TESIS DE LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

2015

38

Patricia Rubio Cuesta

Implicación de las trombofilias y los trastornos autoinmunes en el fallo de implantación tras fecundación in vitro

Departamento
Cirugía, Ginecología y Obstetricia

Director/es
García Aguirre, Salvador
Duque Gallo, José Antonio

http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis

ISSN 2254-7606

Prensas de la Universidad
Universidad Zaragoza

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Universidad Zaragoza
1542

Tesis Doctoral

IMPLICACIÓN DE LAS TROMBOFILIAS Y LOS TRASTORNOS AUTOINMUNES EN EL FALLO DE IMPLANTACIÓN TRAS FECUNDACIÓN IN VITRO

Autor

Patricia Rubio Cuesta

Director/es

García Aguirre, Salvador
Duque Gallo, José Antonio

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Cirugía, Ginecología y Obstetricia

2015

Repositorio de la Universidad de Zaragoza – Zaguan http://zaguan.unizar.es

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA, GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA

"Implicación de las trombofilias y los trastornos autoinmunes en el fallo de implantación tras fecundación in vitro"

TESIS DOCTORAL

Patricia Rubio Cuesta

Zaragoza, 2014

“Implicación de las trombofilias y los trastornos autoinmunes en el fallo de implantación tras fecundación in vitro”

Memoria

presentada por

PATRICIA RUBIO CUESTA

Para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía

por la Universidad de Zaragoza

DIRIGIDA POR

DR. SALVADOR GARCÍA AGUIRRE DR. JOSÉ ANTONIO DUQUE GALLO

.

Por la gente que cree en mí

AGRADECIMIENTOS

Una mención especial a mis directores de tesis, el Dr. García Aguirre y el Dr. Duque Gallo, por su ayuda en el fondo y en la forma. Gracias por depositar vuestra confianza en un proyecto que inicialmente se presentaba casi utópico haciendo que mereciera la pena intentarlo. Os agradezco el apoyo y la paciencia durante estos años.

Mi gratitud a los Servicios de Inmunología, Hematología y Hemostasia del Hospital Universitario Miguel Servet, cuya colaboración ha resultado imprescindible para el desarrollo de la investigación. Mi agradecimiento expreso a las enfermeras de Coagulación por la organización y el empeño desinteresado y muy especialmente, a la Dra. Nuria Fernández, por su aportación científica y su dedicación personal al proyecto.

Agradezco la buena disposición del personal del Servicio de Archivos y del Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos del hospital.

A mi referente, mi compañera, mi amiga María Lapresta, por tu capacidad para mostrarme todas las opciones, por ayudarme a decidir, por enseñarme lo que es el sacrificio con recompensa diferida.

A mi familia, especialmente a mis padres, por vuestro empeño incansable para que mi vida sea más cordial y más sencilla. Por vuestros experimentados consejos, vuestro apoyo y confianza incondicional. A mi hijo Marcos, el primer aliento fresco del día y el primer sueño dulce de la noche.

A Gustavo, por la tranquilidad y coherencia que aportas a mi vida. Por pintar los problemas de un color más claro y las alegrías de uno más intenso.

A todos, GRACIAS.

INDICE DE CONTENIDOS:

1. INTRODUCCIÓN 6

1.1. Reproducción humana 7

1.1.1 Esterilidad, subfertilidad e infertilidad 8

1.1.2 Conceptos demográficos 11

1.1.3 Epidemiología de la esterilidad 13

1.1.4 Factores etiológicos de esterilidad 16

1.1.5 Estudio de la pareja estéril 20

1.2. Técnicas de reproducción asistida 26

1.2.1 Inseminación con semen conyugal (IAC) 28

1.2.2 Inseminación con semen de donante (IAD) 29

1.2.3 Fecundación in vitro (FIV) y Microinyección espermática (ICSI) 30

1.2.4 Donación de ovocitos (DO) 32

1.3 Fracaso de las técnicas de reproducción asistida: fallo de implantación 34

1.3.1 Factores predictores de éxito en un ciclo de reproducción 36

1.3.1.A Predictores de respuesta ovárica 36

1.3.1.B Predictores de fecundación exitosa 36

1.3.1.C Predictores de correcta implantación 37

1.4 Estudio de trombofilias 50

1.4.1 Trombofilias congénitas o familiares 51

1.4.2 Trombofilias adquiridas. Síndrome antifosfolipido (SAF) 56

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO 61

2.1 Justificación 62

3. OBJETIVOS 64

3.1 Objetivo principal 65

3.2 Objetivos específicos 65

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO 66

4.1 Hipótesis conceptuales 67

4.2 Hipótesis operativas 67

5. MATERIAL Y MÉTODO 69

5.1 Diseño de la investigación 70

5.2 Ámbito del estudio 72

5.3 Grupos de estudio 73

5.3.1 Grupo caso 73

5.3.2 Grupo control 74

5.4 Descripción de técnicas y protocolos 74

5.4.1 Estudio analítico: trombofilias y autoinmunidad 74

5.4.2 Protocolo para ciclo de FIV 82

5.5 Metodología de la investigación 87

5.5.1 Cálculo del tamaño muestral 87

5.5.2 Fuentes de datos 87

5.5.3 Almacén y soporte de la información 88

5.5.4 Variables del estudio …… 89

5.5.5 Estadística descriptiva ……. 92

5.5.6 Estadística inferencial …….. 93

5.5.7 Sesgos y limitaciones …… 95

5.5.8 Aspectos éticos …….. 95

6. RESULTADOS …… 97

6.1 Descripción de la muestra …….. 98

6.1.1 Grupo caso: población FIV ……... 98

6.2 Descripción específica …… 121

6.2.1 Estudio de trombofilias congénitas en casos y controles …….. 121

6.2.2 Estudio de trombofilias adquiridas en casos y controles …….. 125

6.2.3 Marcadores de autoinmunidad en casos y controles ……. 129

6.3 Análisis multivariante ……... 130

6.3.1 Trombofilias como rasgo de población FIV …….. 130

6.3.2 Trombofilias congénitas …… 132

6.3.3 Trombofilias adquiridas ……. 134

6.3.4 Marcadores de autoinmunidad …… 136

6.3.5 Análisis conjunto de trombofilias y autoanticuerpos …….. 138

7. DISCUSIÓN …… 140

7.1 Etiopatogenia del fallo de implantación …… 141

7.2 Trombofilias y autoinmunidad en el fallo de implantación …….. 144

7.2.1 Implicación de las trombofilias en el fallo de implantación ……..... 145

7.2.2 Implicación de los trastornos autoinmunes en el fallo de implantación …. 154

8. CONCLUSIONES ……. 158

9. BIBLIOGRAFÍA ……. 161

10. ABREVIATURAS ……. 177

INTRODUCCIÓN:

1.1. REPRODUCCIÓN HUMANA

La reproducción humana es un campo de la ginecología en constante evolución y desarrollo debido al creciente interés por parte de científicos y profesionales implicados en el área y por haberse convertido en un servicio sanitario cada vez más demandado por la población general.

Los problemas de fertilidad representan el principal cometido de la salud reproductiva que, progresivamente, adquiere un papel más relevante en el mundo desarrollado. Los cambios en el esquema social y laboral de la mujer suponen un retraso voluntario de la maternidad y con ello problemas derivados del envejecimiento germinal. De forma paralela, la mayor información y la desmitificación del problema permiten a la pareja consultar con mayor libertad a un especialista.

La reproducción humana asistida es una disciplina dinámica e innovadora que ha sufrido un enorme desarrollo y una rápida progresión en las últimas décadas gracias a la incorporación de importantes aportaciones clínicas, técnicas y de investigación realizadas por diferentes áreas de conocimiento como la biología celular, molecular, endocrinología, farmacología, etc., interrelacionadas entre sí con el único objetivo de desvelar las incógnitas de los trastornos de la fertilidad[1].

En el momento actual, España cuenta con un gran número de centros especializados en medicina reproductiva de primer nivel, ocupando el tercer puesto europeo en volumen de tratamientos de fertilidad realizados. Las características de la legislación española y la potencia de grupos dedicados a este campo convierten a nuestro país en líder en programas de ovodonación. La investigación científica y el desarrollo biotecnológico intentan adecuarse a una demanda social creciente; si bien, el coste económico aparece como el principal factor limitante del proyecto tanto en el ámbito público como en el privado[2,3].

1.1.1. ESTERILIDAD, SUBFERTILIDAD E INFERTILIDAD

El ***potencial reproductivo*** hace referencia a la capacidad intrínseca de cada especie para conseguir descendencia. El ser humano está genéticamente predispuesto a tener un bajo potencial en comparación con otras especies del reino animal.

Se estima que, en condiciones ideales y aisladas del medio, la tasa total de fertilidad femenina ronda los 20 a 25 hijos por cada mujer, teniendo en cuenta el tiempo de vida fértil, la frecuencia de ovulación y la duración del embarazo y la lactancia.

Sin embargo, el empleo de modelos demográficos específicos demuestra que la tasa de fertilidad media es de 15 hijos por mujer, valor bastante menor del cálculo inicial y muy distante de las tasas descritas en otras especies animales[4].

El ***rendimiento reproductivo*** consiste en la capacidad propia de cada individuo para reproducirse modificada por factores medioambientales o del entorno.

En nuestro caso, estos condicionantes cambian constantemente, por lo que resulta complicado aproximar y generalizar este rasgo en el conjunto de la población. Si bien, los humanos somos los únicos capaces de manipular los factores externos y con ello el rendimiento generacional de la especie[3].

Un ejemplo claro es la distribución por edades de las muestras y las tasas de fertilidad específicas en los distintos grupos etarios. En África, cada mujer tiene un número medio de 6 hijos, mientras que en Europa la media ronda el 1,47. Sin embargo, el porcentaje de mujeres de 40-44 años sin hijos en África es de 10,1% mientras que en Europa es del 5,4%[4,5].

Con el fin de unificar criterios y permitir una homogeneidad en el diagnóstico y clasificación de la patología reproductiva, la ESHRE[6] (European Society of Human Reproduction and Embryology) define las distintas situaciones como:

- FERTILIDAD:

Capacidad para conseguir un embarazo tras UN AÑO de exposición regular al coito.

- ESTERILIDAD:

Incapacidad de una pareja para conseguir embarazo tras un año de exposición regular al coito.

  - Esterilidad Primaria: nunca se ha conseguido un embarazo sin tratamiento.
  - Esterilidad secundaria: si transcurren más de 12 meses sin conseguir nuevo embarazo tras gestación espontánea.

- SUBFERTILIDAD:

Capacidad para conseguir un embarazo sin ayuda médica en un período superior a un año.

- INFERTILIDAD:

Hoy en día, hace alusión a las mujeres con abortos de repetición, entendiendo esto como la pérdida consecutiva de tres o más gestaciones antes de la 20 semana o como cinco pérdidas no consecutivas.

  - Infertilidad primaria: la pareja no tienen hijos vivos anteriores.
  - Infertilidad secundaria: los abortos habituales aparecen tras una gestación normal.

- FECUNDABILIDAD:

Probabilidad de conseguir un embarazo durante un ciclo menstrual.

Para asegurar una eficacia reproductiva óptima, se recomienda mantener relaciones cada 2 ó 3 días sin programarlo con relación al momento ovulatorio con el fin de reducir el estrés emocional que esto conlleva.

- FECUNDIDAD:

Capacidad para conseguir un feto vivo y viable en un ciclo menstrual con exposición al coito.

La tasa de fecundidad de una pareja sin problemas de fertilidad y con relaciones sexuales regulares sin anticoncepción ronda el 30% el primer mes y, aproximadamente el 20 mensual durante el primer año.

En función del tiempo de exposición, la probabilidad de embarazo acumulada registra un 57% de embarazos en tres meses, 72% en 6 meses, 85-90% en un año y 95-97% en 2 años. Siempre condicionados por otros factores, fundamentalmente la edad de la mujer[4].

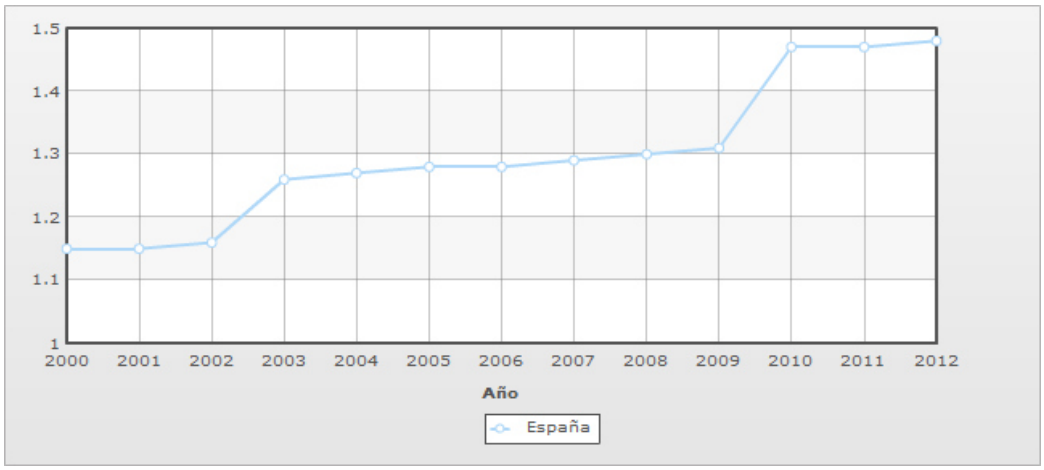
1.1.2. CONCEPTOS DEMOGRÁFICOS

►La *tasa de fertilidad* hace referencia al número medio de hijos que nacerían por cada mujer si todas ellas vivieran hasta el final de sus años fértiles y parieran de acuerdo con la tasa de fecundidad promedio para cada edad.

Este valor es un indicador de los potenciales cambios demográficos de cada país **(Figura 1)**[4].

La tasa de fertilidad europea y, particularmente la española, ha descendido drásticamente en las últimas décadas registrándose un número medio de 1,47 hijos por mujer; valor muy alejado del 2,1 considerado como tasa de sustitución necesaria para mantener el tamaño poblacional. Esta falta de recambio generacional aboca a un envejecimiento y una disminución progresiva de la población, lo cual supone, desde hace años, un problema político, social y económico de gran relevancia[5,7].

Fig.1: Tasa de fertilidad española

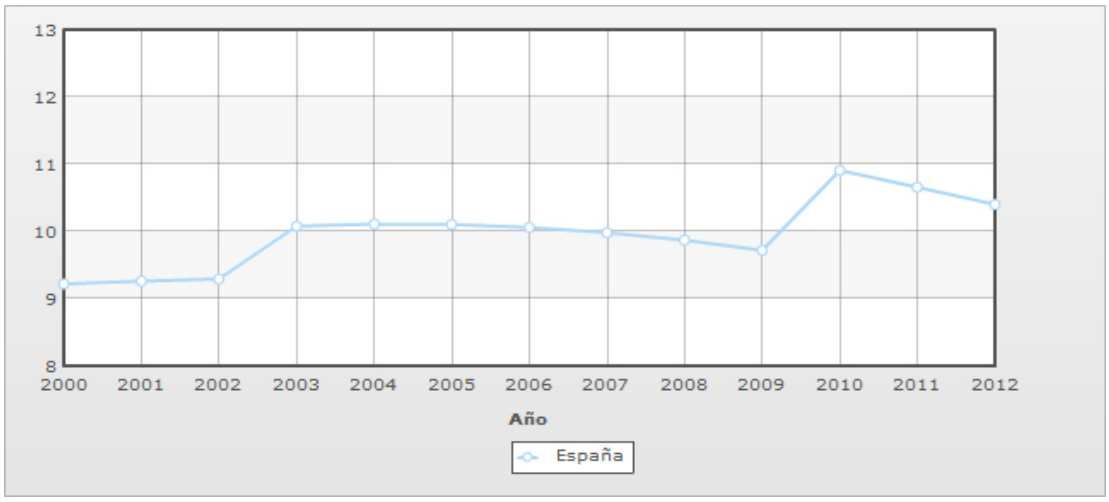


País	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
España	1,15	1,15	1,16	1,26	1,27	1,28	1,28	1,29	1,3	1,31	1,47	1,47	1,48

►La *tasa de natalidad* representa el valor promedio de nacimientos anual por cada 1000 habitantes en cada país. Se trata de un parámetro fundamental para la estimación de crecimiento demográfico que, a su vez, está íntimamente relacionado con la fertilidad y la distribución por edades de cada población **(Figura 2).**

En España, la tasa de natalidad bruta estimada en 2012 es de 10 nuevos nacimientos por año por cada 1000 habitantes, prácticamente estancada desde el año 2000[6-8].

Fig.2: Tasa de natalidad en España (nacimientos/1000 habitantes)

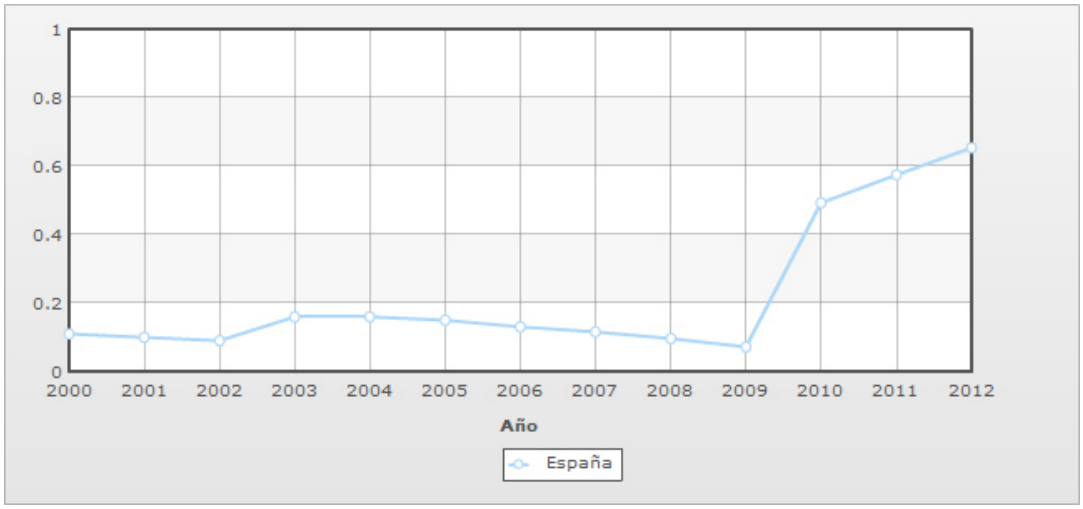


País	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
España	9,22	9,26	9,29	10,08	10,11	10,1	10,06	9,98	9,87	9,72	10,91	10,66	10,4

►La *tasa de crecimiento* es el promedio porcentual del cambio anual del número de habitantes como resultado del balance entre nacimientos y muertes y el de los movimientos migratorios que entran y salen del país. Este porcentaje puede ser positivo (superávit) o negativo (déficit).

La tasa de crecimiento se emplea como un marcador socioeconómico que orienta la magnitud de las necesidades de un país en concepto de infraestructuras, recursos y empleo en función de la evolución de su población **(Figura 3)**[4,8]**.**

Fig.3: Tasa de crecimiento española (%)



País	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
España	0,11	0,1	0,09	0,16	0,16	0,15	0,13	0,12	0,1	0,07	0,49	0,57	0,65

1.1.3. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ESTERILIDAD:

Según datos publicados por la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) en 2011, la esterilidad/infertilidad es un problema que afecta entre el 15-17% de las parejas españolas en edad reproductiva. Es decir, más de 600000 parejas serían candidatas a una consulta por un especialista en reproducción; y de ellas, 1 de cada 1000 es subsidiaria de una técnica asistida[5,7].

No obstante, se trata de una estimación aproximada ya que la valoración de esta patología es imprecisa y susceptible de sesgos. Por tratarse de un problema que afecta a la intimidad de la pareja, el índice de participación en las encuestas es bajo y la recogida de datos en la historia clínica general es irregular. Se calcula que el 25% de los afectados nunca consulta el caso con un especialista, se infraestima el cómputo por contaje incompleto de esterilidades secundarias, parejas que adoptan y esterilidades tratadas con éxito.

Por su parte, se sobreestiman las cifras con casos de esterilidades voluntarias. Sumado a lo anterior, se conoce la dificultad para diseñar modelos sociodemográficos adecuados para establecer el rendimiento y la eficacia reproductiva de cada población; por lo que las estadísticas y los estudios en reproducción humana se hacen sobre previsiones y no sobre datos completamente reales[2].

Hasta la década de los 70, en la que los británicos Dr. R. Edwards y Dr. P. Steptoe consiguieron la primer niña viva y sana, Louise Brown, resultado de una gestación tras fecundación in vitro (FIV); la fertilidad no se contemplaba como un problema de salud potencialmente solventable. El desarrollo científico y tecnológico, la cobertura sanitaria integral y la difusión de los avances en reproducción asistida, hacen de esta superespecialidad un área de investigación prometedora y ambiciosa así como un servicio muy solicitado por la población.

Entre 600.000-700.000 parejas españolas en edad reproductiva son incapaces de concebir un hijo vivo de forma espontánea. Este problema afecta a 40.000 nuevas parejas al año; registrándose un incremento en la demanda de asesoramiento reproductivo de un 25 % con respecto a la década anterior[6,7].

La explicación a este hecho hay que buscarla en el intenso cambio demográfico, el aumento en la esperanza y calidad de vida, la mejora económica, el cambio social y en la integración de la mujer en el mundo laboral que condiciona un llamativo retraso de la maternidad. De forma paralela, la eliminación de estereotipos y connotaciones negativas asociadas a los problemas de esterilidad animan a las parejas a consultar el problema; el desarrollo y la divulgación de nuevas técnicas, los centros novedosos bien dotados en capital

técnico y el gran número de especialistas dedicados a este campo, mejoran las expectativas y perpetúan la demanda de estos servicios[7].

Existen multitud de factores medioambientales e intrínsecos al individuo, la mayoría desconocidos, que pueden influir en la fecundidad de una pareja. Todos los estudios epidemiológicos coinciden en que la edad, especialmente la femenina, es uno de los principales factores limitantes. A partir de los 35 años la capacidad reproductiva de la mujer disminuye progresivamente hasta los 40, donde el deterioro se hace exponencial.

