, como ya hemos comentado, el impacto que puedan tener los miomas intramurales que no distorsionan la cavidad en el FRI es todavía motivo de controversia, si no se encuentran otras posibles causas, podría plantearse la posibilidad de llevar a cabo una miomectomía. Desgraciadamente, en el momento actual, el problema metodológico de los trabajos que apuntan a mejores resultados clínicos con posterioridad a la miomectomía, es la ausencia de estudios prospectivos.

Incrementar el flujo vascular subendometrial y/o Mejorar el grosor endometrial: otra posibilidad terapéutica en aquellos casos en los que el FRI se asocia con endometrios ultrasónicamente poco desarrollados, es la de intentar incrementar el grosor endometrial o mejorar el flujo vascular subendometrial. Aunque se ha ensayado con múltiples procedimientos y diferentes agentes (Pentoxifilina + Vitamina E, Sildenafil, altas dosis de estrógenos administrados por vía oral o vaginal, Dosis bajas de Acido acetil salicílico), ninguno de ellos registra en la literatura evidencia suficiente (Lédée-Bataille et al, 2002; Sher et al, 2004; et al, 2008).

Criopreservar los embriones para transferirlos en un ciclo posterior: distintos autores sugieren que esta ventaja podría explicarse a través de una más adecuada sincronía embrio-endometrial en los ciclos de Transferencia de embriones criopreservados (TEC), gracias a una preparación más fisiológica del endometrio, más eficiente y menos afectada por el proceso de HOC (Margalioth et al, 2006; Devroey et al, 2011). El meta-análisis publicado por Roque et al (2013), evidencia por primera vez que los resultados de los ciclos de FIV-ICSI se pueden mejorar mediante la realización sistemática de la TEC. Esta revisión muestra que la estrategia universal de la TEC en pacientes con respuesta folicular normal o alta se asocia con mejores resultados, comparada con la transferencia de embriones en fresco.

Transferencia personalizada: la tecnología de microarrays ha permitido la identificación de la señal transcriptómica de receptividad en la ventana de implantación. Esta tecnología ha conducido al desarrollo de una herramienta de diagnóstico molecular, el test ERA (*Endometrial Receptivity Array*) para el diagnóstico del momento óptimo de receptividad endometrial (Díaz Gimeno, 2011). El uso de este test en pacientes con FRI ha demostrado que la ventana de implantación se desplaza en una cuarta parte de estas pacientes y que el uso

de una transferencia embrionaria personalizada en el día designado por el test ERA mejora el rendimiento reproductivo (Ruiz-Alonso, 2013; Mahajan, 2015).

Inmunoterapia: mientras los estudios de prospectivos, randomizados y doble ciego de Balasch et al. (1996) y Stephenson et al. (2000) no mostraron beneficio en las pacientes con FRI tratadas con inmunoglobulinas intravenosas (IVIG), el estudio de Elram et al (2005) consiguió que 7 de 10 pacientes con FRI obtuvieran un embarazo en curso. El tratamiento consistió en la administración de dos dosis de 30 g IVIG iv. (una antes de la punción folicular y otra tras constatar el embarazo por ecografía). También Yoshioka et al. (2006) publican una serie de 17 pacientes con FRI a quienes se trata con una perfusión intrauterina de células mononucleares autólogas de sangre periférica (PBMCs). Las PBMCs se obtuvieron el día de la recuperación ovocitaria, cultivándose con hCG durante 4 días y posteriormente perfundiéndose en la cavidad uterina mediante un catéter convencional de transferencia. Llevaron a cabo la transferencia de Blastos en día +5. El grupo tratado con PBMCs obtuvo una tasa de implantación significativamente mayor (23,4% vs 4,1%; $p=0,011$), una tasa de embarazo clínico significativamente mayor (41,2% vs 11,1%; $p=0,042$) y una tasa de nacidos vivos también significativamente superior al del grupo no tratado (35,3% frente a 5,5%; $p=0,028$).

Aunque existen diversos estudios que sugieren el beneficio del tratamiento con Intralípidos o IVIG en las pacientes con FRI, uno de los más amplios es el publicado por Ramos Medina et al. (2014) quienes analizan las subpoblaciones de células NK (CD3-CD56bright, CD16+CD56+, CD16+CD56-), mediante citometría de flujo multiparamétrica, en un subgrupo de 90 pacientes con FRI (edad media, 34.9 ± 5.5 años) y en 32 mujeres control con fertilidad demostrada. Los porcentajes de células NK fueron significativamente superiores en las mujeres con FRI ($p=0.001$) que en las controles. Mediante curvas ROC, obtienen como punto de corte el 12% de células NK en sangre, que ofrece un 46% de sensibilidad y un 76% de especificidad. Mujeres con NKs >12% presentaban mayor frecuencia de pérdida fetal ($p < 0.0001$) que aquellas cuyo porcentaje de NKs era $\leq 12\%$. Aplicando IVIG en dosis de inducción durante el ciclo de FIV (400 mg/kg de peso semanalmente) y de mantenimiento, si se producía el embarazo (200 mg/kg de peso cada 3 semanas hasta la 35ª semana), obtienen unos excelentes resultados de embarazo clínico. Pero es menester volver a citar el meta-análisis de Tang et al. (2011) donde se señala la necesidad de más estudios para confirmar o refutar la función de las células NK como prueba predictiva en la detección de las mujeres con FRI que pudieran beneficiarse de inmunoterapia. La heterogeneidad de la mayor parte de lo publicado obliga, hoy por hoy, a mantener una actitud prudente y basada siempre en estudios inmunológicos rigurosos, a la hora de establecer la indicación de la inmunoterapia en pacientes con FRI.

Finalmente, se ha abierto una reciente línea de investigación con el estudio de los KIR (*Killer Immunoglobulin-like Receptors*), una familia de receptores de superficie de la NKs. Diversos estudios demuestran una significativa mayor incidencia de fracaso reproductivo de repetición en mujeres con genotipo KIR AA embarazadas de fetos que expresan HLA-C2 exclusivamente paterno. La

ausencia del activador de KIR2DS1 (haplotipo A) aumenta no solo el riesgo de FRI sino también de complicaciones durante el embarazo (Wang S et al; 2007). De hecho, se ha descrito que las gestaciones en madres homocigotas para KIR AA comparado con madres heterocigotas KIR AB o BB tienen un riesgo más elevado de abortos recurrentes, pre-eclampsia o CIR (Hiby SE et al, 2004, 2008 y 2014; Farrell et al, 2014; Long et al, 2015). El estudio retrospectivo de Alecsandru et al (2014) sobre 291 pacientes con FRI o abortos recurrentes (1.304 ciclos de FIV), evaluando la influencia del haplotipo KIR materno sobre la posibilidad de embarazo, aborto y RNV después de transferir dos embriones (DET) o de la transferencia selectiva de 1 embrión (SET), separando el origen de los ovocitos (propios o donados), objetiva un incremento significativo en la tasa de aborto por embrión transferido con la DET ($p=0,03$) en la mujeres con haplotipo KIR AA (22,8%) comparado con las de los haplotipos KIR AB (16,7%) y KIR BB (11,1%), así como un descenso significativo de las tasas de RNV por embrión transferido después de DET en los ciclos de Ovodon de mujeres homocigotas KIR AA (7,5%) comparado con las mujeres con haplotipos KIR AB (26,4%) y KIR BB (21,5%) ($p=0,006$). Por ello, en este tipo de situaciones (FRI en mujeres con haplotipo AA y varones con HLA-C2) los autores sugieren la transferencia selectiva de un único embrión.