Hendershot y Pratt[9], publicaron en 1982 sus series tratando este tema, las cuales han sido repetidas por diferentes autores con similares resultados. Se estima que, tras 12 meses de exposición regular al coito sin anticoncepción, la tasa de embarazo para mujeres entre los 20-24 años es del 86%, del 78% entre los 25-29 años, del 63% en el grupo de 30-34 y del 52% entre los 35 a los 40, asumiendo que el 50% de las mujeres mayores de 38 años son estériles. Este aspecto guarda una correlación directa con el tiempo necesario para gestar (fecundabilidad), sensiblemente superior en parejas de 41 ó más años **(Tabla 1)[2].**

Tabla.1: Tiempo necesario para gestar en los distintos grupos etáreos según sexo

EDAD MUJER	MESES	N	EDAD VARÓN	MESES	N
≤30	4,07±4,5	177	≤30	3,70±4,4	84
31-35	4,80±5,5	241	31-35	4,69±5,1	227
36-40	5,28±7,9	103	36-40	4,62±4,5	157
≥41	33,86±65,2	7	≥41	10,56±10,5	43

El efecto de la edad masculina es controvertido y no tan notorio. No obstante, se observa una reducción significativa de la fertilidad conforme el varón envejece, con un descenso de pendiente constante del 23% anual a partir de los 35 años.

Probablemente, este efecto no sea únicamente el reflejo de un deterioro de la cantidad y calidad del semen sino también implique otras variables de carácter demográfico íntimamente relacionados con el envejecimiento masculino como el incremento de la comorbilidad con disfunción sexual secundaria, menor tiempo de erección, alteraciones en la eyaculación, cambio en los hábitos sexuales con menor número de coitos por relación, menor frecuencia de eventos íntimos, etc[9,10].

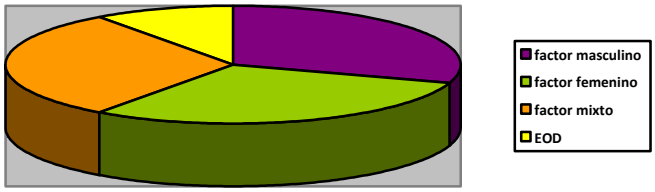
1.1.4. FACTORES ETIOLÓGICOS DE ESTERILIDAD

Según la ESHRE, la esterilidad se define como la incapacidad de la pareja para conseguir un embarazo tras un año de exposición regular al coito. Se considera primaria cuando nunca se ha conseguido embarazo sin tratamiento; y secundaria si, tras una gestación conseguida sin tratamiento, transcurren más de 12 meses sin nuevo embarazo.

La capacidad para gestar sin ayuda médica en un período superior a un año se denomina subfertilidad, concepto imprescindible para la correcta clasificación de los factores etiológicos de la esterilidad y explicar las resoluciones espontáneas de la misma al cabo de los años.

Las causas de esterilidad son masculinas, femeninas, mixtas e inexplicables. Además, pueden ser absolutas o relativas, incluyendo en esta segunda categoría aquellas noxas responsables de la esterilidad en función de la fertilidad del otro miembro de la pareja. Aproximadamente el 30% de las esterilidades son secundarias a un factor femenino, un 30% son de origen masculino, un 25% secundarias a un factor mixto y un 15% de causa desconocida, catalogadas como esterilidad de origen desconocido (EOD)[4,6] **(Figura 4).**

Fig.4: Causas de esterilidad



1.1.4.1 ESTERILIDAD POR FACTOR FEMENINO:

La etiología de origen femenino se divide en cinco grandes grupos:

1.- Alteraciones tubáricas: responsables del 40% de las esterilidades de la mujer. Son defectos en la morfología de las trompas que impiden su correcto funcionamiento. La causa más frecuente es la oclusión o engrosamiento secundario a un cuadro infeccioso abdómino-pélvico o a una endometriosis. Los defectos congénitos son poco habituales y el cáncer de trompa supone menos del 1% de los procesos neoplásicos del aparato genital.

2.- Alteraciones ováricas: origen del 40% de las esterilidades femeninas. Se dividen en causas orgánicas (agenesias, tumoral, endometriósica, inflamatoria e infecciosa) y de causa funcional (insuficiencia o disfunción ovárica, alteración de fase lútea, persistencia de cuerpo lúteo).

3.- Alteraciones anatómicas: causa del 10% de las esterilidades por factor femenino. Se incluyen las distorsiones del aparato genital, muy relacionadas por otra parte, con los abortos de repetición y la patología perinatal como el parto pretérmino. Entre los más frecuentes destacan los miomas submucosos, los pólipos y adherencias endometriales y en menor porcentaje, los defectos estructurales congénitos del cuerpo uterino como el útero septo y el doble.

4.- Alteraciones en la migración de los espermatozoides: a nivel vaginal (malformaciones, infecciones, inflamaciones o neoplasias) y/o a nivel cervical (patología orgánica o funcional en la composición del moco en la que se incluye la esterilidad inmunológica por presencia de anticuerpos antiespermatozoide en el moco cervical).

5.- Alteraciones asociadas a enfermedades sistémicas: orgánicas o funcionales[4,7].

1.1.4.2 ESTERILIDAD POR FACTOR MASCULINO:

El origen de la esterilidad masculina es variado y con muy distinta repercusión sobre el resultado fértil de la pareja por lo que requiere una adecuada anamnesis y exploración física con el fin de orientar correctamente la necesidad de pruebas complementarias.

Los objetivos de la evaluación masculina son:

- Identificar patologías y factores de riesgo que causen infertilidad masculina o que contribuyan a ella.
- Orientar la estrategia terapéutica tratando o corrigiendo la causa, si es posible, o proponiendo mejoras alternativas que pudieran favorecer el éxito de una técnica de reproducción asistida (TRA).
- Identificar anomalías genéticas transmisibles a la descendencia.
- Identificar patologías relevantes para la salud del varón.

Un correcto rastreo etiológico debe incidir en aspectos como:

a. Antecedentes familiares

- Consanguineidad, endocrinopatías tipo Diabetes Mellitus (DM), trastornos tiroideos o de suprarrenales. Enfermedades sistémicas como Fibrosis Quística (FQ) o

colagenosis. Repaso de la historia reproductiva de padres y hermanos. Anomalías genéticas.

b. Antecedentes personales:

- Genitales: aplasias, agenesia, criptorquidia, epididimitis, orquitis, varicocele, torsiones, traumatismos.
- Infecciosos: ETS, TBC, parotiditis, fiebre reumática o de origen desconocido.
- Urológicos: malformaciones del sistema, infecciones de repetición del tracto urinario, pielonefritis, problemas prostáticos, función renal.
- Digestivos: hernias, úlceras, función hepática, hepatitis, cirrosis.
- Endocrinológicos: galactorrea, pubertad precoz o tardía, DM, hipotiroidismo,etc.
- Neurológicos: alteraciones visuales y olfativas.
- Cardiovascular, respiratorio y reumatológicos.
- Oncológicos: tumores testiculares, tratamientos con QT o RT.
- Intervenciones quirúrgicas.

c. Función sexual.

- Libido, erección, eyaculación, orgasmo y coito.

d. Contacto con posibles gonadotóxicos:

- Calor excesivo, tabaquismo, drogas, alcohol, tóxicos laborales, radiaciones y medicamentos[4,10].

1.1.5. ESTUDIO DE LA PAREJA ESTÉRIL:

Debido a los múltiples cambios y avances en el terreno de la reproducción humana, el protocolo para el estudio de la pareja estéril se encuentra en constante revisión. Con un grado de recomendación C, el diagnóstico debe realizarse de forma paralela en ambos miembros de la pareja comenzando tras un año de exposición regular al coito sin obtener gestación viable.

Como se expuso con anterioridad, la probabilidad de embarazo de una pareja fértil que mantiene relaciones frecuentes sin anticoncepción ronda el 20% mensual, llegando a una probabilidad acumulada del 85-93% al año[2]. Es por ello que la SEF (Sociedad Española de Fertilidad), la SEGO (Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia), y la ASMIR (American Society for Reproductive Medicine) establecen los 12 meses como el período que debe transcurrir antes de iniciar un estudio de esterilidad ("recomendación de buena práctica clínica" (BPC) o "good practice point" (GPP)). No obstante, existen factores que afectan fehacientemente este lapso de tiempo y justificarían iniciarlo a los 4-6 meses e incluso plantear directamente un tratamiento[9,10] **(Tabla 2).**

Tabla 2: Causas de inicio precoz del estudio de esterilidad

MUJER	HOMBRE
Edad >35 años	Patología genital
Amenorrea u oligomenorrea de >6 meses	Cirugía urogenital previa
Enfermedad inflamatoria pélvica	Enfermedad de transmisión sexual
Cirugía abdominopélvica previa	Exploración genital anormal
Patología tubárica, uterina u ovárica	Enfermedad genética asociada a esterilidad
Endometriosis	
Enfermedad genética asociada a esterilidad	

1.1.5.1 PROTOCOLO DEL ESTUDIO DE ESTERILIDAD:

Con el fin de "evitar pruebas innecesarias que demoren el diagnóstico y encarezcan el proceso" (ESHRE Capri Workshop año 2000)[11], se establecen tres parámetros diagnósticos ineludibles en un estudio de esterilidad que se correlacionan de forma evidente con la consecución de un embarazo. Éstos son:

1. Confirmación de la existencia de ovulación.
2. Confirmación de la integridad y permeabilidad del canal genital.
3. Confirmación de la presencia de una proporción suficiente de espermatozoides morfológica y funcionalmente normales.

Una anamnesis completa incluyendo antecedentes médicos, quirúrgicos y reproductivos de la pareja, una exploración ginecológica, un estudio ecográfico transvaginal, una analítica general y un perfil hormonal en fase folicular precoz (día 2º-4º día de ciclo) y en mitad de fase lútea (21º-22º día de ciclo) componen el estudio femenino inicial e imprescindible en una primera consulta por esterilidad.

Las pruebas complementarias son catalogadas por el RCOG (Royal College of Obstetricians and Gynaecologists) y la ESHRE en tres niveles de evidencia según el rendimiento clínico de cada una de ellas, concediendo con ello un nivel de recomendación.

1.1.5.1.1 **Primer nivel diagnóstico:**

Lo integran aquellas pruebas que se correlacionan de forma significativa con tasas superiores de gestación y por ello deben incluirse en el estudio básico de esterilidad. Entre ellas destacan:

- **Test de ciclo ovulador**:

No existe ninguna prueba de certeza ovulatoria. La determinación de progesterona plasmática en mitad de fase lútea, a pesar de sus grandes

fluctuaciones, es la que presenta mejor relación coste-eficacia, considerándose la prueba de elección (*Evidencia IIb, recomendación grado B*). En general se acepta que, valores de progesterona en suero tras 6-7 días postovulatorios con niveles superiores a 15 ng/mL refleja una fase lútea adecuada. Valores por debajo de 10 ng/mL hacen sospechar una insuficiencia lútea y cifras menores de 3 ng/mL indican ciclos anovuladores.

Reserva ovárica:

La edad de la mujer condiciona una pérdida paulatina y un envejecimiento progresivo de los ovocitos que, como se sabe, limita la fertilidad femenina en el tiempo. Es por ello que la reserva ovárica es un concepto de absoluta trascendencia en la orientación de un estudio de esterilidad.

Con este objetivo es indicación solicitar un estudio hormonal en fase folicular precoz con FSH, LH y 17-β-Estradiol en mujeres con ciclos irregulares y en las mayores de 35 años. La determinación de la prolactina y la función tiroidea es imprescindible ante la sospecha de anovulación y/o irregularidad menstrual.

A causa de la limitación que supone la variabilidad de la FSH intra e interciclo, se buscan marcadores de reserva ovárica independientes del ciclo menstrual que estandaricen este concepto **(Tabla 3).** El recuento de folículos antrales y la determinación de hormona anti-mülleriana son los que mejor reflejan esta situación aunque en el momento actual no están incluidos en todos los protocolos.

Tabla 3: Características de un buen marcador de reserva ovárica

	Edad	FSH y E_2	Inhibina B	AMH	Recuento antrales
Predecir baja respuesta	+	++	++	+++	+++
Predecir alta respuesta	+	-	-	+++	++
Variabilidad dentro del ciclo	+	+++	++	-	-
Variabilidad entre ciclos	+	+++	+++	-	+
Dependiente del observador	-	+	-	+	++
Aplicable a todos los pacientes	+++	++	+	+++	+
Barato	+++	+	+	-	++

(-: nada +: poco ++: moderado +++: mucho)

- *Recuento de folículos antrales por ecografía transvaginal* es una técnica sencilla, inocua y reproducible empleada para predecir la respuesta ovárica a los tratamientos de reproducción. Se recomienda incluirla en la valoración de mujeres mayores de 35 años. Se sabe que las pacientes con un número igual o inferior a tres suponen el mayor porcentaje de cancelaciones por baja respuesta (BR).

- *Determinación de la hormona anti-mülleriana (AMH):* parece ser el marcador más fiable de reserva ovárica si bien, está pendiente de validación. Su indicación está orientada a pacientes con FSH >15 mUI/mL en el 3º día de ciclo.

- **Confirmación de la permeabilidad tubárica**:

Puede realizarse a través de una histerosalpingografía (HSG), una

histerosonosalpingografía (HSSG) o por cromopertubación laparoscópica. La HSG se considera de elección por tratarse de una prueba barata, sencilla y con bajo índice de complicaciones. Los hallazgos se correlacionan en un 60-70% con los objetivados por laparoscopia, ofreciendo la mejor relación coste-beneficio *(recomendación grado B*).

El estudio tubárico vía laparoscópica debe reservarse para los casos donde la endoscopia esté indicada dentro del contexto diagnóstico o terapéutico de una patología orgánica conocida o de sospecha *(recomendación grado B).*

- ***E*studio del factor masculino:**

Incluye una correcta anamnesis reflejando antecedentes familiares, personales, sexuales, reproductivos, hábitos o contacto con tóxicos seguida de una exploración general y del aparato genital. Como en la mujer, una analítica básica con serologías contribuye a descartar importantes causas de esterilidad.

El estudio de laboratorio básico de un varón consta de dos seminogramas en el período de tres semanas siguiendo las directrices de la OMS.

La evaluación completa u óptima es aconsejable si existen alteraciones en el estudio seminal inicial, ante una historia reproductiva anormal, en caso de esterilidad de origen desconocido (EOD), y en parejas en las que se han tratado sin éxito anomalías femeninas

El *seminograma* consta de un estudio detallado de los espermatozoides y el plasma seminal. Para alcanzar un diagnóstico se recomienda disponer de dos o tres muestras recogidos con intervalos de 1-3 semanas con el fin de eliminar sesgos por variabilidad fisiológica.

La muestra debe recogerse en un bote estéril de plástico, mediante masturbación, tras 3-4 días de abstinencia intentando incluir el eyaculado completo ya que las fracciones del semen no son homogéneas. Si existen

problemas para la toma se contempla la recogida tras relaciones sexuales con preservativo sin espermicida.

Para el análisis seminal se utilizan criterios estandarizados cuyos valores de referencia corresponden a los de la población fértil, no siendo en ningún momento valores de normalidad; ya que individuos con calidad seminal inferior a la catalogada consiguen embarazos[12,13] **(Tabla 4).**

El estudio del esperma evalúa parámetros macroscópicos como el aspecto, liqüefacción, viscosidad, pH, volumen y color.; y microscópicos como la concentración, número total, movilidad y vitalidad, morfología y presencia de anticuerpos antiespermatozoide (aglutinación).

La recuperación de espermatozoides móviles (REM), debe realizarse ante dos seminogramas consecutivos anómalos y siempre de cara a orientar una conducta terapéutica en caso de esterilidad[14].

Tabla 4: Valores de referencia para el estudio del semen OMS-2010[14]

Volumen del eyaculado	**1.5 ml**
pH	**≥7.2**
Concentración espermática	**15 x 10^6 /mL**
Total de espermios	**30 millones/eyaculado**
Viabilidad	**> 58%**
Motilidad	**PR + NP ≥40%**
Motilidad	**PR ≥ 32%**
Formas normales	**≥ 4%**

La valoración endocrina del varón, así como las ecografías transrectal o escrotal y la realización de un cariotipo y/o microdelecciones del cromosoma Y impera ante un seminograma anómalo, si la concentración espermática es inferior a 5 millones/mL, si existe alguna disfunción sexual o ante la sospecha de alguna patología local o sistémica[12,15].

1.1.5.1.2 **Segundo nivel diagnóstico:**

Incluye las pruebas que ponen de manifiesto alteraciones cuyo tratamiento no se correlaciona de forma consistente con un incremento en las tasas de gestación. Entre ellas, la histeroscopia de rutina y el test de penetración en moco cervical u ovocitos de hámster[11].

1.1.5.1.3 **Tercer nivel diagnóstico:**

Contempla aquellas pruebas cuyos resultados no se asocian a mejores tasas de gestación, por lo que se desestiman, al menos, de forma rutinaria. Algunas de ellas son la temperatura basal, la faloscopia, la biopsia endometrial generalizada o el test postcoital[11].

1.2. TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA:

Un estudio danés publicado en 2009 pone de manifiesto que, tras 5 años de seguimiento, el 69,4% de las parejas estériles consigue gestar tras una técnica de reproducción asistida en contraposición con el 6,6% que obtienen un embarazo espontáneo en este mismo período de tiempo[16].

A pesar de esto, únicamente el 56% de las parejas con problemas de fertilidad solicitan ayuda sanitaria; y de ellas, tan solo el 22% llevan a cabo un tratamiento bajo supervisión especializada[17]. Las razones que justifican este hecho son muy diversas y dispares según el

territorio del mundo al que nos refiramos. En la mayoría de los países la principal limitación de acceso es la económica y en segundo lugar la religiosa[18].

A pesar de que la OMS define la esterilidad como una "enfermedad del aparato reproductor"[17]; únicamente 45 de los 191 estados miembros cuentan con la posibilidad de ofrecer a su población un tratamiento con técnicas de reproducción asistida; y de estos, un número muy escaso disponen de programas de financiación estatal. Se considera un gasto sanitario innecesario y demorable que pone de manifiesto grandes diferencias respecto al derecho de tener un hijo biológico según el país de origen. Los costes de un ciclo de reproducción asistida suponen el 15% del salario anual de un ciudadano japonés y hasta el 50% de un estadounidense. Ni que mencionar los países en vías de desarrollo donde otras necesidades de primer orden desplazan este tipo de patología que tan siquiera se contempla como un problema de salud. Los países del norte de Europa disponen de los mejores programas financiados para el manejo de la esterilidad, lo cual supone el 0,2% del gasto sanitario anual.

Este sistema permite la regulación y estandarización de los tratamientos obteniendo la máxima eficacia con gran equidad poblacional. Los países nórdicos fueron los primeros en limitar la transferencia a un único embrión con el fin de rebajar el porcentaje de embarazo múltiple asociado a las TRA; comprobando, más tarde, que la medida no tiene una repercusión negativa significativa en la tasa global de éxito. Gracias a esta política de restricción de embriones transferidos han conseguido reducir los embarazos múltiples de un 34% en 1991 al 5% registrado en 2004, con el ahorro que ello supone para el sistema nacional de salud[19].

En España, la sanidad pública incluye las técnicas de reproducción asistida dentro de la cartera de oferta, por lo que toda la población que atienda a los criterios vigentes de inclusión puede acceder a este servicio. La legislación referente a Técnicas de Reproducción Humana Asistida (14/2006) limita la transferencia a no más de tres embriones por ciclo; si bien, los especialistas abogan por la transferencia selectiva como criterio de calidad[7].

1.2.1 INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN CONYUGAL (IAC):

Consiste en el depósito instrumental del semen conyugal (IAC) en el aparato genital femenino, preferentemente en la cavidad uterina. El semen ha sido previamente procesado en el laboratorio con técnicas encaminadas a mejorar su calidad (Consenso IFFS; revisión 1998).

Existe evidencia para indicar una IAC en parejas que no consiguen una gestación espontánea mediante relaciones sexuales o coitos dirigidos después de 12-24 meses (RCOG, ESHRE, ASMR, OMS y FIGO) ya que aumenta las posibilidades de embarazo frente a la actitud expectante tanto en ciclo natural como estimulado.

Estudio imprescindible antes de una IA:

- Seminograma y recuperación de espermatozoides móviles (REM).
- Exploración ginecológica completa con ecografía transvaginal.
- Confirmación de permeabilidad tubárica.
- Determinaciones hormonales en el 3º y 2º días de ciclo.
- Serologías de ambos miembros de la pareja (RPR, HIV, VHB y VHC).

Indicaciones de IAC:

- *Esterilidad de origen masculino leve moderada:* siempre que el REM supere, al menos, $6x10^6$/ml y se descarte una alteración severa de la morfología.
- *Incapacidad de depositar el semen en vagina:* por impotencia psicógena u orgánica, hipospadias severo, eyaculación retrógrada o disfunción vaginal.
- *Esterilidad o subfertilidad por factor femenino:* disfunción ovárica, factor cervical o uterino, endometriosis leve (grado I ó II).
- *Esterilidad de origen desconocido (EOD):* existe suficiente evidencia para afirmar que, cuanto mayor es el intervalo de años de esterilidad, menor es la tasa de gestación.

■La tasa de éxito por ciclo es del 10-15%. Si no se logra gestación está indicado repetir tratamiento en tres-cuatro ciclos consecutivos o no, y nunca más de 6. De esta forma, la tasa

de éxito acumulado en cuatro ciclos llega a alcanzar el 25-30%. La mayor parte de los embarazos se consiguen en los tres primeros ciclos de tratamiento, disminuyendo drásticamente las posibilidades en el cuarto y posteriores[20,21].

1.2.2 INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN DE DONANTE (IAD):

Introducción de forma no natural, de espermatozoides procedentes de un donante en el aparato reproductor de una mujer con objetivo de conseguir una gestación.

El estudio femenino previo a una IAD es superponible al de la IAC.

Indicaciones de la IAD:

- *Infertilidad masculina grave:*
  - Azoospermia secretora con biopsia testicular negativa.
  - Fallo de ICSI por factor masculino muy patológico: fallos de fecundación repetidos o mala calidad embrionaria.
- *Enfermedades genéticas en el varón no susceptibles de tratamiento con DGP.*
- *Enfermedades de transmisión sexual con lavados positivos repetidos.*
- *Incompatibilidad Rh con isoinmunización previa y varón homocigoto para antígeno D.*
- *Mujer sin pareja masculina*

Captación de donantes:

La selección, habitualmente, se realiza entre la población estudiante o trabajadores de ciertos sectores en los que se presupone un nivel de inteligencia medio-alto, hábitos controlados y marginalidad poco probable, con el fin de que sean bien aceptados por los receptores.

La donación es anónima, altruista y nunca tendrá carácter lucrativo o comercial. La edad de los donantes debe ser igual o mayor de 18 años sin límite superior sólidamente justificado aunque; existe correlación entre la edad paterna y el riesgo de mutaciones genéticas

en la descendencia, por lo que, se establece un intervalo etáreo de conveniencia entre los 18-25 años.

Información al donante:

- No podrá conocer ningún dato a cerca de la identidad de la mujer inseminada, ni del hijo obtenido, ni del padre social.
- No tendrá ningún derecho ni obligación sobre el hijo nacido con su semen.
- Será obligatorio su consentimiento informado por escrito.
- La información solicitada deberá darla verazmente.
- Podrá disponer de su semen congelado si quedara estéril tras la donación, previo pago del coste generado al banco de semen por su mantenimiento.
- El donante no debe ser adoptado ya que desconocería sus antecedentes familiares.

Estudio obligatorio del donante:

- Historia médica exhaustiva con antecedentes familiares, personales y hábitos tóxicos.
- Exploración física y andrológica anotando datos morfológicos como raza, peso, altura, color de pelo y ojos.
- Análisis del semen incluyendo estudio bacteriológico.
- Análisis de sangre: serologías, grupo sanguíneo y Rh.
- Cariotipo y estudio de Fibrosis Quística.

■La tasa de éxito por ciclo es del 20-25%, alcanzando el 65-75% acumulado en seis ciclos. Es importante puntualizar que, por impositivo legal, el número máximo de hijos por donante es de seis, incluyendo su propia descendencia[20,22].

1.2.3 FECUNDACIÓN IN VITRO (FIV) Y MICROINYECCIÓN ESPERMÁTICA (ICSI):

Consiste en poner en contacto los gametos masculinos y femeninos para lograr la fecundación y el desarrollo embrionario inicial fuera del organismo de la mujer.

Según el procedimiento empleado disponemos de dos posibilidades; la fecundación en vitro convencional (FIV), en la que se deposita una microgota con aproximadamente 20000 espermios en una placa que contiene ovocitos en condiciones idóneas para facilitar una fecundación espontánea o la microinyección espermática (FIV-ICSI), variedad de la anterior, en la que el embriólogo participa de forma activa introduciendo un espermio seleccionado en el interior del citoplasma de cada ovocito bajo control microscópico.

La elección de una u otra modalidad se hace inmediatamente antes de iniciar el proceso ya que la decisión está condicionada no solo por la indicación y circunstancias previas a la técnica sino por las características de los gametos obtenidos.

Indicaciones de la FIV convencional vs FIV-ICSI:

- *Factor tubárico bilateral:* lesión severa o ausencia de las trompas de Falopio.
- *Factor femenino:* fundamentalmente por endometriosis severa (grados III-IV) diagnosticado mediante laparoscopia[+5], alteraciones de la ovulación que no responden a tratamientos, alteraciones inmunológicas con trascendencia reproductiva.
- *Factor masculino severo:* afectación grave de la calidad seminal por reducción de número, movilidad o anomalías morfológicas de un alto porcentaje de los espermatozoides.
- *Fracaso de IAC anteriores o fallos de fecundación* en tratamientos previos.
- *Necesidad de diagnostico genético preimplantacional.*

■La tasa de embarazo en cada ciclo de FIV está muy condicionada por la indicación del tratamiento, la edad de la mujer y la calidad de los embriones, por lo que establecer un porcentaje global de éxito es muy complicado. En términos generales, se acepta una tasa de gestación/transferencia del 35-40%. El 80% de los embarazos se obtienen en los tres primeros

ciclos, por lo que la realización de un cuarto y superiores deberá de ser minuciosamente evaluado en cada caso concreto[20,23].

1.2.4 DONACIÓN DE OVOCITOS (DO):

Aquella técnica de reproducción en la que el gameto femenino es aportado por una donante en casos en los que la receptora sea portadora de una alteración genética o cromosómica, disponga de ovocitos de calidad insuficiente para obtener un embarazo viable o se hayan agotado.

Indicaciones de la donación de ovocitos:

Mujeres sin función ovárica:

- *Fallo ovárico primario:* disgenesias gonadales puras, síndrome de Turner, Síndrome de Swayer.
- *Fallo ovárico prematuro (FOP):* yatrógeno, autoinmune, infeccioso, metabólico, etc.
- *Menopausia.*

Mujeres con función ovárica:

- Portadoras de alteraciones genéticas.
- *Fallos repetidos de FIV-ICSI:* baja respuesta, mala calidad ovocitaria o embrionaria, fallo de fecundación, fallo de implantación.
- *Abortos de repetición.*
- *Ovarios inaccesibles a FIV:* (<1%) pelvis congeladas por infecciones o endometriosis, adherencias postquirúrgicas.

Screening de donantes:

La ley española de Reproducción Humana Asistida 14/2006 señala que, la donación de ovocitos debe ser anónima, altruista y nunca tendrá carácter lucrativo o comercial. La donante deberá tener más de 18 años y plena capacidad de obrar. El Real Decreto 412 de 1996 establece que el límite etario superior son los 35 años. Su estado psicofísico deberá cumplir los términos de un protocolo obligatorio de estudio que tendrá carácter general, historial negativo en lo que se refiere a enfermedades de transmisión genética y estudio serológico previo al inicio de la estimulación.

La usuaria de la técnica y los hijos nacidos de su aplicación tienen derecho a obtener información general sobre el donante siempre que no incluya su identidad.

Los centros autorizados y el Registro Nacional velarán para restringir el nacimiento de un máximo de seis hijos por cada donante incluyendo los propios. Así mismo, se deberá garantizar la máxima similitud fenotípica e inmunológica así como las máximas posibilidades de compatibilidad con la mujer receptora y su entorno familiar.

■Las tasas de gestaciones obtenidas son las más elevadas en comparación con cualquier otra técnica de reproducción, ya que los ovocitos proceden de mujeres jóvenes y sanas. Según datos del registro de la Sociedad Española de Fertilidad, la probabilidad de éxito tras una ovodonación es superior al 50% por ciclo[24,25].

1.3 FRACASO DE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA: EL FALLO DE IMPLANTACIÓN

LA FECUNDACIÓN:

La fecundación se define como la penetración de un espermatozoide en un ovocito maduro, que comienza con el contacto del espermio y la zona pelúcida del ovocito y finaliza cuando el cigoto tiene dos blastómeras (30 horas aproximadamente).

En este proceso, llevado a cabo en la trompa de Falopio, se crea un cigoto con genoma propio que se irá dividiendo por mitosis dando lugar a la mórula. El cigoto progresa gracias a los movimientos de peristaltismo tubárico hacia la cavidad uterina donde tendrá lugar el proceso de implantación. La mórula (16 a 32 células), tarda tres días en llegar a cavidad, envuelta todavía en zona pelúcida, donde comienza a cavitarse hasta alcanzar la fase de blastocisto (100 células). El hatching o rotura de la zona pelúcida, es un requisito indispensable para la implantación. El blastocisto puede llevarlo a cabo en la cavidad uterina o en un sitio fuera de ella (ectópico), lo que descarta la intervención activa del endometrio en éste proceso; no obstante, el hatching debe producirse en la fase de máxima receptividad endometrial o "ventana de implantación" con el fin de asegurar una correcta adhesión. Éste período en los seres humanos se extiende del día 6 al 10 postovulación, es decir, entre el día 20 y el día 24 de un ciclo ideal[26].

LA IMPLANTACIÓN:

La implantación consta de tres fases consecutivas; la aposición, la adhesión y la invasión.

Durante la *aposición*, el blastocisto se orienta y localiza el punto de invasión endometrial. Este punto es especie-específico y en los humanos se sitúa en el fondo y/ tercio superior de cara posterior uterina (localización más habitual de la placenta)[26,27].

La *adhesión* es la fase en la que contactan el trofoectodermo del blastocisto y el epitelio luminal del endometrio. Se especula que esta unión se realiza a través de moléculas puente entre las integrinas de ambas superficies y/o mediante la unión de integrinas endometriales con sus receptores en el blastocisto. Una integrina de membrana reconocida como fundamental es la alfaV/beta 3, que comparte dominio beta3 con las proteínas de membrana responsables de la adhesión plaquetaria[28]. Si bien el mecanismo molecular es controvertido, se han identificado multitud de citocinas e interleucinas imprescindibles para llevar a cabo el proceso cuya manipulación en el laboratorio bloquea la adhesión endometrial. Algunas de ellas son el factor estimulante de colonias tipo 1 (CSF-1), el factor inhibidor de la leucemia (LIF) o la interleucina 1 y 6 (IL-1, IL-6)[27].

Por último, durante la fase de *invasión*, el trofoblasto embrionario penetra y desplaza el endometrio hasta romper la membrana basal invadiendo el estroma y los vasos uterinos. En los humanos, la placentación se denomina hemocorial, ya que la sangre materna está en contacto directo con el trofoblasto en el espacio intervelloso. El proceso de invasión está mediado y regulado por sistemas proteolíticos compuestos por proteasas e inhibidores-proteasa-específicos que controlan la capacidad invasora del trofoblasto. Algunos conocidos como el activador del plasminógeno-uroquinasa (u-PA)/inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), metaloproteinasas (estromalisina, colagenasa tipo IV), producidas por el trofoblasto, el factor transformante del crecimiento β (TGF-β) de origen decidual, y otros pendientes de conocer[28,29].

FALLO DE IMPLANTACIÓN:

El **fallo de implantación** se define como la ausencia de gestación tras un mínimo de tres ciclos con embriones frescos o congelados con adecuada transferencia de, al menos, cuatro embriones de buena calidad en mujer menor de 40 años[30].

Se trata de un grave problema que llega a afectar a un tercio de las parejas sometidas a FIV considerándose uno de los factores limitantes de mayor trascendencia en la reproducción asistida junto a las pérdidas fetales de repetición. El diagnóstico se hace por exclusión[30,31].

Aunque la tasa de gestación obtenida mediante TRA ha alcanzado cifras más que aceptables, el trabajo y el empeño van dirigidos a incrementar el porcentaje de éxitos, especialmente, en aquellas parejas con peores estadísticas. Para ello resulta imprescindible identificar la mayoría de anomalías responsables de fracasos no controlados de los tratamientos.

Cuando se inicia un ciclo, existen varios factores que pueden orientar la probabilidad de éxito de cada una de sus fases.

1.3.1 FACTORES PREDICTORES DE ÉXITO EN UN CICLO DE REPRODUCCIÓN:

1.3.1.A : Predictores de respuesta ovárica:

Se consideran factores pronósticos de respuesta ovárica a la estimulación, la edad de la paciente, la respuesta a ciclos previos, el nivel de FSH basal en fase folicular precoz, el recuento de folículos antrales y el nivel circulante de hormona antimuleriana (AMH) como marcador independiente de reserva folicular. Algunos son condicionantes inalterables y otros pueden ser convenientemente modificados[31-33].

1.3.1.B : Predictores de fecundación exitosa:

Existen marcadores considerados pronósticos de fecundación como la calidad espermática y, especialmente, la calidad ovocitaria; si bien, ninguno de ellos ofrece la posibilidad de transformación y mejora en el laboratorio. No obstante, en la actualidad, los fallos de fecundación se han reducido significativamente mediante el empleo de la técnica de FIV-ICSI[31].

1.3.1.C : Predictores de correcta implantación:

La implantación es una fase no bien conocida en la que quedan varias incógnitas por despejar. A consecuencia de ello, el fallo de implantación es un trastorno de etiología compleja y muy controvertida donde existen marcadores pronósticos aún desconocidos y otros identificados aunque no siempre bien desarrollados. Estos se dividen en factores maternos y otros dependientes del embrión[34].

A.- FACTORES EMBRIONARIOS:

A.1) Calidad embrionaria:

El ideal de laboratorio supone conseguir el desarrollo de un embrión con el mayor potencial de implantación posible y poderlo seleccionar para su transferencia. Por ello, la calidad embrionaria está considerada un indicador de éxito de un tratamiento de reproducción de suma trascendencia.

Un buen sistema de clasificación embrionaria es fundamental para:

- Hacer una correcta selección del producto a transferir.
- Estandarizar los tipos y características del embrión y emplearlo como referencia en estudios entre distintos centros.
- Hacer transferencias selectivas limitando el porcentaje de embarazo múltiple.
- Permitir comparar eficacia de resultados entre ciclos de una misma paciente.
- Evaluar distintos métodos de cultivo.

En la práctica habitual, la valoración de la calidad embrionaria se basa en criterios exclusivamente morfológicos. Esto nos permite clasificarlos en distintas categorías con intención de seleccionar los mejores para transferir y criopreservar.

Las principales características a evaluar son: el número de células o blastómeras, el tamaño celular y su simetría, el aspecto del citoplasma, la multinucleación y el porcentaje de fragmentación[35,36]. Mediante la evaluación de estos aspectos podemos establecer tres categorías embrionarias **(Tabla 5)**:

- Embriones óptimos son aquellos que presentan un correcto desarrollo y reúnen características de buen pronóstico de implantación. Serán los primeros elegidos para transferir y criopreservar en caso de excedente.
- Embriones subóptimos aquellos que se desarrollan correctamente pero presentan algún determinante de menor viabilidad. Los consideramos para transferir ante la ausencia de embriones de buena calidad. Se pueden preservar como embriones acompañantes junto a otros óptimos o hacerlo solo si alcanzan estadio de blastocisto de forma correcta.
- Embriones no viables o anormales, como los bloqueados, serán completamente descartados por falta de potencial implantacional.

Los criterios morfológicos referidos son la primera barrera de criba, si bien, para la elección de los embriones a transferir conviene atender a otros aspectos que nos permitan afinar la selección, especialmente si disponemos de varios embriones óptimos. Tendrán preferencia aquellos con mayor vesiculación del citoplasma, zona pelúcida mas fina y mejor contacto celular. Si nuestros medios lo permiten adquieren protagonismo la valoración de la morfología de los zigotos y la división temprana o primera división mitótica[35-38].

El patrón nuclear en el estadio de zigoto no determina el correcto desarrollo del embrión, ya que es independiente, pero es importante como criterio de selección en el momento de la transferencia. Está demostrado que, los embriones procedentes de un zigoto con buena morfología (pronúcleos centrales, adyacentes y de tamaño similar) tienen mayor tasa de implantación, embarazo y supervivencia tras la descongelación. Para poder

considerarlo es fundamental trabajar con cultivos individualizados que nos permitan seguir la evolución de cada embrión por separado[39].

La división temprana es un indicador de calidad del embrión y su capacidad de desarrollo, ya que condiciona la morfología óptima el día de la transferencia. Es un buen criterio para discriminar embriones de la misma calidad, escogiendo el que, presuntamente, tiene mayor posibilidad de implantar[40,41].

La Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR), lleva años analizando los principales parámetros que permitan identificar embriones con mayor capacidad implantatoria reduciendo al máximo la subjetividad del proceso.

Según el potencial implantatorio esperado, la ASEBIR establece cuatro categorías:

Categoría A: Preembrión de óptima calidad con máxima capacidad de implantación.

Categoría B: Preembrión de buena calidad con elevada capacidad de implantación.

Categoría C: Preembrión regular con probabilidad de implantación media.

Categoría D: Preembrión de mala calidad con probabilidad baja de implantación.

La valoración se realiza tras múltiples observaciones en momentos determinados de su desarrollo, especialmente entre los días +2 (44-47 horas tras inseminación) y +3 (67-71 horas tras inseminación) de vida embrionaria **(Tabla 5)**:

Los parámetros evaluados son: el número de células, el grado de fragmentación, la igualdad de tamaño celular, la vacuolización y la multinucleación.

Tabla 5: Características morfológicas de los embriones:

Embriones óptimos Categoría A*	D2: 4 células simétricas <10% de fragmentación, no multinucleado D3: 7-8 células simétricas <10% de fragmentación.
Embriones acompañantes Categoría B, C*	D2: 2,3,5 células; D3: <6 ó >9 células Ligera desorganización o asimetría Zona pelúcida anormal Fragmentación del 10-35% Pequeñas vacuolas
Embriones anormales Categoría D*	Asociación de las anteriores Bloqueados o D2>6 células o D3>12 células Fragmentación tipo IV ó superior al 35% >30% embrión vacuolado Multinucleación en D2 Blastómeras degeneradas o con citolplasma contraído Célula dominante (≥50% embrión)

*Categoría ASEBIR 2007.

A.2) Alteración en el material genético del embrión:

Los trastornos en el genoma embrionario suponen una de las principales causas de las pérdidas fetales de repetición y de los fracasos en la implantación. Estas modificaciones pueden producirse en la fecundación precoz o meiosis o en la primera división mitótica del ovocito. Ambos miembros de la pareja, aun asintomáticos, pueden aportar gametos aneuploides que en ellos se encuentran balanceados. De esta unión, siguiendo el proceso de segregación genética normal, resultarían dos tercios de embriones genéticamente anómalos susceptibles de no implantar o ser abortados.

Hoy en día, contamos con la posibilidad de controlar estas alteraciones analizando la presencia de anomalías genéticas y cromosómicas mediante la biopsia y el diagnóstico genético preimplantacional (DGP) antes de transferir los embriones al útero materno.

Una vez producida la fecundación mediante técnica de microinyección (ICSI), el zigoto humano se divide cada 24 horas aproximadamente, consiguiendo una media de 8 blastómeros transcurridos tres días desde la captación ovocitaria. Éste es el momento idóneo en el que, a través de una apertura en la zona pelúcida, se realiza la **biopsia del embrión.** Por microaspiración se obtienen 1 ó 2 blastómeras o células para analizar; manteniendo el resto del embrión en cultivo a la espera de ser transferido, habitualmente en el día +5.

Ésta técnica nos permite obtener resultados en 3 a 48 horas, período perfectamente compatible con el tiempo máximo de desarrollo embrionario in vitro. Hay posibilidades de tomar la biopsia en otras etapas del desarrollo madurativo o bien del ovocito (biopsia del corpúsculo polar) o bien del embrión (biopsia de blastocisto, en el día 5 ó 6), pero en ninguno de los casos se asegura la posterior transferencia en correcto estado[31,34].

DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (DGP):

EL DGP se presenta como una forma de de diagnóstico muy precoz que, apoyándose en las nuevas técnicas de reproducción asistida, hace posible el estudio genético de los embriones antes de ser transferidos. Ésta técnica se considera clínicamente útil cuando su

aplicación contribuye a incrementar la posibilidad de obtener un recién nacido no afecto por la enfermedad que se pretende evitar. Por tanto, el DGP debería orientarse hacia el estudio de embriones procedentes de:

-Pacientes afectos o portadores de enfermedades de herencia monogénica conocida.

-Pacientes portadoras de alteraciones cromosómicas identificadas y transmisibles.

-Pacientes con mayor riesgo de sufrir alteraciones genéticas en sus gametos siendo susceptibles de crear embriones genéticamente anormales (como las mujeres con fallo de implantación o las abortadoras de repetición).

Para que la técnica resulte rentable es imprescindible que se cumplan ciertas condiciones como:

- Perfecto conocimiento de la alteración genética o cromosómica responsable de la enfermedad a evitar.
- Evidencia de un riesgo suficiente de transmisión de una enfermedad relevante a la descendencia.
- Posibilidad de conseguir un número suficiente de embriones para poder realizar estudio y seleccionar al menos uno sano para ser transferidos (se estima necesario un número mínimo de 6 embriones/ciclo).
- Control de los factores no embrionarios que aseguren una implantación y exitoso desarrollo embrionario hasta conseguir un neonato sano.
- Correcta información, asesoramiento genético y detalle de las limitaciones de las técnicas de DGP ofrecido por expertos a las parejas candidatas.

Según las recomendaciones de la SEF cada centro debe establecer sus criterios de selección para el DGP, siempre atendiendo a un criterio general de inclusión: “El DGP está indicado cuando el diagnóstico genético sea técnicamente posible, su fiabilidad sea elevada, las posibilidades de éxito sean aceptables y las técnicas de reproducción sean factibles”. Y sin

obviar un criterio general de exclusión: "El DGP está contraindicado cuando el diagnóstico genético no sea posible o incierto, cuando las posibilidades de éxito no sean aceptables o si las técnicas de reproducción están contraindicadas"[42,43].

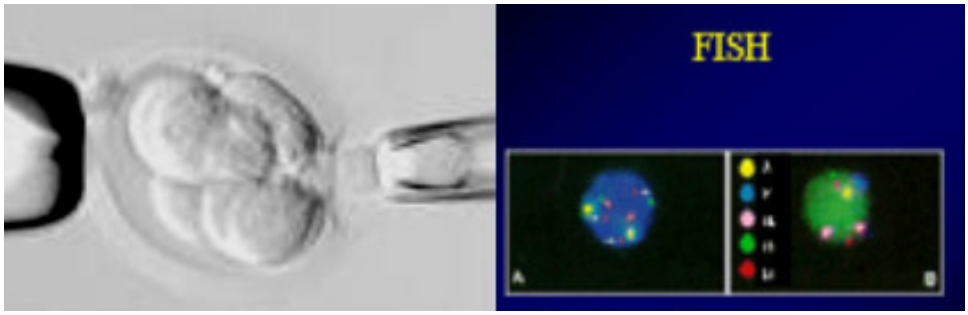
INDICACIONES DEL DGP:

- Enfermedades monogénicas en las que existe un diagnóstico fiable.
- Anomalías cromosómicas numéricas o estructurales identificadas
- Abortos de repetición.
- Fallos de implantación repetidos.
- Factor masculino severo.
- Antecedentes de embarazos con alteraciones cromosómicas identificables.

El objetivo final y futuro de la medicina genética reproductiva plantea conseguir marcadores genéticos que permitan identificar los embriones sanos que implantarán y se desarrollarán con normalidad para ser fácilmente seleccionados y transferidos en ciclos con elevadas tasas de éxito[42].

►El *estudio cromosómico* de los blastómeros biopsiados, tanto numérico como estructural, se realiza mediante técnicas de hibridación in situ (FISH) empleando sondas fluorescentes de ADN específicas para marcar los cromosomas a estudio. De esta manera, utilizando un microscopio de fluorescencia, podemos identificar el número de copias y la estructura de un determinado cromosoma **(Figura 5).**

Fig.5: Biopsia embrionaria + DGP por FISH



En el protocolo habitual se incluye el estudio del cromosoma X, Y, 18, 13, 21, 16 y 22 en tres rondas de hibridación consecutivas tal como describieron Vidal and cols[44]. Se podrán incluir más según la indicación del DGP. Resulta evidente que, de esta forma, se valora menos de un tercio de la información cromosómica; por lo que la tasa de éxito queda limitada a los fallos de implantación secundarios a alteraciones a este nivel.