Glucocorticóides: el tratamiento combinado de Prednisona para la inmunosupresión y la combinación con Ácido acetil salicílico (AAS) a dosis bajas como agente anti-trombótico, iniciado antes de la estimulación de la ovulación, puede mejorar la tasa de embarazo en pacientes con autoanticuerpos que han tenido fracasos repetidos de implantación en FIV. En este sentido, el trabajo prospectivo de Geva et al. (2000) realizado en 52 pacientes seropositivas para Anticuerpos no órgano-específicos: Ac Anticardiolipina (ACA), Ac Antinucleares (ANA), Ac anti-doble cadena de ADN (ds), Factor reumatoide (FR) y Anticoagulante Lúpico (LAC), que fueron tratadas con Prednisona (10 mg/día) + AAS (100 mg/día) durante las 4 semanas que precedieron a la estimulación para FIV, obtuvo una tasa de embarazo clínico por ciclo del 32,7% (17/52), sin mayor incidencia de complicaciones durante el embarazo.

Heparina de bajo peso molecular (HBPM) en pacientes CON Trombofilia: el estudio prospectivo aleatorizado de Qublan et al. (2008) en 42 mujeres con FRI y trombofilia, tratadas con Enoxaparina (40 mg/día) obtuvo tasas de implantación (20,9% vs 6,1%; $p<0.01$), de embarazo clínico (31% vs 9,6%; $p<0.05$) y de nacido vivo (23,8% vs 7,8%; $p<0.05$) significativamente superiores a las del grupo control.

Heparina de bajo peso molecular (HBPM) en pacientes SIN Trombofilia: tanto en el estudio de Stern et al. (2003), como en el estudio prospectivo de Urman et al. (2009), la administración empírica de HBPM mejoró significativamente las tasas de de implantación, de embarazo clínico y de nacido vivo frente al grupo placebo. Este último estudio incluyó a 144 parejas con dos o más ciclos de transferencia de buenos embriones sin éxito, cavidad uterina normal evaluada por histeroscopia, cariotipo normal y resultados negativos en el estudio de Trombofilias. La administración aleatoria de HBPM o placebo se iniciaba al día siguiente de la punción folicular y se mantenía, como

mínimo, hasta el test de embarazo positivo. Los mecanismos potenciales de la HBPM en la implantación parecen estar en relación con la mejora de algunos pasos requeridos para el proceso de implantación y con el brote angiogénico (vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular; activación de las proteasas que llevan a degradación de la membrana basal; incremento, proliferación, migración y ensamblaje de las células endoteliales para formar un túbulo con lumen permeable; selección de pericitos fuera de los capilares para formar vasos estables).

III 2º.- Actuaciones sobre los gametos o los embriones:

Gameto masculino: en el caso de que los parámetros seminales estuvieran muy alterados, puede ser útil la investigación de la fragmentación del DNA espermático. Si éste estuviera alterado, se ha postulado que el tratamiento médico específico puede mejorar la calidad espermática (*Isidori et al, 2006*), particularmente con el uso de antioxidantes (*Greco et al, 2005*). También se ha postulado la selección de espermatozoides con menores niveles de daño oxidativo (*Sakkas y Alvarez, 2010*) mediante el uso de columnas de Anexina-V (*Jakab et al, 2005; Said et al, 2005 y 2006*) o IMSI (*Bartoov et al, 2003; Souza Setti et al, 2010; Oliveira et al, 2011*). Por último, basado en la observación de que el daño del DNA es menor en los túbulos seminíferos que en el epidídimo o en el eyaculado en fresco (*Greco et al, 2005; Suganuma et al, 2005*), se ha propuesto el uso de espermatozoides procedentes del testículo. La indicación de esta técnica en parejas con FRI ha obtenido en los trabajos publicados por Greco et al (2005) y Weissman et al (2008) una tasas de embarazo significativamente superiores, aunque se requieren más estudios prospectivos que confirmen este posible beneficio.

Eclosión Asistida (Assisted Hatching): tres meta-análisis confirman que las tasas de nacidos vivos no son superiores realizando eclosión asistida que en los grupos control (*Seif et al, 2009; Martins et al, 2011; Das et al, 2012*). El Practice Committee de la ASMR en 2006 expone que, aunque se han observado tasas de embarazo clínico y de implantación superiores después de una eclosión asistida, las tasas de RNV no han mejorado de forma significativa, quizá debido a que los pequeños tamaños muestrales de los estudios no han tenido el poder suficiente para detectar una diferencia estadística.

Diagnóstico genético preimplantatorio (DGP) y Screening preimplantatorio de aneuploidías (PGS): como ya señalamos, el valor del DGP y del PGS en el FRI es controvertido. Hoy por hoy carecemos de un cuerpo de evidencia que indique que los embriones de las mujeres con FRI tengan un mayor porcentaje de aneuploidías. La frecuencia de aneuploidías en embriones de mujeres con FRI fue del 67% en el estudio de Pehlivan et al. (2003) y del 69,2% en el estudio de Rubio et al. (2013), porcentajes similares al ofrecido por Baart et al. (2006) en población sin FRI (64%). Otros autores, sin embargo sí sugieren que las anomalías cromosómicas embrionarias están en el origen etiológico del FRI (*Taranissi et al, 2005; Margalioth et al, 2006; Platteau et al, 2006*).

El estudio de Rubio et al (2013) compara en mujeres con RIF la estrategia del PGS (n=93) frente a la de transferencia de Blastocistos (n=90). Los resultados arrojan un mayor beneficio del PGS, tanto en tasa de embarazo por transferencia (51,4 % con PGS y 24,3% con transfer de blastos), como en tasa de nacido vivo por paciente (32,3 % con PGS y 15,5% con transfer de blastos; p=0,0099. CI95%: 1.26-5,29; OR: 2,585) y en tasa de nacido vivo por ciclo iniciado (23,6 % con PGS y 10,9% con transfer de blastos; p=0,0081. CI95%: 0,19-0,79; OR: 0,7916). La metodología de este estudio fue criticada posteriormente por Mastenbroek (2013).