Se consideran especialmente rentables para este estudio aquellos grupos de pacientes con enfermedades conocidas y secundarias a alteraciones únicas de determinados cromosomas, Un buen ejemplo son las parejas con enfermedades asociadas a cromosomas sexuales como la hemofilia o la distrofia muscular de Ducchenne, con mujeres menores de 37 años, en las que el porcentaje de alteraciones cromosómicas no se ve excesivamente incrementado por la edad materna. En ellas únicamente la selección de sexo permite erradicar la enfermedad en esa línea familiar[26].

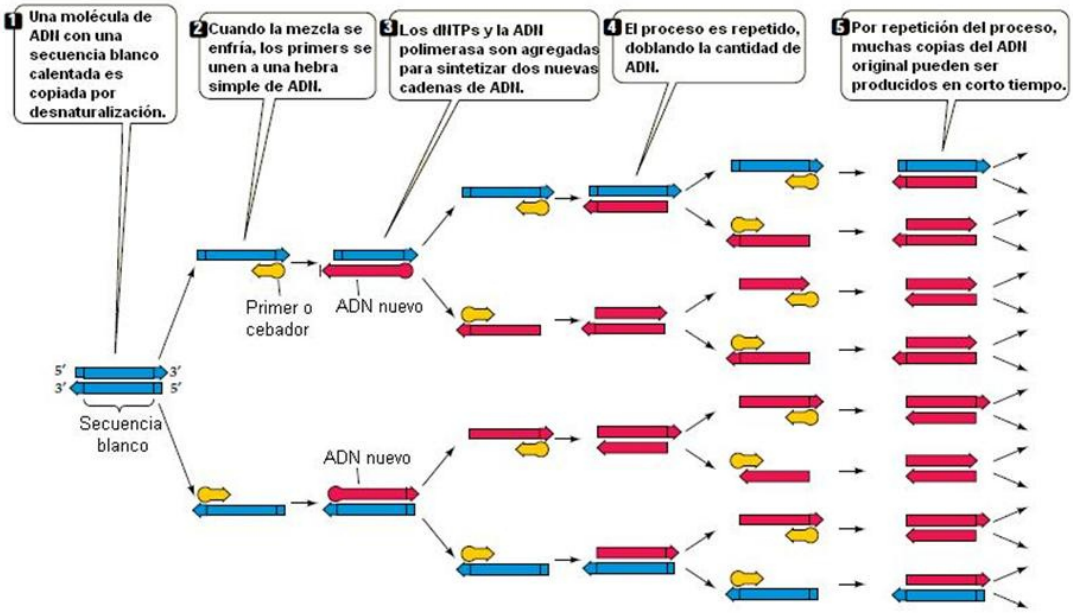
Otro punto a destacar es que, la incidencia de anomalías cromosómicas tiende a repetirse sistemáticamente en los embriones obtenidos de una misma pareja, lo cual supone una información valiosa a transmitir a los padres antes de un segundo ciclo[45].

►El estudio genético de las blastómeras se realiza ampliando secuencias específicas del ADN de ciertos genes mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) **(Figura 6)**.

Actualmente, esta técnica se emplea para localizar genes mutados responsables de la manifestación de ciertas enfermedades con la finalidad de no perpetuarlas en la descendencia.

Por tanto, esta modalidad de DGP está indicada en enfermedades monogénicas de las que se disponga de un estudio directo de mutaciones y/o un estudio indirecto donde se verifique el haplotipo asociado, lo cual debe ser previamente evaluado y corroborado por una comisión genético-ginecológica.

Fig.6: Amplificación de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)



Para el estudio por PCR se requiere una especial precaución en el procesado de las biopsias por lo que la fecundación debe realizarse, necesariamente, mediante ICSI con una decumulación ovocitaria exhaustiva. Se acepta realizar el diagnóstico en una sola célula mononucleada, si bien se recomienda hacer el análisis de dos células independientes. Por complicaciones inherentes a los cuidados requeridos por la técnica, se acepta que un 10% de los embriones biopsiados serán no aptos para diagnóstico[42,45].

Según la guía de protocolos de la SEF, se recomienda que el estudio genético garantice un 80-90% de amplificación de las células analizadas y una fiabilidad del 95%, con una tasa de pérdidas alélicas (ADO) inferior al 10%. Igualmente, se recomienda establecer el diagnóstico en base a la opinión o lectura de resultados por parte de dos expertos. Estos resultados deben ser contrastados en todas las células analizadas de un mismo embrión y/o

para todos los loci estudiados, siendo candidatos a transferencia únicamente, aquellos embriones para los que exista plena concordancia de normalidad[42].

Limitaciones del DGP:

1. **Limitación en el diagnóstico:**

La técnica de DGP está basada en la identificación y estudio de ciertas anomalías genéticas preestablecidas antes de comenzar el proceso. La normalidad de los resultados obtenidos no excluye la existencia de anomalías genéticas o congénitas no estudiadas, no detectables o no identificadas mediante los procedimientos aplicados. Por esta razón, se debe recomendar someter a diagnóstico prenatal todos los embarazos obtenidos tras FIV-DGP.

2. **Diagnóstico insuficiente o no concluyente:**

Los cuidados necesarios en la manipulación de las biopsias en la PCR, la imposibilidad de obtener el 100% de información de un solo núcleo en interfase mediante FISH y la existencia de mosaicismos implican que, alrededor de un 7-10% de los blastómeros a estudio se quedan sin diagnosticar o con diagnósticos erróneos o incompletos. Esto obliga a informar exhaustivamente a los futuros padres incidiendo en que existe un 0,9% de posibilidades de obtener un feto afecto por la alteración genética a pesar de haber realizado DGP.

3. **Insuficiente número de embriones:**

Problema importante en las bajas respondedoras, muy habitualmente añosas.

4. **Deterioro embrionario:**

La extracción de células para analizar puede influir negativamente en el desarrollo de algunos embriones. Por otra parte, el resto del embrión biopsiado debe permanecer en un medio de cultivo a la espera de ser transferido. Ambas

circunstancias pueden comprometer el número de embriones disponibles para la transferencia, especialmente en los casos en los que el número inicial no era elevado[42,45,46].

B.- FACTORES MATERNOS:

B.1) Alteraciones en la anatomía uterina:

Resulta primordial comprobar la integridad de la cavidad uterina. Alteraciones en la anatomía del aparato reproductor bien de origen congénito (septos, duplicidad) o bien adquirido (miomas submucosos, pólipos endometriales, adherencias, etc.) pueden interferir en la correcta implantación embrionaria[34,47].

B.2) Receptividad endometrial:

La función y capacidad receptora del endometrio es crucial para que la implantación embrionaria transcurra con normalidad. Durante el ciclo menstrual el endometrio prolifera sufriendo cambios morfológicos e histológicos traducidos en un incremento de su espesor y su grosor. Por efecto de la progesterona postovuladora se producen modificaciones a nivel inmunitario local que favorecen, durante unos días, las condiciones óptimas para la aposición, adhesión y posterior invasión del embrión. Este breve espacio de tiempo se denomina “ventana de implantación”[48].

Se documentan multitud de publicaciones que tratan de esclarecer cuáles son las condiciones óptimas que debe reunir un endometrio para favorecer al máximo la implantación embrionaria. Estudios con amplia casuística estiman un grosor endometrial apropiado entre 6 y 17 mm, comprobando que la tasa de gestación disminuye tanto en endometrios finos como en los excesivamente desarrollados[30]. La estructura trilaminar, que tanta importancia tuvo en otro tiempo, parece haber perdido rigor. Una correcta vascularización endometrial y subendometrial estudiada mediante ecografía 3D y power Doppler color, parecen asociarse a mejores resultados FIV, especialmente cuando se transfiere un solo embrión[49,50]. No obstante, estas

pruebas no están incluidas en los protocolos de seguimiento de ciclo por lo que, en el momento actual, carecen de utilidad práctica[51].

Existen varias líneas de trabajo implicadas en reproducir las condiciones óptimas de la ventana de implantación con el fin de mejorar los resultados de los tratamientos de esterilidad[51]. Incluso, se plantea un estudio de determinantes genéticos de receptividad endometrial dirigido a detectar pacientes condenadas a repetir un embrio-transfer fallido a causa de un endometrio con malas condiciones implantatorias[50].

Los defensores del endometrio como sustrato morfológico fundamental abogan por terapias basadas en regímenes de estradiol a dosis altas por vía oral o tansvaginal así como por medicamentos orientados a mejorar la vasculatura como el ácido acetil-salicílico y el sinderafilo[49].

Corrientes mas innovadoras que conceden un papel mas relevante a la epigenética endometrial estudian posibles regímenes de inmunoterapias como la instilación endometrial de hCG y LIF (factor inhibidor de la leucemia) cuya secreción podría estar disminuida en pacientes con fallo de implantación[48]. En un estudio multicéntrico, randomizado, doble ciego de Brisden at al[52], publicado en el año 2009 en la revista Fertility Sterility no se consigue demostrar una mejoría frente a placebo en el porcentaje de implantación y gestación en el grupo con administración sistemática de r-hLIF despúes de la embriotransferencia, no obstante, se deja abierta la posibilidad de seguir revisando esta esperanzadora terapia. Gleicher et al[53]. en su trabajo publicado en la misma revista en el año 2011, sugieren la perfusión endometrial de factores de crecimiento como las G-CSF (colonias estimuladoras de granulocitos) en pacientes con fallo de implantación refractarias al tratamiento con estrógenos y vasodilatadores. Recientes estudios presentan el G-CSF como potentes inhibidores de la actividad de células NK (natural killer cells) con presencia de receptores endometriales para células NK, presuntamente implicadas en el fracaso de implantación[54,55].

Hay grupos, como el de Narvekar et al[56]. que plantean el estímulo mecánico del endometrio mediante cánulas de biopsia (“sampling”) como mecanismo natural de activación del sistema inmune local a través de una reacción inflamatoria.

En muchos casos los investigadores objetivan un incremento en la tasa de implantación y/o gestación; sin embargo, concluyen que los efectos directos de la inmunoterapia sobre el endometrio no quedan claros aunque resultan prometedores.

B.3) Factores inmunológicos:

Para que un embarazo progrese es necesaria una respuesta adaptadora del sistema inmune materno que permita el desarrollo de un tejido extraño sin desencadenar una reacción de rechazo. El HLA (complejo mayor de histocompatibilidad humano), cumple un papel fundamental en este proceso de reconocimiento[30].

Se ha planteado que compartir alelos comunes de HLA entre ambos miembros de la pareja podría ser causa de pérdidas fetales de repetición o incluso suponer un posible origen del fallo de implantación en ciertos pacientes. El mecanismo fisiopatológico no está claro, si bien, se ha observado que en estas parejas se produce una respuesta inadecuada del sistema inmune materno al estímulo de los antígenos paternos con una reacción excesivamente citotóxica secundaria a un disvalance T 1 helper / T2 helper y un déficit en la expresión de inmunoreguladores HLA-E, HLA-F Y HLA-G imprescindibles en la tolerancia de la madre al feto.

Existen varias líneas de investigación al respecto que buscan la manera de desensibilizar a la mujer instilando inmunoglobulina de diversos orígene[57].

B.4) Trombofilias:

Existe una clara relación entre los estados de hipercoagulabilidad y las pérdidas fetales de repetición. Especialmente en las relacionadas con el síndrome antifosfolípido. En estos casos, se defiende una etiopatogenia dual basada en trastornos de coagulación a nivel del pequeño y mediano vaso úteroplacentario combinado con una alteración proinflamatoria responsable de una alteración en la capacidad de replicación e invasión del trofoblasto[51,58].

Numerosos autores defienden un mecanismo similar entre los abortos de repetición típicos del síndrome antifosfolípido y los casos de fallo de implantación en pacientes en los que se demuestra una trombofilia congénita o adquirida. Los microtrombos a nivel de la circulación

del mio y endometrio sumado a un trofoblasto alterado y discapacitado en su función proliferativa e invasiva, dificultarían la adhesión e invasión embrionaria condicionando un fracaso precoz de la gestación[59].

No existe un consenso respecto a la relación de causalidad entre las trombofilias y el fallo de implantación; no obstante, todos los grupos dedicados a su estudio coinciden en que esta patología es más prevalente en dicho grupo poblacional[60].

En mujeres abortadoras de repetición con síndrome antifosfolípido demostrado se ha comprobado la conveniencia de iniciar precozmente un tratamiento con AAS y bajas dosis de corticoide[61].

El empleo de la heparina de bajo peso molecular (HBPM) tanto en las mujeres referidas como en las diagnosticadas de un fallo de implantación es muy controvertido a pesar de documentarse amplias series en las que su administración en mujeres portadoras de una trombofilia mejora significativamente el porcentaje de éxito de la FIV. Sin embargo, sí existe consenso en la inconveniencia de administrar HBPM cuando no existe una patología demostrada a pesar de clasificar a la paciente como fallo de implantación repetido o abortadora sistemática[62,63].

Uno de los grandes retos de la reproducción asistida consiste en identificar posibles causas del fallo de implantación, especialmente aquellas noxas con posibilidad de tratamiento capaces de mejorar el futuro reproductivo de estas parejas.

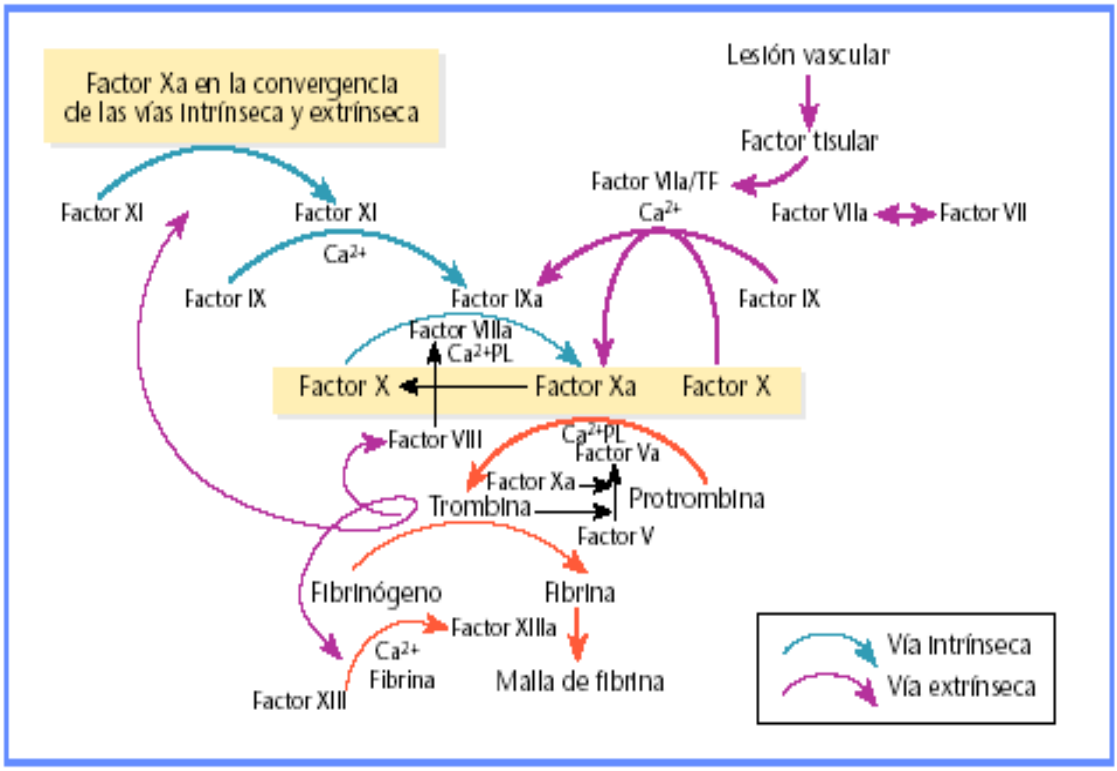
Persiguiendo este objetivo en los últimos años ha tomado una importante relevancia el estudio de los estados de hipercoagulabilidad y las alteraciones de la autoinmunidad como posibles factores causales o, al menos, colaboradores de la patología de la implantación embrionaria.

1.4 ESTUDIO DE TROMBOFILIAS

El término trombofilia fue acuñado en contraposición al de hemofilia para señalar una predisposición a padecer trombosis venosas y arteriales.

Dentro de este trastorno procoagulante se distinguen dos grandes familias, las trombofilias de origen hereditario o genético y las formas adquiridas.

Tabla 6: Cascada de la coagulación sanguínea



1.4.1 TROMBOFILIAS CONGÉNITAS O FAMILIARES

Las **trombofilias congénitas (Tabla 7),** se asocian a un incremento significativo en la prevalencia de eventos trombóticos venosos y a un ligero aumento de las pérdidas fetales de repetición; por el contrario, las trombosis arteriales son casi excepcionales.

Estos trastornos se relacionan con alteraciones genéticas, habitualmente aisladas, que condicionan el déficit o la disfunción de algún factor que interviene en la cascada de la coagulación sanguínea. Tanto la gravedad del cuadro clínico como el riesgo de recidiva dependerá del tipo de mutación, de la edad del individuo y de los factores desencadenantes y concomitantes. Los trastornos considerados de mayor riesgo trombótico son el déficit de

antitrombina III y los sujetos homocigotos o doble heterocigotos para defectos de menor riesgo, especialmente Factor V Leiden y protrombina[63].

Exceptuando algún caso puntual de los grupos citados, la manifestación clínica de las trombofilias congénitas se produce ante una situación externa desencadenante como una intervención quirúrgica, un período de inmovilización prolongado o la toma de anticonceptivos hormonales orales (ACHO) y terapia hormonal sustitutiva (THS). Es por ello que, la mayoría de estos trastornos suponen un hallazgo casual en el contexto de una trombosis venosa profunda (TVP) o un estudio de hipercoagulabilidad a integrantes de una misma familia con uno o varios miembros afectados por un fenómeno trombótico[64].

1.4.1.1 Déficit de proteína C y proteína S:

Son trombofilias asociadas a un riesgo relativo de trombosis 10 veces superior al de la población sana. Ambas son glucoproteínas con síntesis vitamina K dependiente. La proteína C actúa como inhibidor de los cofactores de Va y VIIIa mediante la proteólisis de sus moléculas. El déficit de esta proteína es el resultado de una mutación genética, que en la mayor parte de los casos es heterocigota; dando lugar a un defecto tipo I con producción deficitaria de proteína o tipo II en el que se produce una molécula no funcional.

La prevalencia en la población del ***déficit de proteína C*** oscila entre el 0,2 al 0,5% llegando al 3% entre pacientes con ETEV no seleccionados.

La proteína S es un cofactor de la proteína C encargada de potenciar su acción inhibidora. En el laboratorio únicamente se cuantifica la fracción libre, un 40% del total, que supone la porción activa como cofactor C.

La prevalencia poblacional del ***déficit de proteína S*** es del 0,1%, sin olvidar una deficiencia fisiológica durante la gestación y entre las usuarias de anticoncepción hormonal. Ambas deficiencias son de herencia autosómica dominante[60,63].

1.4.1.2 Déficit de antitrombina III:

La antitrombina III es una glucoproteína encargada de bloquear la acción de la trombina, factores Xa, IXa, XIa y del FVIIa cuando se encuentra unido al factor tisular. La antitrombina es el cofactor de la heparina, la cual induce un cambio en su estructura molecular que aumenta hasta 1000 veces su actividad inhibidora. La herencia es autosómica dominante. Las formas homocigotas son, en su mayoría, incompatibles con la vida.

La prevalencia del ***déficit de antitrombina III*** en la población española es del 0,02%, alcanzando el 1% entre pacientes con ETEV no seleccionados. El riesgo relativo de enfermedad tromboembólica se ha evaluado en 50 con respecto a la población sana, únicamente comparable al riesgo asociado a mutaciones homocigotos o dobles heterocigotos de otros trastornos menores. Esto se traduce en que las manifestaciones clínicas pueden comenzar a partir de los 10 años de edad y a los 40 el 80% hayan presentado algún evento trombótico espontáneo o asociado a factores de riesgo transitorios. El riesgo de recidiva es elevado y aumenta con la edad[62-64].

1.4.1.3 Resistencia a la proteína C activada:

Es un dato analítico que puede responder a diversas causas, algunas de ellas adquiridas, como la elevación del factor VIII; si bien, la más importante es la presencia de factor V Leiden. El factor V es un importante factor procoagulante que potencia la acción del factor Xa en la activación de la protrombina a trombina. Este paso es inactivado por la proteína C que lisa el factor V por proteólisis sobre los residuos de arginina en las posiciones 306, 506 y 679. La mutación R506Q del gen del factor V da lugar a una molécula anómala con una glutamina en lugar de una arginina en posición 506, denominada ***factor V Leiden***, resistente a la inactivación ejercida por la proteína C.

Es una de las causas de trombofilia más frecuentes con una prevalencia media en la población del 5% (2%-7% en población caucásica) que no se produce entre los indios americanos, ni en los negros africanos ni entre la población de extremo oriente[63,65].

En España la prevalencia es del 3%, llegando al 13% entre los pacientes con un ETEV no seleccionados. La herencia es autosómica dominante. La mayoría de los casos son heterocigotos con un riesgo relativo trombótico 8 veces superior al de la población sana. La prevalencia de la mutación V Leiden homocigota ronda el 0,1% (0,06-0,2%) con un riesgo relativo de trombosis hasta 10 veces superior al de los pacientes heterocigotos[63].

1.4.1.4 Mutación G(20210)A del gen de la protrombina:

Responsable de un aumento de la concentración de protrombina en plasma y con ello de un incremento del riesgo relativo de trombosis de 3 veces con respecto a la población sana.

La prevalencia de pacientes heterocigotos en España se ha descrito entre el 3,5 al 6,2%, aumentando al 6-17% entre pacientes con antecedente de ETEV no seleccionados. Entre las peculiaridades clínicas, destaca un elevado porcentaje de cuadros trombóticos de senos venosos craneales[66].

1.4.1.5 Mutación de la MTHFR + Hiperhomocisteinemia:

La homocisteína es un aminoácido de complejo metabolismo en el que intervienen la vitamina B12, B6 y el ácido fólico como sustratos o cofactores de diversas encimas como son la metrilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y la cistationina β-sintetasa. Los niveles séricos normales se encuentran entre 5 y 15 µmol/l.

La ***hiperhomocisteinemia*** con elevación moderada de estas cifras (16-100µmol/l) se asocia a un incremento del riesgo relativo de trombosis arterial y venosa de 2,5 con respecto a la población con cifras de homocisteína dentro de la normalidad; documentándose niveles elevados de este aminoácido en el 15% de los pacientes con ETEV.

El desarrollo de cuadros con aumento moderado de homocisteína se han atribuido a diversas causas, congénitas y adquiridas, entre las que destacan las hipovitaminosis B12, B6, carencias de folatos y la ***mutación C677T homo o heterocigota del gen de la MTHFR***. Esta última alteración es muy frecuente entre la población caucásica llegando a calificarse como rasgo poblacional. Se ha demostrado que, el riesgo trombótico de la mutación es mínimo si no se asocia a una hiperhomocisteinemia[63,67].

Por otra parte, elevaciones de la homocisteína sérica >100µmol/l, se atribuyen a defectos genéticos severos de la cistationina β-sintetasa que da lugar a una rara enfermedad denominada homocistinuria caracterizada por un desarrollo precoz de ateroesclerosis con un marcado incremento del riesgo cardiovascular y un riesgo elevado de complicaciones trombóticas arteriales y venosas en pacientes jóvenes[67].

Tabla 7: Trombofilias congénitas o familiares[63]

Factor de riesgo	Prevalencia en la población%	Frecuencia en pacientes con ETEV%	Riesgo relativo
Déficit de antitrombina	**0,02**	**1**	**50?**
Déficit de proteína C	**0,2-0,5**	**3**	**10**
Déficit de proteína S	**0,1?**	**2**	**10?**

Factor V Leiden heterocigoto	**3-5**	**10-20**	**8**
Factor V Leiden homocigoto	**0,1**	**4?**	**80?**
Protrombina G20210A	**2-6**	**6-17**	**3**
Hiperhomocisteinemia (puede ser adquirida)	**5-10**	**15**	**2,5**
Factor VIII>170UI/dl	**10**	**25**	**2?**

1.4.2 TROMBOFILIAS ADQUIRIDAS. SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO (SAF)

La **trombofilia adquirida** es un trastorno de hipercoagulabilidad definido por la positividad de anticuerpos antifosfolípido en sangre periférica**.** Es considerado una condición altamente trombofílica debido a su elevada prevalencia y a la considerable morbimortalidad que asocia.

Se estima que, un 5-15% de los pacientes diagnosticados de trombosis venosa presentan anticuerpos antifosfolípido y, la presencia de éstos en títulos elevados incrementaría 3-4 veces el riesgo de trombosis sobre la población general[63].

Las principales manifestaciones clínicas del SAF son las trombosis venosas, las pérdidas fetales de repetición y los cuadros secundarios a una disfunción placentaria como la eclampsia, preeclampsia, restricción de crecimiento intrauterino y prematuridad, que ocurren en un 15-20% de las pacientes con esta alteración. La fisiopatogenia del SAF es controvertida[68].

Los trastornos secundarios a una insuficiencia placentaria se manifiestan en el segundo y tercer trimestre. Parecen guardar relación directa con infartos placentarios secundarios a trombosis de microvasos y aterotrombosis de arterias arcuatas del útero materno. Sin embargo,

los abortos de repetición en primer trimestre se atribuyen a una inhibición de la proliferación del trofoblasto mediada por los propios autoanticuerpos. Una pequeña proporción de mujeres con diagnóstico de síndrome antifosfolípido y pérdidas fetales de repetición en primer trimestre tienen títulos elevados de anticuerpos anti-Ro. Su detección es importante ya que se asocian a un riesgo de bloqueo cardiaco fetal completo del 2% y un 5% de lupus neonatal[69].

Los eventos trombóticos extraplacentarios típicamente relacionados con el SAF son los venosos, especialmente la trombosis profunda de extremidades inferiores y el tromboembolismo pulmonar (TEP). Menos prevalentes, aunque características, son las trombosis en territorios venosos poco habituales como las venas cerebrales, mesentéricas, renales o esplénicas. Los eventos de trombosis arteriales son menos frecuentes.

El SAF se caracteriza por ser "lecho específico", las recidivas trombóticas de un individuo suelen afectar siempre al mismo territorio vascular; ocasionando clínica específica en cada paciente. Por tanto, es raro que el síndrome se manifieste globalmente en una misma persona.

- El *Síndrome antifosfolípido primario* aparece sin otra patología subyacente o bien acompañado por manifestaciones aisladas como una trombopenia, un lívedo reticularis o anomalías en válvulas cardíacas; habitualmente prolapsos asintomáticos de la aórtica o la mitral que afectan al 30% de los pacientes diagnosticados de SAF.

- Se conoce como *Síndrome antifosfolípido secundario* aquel que se presenta en el contexto de una enfermedad autoinmune, en especial el Lupus Eritematoso Sistémico (30-50% de los casos son SAF+), síndrome de Sjögren o en un cuadro de artritis reumatoide.

Con el fin de consensuar la selección y tratamiento de estos pacientes existen unos criterios clínicos y de laboratorio imprescindibles para clasificar a un individuo como SAF **(Tabla 8).**

Para el diagnóstico es obligatorio al menos un criterio clínico y uno analítico. Además, el test de laboratorio debe ser positivo en dos determinaciones consecutivas distanciadas entre sí, al menos, 6 semanas[63].

1.4.2.1 CRITERIOSDIAGNÓSTICOS DE SAF

Los criterios establecidos para el diagnóstico de un síndrome antifosfolípido se exponen en la siguiente tabla **(Tabla 8)**.

Tabla 8: Criterios diagnósticos de SAF

Criterios Clínicos	Criterios de Laboratorio
Trombosis: Arterial, venosa o microvascular en algún tejido u órgano	Anticuerpos IgG y/o IgM anticardiolipina (ACL) a títulos altos o moderados*.
Complicaciones Obstétricas: Muerte inexplicable de un feto morfológicamente normal por encima de la 10º semana de gestación. Tres o más pérdidas embrionarias inexplicables y consecutivas antes de la 10º semana de gestación. Uno ó más partos prematuros previos a semana 34 de fetos morfológicamente normales secundarios a eclampsia, preeclampsia, o insuficiencia placentaria grave.	Anticoagulante lúpico positivo

*No hay consenso en la definición de títulos altos y moderados de autoanticuerpos. En general, valores de IgG ACL>30 U/ml ó 40 GPL unidades se consideran altos.

1.4.2.1.A Pruebas de laboratorio para el diagnóstico de SAF

- **Anticuerpos antifosfolípido:**

Son un grupo heterogéneo de inmunoglobulinas inespecíficas tipo IgG y en menor medida IgM e IgA, que se unen con escasa afinidad a moléculas de fosfolípidos de células circulantes, como las plaquetas, y células del endotelio vascular. El complejo de unión incluye

una proteína cofactora cuya función es incrementar la afinidad del anticuerpo y mediar la unión con el epitopo del fosfolípido.

El *anticoagulante lúpico (AL)* es un anticuerpo dirigido frente a un complejo protrombina-fosfolípido mientras que el *anticardiolipina (ACL)* lo hace frente a un complex β2-glicoproteína (β2-GLP)-fosfolípido de carga negativa (cardiolipina, fosfatidilserina, ácido fosfatídico y fosfatidilinositol).

Actualmente, está perfectamente establecido que los ACL y AL son dos anticuerpos completamente distintos e independientes que se pueden separar bioquímicamente.

Los anticuerpos antifosfolípido no son exclusivos del SAF. Es típico encontrarlos en pacientes con infecciones crónicas como la sífilis, la hepatitis C o el VIH o en personas tratadas con determinados fármacos como las fenotiacinas, la procainamida, la hidralacina y la quinidina. Incluso, pueden identificarse de forma accidental en un porcentaje de población sana. Habitualmente estas personas no presentan clínica relacionada con trastornos de la coagulación por lo que no es necesario tomar medidas profilácticas. De ello se deduce que, la sola presencia de autoanticuerpos circulantes es condición indispensable aunque no suficiente para desarrollar un síndrome antifosfolípido[60,68].

En un individuo pueden localizarse ambos tipos de autoanticuerpos o tan solo uno de ellos, si bien, la clasificación se hará según la clínica que presenten, agrupándolos en portadores asintomáticos y portadores con síntomas atribuibles a los anticuerpos ó pacientes SAF+. Por ello que el diagnóstico de SAF implique una condición clínica junto a una determinación positiva en el laboratorio.

No existe una prueba específica para la detección del AL, se hace de forma indirecta. Debido a su acción inhibidora sobre la protrombina, el AL es capaz de alterar las pruebas de coagulación, detectando su presencia por el alargamiento del tiempo de Quick con tromboplastina diluida, tiempo de veneno Russell diluido y/o tiempo de tromboplastina parcial activado con y sin fosfolípido diluido. El diagnóstico debe confirmarse siempre observando la ausencia de corrección de los test de coagulación empleando una mezcla de plasma normal y del paciente.

Los ACL no tienen efecto a este nivel por lo que su determinación se realiza mediante una prueba de radioinmunoanálisis o ELISA.

Los test de detección específica de la β2-GLP han demostrado una mayor precisión y una mejor correlación en la titulación de anticuerpos con repercusión trombótica que las pruebas destinadas al estudio de los ACL. Estos kit comerciales tienen menor sensibilidad y mayor especificidad por lo que reducen el cribaje de pacientes con infecciones crónicas o bajo determinados tratamientos con ACL asintomáticos. Sin embargo, estas pruebas no están validadas y no se admiten como criterio diagnóstico de SAF en el momento actual[60,63].

►El estudio de los estados de hipercoagulabilidad o trombofilias está protocolizado en el diagnóstico diferencial de multitud de patologías médicas, incluso menos prevalentes que el problema que nos ocupa. Sin embargo, la controversia en torno a este tema hace que sea un aspecto no siempre contemplado en el despistaje de trastornos reproductivos y fracaso repetido de las técnicas de reproducción artificial.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO:

2.1 JUSTIFICACIÓN:

Según datos publicados por la Sociedad Española de Fertilidad en al año 2011, la esterilidad afecta al 15-17% de las parejas españolas en edad fértil. Esto implica que, más de 600000 parejas serían candidatas a una consulta por un especialista en reproducción y de ellas, 1 de cada 1000 sería subsidiaria de una técnica asistida. Por ello, resulta evidente que esta patología supone un problema de salud que genera un importante gasto sanitario y una demanda social paulatina[5,7].

El fallo de implantación representa un serio inconveniente y un condicionante negativo en los resultados ofrecidos por cualquier grupo dedicado al estudio y tratamiento de los trastornos reproductivos.

La falta de consenso y el desconocimiento de su etiopatogenia y fisiopatología complican el enfoque y la elaboración de un protocolo de manejo; dificultando la posibilidad de subsanar el compromiso que esto supone en el éxito de los tratamientos de reproducción lo cual contribuye a perpetuar y cronificar el problema.

El fallo de implantación se contempla como la causa más frecuente de fracaso repetido de las técnicas de reproducción asistida (TRA) en mujeres menores de 40 años, con buena calidad embrionaria y sin patología reproductiva severa. Por esto, la identificación de posibles factores responsables, o al menos favorecedores del fracaso en la aposición, adhesión y/o invasión endometrial de embriones de buena calidad y correctamente transferidos, supondría un avance de suma trascendencia.

Las trombofilias congénitas y adquiridas, así como los trastornos de la autoinmunidad, se presentan como posibles cofactores o, en el mejor de los casos, como agentes etiológicos de las pérdidas fetales de repetición y del fallo de implantación. Como se viene advirtiendo, se trata de un tema controvertido y ampliamente debatido en los últimos años. La determinación del grado de implicación o de no influencia de estas patologías en el fallo de implantación acarrearía un cambio de actitud traducido en los protocolos de diagnóstico y tratamiento de las parejas víctimas de un fracaso repetido de los ciclos de fecundación in vitro.

Importantes grupos de investigación en reproducción humana han presentado resultados a favor y en contra de incluir la determinación de los parámetros de trombofilia y autoinmunidad en los estudios de esterilidad. Sobra apuntar que, la implicación directa derivada de esta medida, supone valorar la conveniencia de tratamiento sistemático en las pacientes portadoras de estas patologías.

La magnitud y el alcance del problema aportan suficiente motivo al estudio que se presenta en esta memoria.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL:

El objetivo fundamental de la investigación trata de:

- Valorar si existe relación causal entre las trombofilias congénitas, adquiridas y/o los trastornos de autoinmunidad con el fallo de implantación.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Como objetivos secundarios se plantean:

- Determinar la incidencia de trombofilias congénitas y adquiridas en la población FIV y compararla con la incidencia en la población general.
- Determinar la incidencia de trastornos de la autoinmunidad en la población FIV y compararla con la incidencia en la población general.
- Determinar la relación entre trombofilia y trastorno de autoinmunidad con respuesta al ciclo de estimulación ovárica y calidad embrionaria.
- Determinar la relación entre trombofilia, tasa de gestación y aborto precoz.
- Valorar la influencia de uno y varios trastornos sobre la tasa de gestación y el fallo de implantación.

De acuerdo con los resultados de la investigación se planteará la necesidad de modificar los protocolos de diagnóstico de la pareja con fallo repetido en los ciclos de FIV, contemplando o desestimando la determinación sistemática del estudio de trombofilia y los trastornos de autoinmunidad.

HIPOTESIS DE TRABAJO

4.1. HIPOTESIS CONCEPTUALES

El presente estudio pretende evaluar, a través de una muestra representativa, la existencia de una mayor incidencia de trombofilias congénitas, adquiridas o marcadores de autoinmunidad en la población sometida a tratamientos de fecundación in vitro frente a la población sin problemas de fertilidad que gesta espontáneamente hijos sanos; con la finalidad de objetivar si esta patología pudiera justificar fallos repetidos de las técnicas de reproducción.

Mediante un análisis de hipercoagulabilidad y la determinación de autoanticuerpos inespecíficos en sangre periférica de mujeres sin antecedentes médicos ni obstétricos de interés que han tenido un parto en un período mínimo de 6-8 semanas previas a la extracción, y la valoración de los mismos parámetros en mujeres sometidas a 1, 2 y 3 ó superior ciclos de fecundación; se plantea el objetivo de determinar si estas patologías pudieran justificar un fracaso repetido de las técnicas de reproducción asistida.

El interés de esta investigación está especialmente dirigido a identificar posibles agentes causales o colaboradores del fallo de implantación; diagnóstico que agrupa a las parejas sometidas a varios tratamientos de fertilidad no exitosos a pesar de reunir buenas condiciones para gestar.

4.2. HIPOTESIS OPERATIVAS

Para abordar este problema se consideran dos hipótesis:

- La **Hipótesis nula (H_0)** establece que no existen diferencias estadísticamente significativas o, si existen, pueden ser atribuidas al azar ó a la variabilidad inherente a los fenómenos biológicos entre, el grupo control (constituido por mujeres sanas sin antecedentes de abortos o cualquier otra patología obstétrica, que gestan espontáneamente antes de los 40 años) y el grupo problema (compuesto por pacientes que no consiguen embarazo a pesar de someterse a tres ó más ciclos de FIV con embriones de buena calidad correctamente transferidos)

respecto a la incidencia de trastornos de hipercoagulabilidad o marcadores elevados de actividad autoinmune que pudieran justificar el fracaso repetido de los tratamientos.

- La **Hipótesis alternativa (H_1)** establece que sí existen diferencias estadísticamente significativas, que no pueden ser atribuidas al azar ó a la variabilidad inherente a los fenómenos biológicos entre, el grupo control (constituido por mujeres sanas sin antecedentes de abortos o cualquier otra patología obstétrica, que gestan espontáneamente antes de los 40 años) y el grupo problema (compuesto por pacientes que no consiguen embarazo a pesar de someterse a tres ó más ciclos de FIV con embriones de buena calidad correctamente transferidos) respecto a la incidencia de trastornos de hipercoagulabilidad o marcadores elevados de actividad autoinmune que pudieran justificar el fracaso repetido de los tratamientos.

Estas dos hipótesis son mutuamente excluyentes. Sólo existen dos decisiones posibles: rechazar la hipótesis nula (H_0), identificando las trombofilias y/o trastornos de autoinmunidad como un agente causal del fallo de implantación (aceptación de la hipótesis alternativa (H_1)); o bien no rechazar la hipótesis nula (H_0) y sí rehusar la hipótesis alternativa (H_1).

MATERIAL Y METODO

5.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

La memoria que se presenta se basa en la realización de un estudio prospectivo de casos y controles.

Para su desarrollo se emplea un diseño descriptivo observacional que incluye un análisis de datos recogidos de forma prospectiva en el período de Enero de 2009 hasta Septiembre de 2011.

El **grupo de casos** está integrado por pacientes seleccionadas de manera aleatoria de las listas de FIV del Servicio de Reproducción Humana del Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS) de Zaragoza durante el período referido. Estas pacientes se distribuyen en tres grupos según se sometan al primer, segundo y tercer o superior ciclo de fecundación. Según criterios de lista de espera, cada paciente recibe por correo una citación para consulta de planificación del ciclo, donde se le indica la pauta y medicación para la estimulación ovárica y posteriores captación ovocitaria y transferencia embrionaria. Según el protocolo del servicio, en esta visita se entrega la documentación necesaria para realizar una primera extracción sanguínea con el objetivo de monitorizar el nivel basal de gonadotropinas y estradiol.

Las pacientes seleccionadas para formar parte del proyecto deben cumplir unos criterios de inclusión y aceptar las condiciones de la investigación, la cual exige solicitar un estudio de trombofilia y marcadores de autoinmunidad en sangre periférica asociados a la analítica básica de su ciclo y siempre aprovechando la misma extracción. Las pacientes son convenientemente informadas del proyecto y de su compromiso como parte del mimo, y así lo ratifican en un consentimiento informado.

El **grupo control** está constituido por mujeres de raza blanca, sanas, sin antecedentes obstétricos de interés, que han concebido un hijo sano de forma espontánea. Estas pacientes son reclutadas en las consultas de control del embarazo de bajo riesgo del área de tocología del Centro Médico de Especialidades Grande Covián, dependiente del HUMS, durante el mismo período de tiempo (2009-2011). En este grupo, el estudio de trombofilia y

autoinmunidad se realiza de 6 a 8 semanas tras el parto con el fin de recuperar la normalidad en los parámetros analíticos.

Quedan excluidas del proyecto las pacientes mayores de 40 años, las endometriosis grado IV y las oligoastenoteratospermias severas, ya que asocian mayor riesgo de fracaso de las técnicas de reproducción por mala calidad embrionaria. Se prescinde de las pacientes con anomalías estructurales graves en el útero, enfermedades autoinmunes filiadas y aquellas en tratamiento previo con antiagregantes plaquetarios, anticoagulantes o corticoides, ya que podrían modificar los parámetros analíticos o el resultado del ciclo. Así mismo, no se incluyen los casos de mala respuesta ni aquellos en los que se transfieran dos o más embriones de grado inferior al C o con menos de 5 células. Ninguna paciente incluida en el estudio tiene historia de enfermedad tromboembólica anterior o enfermedad tiroidea no tratada o de base autoinmune.

Se realiza una revisión retrospectiva de la historia clínica de todas las pacientes con el fin de investigar antecedentes médicos y obstétricos de interés. Se recogen datos relativos a patologías previas, hábitos tóxicos, índice de masa corporal (IMC) y antecedentes quirúrgicos de ambos miembros de la pareja en estudio por esterilidad. En el caso del varón se recopilan datos referentes a historia de parotiditis, orquitis, epididimitis, traumatismos o torsiones testiculares, ETS, enfermedades sistémicas como la DM, patología testicular benigna o maligna, criptorquidea, malformaciones del aparato urogenital, QT, RT, medicaciones, hábito tabáquico, consumo de alcohol u otras drogas y exposición laboral a productos tóxicos.

Respecto a las variables femeninas se atiende a las características del ciclo menstrual, historia de gestaciones o abortos previos y forma de concepción, informes de intervenciones o tratamientos específicos sobre el aparato genital o la función reproductora.

Se revisan los archivos del último ciclo de reproducción asistida de cada pareja, reflejando la causa de la esterilidad, el protocolo de estimulación ovárica, el REM/ml, el número de ovocitos captados, la técnica de fecundación empleada (FIV vs FIV-ICSI), el número de embriones obtenido, la cantidad y calidad de los embriones transferidos, puntualizando si ha

sido o no selectiva, así como el resultado del ciclo en gestación única, múltiple, ectópica, aborto o no gestación.

5.2 ÁMBITO DEL ESTUDIO

El Hospital Universitario Miguel Servet está situado en la ciudad de Zaragoza, quinta en población del país y primera de Aragón. La provincia de Zaragoza tiene una extensión de 17.274 Km^2 y constituye el 36% de la superficie aragonesa (47.720 Km^2). La población total de la provincia de Zaragoza en el año 2011, según datos del Instituto Nacional de Estadística, es de 973.325 habitantes (71,16% de los habitantes de Aragón)[5].

Este centro es el hospital de referencia de las Áreas de Salud II y IV del mapa sanitario de la Comunidad Autónoma, y atiende una población aproximada de 529.667 habitantes[69].

El Servicio de Reproducción Humana del HUMS es centro de referencia de todo Aragón, recibiendo pacientes para tratamientos de fertilidad no solo de Huesca y Teruel sino del resto de áreas sanitarias de Zaragoza y provincias limítrofes de Castilla y León como Soria[69].

En este servicio se realizan aproximadamente 560 ciclos de FIV y/o microinyección espermática (FIV-ICSI) anuales, de los cuales 250 son primeros ciclos, 160 segundos y 150 terceros ciclos.

Para el planteamiento y el desarrollo de la tesis ha sido necesaria la estrecha colaboración con las unidades de Coagulación y de Inmunología del Servicio de Hematología del mismo hospital, quienes accedieron a realizar, de forma añadida al trabajo habitual, las determinaciones analíticas solicitadas por las pacientes del estudio. La previsión inicial fue de 300 analíticas extraordinarias, incrementándose hasta 365 a lo largo de los dos años de recogida de datos.