Dos estudios randomizados que evalúan el PGS con FISH en mujeres con FRI no mostraron beneficio (*Gianaroli et al, 1999; Werlin et al, 2003*). La revisión de Donoso et al. (2007) también concluye que el uso rutinario del PGS mediante FISH no debe ser aconsejado, en base a los errores diagnósticos derivados de la alta tasa de mosaicismo (*Harper et al, 1995; Munné et al, 1997; Voullaire et al, 2000; Wilton et al, 2009*), que puede llegar a afectar hasta al 50% de los embriones en los primeros estadios de división, máxime si se realiza la biopsia de una sola blastómera. El beneficio de intentar corregir estos diagnósticos erróneos, realizando la biopsia de 2 blastómeras, puede no estar compensado por la disminución de la capacidad implantatoria de los embriones biopsiados (*Cohen et al, 2007; Goossens et al, 2008*).

Sin embargo estamos viviendo un periodo de transición entre el “viejo” procedimiento del DGP/PGS mediante FISH y el nuevo mediante arrays de Hibridación Genómica Comparativa (aCGH) y arrays de Polimorfismos de Nucleótido Único (SNP) (*Fragouli et al, 2008; Northrop et al, 2010*), que ofrecen una capacidad diagnóstica significativamente superior. El aCGH detecta aneuploidías en todos los cromosomas, un 50% más anomalías que la FISH-12 y un 20% más de embriones anormales (*Colls et al. 2009*). El resultado se puede obtener en 24h, lo que permite biopsiar tanto corpúsculos polares (CP) o blastómeras en D+3 y transferir en ciclo en fresco, o bien realizar una biopsia de trofoectodermo en D+5 y criopreservar los embriones euplóides. La biopsia de trofoectodermo es además menos deletérea para la viabilidad embrionaria (*Fragouli et al, 2010 y 2011; Schoolcraft et al, 2010*). En el estudio de Hodes-Wertz et al. (2012) aplicando aCGH a 2.282 embriones de mujeres con abortos idiopáticos de repetición, la biopsia de trofoectodermo en D+5 presentó una clara ventaja sobre el D+3, en cuanto a tasa de embarazo, incluso aunque se transfirieran menos embriones y obtuvo una tasa de aborto considerablemente más baja de la esperada, tanto en el grupo de edad de mujeres de <35 años (tasa esperada del 26,3%, frente al 3,3% obtenida tras la biopsia de trofoectodermo), como en el de >35 años (tasa esperada del 36,7% frente al 8,6% obtenida tras la biopsia de trofoectodermo), sin diferencias significativas entre ambos grupos de edad. Aún así, se necesitan más estudios que confirmen en qué medida el uso rutinario del DGP/PGS con aCGH puede ser beneficioso en las mujeres con FRI.

Transferencia en estadio de Blastocisto: diversos estudios sugieren que el cultivo prolongado hasta el estadio de Blastocisto (D+5 ó D+6) incrementa la probabilidad de implantación (*Marek et al, 1999; Cruz et al, 1999; Gardner et al, 2000 y 2004; Guerif et al, 2004; Levitas et al, 2004; Machtinger et al, 2006*). La revisión para la Cochrane Database realizada por Blake et al. (2007), apoya esta estrategia

sobre la base de una mejor selección de los embriones a transferir y una mejor sincronía embrio-endometrial (**Recomendación grado A; nivel de evidencia Ia**). El estudio posterior de Papanikolaou et al. (2008) demuestra un significativo incremento en las tasas de nacidos vivos por ciclo y por embrión transferido. En las mujeres con FRI se debe considerar la estrategia del cultivo largo y transferencia de Blastos si no se ha llevado a cabo en ciclos anteriores (**Recomendación GPP**).

III 3º.- Actuaciones sobre OTRAS CAUSAS:

Endometriosis: en caso de que tras varios fallos sucesivos de implantación, se llevara a cabo una laparoscopia que evidenciara una endometriosis, su tratamiento siempre irá referido al propuesto en la guía de diagnóstico y tratamiento de la ESHRE (*Kennedy et al, 2005; ESHRE guideline 2007; Lotte et al, 2011*). De una forma resumida, puntualizamos algunas propuestas específicas de dicha guía:

- **Tratamiento hormonal de la endometriosis:** la supresión de la función ovárica para mejorar la fertilidad de las pacientes con endometriosis mínima y leve no es eficaz, y no debería ofrecerse sólo con esta indicación. La evidencia disponible no alude a estadios más avanzados de la enfermedad. **Recomendación grado A (Nivel de evidencia Ia).**
- **Tratamiento quirúrgico de la endometriosis:** la ablación de las lesiones endometriósicas más la adhesiolisis destinadas a mejorar la fertilidad en casos de endometriosis mínima y leve son más eficaces que la laparoscopia diagnóstica aislada. **Recomendación grado A (Nivel de evidencia Ia).** La quistectomía laparoscópica de quistes ≥ 4 cm incrementa más la fertilidad posterior que el drenaje y la coagulación. La coagulación o fotovaporización de la pseudocápsula se asocia a mayor riesgo de recurrencia en comparación con la escisión. **Recomendación grado A (Nivel de evidencia Ib).**
- **Tratamiento postoperatorio de la endometriosis:** el tratamiento postoperatorio con danazol o agonistas GnRH no mejora la fertilidad en comparación con la conducta expectante. **Recomendación grado A (Nivel de evidencia Ia).**

Hidrosalpinx: las conclusiones del meta-análisis de Johnson et al, publicado en la Cochrane Database en 2010, se resumirían en que:

- El tratamiento quirúrgico debe ser considerado en todas las mujeres con hidrosalpinx antes de iniciar un tratamiento de FIV (**Recomendación GPP**).
- Los estudios incluidos demuestran la utilidad de la salpinguectomía en tanto en los hidrosalpinx unilaterales como en los bilaterales (**Recomendación grado A; nivel de evidencia Ia**).
Esta revisión proporciona la evidencia de que la oclusión tubárica perlaparoscópica (salpingocleisis proximal) es una alternativa útil a la salpinguectomía para mejorar las tasas de embarazo de la FIV en aquellas

mujeres en las que la resección del hidrosálpinx no esté exenta de complicaciones (**Recomendación grado A; nivel de evidencia Ib**).

- En aquellas mujeres en las que los tratamientos quirúrgicos pueden representar un riesgo evidente de complicación (obesidad mórbida, pacientes con síndrome adherencial severo, mujeres con enfermedades que suponen un elevado riesgo quirúrgico, etc.), se ha propuesto el bloqueo tubárico histeroscópico mediante dispositivo Essure®, con el fin de evitar el drenaje de líquido hidrosalpingítico hacia la cavidad (**Recomendación GPP**). Esta técnica se lleva a cabo en consulta ambulatoria, y produce una reacción fibrosa que al cabo de tres meses conduce a la obstrucción de la trompa. Como el dispositivo solo está aprobado con fines anticonceptivos y en su ficha técnica no se incluye esta indicación, actualmente hay que utilizarlo como medicación de uso compasivo o en el ámbito de un estudio clínico que haya sido aprobado por un comité ético. Por ello hasta la fecha se han publicado pocos trabajos, con un escaso número de pacientes, aunque las perspectivas parecen prometedoras (*Kerin et al, 2007; Mijatovic et al, 2012; D'Arpe et al; 2014*). En la revisión sistemática de Arora et al. (2014), de 115 mujeres incluidas en 11 estudios, la inserción del Essure® logró el bloqueo tubárico en el 98.1% (CI95%:93.1-99.9%) y la FIV posterior dio lugar a una tasa de embarazo del 38,6% (CI95%: 30,9-46,8%), de embarazo en curso del 28.6% (CI95%: 21,1-35,8%) y de nacidos vivos por transferencia embrionaria del 27.9% (CI 95%: 21,7-36,6%).

Transferencia embrionaria difícil: la transferencia embrionaria dificultosa ha sido identificada como un paso limitante en el éxito de un ciclo de FIV. Diversos estudios ponen de manifiesto que cuanto mayor sea el tiempo transcurrido desde que se inicia la canalización del cervix hasta la descarga embrionaria, mayor probabilidad existe de originar contracciones uterinas y menor probabilidad de implantación (*Fanchin et al, 2001; Matorras et al, 2004*). Por ello, en este tipo de transferencias se ha propuesto desde la histeroscopia en ciclo previo (cervico-histeroscopia) para intentar permeabilizar una estenosis del canal o liberar pequeñas adherencias en cuellos conglutinados, hasta la dilatación cervical histeroscópica (*Serhall, 2003; Prapas, 2004*) o la transferencia bajo sedación (*Urman et al, 2005; El-Toukhy et al, 2008*).

Soporte de fase lútea: un endometrio con desarrollo inadecuado durante la ventana de implantación puede contribuir al fallo de implantación. Son evidentes los resultados de la suplementación lútea de progesterona en la mejora de las posibilidades de embarazo. Aunque se desconoce el mecanismo de acción exacto, la hipótesis es que esté mediado por un bloqueo de la actividad Th1 y por una estimulación de la liberación de citoquinas Th2, lo que favorecería la tolerancia inmunológica para la implantación embrionaria (*Nardo et al, 2006*).

Estilo de vida: existe evidencia de que el tabaquismo se asocia a un incremento de las necesidades de gonadotropinas durante la HOC, a un menor número de ovocitos recuperados, a un incremento de fallos de fecundación y a tasas más bajas de implantación (*Hughes y Brennan, 1996; Van Voorhis et al, 1996; Klonoff-Cohen et al, 2001; Waylen et al, 2009; Firns et al, 2015*). Así mismo, las mujeres con un IMC < 19 kg/m² y las mujeres con sobrepeso (IMC > 29 kg/m²) deben ser

animadas a recuperar un IMC óptimo antes de realizar un nuevo intento de FIV. En casos de obesidad mórbida debe ser considerada la cirugía bariátrica o el uso de balones intragástricos, contraindicándose la realización de un nuevo ciclo de FIV antes del año que sucede a la cirugía (*Practice Committee ASRM, 2015*). De lograrse el embarazo, diversos estudios sobre cirugía bariátrica no evidencian un mayor riesgo de morbilidad perinatal (*Marceau et al, 2004; Sheiner et al, 2004*), aunque sí una mayor incidencia de anemia ferropénica y deficiencias nutricionales (*Practice Committee ASRM, 2008*). Finalmente, está reconocido que el consumo de alcohol se asocia a un riesgo incrementado de aborto, parto prematuro y nacidos con bajo peso (*Windham et al, 1992; Mukherjee et al, 2005*). Las mujeres con FRI deben reducir el consumo de alcohol a una o dos copas/semana (*NICE guideline, 2004*) o guardar abstinencia durante el embarazo.

Soporte emocional: resulta evidente que si hoy en día aceptamos la necesidad de un abordaje multidisciplinar en cualquier TRA, lo que incluye un soporte emocional a cargo de especialistas en psicología de la reproducción, lo es más en este tipo de parejas donde los fracasos sucesivos, unidos al desconocimiento del motivo específico de su FRI, pueden conducir no solo a un incremento en los niveles de ansiedad o depresión, sino al abandono de nuevos ciclos de tratamiento (*Smeenk et al, 2004; Olivius et al, 2004; Boivin et al, 2011*).

Las Guías de Práctica Clínica de la SEF y de la SEGO pretenden contribuir al buen quehacer profesional de todos los ginecólogos, especialmente de los más alejados de los grandes hospitales y clínicas universitarias. Presentan métodos y técnicas de atención clínica aceptadas, contrastadas y utilizadas por especialistas en cada tema. Estas guías no deben interpretarse de forma rígida ni excluyente, sino que deben servir para la atención individualizada a las pacientes. No agotan todas las posibilidades, ni pretenden sustituir a los protocolos ya existentes en los Departamentos y Servicios Hospitalarios.

LECTURAS RECOMENDADAS

Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update* 2006; 12 (6): 731–746.

Alecsandru D, Garrido N, Vicario JL, Barrio A, Aparicio P, Requena A, García-Velasco JA. Maternal KIR haplotype influences live birth rate after double embryo transfer in IVF cycles in patients with recurrent miscarriages and implantation failure. *Hum Reprod* 2014; 29 (12): 2637 – 2643.

Aoki VW, Wilcox AL, Peterson CM, Parker-Jones K, Hatasaka HH, Gibson M et al. Comparison of four media types during 3-day human IVF embryo culture. *RBM online* 2005; 10 (5): 600–606.

Arora P, Arora RS, Cahill D. Essure® for management of hydrosalpinx prior to in vitro fertilisation-a systematic review and pooled analysis. *BJOG* 2014; 121 (5): 527-36.

Baart EB, Martini E, van den Berg I, Macklon NS, Galjaard RJ, Fauser BC, Van Opstal D. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2006; 21 (1): 223-233.

Baart EB, Martini E, van den Berg I, Macklon NS, Galjaard RJ, Fauser BC, Van Opstal D. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2006; 21 (1): 223-33.

Balasz J, Creus M, Fábregues F, Font J, Martorell J, Vanrell JA. Intravenous immunoglobulin preceding in vitro fertilization-embryo transfer for patients with repeated failure of embryo transfer. *Fertil Steril* 1996; 65 (3): 655-658.

Barhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilisation. *Fertil Steril* 2002; 77: 1148–1155

Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H et al. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril*. 2003; 80 (6): 1413-9.

Blake DA, Farquhar CM, Johnson N, Proctor M. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; (4): CD002118. Review. Update in: *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 7: CD002118.

Boivin J, Griffiths E, Venetis CA. Emotional distress in infertile women and failure of assisted reproductive technologies: meta-analysis of prospective psychosocial studies. *BMJ* 2011; 342: d223.

Bosch E, Labarta E, Crespo J, Simón C, Remohí J, Jenkins J, Pellicer A. Circulating progesterone levels and ongoing pregnancy rates in controlled ovarian stimulation cycles for in vitro fertilization: analysis of over 4000 cycles. *Hum Reprod* 2010; 25 (8): 2092-2100.