5.3 GRUPOS DE ESTUDIO

5.3.1 GRUPO CASO

El grupo caso está constituido por pacientes diagnosticadas de esterilidad que han requerido un tratamiento avanzado de reproducción. Estas mujeres son repartidas en tres subgrupos según el número de ciclos de fecundación in vitro a los que hayan sido sometidas verificando la homogeneidad de la muestra en función del perfil de inclusión, caracterizado por los aspectos expuestos a continuación:

- CRITERIOS DE INCLUSIÓN:
  - Raza blanca
  - Edad menor o igual a 40 años
  - Diagnóstico de esterilidad por:
    - Factor tubárico
    - Otro factor femenino (disovulación o endometriosis I-III)
    - Factor masculino (excepto las formas muy severas)
    - Esterilidad de origen desconocido (EOD)

- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:
  - Mujeres mayores de 40 años.
  - Factor femenino por endometriosis profunda grado IV.
  - Factor femenino por malformaciones uterinas graves (útero doble, septo completo, hipoplasias).
  - Factor masculino por oligoastenoteratospermia severa (<3 mill/ml)
  - Mujeres con enfermedades autoinmunes, tromboembólicas o tiroidea diagnosticadas.
  - Mujeres en tratamiento con antiagregantes plaquetarios, anticoagulantes o esteroides.

- Mala respuesta en ciclos previos.
- Ciclos anteriores con transferencia de embriones de mala calidad (Grado inferior al C o menos 5 células).

5.3.2 GRUPO CONTROL

El grupo control está formado por mujeres reclutadas en el Centro Médico de Especialidades Grande Covián durante su visita de control tras el parto de un hijo único y sano.

- CRITERIOS DE INCLUSIÓN:
  - Raza blanca.
  - Menores de 40 años.
  - Mujeres sin antecedentes médicos de interés.
  - Mujeres sin antecedentes de abortos previos u otra patología obstétrica relevante.
  - Gestación espontánea de un neonato sano hace un mínimo de 6-8 semanas.
  - Sin medicación antes ni durante el embarazo.

5.4 DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS Y PROTOCOLOS

5.4.1 ESTUDIO ANALÍTICO: TROMBOFILIAS Y AUTOINMUNIDAD

La base del estudio radica en la determinación de parámetros de hipercoagulabilidad y marcadores de actividad autoinmune en una muestra representativa de población sin problemas reproductivos, así como en mujeres sometidas a un tratamiento de fertilidad. El objetivo consiste en valorar diferencias en la incidencia y analizar la posible responsabilidad de estas patologías en el fallo de implantación.

Todas las pacientes incluidas en la investigación, bien como caso bien como control, son convenientemente informadas de las bases, implicaciones e intenciones del estudio, y así lo certifican mediante la firma de un consentimiento informado. En este documento, se refleja el compromiso de acceder a una extracción de sangre venosa para la realización de la batería de pruebas analíticas acordadas con la unidad de Coagulación y de Inmunología del Servicio de Hematología del HUMS.

Las mujeres que componen el grupo control son identificadas e informadas del proyecto en la visita puerperal, citada en la consulta de embarazo de bajo riesgo del Centro Médico de Especialidades Grande Covián, tres o más semanas después del parto. De esta manera, el reclutamiento es más eficaz y, debido a la proximidad de fechas, se asegura un mejor cumplimiento del compromiso adquirido. En las guías clínicas referentes a "Trastornos de la coagulación y gestación" de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH), se recomienda no realizar estudios de coagulación antes de 21 días postparto[60]. En el diseño de la investigación, el análisis se solicita transcurridas 6-8 semanas desde el parto, con el fin de asegurar una recuperación absoluta de los parámetros fisiológicos.

Las pacientes del grupo caso son previamente seleccionadas y reciben la información del proyecto en la visita de planificación del ciclo de FIV. Si aceptan formar parte del estudio, se les proporciona un volante de prueba especial de laboratorio que deben adjuntar al de su analítica de inicio de tratamiento con el fin de aprovechar la misma extracción sanguínea.

5.4.1.1 ESTUDIO DE TROMBOFILIAS CONGÉNITAS

El estudio de trombofilias congénitas se compone de dos fracciones, un estudio básico de hemostasia y anticoagulantes naturales y una segunda parte dirigida a identificar mutaciones genéticas de trombofilia.

5.4.1.1.A ESTUDIO DE HEMOSTASIA Y ANTICOAGULANTES NAURALES

►Tipo de muestra:

La extracción sanguínea se realiza con sistema BD Vacutainer® por punción venosa de la fosa antecubital previa asepsia. Todas las muestras se procesan en las primeras 4 horas postextracción.

Parte de la sangre total se deposita en 2 tubos de vidrio de 4,5 mL (Becton Dickinson ref 367704) con citrato trisódico 0,129 M al 3,2% como anticoagulante y posteriormente centrifugada a 2000 *g* durante 15 minutos.

Parte del plasma se procesa para el estudio básico de hemostasia y anticoagulantes naturales (TP, TTPa, TT, Fibrinógeno derivado, PC, PtS y AT) y el resto se somete a una segunda centrífuga (doble centrifugación) a 2500 *g* durante 10 minutos para la determinación de anticoagulante lúpico (AL).

Las muestras de plasma son procesadas en un coagulómetro de la familia ACL TOP (ACL TOP 700 CTS).

►Técnicas:

Centrando la descripción en los anticoagulantes naturales empleados en el estudio de la presente muestra, se especifica el protocolo del Servicio de Hematología del HUMS en la determinación de:

- Proteína C (PC): *Principio*: La PC es una proteína dependiente de Vitamina K que está presente en el plasma como zimógeno. *Test*: El nivel de PC se determina en plasma citratado a través de un test cromogénico que utiliza el reactivo HemosIL® Protein C (Instrumentation Laboratory Company. Bedford, MA, EEUU). *Valores esperados:* Los niveles de actividad de PC normales para un adulto se establecen, en nuestro laboratorio, entre el 80–120%[28].
- Proteína S (PtS): *Principio:* La PtS es un cofactor dependiente de la vitamina K que interviene en los procesos anticoagulantes y profibrinolíticos de la PC activada. La

PtS está presente en el plasma en dos formas: PtS libre (40%) y PtS ligada a la proteína transportadora de la fracción C4b del complemento (C4BP) (60%). Sólo la PtS libre tiene actividad funcional como cofactor. *Test*: La PtS libre se determina de forma automatizada en muestras de plasma citratado mediante turbidimetría mediante partículas de látex. Se empleó como reactivo el kit HemosIL™ Free Protein S (Instrumentation Laboratory Company. Bedford, MA, EEUU. *Valores esperados:* Los niveles de actividad de PtS libre normales para un adulto se establecen, en nuestro laboratorio, entre el 60-140%[60].

- Antitrombina III (AT III): *Principio:* La AT o Cofactor I de la Heparina es el principal inhibidor fisiológico de la coagulación sanguínea y es esencial para que la terapia anticoagulante con Heparina sea efectiva. La AT mediante su acción inhibidora de las proteasas de la coagulación, especialmente trombina, factor Xa y factor IXa, evita procesos incontrolados de la coagulación y posibles accidentes trombóticos. *Test*: La determinación se realiza sobre plasma citratado empleando el kit Antitrombina Líquida - 020300400 (Instrumentation Laboratory Company. Bedford, MA, EEUU). *Valores esperados:* El intervalo de normalidad de los niveles de antitrombina se establece en nuestro laboratorio entre el 80-120 % para la población adulta[63].

5.4.1.1.B ANÁLISIS GENÉTICO: MUTACIONES DE TROMBOFILIA

►Tipo de muestra:

Otra parte de la sangre total extraída se deposita en 1 tubo de vidrio de 6 mL (Becton Dickinson ref 367864) con EDTA como anticoagulante.

Para su análisis a corto plazo, hasta 10 días, las muestras son almacenadas entre 2-8ºC y para almacenaje a largo plazo la temperatura de reserva es -70ºC.

►**Técnicas:**

El estudio para la identificación de mutaciones de trombofilia (mutación FVL, mutación PT-G20210A y la mutación C677T del gen de la metilen-tetrahidrofolato reducatasa) se lleva a cabo mediante dos tipos de técnicas[66,67]:

- Test FV-PTH-MTHFR StripAssay® (ViennaLab): *Principio*: test diseñado para la detección de estas mutaciones basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación inversa.

- Test kit Elucigene TRP-F (GEN-PROBE®): *Principio*: sistema que emplea la tecnología de amplificación alelo-específica ARMS para la detección de mutaciones, inserciones y deleciones puntuales en el ADN.

5.4.1.2 ESTUDIO DE MARCADORES DE AUTOINMUNIDAD

► **Tipo de muestra:**

Se realiza una extracción sanguínea con sistema BD Vacutainer® por punción venosa de la fosa antecubital previa asepsia. La sangre total se deposita en un tubo de plástico de 6 mL (Becton Dickinson ref 368175) que contiene un activador de la coagulación con silicón.

El tiempo máximo permitido entre la obtención de la sangre y su separación para la obtención del suero mediante centrifugación a 2000-2500 g durante 10 minutos, es de 2 horas.

Una vez separado el suero la muestra es estable a temperatura ambiente durante 8 horas y hasta 48 horas a 4°C. Superadas las 48 horas el suero debe ser congelado a -20º C.

► Técnicas para la determinación de autoanticuerpos:

El estudio de autoinmunidad, tanto inespecífico como el incluido en la batería de trombofilias adquiridas, se realiza empleando kits comerciales basados en dos técnicas, la inmunofluorescencia indirecta y el ELISA[60,63].

A.1 Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta:

La técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) se basa en la detección de complejos antígeno-anticuerpo mediante el empleo de enzimas unidas al antígeno o al anticuerpo, los cuales actúan sobre determinados sustratos para dar origen a productos coloreados que pueden ser medidos espectofotométricamente.

La intensidad de color será directamente proporcional a la cantidad de complejos antígeno-anticuerpo que se ha formado y por lo tanto directamene proporcional a la concentración de antígeno o anticuerpo investigado en la muestra analizada.

En la actualidad los sustratos más habitualmente empleados corresponden a cultivos procedentes de distintas líneas celulares ya fijados y permeabilizados.

A.2 Técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay):

La técnica de ELISA es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático basado en la detección de antígenos o anticuerpos inmovilizados sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción.

La prueba recurre al empleo de inmunógenos, haptenos o anticuerpos marcados con un sustrato cromogénico. Tras incubación la actividad enzimática presente es proporcional a la intensidad de color desarrollado y puede ser medido espectrofotométricamente.

Todo test de ELISA consta de varias fases: 1) sensibilización de la placa, 2) fijación del antígeno o anticuerpo a la superficie de la placa, 3) aplicación de la muestra a estudio, 4)

medición de controles positivo y negativo, 5) detección y caracterización a través de anticuerpos marcados, 6) incubación con la muestra, 7) incubación con el sistema de detección y 8) adición del sustrato.

5.4.1.3 ESTUDIO DE TROMBOFILIAS ADQUIRIDAS

5.4.1.3.A DETERMINACIÓN DEL ANTICOAGULANTE LÚPICO (AL):

► Tipo de muestra:

La determinación se realiza sobre la fracción de plasma extraída para el estudio general que ha sido sometida a doble centrífuga, tal como se especifica en el apartado 5.4.1.1.

El procedimiento se lleva a cabo mediante el empleo del método TVVRd (tiempo del veneno de víbora de Russell diluido), del SCT (Tiempo de coagulación con caolín) o ambos[63,69].

Los kits comerciales empleados en nuestro centro son:

- HemosIL™ LAC Screen/HemosIL™ LAC Confirm: Test integrado basado en el método del TVVRd, donde el Veneno de la Víbora de Russell en presencia de Calcio activa directamente al Factor X.
- HemosIL™ Silica Clotting Time Screen/HemosIL™ Silica Clotting Time Confirm: Test integrado basado en la activación directa de la vía intrínseca de la coagulación por la sílica coloidal en presencia de calcio (SCT).
- Test de Mezclas para HemosIL™ LAC Screen y HemosIL™ SCT Screen: Test mezcla para cada uno de los reactivos de cribaje.

Grado de intensidad de positividad de AL:

Ratio Normalizada AL ≥ 2,0: Positividad Fuerte
Ratio Normalizada AL 1,5-2,0: Positividad Moderada
Ratio Normalizada AL ≤ 1,5: Positividad Débil

Tabla 9. La media de la intensidad de positividad de AL:

- **Positividad Débil:** Todas las determinaciones positivas con Positividad Débil
- **Positividad Débil-Moderada:** 1 ó más determinaciones con Positividad Débil y al menos 1 determinación con Positividad Moderada
- **Positividad Moderada:** Todas las determinaciones positivas con Positividad Moderada
- **Positividad Moderada-Fuerte:** 1 ó más determinaciones con Positividad Moderada y al menos 1 determinación con Positividad Fuerte
- **Positividad Fuerte:** Todas las determinaciones positivas con Positividad Fuerte

5.4.1.3.B DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS aCL y aβ-2 GPI:

► Tipo de muestra:

Las determinaciones se realizan con la fracción de sangre total extraída para el estudio de autoinmunidad (apartado 5.4.1.2), la cual es depositada en un tubo de plástico de 6 mL (Becton Dickinson ref 368175) que contiene un activador de la coagulación con silicón.

► Técnicas:

En el HUMS la determinación de los anticuerpos antifosfolípido aCL y aβ-2 GPI se realiza mediante técnica ELISA indirecto, empleando:

- QUANTA-Lite® ACA IgM III y QUANTA-Lite® ACA IgG III (Inova Diagnostics): Kit comercial basado en la técnica ELISA diseñado para la detección semicuantitativa de aCL IgM e IgG en suero humano. *Valores*: <12,5 MPL Negativo y <15 GPL Negativo, >12,5 MPL Positivo y >15 GPL Positivo.

- QUANTA-Lite® □2 GPI IgM y QUANTA-Lite® □2 GPI IgG (Inova Diagnostics): Kit comercial basado en la técnica ELISA diseñado para la detección semicuantitativa de IgM e IgG de aβ-2 GPI en suero humano. *Valores*: 0-20 SMU Negativo y 0-20 SGU Negativo, >20 SMU Positivo y >20 SGU Positivo.

5.4.2 PROTOCOLO PARA CICLO DE FIV

En todas las pacientes incluidas en el estudio se aplicó el protocolo asistencial habitual de tratamiento FIV vigente en la Unidad de Reproducción del HUMS, el cual se resume en los siguientes puntos:

1. Tras completar el estudio de esterilidad o actualizar las pruebas pertinentes en pacientes ya conocidos, y una vez asentada la indicación de FIV ó FIV-ICSI; se cumplimenta una ficha diseñada para la gestión de lista de espera donde constan los datos de filiación, el diagnóstico, el número de ciclo FIV que le corresponde realizar y la fecha de inicio del estudio. De esta manera, se distribuye y organiza la población demandante del servicio en la sanidad pública. Este elevado volumen de pacientes origina largas listas de espera que suponen uno de los grandes problemas a los que se enfrentan las parejas subsidiarias de una TRA.

2. A través de un sistema informatizado, el Servicio de Admisión del Hospital Materno-Infantil envía una citación por correo postal al domicilio de las pacientes indicando el mes en el que se va a realizar el tratamiento, resaltando la necesidad de concretar la fecha exacta de la cita, coincidiendo con la primera fase (2º- 4º día) de su próximo ciclo menstrual.

3. En esta consulta, se realiza una valoración de folículos antrales mediante ecografía transvaginal y una determinación hormonal en fase folicular precoz que incluye FSH, LH y E_2. A esto se adjunta una petición de serologías de Lúes, VIH, VHB y VHC de ambos miembros de la pareja. A su vez, se indica el inicio de la toma de anovulatorios vía oral (ACHO) con el fin de controlar el inicio de la próxima regla.

En la siguiente consulta, con los resultados de las pruebas y, atendiendo a las fechas calculadas, se programa el ciclo de estimulación ovárica, se explica el protocolo y empleo de fármacos y se les facilitan las recetas de los medicamentos previstos.

4. Al finalizar los anticonceptivos se realiza un control ecográfico basal previo al inicio de la estimulación ovárica. Durante el tratamiento y, con el fin de ir ajustando la dosis de fármacos, se cita a la paciente con una cadencia de 3-4 días para control folicular por ecografía y evolución de estradiol en sangre periférica. Habitualmente, se requieren de 3 a 5 controles durante un tiempo variable de estimulación que ronda los 7 a 12 días hasta alcanzar las condiciones óptimas para programar la punción folicular. A lo largo de estas visitas se cancelan los ciclos de aquellas mujeres que no responden al tratamiento de la forma esperada.

5. Salvo excepciones, pasados tres días de la recuperación ovocitaria por punción ovárica, se realiza la transferencia embrionaria.

6. Las pacientes transferidas permanecen en observación durante dos horas y posteriormente son dadas de alta con la prescripción de 5 mg diarios de ácido fólico y 200 mg de progesterona natural cada 8 horas. La próxima visita en consulta viene determinada por la presencia o ausencia de menstruación pasados 15 días del tratamiento. En caso de que la mujer no regle, se solicita una determinación de β-HCG en sangre venosa que, de ser indicativa de gestación evolutiva, se complementa con una ecografía en la séptima semana y posterior derivación al tocólogo.

5.4.2.1 PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA

Existen varios protocolos de estimulación ovárica reconocidos por las sociedades científicas, entre las que se incluye la SEF. La elección de uno u otro queda sujeta al criterio del profesional, que basará su decisión en la indicación del tratamiento, la respuesta a ciclos

previos si los hubiera, la edad de la paciente, su situación hormonal, el IMC y en experiencias o preferencias personales[20].

Todas las pautas de tratamiento estimulador buscan dos beneficios evidentes:

- El reclutamiento y la estimulación simultánea de varios folículos con el fin de conseguir el máximo número de ovocitos y poder disponer de varios embriones, incrementando así la posibilidad de éxito del tratamiento. Esta capacidad exige un control minucioso de la respuesta ovárica excesiva, la cual acarrea una de las complicaciones importantes asociadas a la técnica, el síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO).

- Controlar eficazmente el momento idóneo para captar la mayor parte de ovocitos en metafase II, asegurando mejor tasa de fecundación y mejor calidad embrionaria[70].

A continuación se especifican los dos protocolos mas utilizados en las pacientes del estudio; los cuales difieren, básicamente, en el uso de agonistas o antagonistas de la GnRH.

5.4.2.1.A PAUTA DE ESTIMULACIÓN CON AGONISTAS DE LA GnRH:

En la mayoría de casos, la pauta de tratamiento se basa en el uso de un **análogo de la GnRH** como supresor hipofisario. La finalidad de esta molécula “desensibilizadora” de los receptores de GnRH en la hipófisis, consiste en evitar el pico endógeno y prematuro de LH inducido por el incremento de los niveles de estradiol; responsable de una ovulación espontánea y la luteinización folicular, frecuente durante la estimulación con gonadotropinas a las que no se asocia este tipo de fármaco[71].

El protocolo de tratamiento se desarrolla en los siguientes pasos [20,71,72].

- Como se expuso anteriormente, la paciente recibe tratamiento con anticonceptivos orales (ACHO) durante un ciclo completo. Atendiendo a una “pauta de larga duración”, en mitad de la fase lútea, esto es, el día 21º de la

toma del fármaco, se inicia la administración diaria del agonista de la GnRH por vía subcutánea o intranasal, según presentación del preparado. Tras la regla, se reduce la dosis del análogo a la mitad manteniéndolo hasta la inducción de la ovulación.

- El 3º ó 4º día del ciclo siguiente se inicia el tratamiento con gonadotropinas. Se emplea rFSH (FSH recombinante, obtenida mediante biotecnología) o la asociación de rFSH y LH en mujeres mayores de 36 años o en pacientes con baja reserva folicular. La dosis de inicio varía entre 150 a 450 UI según el caso, la cual se va ajustando en relación a la respuesta, monitorizada cada 3 a 5 días con el número y medida folicular mediante ecografía transvaginal y el incremento del nivel de estradiol en sangre periférica.

- En todos los casos del estudio se empleó rhCG como inductor de ovulación. El preparado se aplica en forma de solución inyectable en el momento en que se consiguen dos más folículos mayores o iguales a 17mm. La ovulación se produce en torno a las 37 horas posteriores a la administración del fármaco, por lo que la punción folicular debe ser programada a las 36 horas de la inyección.

5.4.2.1.B PAUTA DE ESTIMULACIÓN CON ANTAGONISTAS DE LA GnRH:

Los **antagonistas de la GnRH** tienen un objetivo idéntico al de los agonistas, si bien, a diferencia de éstos, el antagonista es una molécula que se une al receptor hipofisario de GnRH de forma competitiva, bloqueándolo y causando una supresión hipofisaria profunda e inmediata. Este mecanismo de acción les confiere ciertas ventajas frente a los agonistas de la GnRH en los tratamientos de fertilidad **(Tabla 10)**, que está aumentando su protagonismo y generalizando su uso como fármacos supresores en FIV[20,73].

La pauta de estimulación basada en el uso de **antagonistas de la GnRH** como inhibidor hipofisario defiere de la comentada en relación a los agonistas en algunos puntos detallados en el siguiente esquema[20,73]:

- Debido al mecanismo de acción del antagonista, la supresión hipofisaria se realiza durante el propio ciclo de estimulación, por lo que la paciente debe finalizar el mes completo de anticonceptivo y comenzar la administración de gonadotropinas el 2º ó 3º día de regla secundaria a la deprivación por el anovulador.

- Del mismo modo, la dosis de rFSH ó rFSH+LH se irán ajustando según respuesta monitorizada cada 48-72 horas aproximadamente. Cuando por ecografía se documenta, al menos, un folículo de 14 mm, se introduce el fármaco antagonista por vía subcutánea, el cual se mantiene hasta la administración de la rhCG, cuyos criterios de aplicación y posterior punción folicular son iguales que los expuestos en el protocolo anterior

Tabla 10: Ventajas de los antagonistas de la GnRH[20,73]

Eliminación del efecto flare up por liberación inicial de FSH y LH.
Comienzo de la estimulación ovárica coincidiendo con el reclutamiento folicular.
Necesidad de menores dosis de gonadotropinas para la estimulación, permitiendo regímenes menos agresivos y más individualizados.
Posibilidad de inducir la ovulación con un agonista de la GnRH, o GnRH nativa o rLH, reduciendo el riesgo de hiperestimulación.
Menor coste

5.5 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

5.5.1 CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

Se calcula el tamaño muestral para un estudio de casos y controles de comparación de la probabilidad de trombofilia familiar en pacientes con fecundación in vitro con fallo de implantación y sin fallo de implantación.

Para su determinación se han empleado los valores que se exponen a continuación[5,7,8]:

- Proporción de expuestos en los controles: 13%
- Odds ratio: 3
- Nivel de confianza: 95%
- Potencia: 80%
- Controles por caso: 3

El resultado obtenido tras aplicar la fórmula correspondiente fue de 51 casos y 153 controles.