Bosteels J, Weyers S, Puttemans P, Panayotidis C, Van Herendael B, Gomel V et al. The effectiveness of hysteroscopy in improving pregnancy rates in subfertile women without other gynaecological symptoms: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2010; 16 (1): 1-11.

Bozdag G, Aksan G, Esinler I, Yarali H. What is the role of office hysteroscopy in women with failed IVF cycles?. *Reprod Biomed Online* 2008; 17 (3): 410-5.

Bulletti C, DE Ziegler D, Levi Setti P, Cicinelli E, Polli V, Stefanetti M. Myomas, pregnancy outcome, and in vitro fertilization. *Ann NY Acad Sci*. 2004; 1034: 84-92.

Cohen J, Wells D, Munne S. Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates. *Fertil Steril* 2007; 87 (3): 496–503.

Colls P, Goodall N, Zheng X, Munné S. Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy by testing 12 chromosomes. *Reprod Biomed Online* 2009; 19 (4): 532-8.

Coughlan C, Ledger W, Wang Q, Liu F, Demirol A, Gurgan T et al. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online*. 2014; 28 (1): 14-38.

D'Arpe S, Franceschetti S, Caccetta J, Pietrangeli D, Muzii L, Panici PB. Management of hydrosalpinx before IVF: a literature review. *J Obstet Gynaecol* 2015; 35 (6): 547-50.

Das M, Holzer HE. Recurrent implantation failure: gamete and embryo factors. *Fertil Steril* 2012; 97 (5): 1021-7.

De Vos A, Van Steirteghem A. Zona hardening, zona drilling and assisted hatching: new achievements in assisted reproduction. *Cells Tissues Organs* 2000; 166 (2): 220-227.

Demirol A, Gurgan T. Effect of treatment of intrauterine pathologies with office hysteroscopy in patients with recurrent IVF failure. *RBM online* 2004; 8 (5): 590-4.

Denis AL, Guido M, Adler RD, Bergh PA, Brenner C and Scott RT. Antiphospholipid antibodies and pregnancy rates and outcome in in vitro fertilization patients. *Fertil Steril* 1997; 67 (6): 1084–1090.

Devroey P, Polyzos NP, Blockeel C. An OHSS-Free Clinic by segmentation of IVF treatment. *Hum Reprod*. 2011; 26 (10): 2593-2597.

Di Nisio M, Rutjes AWS, Ferrante N, Tiboni GM, Cuccurullo F, Porreca E. Thrombophilia and outcomes of assisted reproduction technologies: a systematic review and meta-analysis. *Blood* 2011; 118 (10): 2670-2678.

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

Donnez J, Jadoul P. What are the implications of myomas on fertility?. A need for a debate?. *Hum Reprod* 2002; 17 (6): 1424-1430.

Donoso P, Devroey P. PGD for aneuploidy screening: an expensive hoax?. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007; 21 (1): 157-68.

Eldar-Geva T et al. Effect of intramural, subserosal, and submucosal uterine fibroids on the outcome of assisted reproductive technology treatment. *Fertil Steril* 1998; 70 (4): 687–691.

Eldar-Geva T, Wood C, Lolatgis N, Rombauts L, Kovacs G, Fuscaldo J and Trounson AO. Cumulative pregnancy and live birth rates in women with antiphospholipid antibodies undergoing assisted reproduction. *Hum Reprod* 1999; 14 (6): 1461–1466.

EIram T, Simon A, Israel S, Revel A, Shveiky D, Laufer N. Treatment of recurrent IVF failure and leukocyte antigen similarity by intravenous immunoglobulin. *RBM Online* 2005; 11 (6): 745–749.

El-Touhky T, Taranissi M. Towards better quality research in recurrent implantation failure: standardizing its definition is the first step. *RBM Online* 2006; 12 (3): 383-385

El-Touhky T, Sunkara S, Khalaf Y. Local endometrial injury and IVF outcome: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2012; 25 (4): 345–54.

El-Touhky T, Sunkara SK, Coomarasamy A, Grace J, Khalaf Y. Outpatient hysteroscopy and subsequent IVF cycle outcome: a systematic review and meta-analysis. *RBM Online* 2008; 16 (5): 712-719.

ESHRE PGD Consortium; *Hum Reprod* 2006. ESHRE PGD Consortium Steering Committee. ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). *Hum Reprod* 2002; 17 (1): 233-46.

Fanchin R, Ayoubi JM, Righini C, Olivennes F, Schönauer LM, Frydman R. Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers. *Hum Reprod* 2001; 16 (6): 1115-1119.

Farrell LE, Hiby SE, Apps R, Chazara O, Trogstad L, Gjessing HK et al. KIR and HLA-C: Immunogenetic regulation of human birth weight. *Norsk Epidemiologi* 2014; 24 (1-2): 107-110

Fatemi HM, Kasius JC, Timmermans A, van Dissel J, Fauser BC, Devroey P et al. Prevalence of unsuspected uterine cavity abnormalities diagnosed by office hysteroscopy prior to in vitro fertilization. *Hum Reprod* 2010; 25 (8): 1959–1965.

Firns S, Cruzat VF, Keane KN, Joesbury KA, Lee AH, Newsholme P, Yovich JL. The effect of cigarette smoking, alcohol consumption and fruit and vegetable consumption on IVF outcomes: a review and presentation of original data. *Reprod Biol Endocrinol* 2015; 13: 134.

Fragouli E, Alfarawati S, Daphnis DD, Goodall NN, Mania A, Griffiths T, Gordon A, Wells D. Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation. *Hum Reprod* 2011; 26 (2): 480-90.

Fragouli E, Katz-Jaffe M, Alfarawati S, Stevens J, Colls P, Goodall NN et al. Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure. *Fertil Steril* 2010; 94 (3): 875-87.

Gardner DK, Lane M, Schoolcraft WB. Culture and transfer of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF. *Hum Reprod* 2000; 15 Suppl 6: 9-23.

Geva E, Amit A, Lerner-Geva L, Yaron Y, Daniel Y, Schwartz T, Azem F, Yovel I, Lessing JB. Prednisone and aspirin improve pregnancy rate in patients with reproductive failure and autoimmune antibodies: a prospective study. *Am J Reprod Immunol* 2000; 43 (1): 36-40.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munné S. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril* 1999; 72 (5): 837-44.

Goossens V, De Rycke M, De Vos A, Staessen C, Michiels A, Verpoest W et al. Diagnostic efficiency, embryo development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 2007; 23 (3): 481– 92.

Greco E, Romano S, Iacobelli M, Ferrero S, Baroni E, Minasi MG et al. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Hum Reprod*. 2005; 20 (9): 2590-4.

Guerif F, Bidault R, Gasnier O, Couet ML, Gervereau O, Lansac J, Royere D. Efficacy of blastocyst transfer after implantation failure. *Reprod Biomed Online* 2004; 9 (6): 630-6.

Hiby SE, Apps R, Chazara O, Farrell LE, Magnus P, Trogstad L et al. Maternal KIR in combination with paternal HLA-C2 regulate human birth weight. *J Immunol* 2014; 192 (11): 5069-73.

Hiby SE, Walker JJ, O'shaughnessy KM, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, Moffett A. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med* 2004; 200 (8): 957-65.

Hiby SE, Regan L, Lo W, Farrell L, Carrington M, Moffett A. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2008; 23 (4): 972-6.

Hodes-Wertz B, Grifo J, Ghadir S, Kaplan B, Laskin CA, Glassner M, Munné S. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. *Fertil Steril* 2012; 98 (3): 675-80.

Horcajadas JA, Pellicer A, Simón C. Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. *Hum Reprod Update* 2007; 13: 77–86.

Horcajadas JA, Riesewijk A, Mínguez P, Dopazo J, Esteban FJ, Domínguez F et al. Gene expression analysis of the endometrium reveals that controlled ovarian stimulation induces a genomic delay with potential clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 4500–4510.

Horcajadas JA, Riesewijk A, Polman J, van Os R, Pellicer A, Mosselman S, Simón C. Effect of controlled ovarian hyperstimulation in IVF on endometrial gene expression profiles. *Mol Human Reprod* 2005; 11: 195–205.

Horcajadas JA, Sharkey AM, Catalano RD, Sherwin JRA, Domínguez F, Burgos LA et al. Use of gene-expression profiling to identify human endometrial refractoriness. *J Clin Endocrinol Metabol* 2006; 91: 3199–3207.

Isidori AM, Pozza C, Gianfrilli D, Isidori A. Medical treatment to improve sperm quality. *Reprod Biomed Online*. 2006; 12 (6): 704-14.

Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, et al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril*. 2005; 84 (6): 1665-1673.

Jerzak M, Kniotek M, Mrozek J, Górski A, Baranowski W. Sildenafil citrate decreased natural killer cell activity and enhanced chance of successful pregnancy in women with a history of recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2008; 90 (5): 1848-1853.

Johnson N, Mak W, Sowter MC. Surgical treatment for tubal disease in women due to undergo *in vitro* fertilisation. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; 20 (1): CD002125.

Johnston-MacAnanny EB, Hartnett J, Engmann LL, Nulsen JC, Sanders MM, Benadiva CA. Chronic endometritis is a frequent finding in women with recurrent implantation failure after *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 2010; 93 (2): 437-41.

Karayalcin R, Ozcan S, Moraloglu O, Ozyer S, Mollamahmutoglu L, Batioglu S. Results of 2500 office-based diagnostic hysteroscopies before IVF. *RBM Online* 2010; 20 (5): 689– 693.

Kennedy S et al. ESHRE Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium Guideline Development Group. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod* 2005; 20(10): 2698-2704.

Khalaf Y, Ross C, El-Toukhy T, Hart R, Seed P, Braude P. The effect of small intramural uterine fibroids on the cumulative outcome of assisted conception. *Hum Reprod* 2006; 21 (10): 2640–44.

Klonoff-Cohen H, Natarajan L, Marrs R, Yee B. Effects of female and male smoking on success rates of IVF and gamete intra-Fallopian transfer. *Hum Reprod* 2001; 16 (7): 1382-90.

Koler M, Achache H, Tsafrir A, Smith Y, Revel A, Reich R. Disrupted gene pattern in patients with repeated *in vitro* fertilization (IVF) failure. *Hum Reprod* 2009; 24 (10): 2541-48.

Kuivasaari P, Hippeläinen M, Anttila M, Heinonen S. Effect of endometriosis on IVF/ICSI outcome: stage III/IV endometriosis worsens cumulative pregnancy and live-born rates. *Hum Reprod* 2005; 20 (11): 3130-3135.

Labarta E, Martínez-Conejero JA, Alamá P, Horcajadas JA, Pellicer A, Simón C, Bosch E. Endometrial receptivity is affected in women with high circulating progesterone levels at the end of the follicular phase: a functional genomics analysis. *Hum Reprod* 2011; 26 (7): 1813-25.

Lédée-Bataille N, Olivennes F, Lefaix JL, Chaouat G, Frydman R, Delanian S. Combined treatment by pentoxifylline and tocopherol for recipient women with a thin endometrium enrolled in an oocyte donation programme. *Hum Reprod* 2002; 17 (5): 1249-1253.

Levine JS, Branch W, Rauch J. The Antiphospholipid Syndrome. *NEJM* 2002; 346 (10): 752-763.

Levitas E, Lunenfeld E, Har-Vardi I, Albotiano S, Sonin Y, Hackmon-Ram R, Potashnik G. Blastocyst-stage embryo transfer in patients who failed to conceive in three or more day 2-3 embryo transfer cycles: a prospective, randomized study. *Fertil Steril* 2004; 81 (3): 567-71.

Li R, Qiao J, Wang L, Li L, Zhen X, Liu P, Zheng X. MicroRNA array and microarray evaluation of endometrial receptivity in patients with high serum progesterone levels on the day of hCG administration. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9: 29-37.

Long W, Shi Z, Fan S, Liu L, Lu Y, Guo X, Rong C, Cui X, Ding H. Association of maternal KIR and fetal HLA-C genes with the risk of preeclampsia in the Chinese Han population. *Placenta*. 2015; 36 (4): 433-7.

Lotte VD, Nelen W, D'Hooghe TM, Dunselman G, Hermens R, Bergh C, Nygren KG et al. The European Society of Human Reproduction and Embryology guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis: an electronic guideline implementability appraisal. *Implement Sci* 2011; 6: 7-15.

Loutradis D; Stefanidis K; Kousidis I; Bletsas R; Drakakis P; Milingos S et al. Effect of human hydrosalpinx fluid on the development of mouse embryos and role of the concentration of

growth factors in culture medium with and without hydrosalpinx fluid. *Gynecol Endocrinol* 2005; 20 (1): 26-29.

Machtinger R, Dor J, Margolin M, Levron J, Baum M, Ferber B et al. Sequential transfer of day 3 embryos and blastocysts after previous IVF failures despite adequate ovarian response. *Reprod Biomed Online* 2006; 13 (3): 376-9.

Mahajan N. Endometrial receptivity array: Clinical application. *J Hum Reprod Sci* 2015; 8 (3): 121-9.

Makrakis E, Pantos K. The outcomes of hysteroscopy in women with implantation failures after in-vitro fertilization: findings and effect on subsequent pregnancy rates. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2010; 22 (4): 339-43.

Marceau P, Kaufman D, Biron S, Hould FS, Lebel S, Marceau S, Kral JG. Outcome of pregnancies after biliopancreatic diversion. *Obes Surg* 2004; 14 (3): 318-24.

Marek D, Langley M, Gardner DK, Confer N, Doody KM, Doody KJ. Introduction of blastocyst culture and transfer for all patients in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1999; 72 (6): 1035-40.

Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, Eldar-Geva T. Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. *Hum Reprod* 2006; 21 (12): 3036-3043.