5.5.2. FUENTES DE DATOS

Para el reclutamiento del grupo control se recurrió a las listas de citaciones del Centro Médico de Especialidades Grande Covián. Según requerimientos de tamaño muestral, se seleccionaron, de forma aleatoria, pacientes citadas en consulta de tocología para control puerperal en el período desde Enero 2009 a Diciembre 2011. La selección definitiva, atendiendo a criterios de inclusión, se realizó revisando la historia clínica disponible en la consulta y el informe del parto que aporta la paciente.

El registro de pacientes candidatas a recibir tratamiento tipo FIV en el Servicio de Reproducción del HUMS en el período marcado entre Enero 2009 y Diciembre 2011, está reflejado en las listas de espera que el Servicio de Admisión del hospital materno infantil Miguel

Servet aporta al equipo de reproducción humana con una cadencia de actualización trimestral. Consultando estos registros se obtuvieron los datos de filiación de las pacientes del grupo caso, la fecha prevista de consulta y el número de ciclos de fecundación a los que había sido sometida, lo cual facilitó la elaboración de subgrupos de población FIV.

La recogida de variables epidemiológicas, antecedentes obstétricos, médicos y quirúrgicos de ambos miembros de la pareja se realizó mediante una revisión meticulosa e individualizada de cada una de las historias clínicas, previa solicitud por escrito en el Servicio de Archivos Clínicos del HUMS.

Los datos referentes a tratamientos de fertilidad previos y las variables que atañen al ciclo en estudio fueron cumplimentados consultando la base de datos informatizada del Servicio de Reproducción, elaborada en formato Microsoft Office Access®, en la cual se recogen periódicamente todas las pacientes sometidas a una fecundación in vitro en este servicio desde su creación en el año 2005.

Los resultados de las analíticas solicitadas se recopilaron accediendo a la base de datos del Servicio de Bioquímica, creada mediante el Programa SSD 1.0 y publicada a través de la red de Intranet local del Servicio Aragonés de Salud (SALUD).

Con el fin de comprobar el resultado final de los ciclos realizados se consultaron los documentos de “Registro de Partos” de la Unidad de Paritorios, donde se consigna: nombre materno, edad gestacional, si se trata de una gestación múltiple, necesidad de preinducción, vía de finalización del parto, peso al nacimiento y Ph de cordón[74].

5.5.3. ALMACEN Y SOPORTE DE LA INFORMACION

Para esta investigación se diseñó específicamente una hoja de recogida de datos, donde se incluyó toda la información referente a cada paciente, obtenida a partir de las fuentes anteriormente mencionadas. Tras completar todos los campos y variables, se rechazaron aquellas mujeres de la muestra que no cumplieron los criterios de selección.

La información obtenida fue transcrita a una base de datos informatizada, utilizando la aplicación Statistics Process Social Sciences (SPSS) 15.0 para Windows, que permitió su posterior análisis estadístico.

5.5.4. VARIABLES DEL ESTUDIO

CARACTERISTICAS EPIDEMIOLOGICAS

Con el fin de evitar la posible existencia de factores de confusión por falta de homogeneidad en la muestra, especialmente entre los subgrupos que componen el grupo caso o población FIV; se realizó un estudio descriptivo de las características epidemiológicas de las pacientes y sus parejas atendiendo a los antecedentes recogidos en la historia clínica. Las principales variables analizadas fueron:

- Edad de ambos miembros de la pareja.
- Antecedentes personales médicos o quirúrgicos de ambos.
- Antecedentes reproductivos de ambos.
- Regularidad en el tono menstrual.
- Técnicas de reproducción previas.
- Número de gestaciones anteriores.
- Número de abortos previos.
- Antecedentes referentes al aparato genital masculino, función sexual o contacto con gonadotóxicos.
- Años de esterilidad de la pareja.
- Causa-diagnóstico de la esterilidad.

RESULTADOS DEL ESTUDIO DE ESTERILIDAD MASCULINO[14]

Se analizaron las siguientes variables del seminograma de todos los varones de la población FIV, escogiendo las mejores cifras en caso de contar con varias determinaciones consecutivas.

- Volumen del eyaculado (ml)
- Recuento de espermatozoides en eyaculado
- Movilidad de espermatozoides
- Formas normales (corte ≥4%).

RESULTADOS DEL ESTUDIO DE ESTERILIDAD FEMENINO[29]

■Analíticas:

En este apartado, junto a las determinaciones hormonales del protocolo para el estudio de la fertilidad femenina, se incluyó el análisis de las variables objeto de la investigación referentes al estudio de trombofilias y marcadores de autoinmunidad.

- Niveles basales de FSH (U/ml), LH(U/ml) y E_2 (pg/ml).
- Función tiroidea (TSH y T_4 libre)
- Marcadores básicos de autoinmunidad:
    - Factor reumatoide (negativo ≤20U, positivo> 20 U)
    - Ac. Antitiroglobulina (ATG)
    - Ac. Antiperoxidasa (APO)
    - Ac. Antinucleares (ANA_s)
    - Ac. Antimitocondriales ($ANCA_s$)
- Estudio de trombofilias congénitas:
    - Proteína C Cromogénica (rango de normalidad de 80-120%)
    - Proteína S Libre (rango de normalidad de 60-140%)
    - Antitrombina III (rango de normalidad 80-120%)
    - Factor VIII coagulante
    - Homocisteína (rango de normalidad 4.2-10.5 µmol/L)
    - Estudio genético de mutaciones en **R506Q** (factor V o resistencia a la proteína C activada), **G(20210)A** (factor II o Protrombina) y **C677T**

(metilen-tertrahidrofolato reductasa) por PCR seguida de hibridación inversa (VIENA LAB).

- Estudio de trombofilias adquiridas:
    - Anticoagulante lúpico circulante (AL) (RN≥2,0: positividad fuerte, RN 1,5-2,0: positividad moderada, RN ≤ 1,5: positividad débil).
    - Ac. Anticardiolipina IgM (IgM-ACL) (neg < 15, indeterminado 15-20, positivo >20 UI/mL)
    - Ac. Anticardiolipina IgG (IgG-ACL) (neg < 15, indeterminado 15-20, positivo >20 UI/mL)
    - Ac. Anti-β2-glicoproteína IgM (negativo < 15UI/mL, indeterminado 15-20, positivo >20 UI/mL)
    - Ac. Anti-β2-glicoproteína IgG (negativo < 15UI/mL, indeterminado 15-20, positivo >20 UI/mL)

■**Otras pruebas:** (variables cualitativas nominales no dicotómicas):

- Hallazgos patológicos en ecografía transvaginal: miomas uterinos no subserosos >3cm, endometriomas, otros quistes ováricos >3cm, tumor ovárico sólido, patología endometrial (pólipos, hiperplasia), hidrosálpinx uni o bilateral.
- Hallazgos en histerosalpingografía: no realizada, ausencia de permeabilidad de una o ambas trompas, impronta en cavidad>30%, útero septo, útero doble, adherencias o sinequias intracavitarias, otras malformaciones uterinas.
- Valoración de folículos antrales en ecografía basal: normal (>3 folículos en al menos un ovario).

CARACTERÍSTICAS Y DESARROLLO DEL CICLO DE REPRODUCCIÓN

Contando con las fichas de ciclo incluidas en la historia del Servicio de Reproducción se recogieron las variables referentes a:

- Número de ciclo FIV: 1º ,2º, 3ºó más (variable ordinal)
- Baja respuesta a ciclos previos si los hubiera: ≤ 3 folículos tras la estimulación o niveles de E_2 el día de la hCG < 500pg/ml (variable cuantitativa dicotómica).
- Protocolo de estimulación:
    - Fármaco empleado para supresión hipofisaria (agonistas/antagonistas)
    - Unidades totales de gonadotropinas
    - Días de estímulo
    - Nivel de estradiol el día de la hCG (pg/ml)
    - REM/ml del ciclo
- Características del ciclo:
    - Número de ovocitos totales recuperados
    - Número de ovocitos en metafase II recuperados
    - Técnica de fecundación empleada (FIV/FIV-ICSI)
    - Número de embriones obtenidos
    - Día de la transferencia embrionaria
    - Número de embriones transferidos y características de cada uno con el grado y número de células.
    - Excedente de embriones para vitrificar.

- Resultado del ciclo:
    - Gestación (según nivel de β-HCG al 15º día de la transferencia): no gestación, si gestación.
    - Tipo de gestación (según ecografía semana 7º): aborto, evolutiva única, evolutiva gemelar.

5.5.5. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Para describir las variables cuantitativas se emplearon la media, la mediana, la desviación estándar y el intervalo de confianza para la media con un nivel de confianza del 95%, como estimadores de los parámetros poblacionales a partir de las muestras estudiadas.

Ya que se desconocían los parámetros poblacionales de distribución normal y era necesario el uso de una estimación de dichos parámetros calculados en la muestra; se contrastó la normalidad de las variables con el test no paramétrico de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lilliford.

Para su representación gráfica se realizaron histogramas de cada variable cuantitativa con superposición de la curva de distribución normal o curva de Gauss. De igual forma, se dibujaron diagramas de caja para poder comparar gráficamente distintos grupos de la muestra.

Las variables cualitativas se describieron mediante tablas de frecuencias y representaciones gráficas en forma de diagramas de sectores[75].

5.5.6. ESTADÍSTICA INFERENCIAL

El objetivo principal de esta investigación consistió en encontrar la posible asociación entre el fallo de implantación tras FIV y la presencia de una patología de hipercoagulabilidad y/o trastorno en el sistema autoinmune; con el fin de poder adaptar los protocolos de diagnóstico e incluso profilaxis en este grupo poblacional. Para este fin, se ha realizado un análisis mediante el uso de diferentes pruebas estadísticas, para validar o rechazar las hipótesis de modelación probabilísticas, sin necesidad de realizar un análisis epidemiológico de comprobación de relaciones causa-efecto.

Todos los procedimientos estadísticos se realizaron con el paquete integrado de análisis estadístico SPSS 15.0. Las técnicas estadísticas que se utilizaron se eligieron en virtud del número de variables a comparar y de la escala de medida de las variables. En todas las pruebas estadísticas se tomó como valor de referencia de la significación estadística una p menor de 0,05.

CONTRASTE DE HIPÓTESIS

El contraste de la distribución entre variables dicotómicas y categóricas se llevó a cabo mediante tablas de contingencia con el estadístico Chi-cuadrado, asociando un análisis de residuos estandarizados cuando el contraste era significativo. Se calcularon los Odd-ratios de las tablas de variables dicotómicas en las tablas de contingencia, con intervalos de confianza para los Odd-ratios con un nivel de confianza del 95%.

La comparación de medias entre variables cualitativas se realizó mediante el Test T-Student, si se trataba de dos medias, o con análisis de la varianza de un factor cuando se comparaban más de dos medias, siempre que cumplieran criterios de normalidad. En caso de no poder trabajar bajo el supuesto de normalidad, se utilizaron los test no paramétricos U de Mann-Whitney o H de Kruskal-Wallis, para comparar la igualdad en la distribución de la variable cuantitativa en dos grupos o en más de dos grupos respectivamente.

Las correlaciones entre variables cuantitativas se llevaron a cabo mediante los coeficientes R^2 de Pearson, cuando la distribución de las variables era normal y el tipo de asociación lineal (ya que solamente mide relación lineal), y Rho de Spearman en variables donde no se pudiera o no se necesitara el supuesto de normalidad, permitiendo medir, a demás, cualquier tipo de relación.

El coeficiente Tau-b de Kendal se empleó para establecer la correlación entre variables cualitativas.

Todos estos coeficientes se interpretan de la misma forma ya que, al ser adimensionales, toman valores entre -1 y 1. Así, cuando el coeficiente está próximo a cero, indica que no existe relación entre las variables, mientras que los valores próximos a los extremos indican una relación (directa o inversa respectivamente) de mayor intensidad cuanto más se acercan a -1 y 1.

Para los coeficientes de correlación se calcularon el contraste de hipótesis habitual con su p-valor, analizando si eran significativos o no[75,76].

ANÁLISIS MULTIVARIANTE

El análisis multivariante es un método estadístico utilizado para determinar la contribución de varios factores en un evento o resultado. Se emplea cuando existe una única *variable dependiente o variable respuesta*, que se corresponde con el evento o resultado estudiado y varias *variables independientes o explicativas* correspondientes a los factores de estudio o llamados de riesgo.

En esta memoria, con los resultados significativos del análisis bivariante se realizaron modelos multivariantes de regresión, lineal o logística, dependiendo de las características de la variable dependiente. Tras la estimación de las ecuaciones y su interpretación, se hizo una validación del modelo propuesto; que, en el caso de regresión lineal, se acometió comprobando las hipótesis del modelo de regresión: homocedasticidad, normalidad de la variable dependiente, no existencia de multicolinealidad ni autocorrelación. Y, en el caso de la regresión logística, se corroboró su validez de criterio y discriminante mediante el contraste de Hosmer-Lemeshow y curvas ROC[77].

5.5.7. SESGOS Y LIMITACIONES

No se detectan sesgos en este proyecto salvo la limitación propia de la posible carencia de calidad de codificación y registro de algunos datos recogidos en las bases hospitalarias. En todos los hospitales de la comunidad autónoma de Aragón, existe un protocolo de codificación que exige el empleo de un mismo formato de base de datos, el CMBD (Conjunto Mínimo Básico de Datos); sin embargo, el seguimiento de la calidad de registro no está constatado.

5.5.8. ASPECTOS ÉTICOS

Las bases de datos empleadas en todas las fases del trabajo están correctamente codificadas, encriptadas y custodiadas por los investigadores, garantizando el anonimato absoluto de todos los pacientes.

Como se ha referido en apartados anteriores todas las pacientes incluidas en el estudio fueron convenientemente informadas del objeto del proyecto y del compromiso que con él se adquiría. Así se refleja y queda certificado con la firma de un consentimiento detallado que se proporcionó tras la información verbal durante la entrevista clínica.

RESULTADOS

6.1 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

6.1.1. GRUPO CASO: POBLACIÓN FIV

La recogida de datos desde Enero 2009 a Diciembre 2011 se realizó siguiendo criterios de tamaño muestral. El grupo de riesgo quedó compuesto por un total de 211 pacientes, las cuales se distribuyeron en tres subgrupos en función del número de ciclos FIV a los que habían sido sometidas.

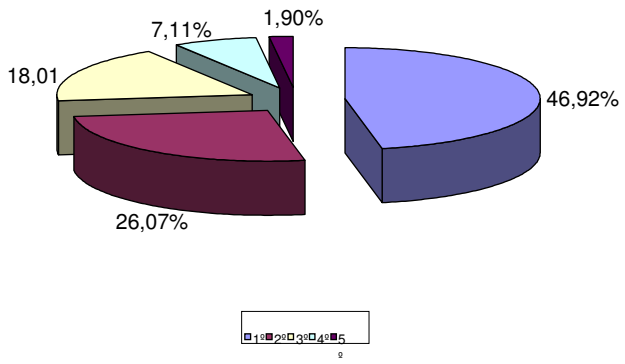
En el grupo de primera FIV se incluyeron 99 mujeres, 55 pacientes integraron el grupo de segunda FIV y el resto compuso el grupo de tres ó más ciclos o grupo problema diagnosticado de fallo de implantación, tal como se muestra en la siguiente tabla **(Tabla 11)**.

Tabla 11: Distribución del grupo caso en subgrupos según número de ciclos FIV

Casos	Frecuencia	porcentaje
1º ciclo FIV	99	46,92%
2º ciclo FIV	55	26,07%
3º o más ciclos FIV	57	27,01%

En un diagrama de sectores se puede visualizar gráficamente la división del grupo de riesgo en subgrupos según los ciclos de FIV recibidos **(Figura 7)**.

Fig.7: Subdivisión del grupo caso según número de ciclos FIV realizados



6.1.1.A CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

El análisis descriptivo de las características epidemiológicas del grupo de riesgo se realizó de forma independiente para cada subgrupo con el fin de perfilar cada categoría evitando sesgos por falta de homogeneidad en la muestra que afectaran al subgrupo problema diagnosticado de fallo de implantación.

EDAD DE LAS MUJERES SOMETIDAS A FIV

La edad media de las mujeres de la cohorte de riesgo fue de 33 a 35 años para las pacientes de los tres grupos, con un p-valor asociado al contrate de Kruskal Wallis no significativo **(Tabla 12)**.

Tabla 12: Edad de las mujeres integrantes de población FIV

		Intervalo de Confianza		
EDAD MATERNA	**Media**	**inferior**	**Superior**	**p-valor***
1º ciclo FIV	33,91	33,31	34,5	0,065
2º ciclo FIV	34,78	33,92	35,65	
3º o más ciclos FIV	34,88	34,16	35,6	

* contraste de Kruskal Wallis (p-valor Kolmogorov-Smirnov 0,000)

ANTECEDENTES MÉDICOS Y HÁBITOS TÓXICOS

Habitualmente, las parejas sometidas a TRA son población joven y sana con escasos antecedentes médicos ni quirúrgicos de interés. En el presente estudio el tabaquismo se presentó como el antecedente médico más relevante. Cabe destacar que, el IMC (índice de

masa corporal) igual o superior a 25 fue el segundo rasgo más frecuente, afectando entre el 11 al 22% de estas mujeres, con una distribución homogénea en toda la muestra **(Tabla 13)**.

Tabla 13: Antecedentes médicos de las mujeres FIV

ANTECEDENTES MÉDICOS	1º ciclo FIV		2º ciclo FIV		3º o más ciclos FIV	
	frecuencia	porcentaje	frecuencia	porcentaje	frecuencia	porcentaje
DM1	1	1,61%	1	3,13%	0	0,00%
DM2	3	4,84%	2	6,25%	2	6,45%
Obesidad	7	11,29%	0	0,00%	7	22,58%
Enf. endocrina	4	6,45%	1	3,13%	1	3,23%
Enf. respiratoria	2	3,23%	3	9,38%	0	0,00%
Enf. psiquiátrica	1	1,61%	2	6,25%	0	0,00%
Enf. neurológica	1	1,61%	0	0,00%	1	3,23%
Enf. hematológica	2	3,23%	0	0,00%	0	0,00%
Infecciosa (VIH,VHB,VHC,Lúes)	1	1,61%	2	6,25%	0	0,00%
Colagenosis	1	1,61%	1	3,13%	0	0,00%
Tabaquismo (>5c/d)	37	59,68%	20	62,50%	20	64,52%
Enf. inflamatoria intestinal	1	1,61%	0	0,00%	0	0,00%
Otras enf sistémicas	1	1,61%	0	0,00%	0	0,00%

ANTECEDENTES OBSTÉTRICOS Y GINECOLÓGICOS

El 50% de los antecedentes ginecológicos con impacto reproductivo en todos los subgrupos de riesgo se englobaron en la categoría de endometriosis e intervención quirúrgica sobre los ovarios por patología benigna, en la cual, el 78% resultaron endometriomas.

En los grupos de 1º y 2º ciclo la patología tubárica superó a la anovulación o disovulación que se presentó como la segunda patología reproductiva más prevalente en el grupo problema **(Tabla 14)**.

Tabla 14: Antecedentes reproductivos en las mujeres de población FIV

ANTECEDENTES REPRODUCTIVOS	1º ciclo FIV		2º ciclo FIV		3º o más ciclos FIV	
	frecuencia	porcentaje	frecuencia	Porcentaje	frecuencia	porcentaje
SOP	5	7,35%	3	7,50%	5	10,42%
Anovulación	0	0,00%	2	5,00%	5	10,42%
Endometriosis	20	29,41%	12	30,00%	11	22,92%
Miomas uterinos	0	0,00%	3	7,50%	3	6,25%
EIP,hidro,piosalpinx	8	11,76%	6	15,00%	1	2,08%
IQ ovario*	19	27,94%	7	17,50%	10	20,83%
IQ cuerpo uterino*	2	2,94%	2	5,00%	3	6,25%
Síndrome X	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Malformación uterina	0	0,00%	0	0,00%	3	6,25%
Pólipo endometrial	4	5,88%	2	5,00%	5	10,42%
Hiperprolactinemia	7	10,29%	1	2,50%	2	4,17%
Cx tubárica**	3	4,41%	2	5,00%	0	0,00%

*IQ: intervención quirúrgica. **CX: Cirugía

Respecto a la historia obstétrica, como cabía esperar, más del 50% del grupo caso no había tenido embarazos previos, sin diferencias significativas en el subgrupo de 3 ó más ciclos a pesar de los tratamientos realizados.

Resultó llamativo el elevado porcentaje de abortos entre las que sí habían conseguido alguna gestación previamente **(Tabla 15)**.

La mayoría de los abortos registrados fueron precoces (antes de la semana 4º) y de primer trimestre. Entre un 21 a 35% refirieron dos o más, siendo las pacientes del grupo de tres o más ciclos las que presentaron mayor número de eventos abortivos, sin alcanzar la significación estadística.

El 10% de los abortos registrados en el grupo de riesgo correspondieron a un antecedente de gestación ectópica que, como era previsible, ocurrieron con más frecuencia cuanto mayor número de ciclos FIV se habían realizado.

Al valorar el **tiempo de esterilidad** de las parejas de población FIV, entendido como el período desde la aparición del deseo genésico hasta la fecha del ciclo de tratamiento que nos ocupa, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (con un p-valor asociado al contraste de Kruskal Wallis menor a 0.05). Este valor fue mayor conforme aumentaba el número de ciclos practicados, con una media entre los 42.81 meses en el grupo de la 1º FIV a 62.93 meses en el de tres o más ciclos **(Tabla 16)**.