Martins WP, Rocha IA, Ferriani RA, Nastri CO. Assisted hatching of human embryos: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Hum Reprod Update*. 2011; 17 (4): 438-53.

Mastenbroek S. One swallow does not make a summer. *Fertil Steril* 2013; 99 (5): 1205-6.

Matorras R, Hernández J (eds): *Estudio y tratamiento de la pareja estéril: Recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad, con la colaboración de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción, de la Asociación Española de Andrología y de la Sociedad Española de Contracepción*. Ed Adalia, Madrid 2007.

Matorras R, Mendoza R, Expósito A, Rodríguez-Escudero FJ. Influence of the time interval between embryo catheter loading and discharging on the success of IVF. *Hum Reprod* 2004; 19 (9): 2027-30.

Matteo MG, Greco P, Rosenberg P, Mestice A, Baldini D, Falagario T et al. Normal percentage of CD56 bright natural killer cells in young patients with a history of repeated unexplained implantation failure after in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2007; 88: 990-993.

Mukherjee RA, Hollins S, Abou-Saleh MT, Turk J. Low level alcohol consumption and the fetus. *BMJ*. 2005; 330 (7488): 375-6.

Nardo L, Sallam HN. Progesterone supplementation to prevent recurrent miscarriage and to reduce implantation failure in assisted reproduction cycles. *RBM Online* 2006; 13 (1): 47-57.

Nastri CO, Gibreel A, Raine-Fenning N, Maheshwari A, Ferriani RA, Bhattacharya S, Martins WP. Endometrial injury in women undergoing assisted reproductive techniques. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Jul 11; (7): CD009517.

Ng EH, Chan CC, Tang OS, Yeung WS, Ho PC. Endometrial and subendometrial blood flow measured by three-dimensional power Doppler ultrasound in patients with small intramural uterine fibroids during IVF treatment. *Hum Reprod* 2005; 20 (2): 501-506.

NICE Guidelines. Alcohol use disorders: Diagnosis, assessment and management of harmful drinking and alcohol dependence. Clinical guideline. 23 February 2011; www.nice.org.uk/guidance/cg115.

Northrop LE, Treff NR, Levy B, Scott RT Jr. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening demonstrates that cleavage-stage FISH poorly predicts aneuploidy in embryos that develop to morphologically normal blastocysts. *Mol Hum Reprod* 2010; 16 (8): 590-600.

Oliveira FG et al. Impact of subserosal and intramural uterine fibroids that do not distort the endometrial cavity on the outcome of in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2004; 81 (3): 582– 587.

Oliveira JB, Cavagna M, Petersen CG, Mauri AL, Massaro FC, Silva LF et al. Pregnancy outcomes in women with repeated implantation failures after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI). *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9: 99-105.

Olivius C, Friden B, Borg G, Bergh C. Why do couples discontinue in vitro fertilization treatment? A cohort study. *Fertil Steril* 2004; 81 (2): 258-61.

Papanikolaou EG, Kolibianakis EM, Tournaye H, Venetis CA, Fatemi H, Tarlatzis B, Devroey P. Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008; 23 (1): 91-9.

Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, Romero J, Remohi J, Simón C, Pellicer A. Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. *RBM Online* 2003; 6 (2): 232-237.

Platteau P, C Staessen C, Michiels A, Van Steirteghem A, Liebaers I, Devroey P. Which patients with recurrent implantation failure after IVF benefit from PGD for aneuploidy screening?. *RBM Online* 2006; 12 (3): 334-339.

Potdar N, Gelbaya T, Nardo LG. Endometrial injury to overcome recurrent embryo implantation failure: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2012; 25 (6): 561–71.

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine; Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology. Role of assisted hatching in in vitro fertilization: a guideline. *Fertil Steril*. 2014; 102 (2): 348-51.

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Obesity and reproduction: a committee opinion. *Fertil Steril* 2015; 104 (5): 1116-26.

Prapas N, Prapas Y, Panagiotidis Y, Prapa S, Vanderzwalmen P, Makedos G. Cervical dilatation has a positive impact on the outcome of IVF in randomly assigned cases having two previous difficult embryo transfers. *Hum Reprod* 2004; 19 (8): 1791-1795.

Qublan H, Amarin Z, Dabbas M, Farraj AE, Beni-Merei Z, Al-Akash H et al. Low-molecular-weight heparin in the treatment of recurrent IVF–ET failure and thrombophilia: A prospective randomized placebo-controlled trial. *Hum Fertil* 2008; 11 (4): 246-253

Qublan HS, Eid SS, Ababneh HA, Amarin ZO, Smadi AZ, Al-Khafaji FF, Khader YS. Acquired and inherited thrombophilia: implication in recurrent IVF and embryo transfer failure. *Hum Reprod* 2006; 21 (10): 2694–2698.

Rama Raju GA, Shashi Kumari G, Krishna KM, Prakash GJ, Madan K. Assessment of uterine cavity by hysteroscopy in assisted reproduction programme and its influence on pregnancy outcome. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2006: 274:160–164.

Ramos-Medina R, García-Segovia A, Gil J, Carbone J, Aguarón de la Cruz A, Seyfferth A, et al. Experience in IVIg therapy for selected women with recurrent reproductive failure and NK cell expansion. *Am J Reprod Immunol* 2014; 71 (5): 458-466.

Romero R, Espinoza J, Mazor M. Can endometrial infection/inflammation explain implantation failure, spontaneous abortion, and preterm birth after in vitro fertilization?. *Fertil Steril* 2004; 82 (4): 799-804.

Roque M, Lattes K, Serra S, Solá I, Geber S, Carreras R, Checa MA. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2013; 99 (1): 156-62.

Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, Bosch E, Mercader A, Vidal C et al. Preimplantation genetic screening using fluorescence in situ hybridization in patients with repetitive implantation failure and advanced maternal age: two randomized trials. *Fertil Steril*. 2013; 99 (5): 1400-7.

Ruiz-Alonso M, Blesa D, Díaz-Gimeno P, Gómez E, Fernández-Sánchez M, Carranza F et al. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril* 2013; 100 (3): 818-24.

Said TM, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Glander H-J, Paasch U. Evaluation of Sperm Recovery following Annexin V MACS Separation. *Reprod Biomed Online* 2006; 13 (3): 336-339.

Said TM, Grunewald S, Paasch U, Rasch M, Agarwal A, Glander HJ. *Fertil Steril*. 2005; 83 (5): 1442-6. Effects of magnetic-activated cell sorting on sperm motility and cryosurvival rates.

Saito S, Yao Y, Shiraishi T, Ueyama M, Hirakawa S. Effect of human hydrosalpinx fluid on in vitro mouse embryogenesis. *J Obstet Gynaecol Res* 2000; 26 (6): 455-459.

Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril*. 2010; 93 (4): 1027-36.

Sauer R, Roussev R, Jeyendran RS, Coulam CB. Prevalence of antiphospholipid antibodies among women experiencing unexplained infertility and recurrent implantation failure. *Fertil Steril* 2010; 93 (7): 2441-2443.

Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG, Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril* 2010; 94 (5): 1700-6.

Seif MM, Edi-Osagie EC, Farquhar C, Hooper L, Blake D, McGinlay P. Assisted hatching on assisted conception (IVF & ICSI). *Cochrane Database Syst Rev* 2006; (1): CD001894.

Serhall P, Ranieri DM, Khadum I, Wakim RA. Cervical dilatation with hygroscopic rods prior to ovarian stimulation facilitates embryo transfer. *Hum Reprod* 2003; 18 (12): 2618-2620.

Sheiner E, Levy A, Silverberg D, Menes TS, Levy I, Katz M, Mazor M. Pregnancy after bariatric surgery is not associated with adverse perinatal outcome. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190 (5): 1335-40.

Sher G, Fisch JD. Vaginal sildenafil improves IVF outcome in women with recurrent IVF failure due to poor endometrial development. *Fertil Steril* 2004; 82 (2): S213.

Smeenk JM, Verhaak CM, Stolwijk AM, Kremer JA, Braat DD. Reasons for dropout in an in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection program. *Fertil Steril* 2004; 81 (2): 262-8.

Somigliana E, De Benedictis S, Vercellini P, Elisa Nicolosi A, Benaglia L, Scarduelli C, Ragni G, and Fedele L. Fibroids not encroaching the endometrial cavity and IVF success rate: a prospective study. *Hum Reprod* 2011; 26 (4): 834-839.

Souza Setti A, Ferreira RC, Paes de Almeida Ferreira Braga D, de Cássia Sávio Figueira R, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Intracytoplasmic sperm injection outcome versus intracytoplasmic

morphologically selected sperm injection outcome: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2010; 21 (4): 450-5.

Stephenson MD, Fluker MR. Treatment of repeated unexplained in vitro fertilization failure with intravenous immunoglobulin: a randomized, placebo-controlled Canadian trial. *Fertil Steril* 2000; 74 (6): 1108-1113.

Stern C, Chamlev L. Antiphospholipid antibodies and coagulation defects in women with implantation failure after IVF and recurrent miscarriage. *RBM Online* 2006; 13 (1): 29-37.

Stern C, Chamley L, Hale L, Kloss M, Speirs A and Baker HW. Antibodies to beta2 glycoprotein I are associated with in vitro fertilization implantation failure as well as recurrent miscarriage: results of a prevalence study. *Fertil Steril* 1998; 70 (5): 938-944.

Stern C, Chamley L, Norris H, Hale L, Baker HW. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of heparin and aspirin for women with in vitro fertilization implantation failure and antiphospholipid or antinuclear antibodies. *Fertil Steril* 2003; 80 (2): 376-383.

Suganuma R, Yanagimachi R, Meistrich ML. Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI. *Hum Reprod*. 2005; 20 (11): 3101-8.

Sunkara SK, Khairy M, El-Toukhy T, Khalaf Y, Coomarasamy A. The effect of intramural fibroids without uterine cavity involvement on the outcome of IVF treatment: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2010; 25 (2): 818-429.

Tan BK, Vandekerckhove P, Kennedy K. Investigation and current management of recurrent IVF treatment failure in the UK. *BJOG* 2005; 112 (6): 773-780

Tang AW, Alfirevic Z, Quenby S. Natural killer cells and pregnancy outcomes in women with recurrent miscarriage and infertility: a systematic review. *Hum. Reprod.* (2011) 26 (8): 1971-1980.

Taranissi M, El-Toukhy T, Gorgy A, Verlinsky Y. Influence of maternal age on the outcome of PGD for aneuploidy screening in patients with recurrent implantation failure. *RBM Online* 2005; 10 (5): 628-632.

Taranissi M, El-Toukhy T, Gorgy A, Verlinsky Y. Influence of maternal age on the outcome of PGD for aneuploidy screening in patients with recurrent implantation failure. *RBM Online* 2005; 10 (5): 628-632.

Tomassetti C, Meuleman C, Pexsters A, Mihalyi A, Kyama C, Simsa P, D'Hooghe TM. Endometriosis, recurrent miscarriage and implantation failure: is there an immunological link?. *RBM Online* 2006; 13 (1): 58-64.

Urman B, Mercan R, Alatas C, Balaban B, Isiklar A, Nuhoglu A. Low-dose aspirin does not increase implantation rates in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection: a prospective randomized study. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17 (10): 586-590.

Urman B, Yakin K, Balaban B. Recurrent implantation failure in assisted reproduction: how to counsel and manage. A. General considerations and treatment options that may benefit the couple. *RBM Online* 2005; 11(3): 371-381.

Van Vaerenbergh I, Fatemi HM, Blockeel C, Van Lommel L, In't Veld P, Schuit F et al. Progesterone rise on HCG day in GnRH antagonist/rFSH stimulated cycles affects endometrial gene expression. *Reprod Biomed Online* 2011; 22 (3): 263-71.

Venetis CA, Kolibianakis EM, Bosdou JK, Tarlatzis BC. Progesterone elevation and probability of pregnancy after IVF: a systematic review and meta-analysis of over 60 000 cycles. *Hum Reprod Update* 2013; 19 (5): 433-57.

Venetis CA, Kolibianakis EM, Bosdou JK, Lainas GT, Sfontouris IA, Tarlatzis BC, Lainas TG. Estimating the net effect of progesterone elevation on the day of hCG on live birth rates after IVF: a cohort analysis of 3296 IVF cycles. *Hum Reprod* 2015; 30 (3): 684-91.

Wang S, Zhao YR, Jiao YL, Wang LC, Li JF, Cui B, Xu CY, Shi YH, Chen ZJ. Increased activating killer immunoglobulin-like receptor genes and decreased specific HLA-C alleles in couples with recurrent spontaneous abortion. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 360 (3): 696-701.

Waylen AL, Metwally M, Jones GL, Wilkinson AJ, Ledger WL. Effects of cigarette smoking upon clinical outcomes of assisted reproduction: a meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2009; 15 (1): 31-44.

Weissman A, Horowitz E, Ravhon A, Nahum H, Golan A, Levrant D. *Reprod Biomed Online*. 2008; 17 (5): 605-9. Pregnancies and live births following ICSI with testicular spermatozoa after repeated implantation failure using ejaculated spermatozoa.

Werlin L, Rodi I, DeCherney A, Mareello E, Hill D, Munné S. Preimplantation genetic diagnosis as both a therapeutic and diagnostic tool in assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2003; 80 (2): 467-8.

Windham GC, Fenster L, Swan SH. Moderate maternal and paternal alcohol consumption and the risk of spontaneous abortion. *Epidemiology*. 1992; 3 (4): 364-70.

Yoshioka S, Fujiwara H, Nakayama T, Kosaka K, Mori T, Fujii S. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells promotes implantation rates in patients with repeated failure of IVF–embryo transfer. *Hum Reprod* 2006; 21 (12): 3290–3294.