Tabla 16: Tiempo de esterilidad (meses) de las parejas FIV

MESES DE ESTERILIDAD	Media	Intervalo de Confianza inferior	Intervalo de Confianza Superior	p-valor*
1º ciclo FIV	42,81	39,61	46,01	0,000
2º ciclo FIV	51,67	45,47	57,88	
3º o más ciclos FIV	62,93	58,03	67,83	

* contraste de Kruskal Wallis (p-valor Kolmogorov-Smirnov 0,000)

Tabla 15: Antecedentes obstétricos en población FIV

HISTORIA OBSTÉTRICA		1ºciclo FIV		2º ciclo FIV		3º ó más ciclos FIV	
		frecuencia	porcentaje	frecuencia	porcentaje	frecuencia	porcentaje
Nº de gestaciones							
	0:	76	76,77%	37	67,27%	36	63,16%
	1:	17	17,17%	16	29,09%	18	31,58%
	2	4	4,04%	1	1,82%	3	5,26%
	3:	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
	4:	0	0,00%	1	1,82%	0	0,00%
	5:	1	1,01%	0	0,00%	0	0,00%
	6:	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
	7:	1	1,01%	0	0,00%	0	0,00%
Nº de partos previos							
	0:	97	97,98%	54	98,18%	56	98,25%
	1:	2	2,02%	1	1,82%	1	1,75%
Nº de abortos							
	0:	78	78,79%	38	69,09%	37	64,91%
	1:	15	15,15%	15	27,27%	17	29,82%
	2:	4	4,04%	1	1,82%	3	5,26%
	3:	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
	4:	0	0,00%	1	1,82%	0	0,00%
	5:	1	1,01%	0	0,00%	0	0,00%
	6:	1	1,01%	0	0,00%	0	0,00%

ESTUDIO DE ESTERILIDAD FEMENINO

En el análisis del estudio hormonal basal no se objetivaron diferencias significativas en los valores medios de FSH en fase folicular precoz, con cifras entre 7,13 y 7,31 mUI/ml en los tres grupos (p-valor = 0.961 > 0.05) **(Tabla 17)**.

Tabla 17: Niveles medios de FSH basal (mUI/ml)

		Intervalo de Confianza		
FSH	**Media**	**Inferior**	**superior**	**p-valor***
1º ciclo FIV	7,31	6,80	7,83	0,961
2º ciclo FIV	7,26	6,51	8,01	
3º o más ciclos FIV	7,13	6,56	7,70	

* contraste de Kruskal Wallis (p-valor Kolmogorov-Smirnov 0,004)

A pesar de no alcanzar la significación estadística en esta determinación, resultó llamativo el análisis del porcentaje de pacientes con FSH basal igual o superior a 10 mUI/ml, como marcador de baja reserva folicular, el cual superó el 10% en los tres grupos; registrando cifras del 21.80% entre las pacientes sometidas al segundo ciclo FIV **(Figura 8)**.

Igualmente, el nivel medio de Estradiol basal resultó ligeramente superior en el subgrupo de 2º ciclo FIV, aunque siempre por debajo de 60 pg/ml, sin diferencias significativas entre ellos (p-valor de 0.827 > 0.005) **(Tabla18)**.

Fig.8: Porcentaje de pacientes con FSH ≥ 10mUI/ml

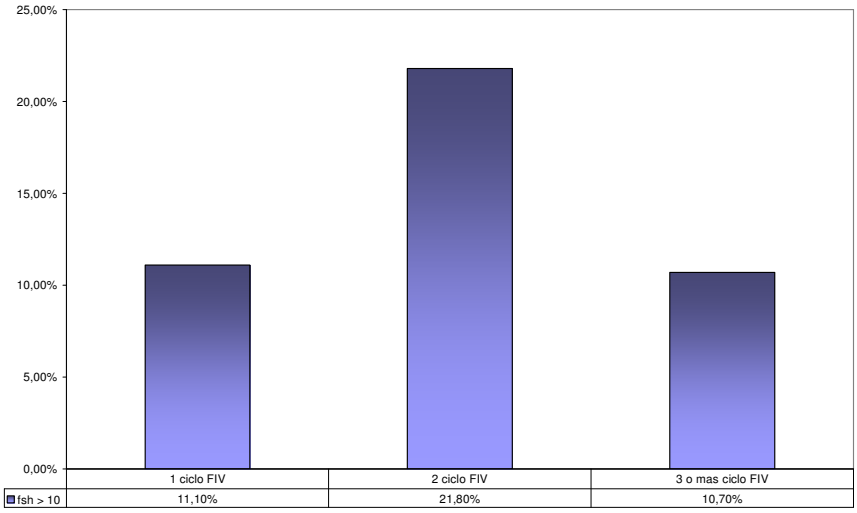


Tabla 18: Niveles de estradiol basal (pg/ml)

ESTRADIOL BASAL	Media	Intervalo de Confianza Inferior	Intervalo de Confianza Superior	p-valor*
1º ciclo FIV	47,71	44,25	51,17	0,827
2º ciclo FIV	48,87	41,78	55,96	
3º o más ciclos FIV	45,80	41,41	50,18	

* contraste de Kruskal Wallis (p-valor Kolmogorov-Smirnov 0,008)

ESTUDIO DESCRIPTIVO DEL FACTOR MASCULINO DE LA POBLACIÓN FIV

Para el análisis descriptivo de los varones caso, se valoraron, por subgrupos, datos referentes a la edad media, antecedentes médicos y reproductivos así como los resultados del estudio de fertilidad.

La *edad media* de los hombres del primer subgrupo fue de 36.63 años (IC al 95 %: 35.75-37.50), la de las parejas del 2º ciclo FIV fue de 37.07 (IC al 95 %: 36.08-38.07) y la edad

media de los varones del grupo problema fue de 35.72 años (IC al 95 %: 34.74-36.70), curiosamente el menor de los tres. Sin embargo, tras realizar el test ANOVA para el contraste de igualdad de medias en los tres grupos, se obtuvo un p-valor no significativo de 0.189 (> de 0,05).

De forma paralela a las mujeres del grupo de riesgo, el antecedente médico más prevalente fue el tabaquismo **(Tabla 19)**.

Tabla 19: Antecedentes médicos en los varones FIV

ANTECEDENTES MÉDICOS	1º ciclo FIV		2º ciclo FIV		3º o más ciclos FIV	
	frecuencia	Porcentaje	frecuencia	porcentaje	frecuencia	porcentaje
DM1	1	2,50%	0	0,00%	0	0,00%
Obesidad	1	2,50%	1	5,00%	0	0,00%
Enf. endocrina	2	5,00%	0	0,00%	1	3,13%
Enf. respiratoria	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Enf. psiquiátrica	0	0,00%	1	5,00%	0	0,00%
Enf. neurológica	1	2,50%	0	0,00%	1	3,13%
Enf. hematológica	1	2,50%	0	0,00%	0	0,00%
Enf. renal	0	0,00%	2	10,00%	0	0,00%
Infecciosa (VIH,VHB,VHC,Lúes)	0	0,00%	2	10,00%	0	0,00%
QT	1	2,50%	1	5,00%	2	6,25%
Colagenosis	1	2,50%	0	0,00%	1	3,13%
Tabaquismo (>5c/d)	30	75,00%	13	65,00%	27	84,38%
Otras enf sistémicas	2	5,00%	0	0,00%	0	0,00%

Tal como se observa en la siguiente referencia **(Tabla 20)**, el antecedente reproductivo más frecuente fue la patología testicular benigna entre la que destacaron el varicocele, los quistes de epidídimo, los traumatismos y las orquitis no infecciosas. Estos cuadros supusieron, prácticamente, la mitad de los antecedentes de interés; seguidos por la parotiditis y las hernias inguinales.

Se registraron tres casos de patología testicular maligna repartidos de forma homogénea en los tres grupos.

Tabla 20: Antecedentes reproductivos en los varones de población FIV

ANTECEDENTES REPRODUCTIVOS	1º ciclo FIV		2º ciclo FIV		3º o más ciclos FIV	
	frecuencia	porcentaje	frecuencia	porcentaje	frecuencia	porcentaje
Parotiditis	4	22,22%	4	30,77%	1	5,26%
Pat. testicular benigna	8	44,44%	7	53,85%	8	42,11%
Pat. testicular maligna	1	5,56%	1	7,69%	1	5,26%
Impotencia, falta de líbido, problemas erección	1	5,56%	0	0,00%	1	5,26%
Hernia inguinal	3	16,67%	1	7,69%	6	31,58%
Agenesia testicular bilateral	1	5,56%	0	0,00%	1	5,26%
Fibrosis quística	0	0,00%	0	0,00%	1	5,26%

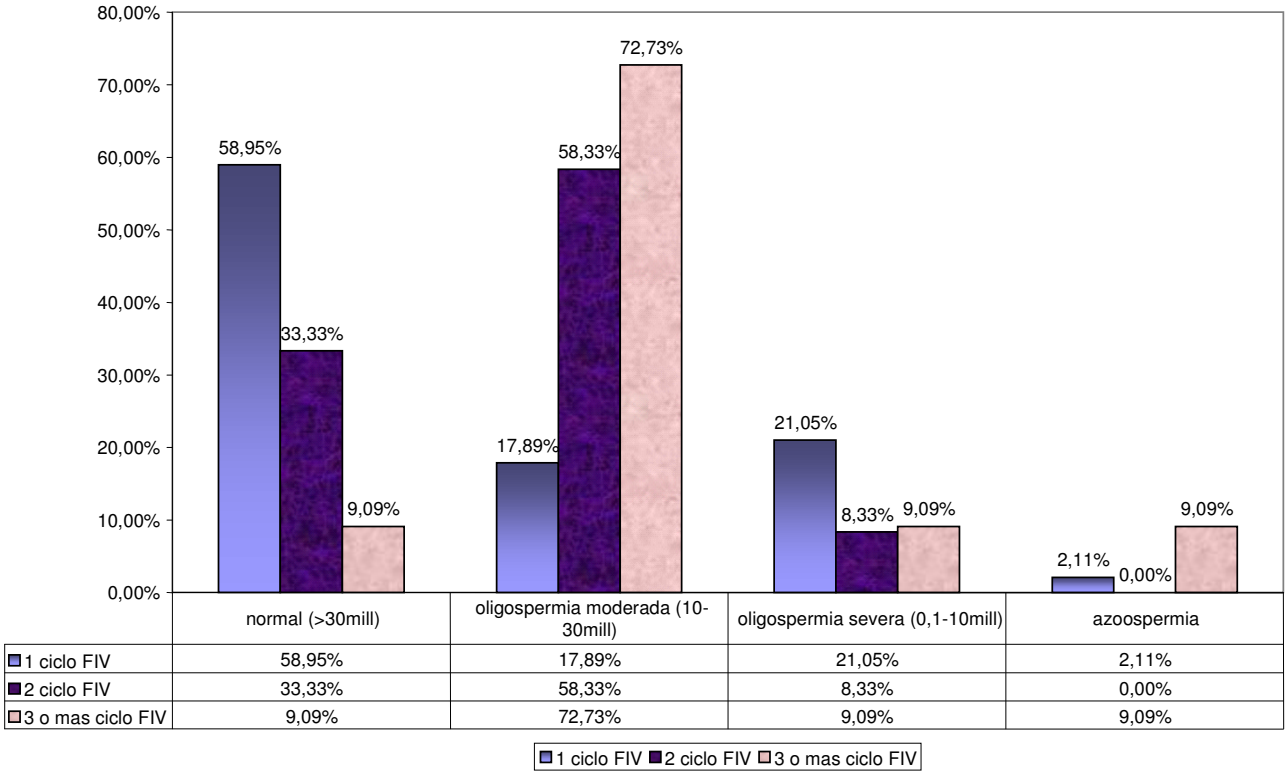
ESTUDIO DE FERTILIDAD MASCULINO

En diagramas de barras se muestran los valores del seminograma de los varones de la cohorte de riesgo, desglosado según parámetros de recuento, morfología y movilidad.

Según los valores de referencia para el estudio del semen dictados por la OMS en 2010[14], un recuento espermático normal es aquel que supera o iguala los 30 millones por eyaculado o una concentración espermática de 15 millones por ml. Atendiendo a esta definición se observó que, en el grupo de primera FIV, el 58% de los varones se ajustaba a la definición de normalidad.

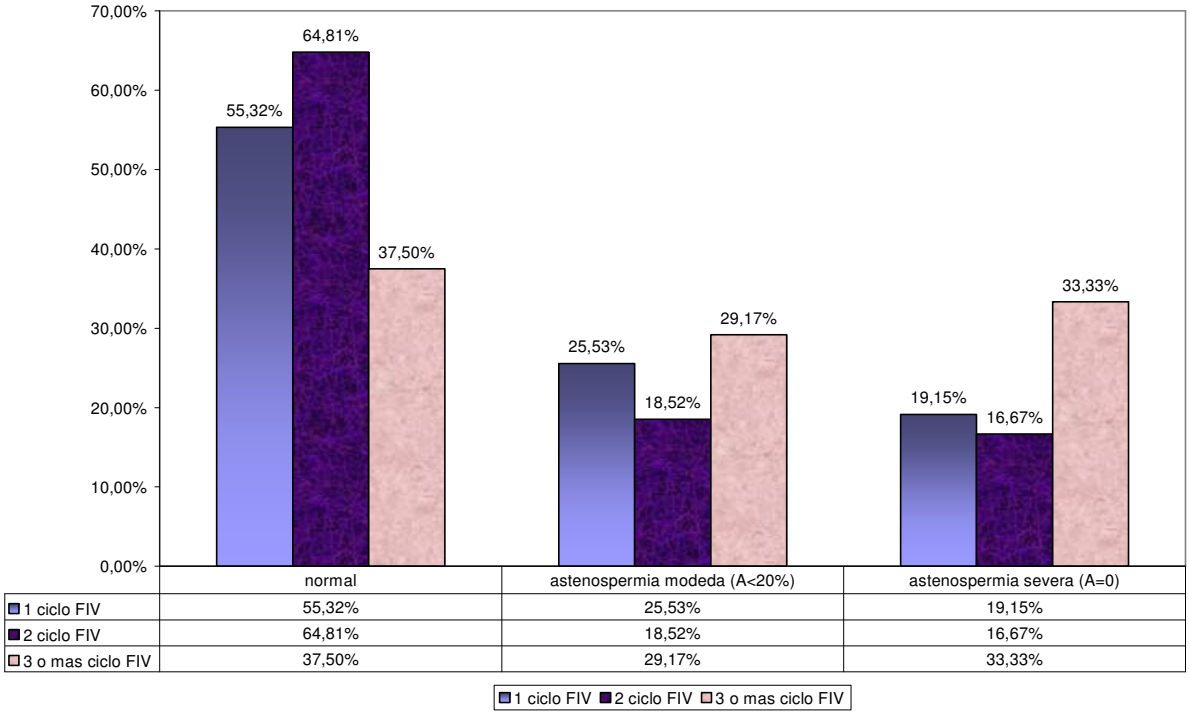
En el segundo grupo, lo más habitual era una oligoespermia moderada (>10 millones), presente en el 58,33% de los seminogramas. El 72,73% de los varones del tercer grupo presentaron una oligoespermia moderada, un 9% una oligoespermia severa (<10 millones) y tan solo un 9% de seminogramas portaba un recuento normal. En este grupo, se registró el mayor porcentaje de azoospermias con un 9% de casos frente al 2,1% y al 0% registrados en el primer y segundo grupo respectivamente. Estos pacientes quedaron fuera del estudio según criterios de exclusión. Sin embargo, el mayor porcentaje de oligoespermias severas, se concentró en el grupo de 2º FIV, con un 21,05% de casos frente al 9% del grupo problema **(Figura 9)**.

Fig.9: Recuento espermático en los seminogramas FIV



Sin diferencias significativas, prácticamente la mitad de varones de los tres grupos; esto es, el 55%, el 64% y el 37,50% respectivamente, presentaron una movilidad espermática progresiva rápida normal (PR≥32%). El resto de los seminogramas se repartieron entre astenospermia moderada y severa de forma homogénea en todos los grupos, siempre con mayor porcentaje patológico en el grupo problema **(Figura 10)**.

Fig.10: Movilidad espermática en los seminogramas FIV



Los valores de formas normales fueron muy similares en los tres grupos definidos. Cabe destacar que, la media resultó algo inferior entre los varones del subgrupo de 3º o más ciclos, sin que esta diferencia alcanzara la significación estadística (p-valor de 0.385 > 0.05) **(Tabla 21)**.

Tabla 21: Espermios con morfología normal en los seminogramas FIV

FORMAS NORMALES	Media	Intervalo de Confianza		p-valor*
		Inferior	Superior	
1º ciclo FIV	57,48	52,87	62,1	0,385
2º ciclo FIV	57,19	51,55	62,13	
3º o más ciclos FIV	52,49	46,94	58,04	

* contraste ANOVA (p-valor Kolmogorov-Smirnov 0,201)

Por tanto, el análisis global de los seminogramas refleja un porcentaje de normalidad completa inferior al 50%, con un valor próximo para los varones del 1ºciclo FIV.

La oligoteratospermia severa se registró como la alteración del seminograma más frecuente entre estos varones, un 12%, seguida de la oligoastenospermia moderada (11%).

Entre los varones del segundo y tercer grupo el diagnóstico patológico más prevalente fue el de oligoastenospermia severa, con un porcentaje del 6% y 21% respectivamente **(Tabla 22).**

Tabla 22: Resultados de los seminogramas FIV

RESULTADO SEMINOGRAMA	1º ciclo FIV		2º ciclo FIV		3º o más ciclos FIV	
	frecuencia	porcentaje	frecuencia	porcentaje	frecuencia	porcentaje
Normal	49	49,49%	31	37,35%	21	37,50%
Oligospermia severa	2	2,02%	3	3,61%	2	3,57%
Astenospermia	4	4,04%	4	4,82%	2	3,57%
Astenospermia severa	7	7,07%	1	1,20%	1	1,79%

Oligoastenospermia severa	1	1,01%	5	6,02%	12	21,43%
Oligoteratospermia severa	12	12,12%	1	1,20%	1	1,79%
Astenoteratospermia severa	2	2,02%	0	0,00%	1	1,79%
Oligoastenoteratospermia severa	1	1,01%	31	37,35%	2	3,57%
Azoospermia	7	7,07%	3	3,61%	6	10,71%
Astenoteratospermia moderada	3	3,03%	0	0,00%	3	5,36%
Oligoastenospermia moderada	11	11,11%	4	4,82%	5	8,93%

6.1.1.B CARACTERÍSTICAS DEL CICLO FIV A ESTUDIO

Como se expuso anteriormente, los subgrupos de pacientes de la población FIV se distribuyeron en función del número de ciclo al que eran sometidos en el momento del estudio.

El grupo diagnosticado de fallo de implantación, o también denominado grupo problema, era el objetivo principal al que iban dirigidas la mayoría de las hipótesis y conclusiones, por lo que su correcta caracterización revistió una especial importancia.

Este tercer subgrupo FIV quedó compuesto por 57 mujeres, el 27.01% de los casos totales. De ellas, tal como se muestra en el diagrama de sectores previo **(Figura 7)**, el 66,68% se sometió a su tercer ciclo coincidiendo con el momento de la investigación, el 26,32% a su cuarto ciclo y el 7,03% a su quinto o superior intento. Debido a lo prolongado y complicado de su historia reproductiva, esta categoría reunía los pacientes con más información y mayor número de datos disponibles.

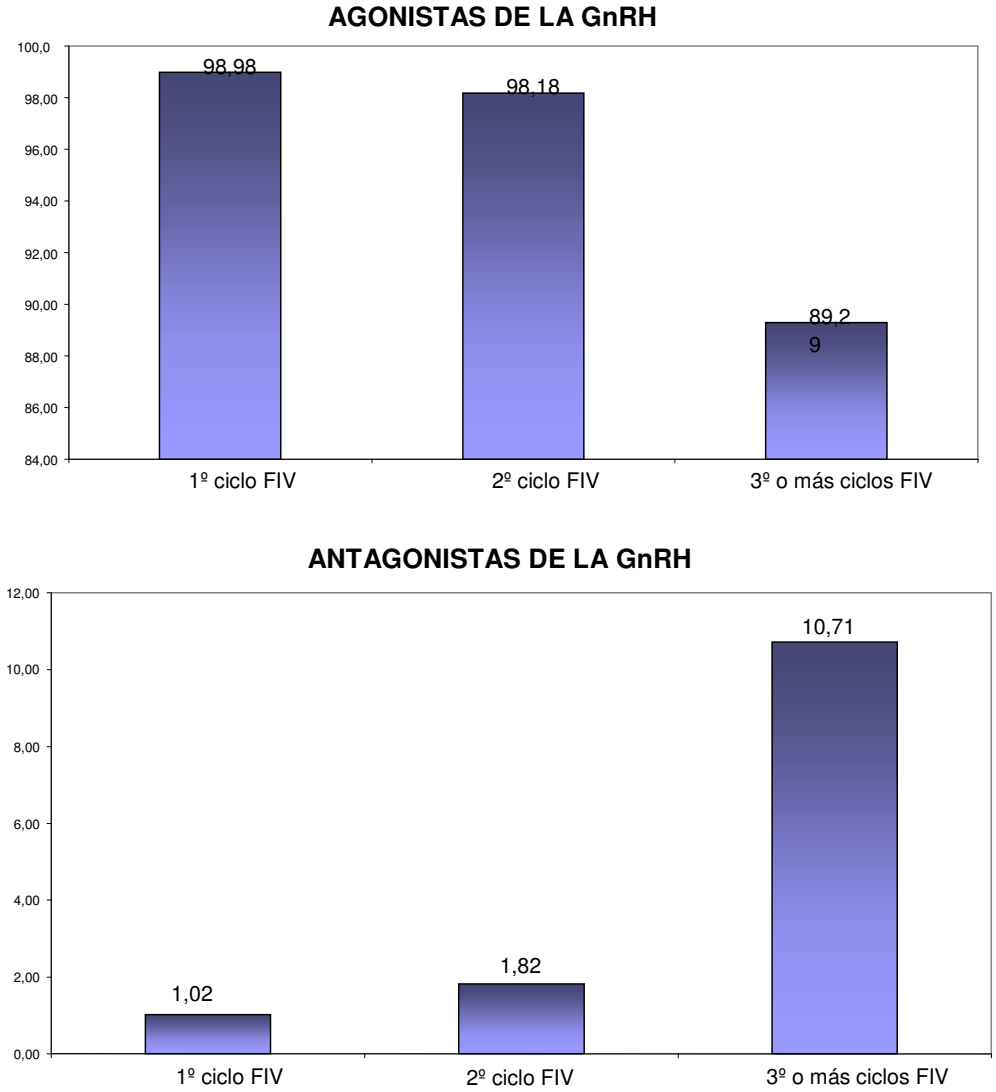
En el apartado que sigue se exponen las características correspondientes al ciclo de FIV a estudio.

PROTOCOLO DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA

Atendiendo a los protocolos de estimulación ovárica empleados en nuestro servicio de reproducción, el 98% de las pacientes recibieron un agonista de la GnRH como supresor hipofisario.

Se registró un descenso al 89.29% en el grupo problema a favor del uso de antagonistas en un evidente intento de cambiar la pauta o mejorar el resultado del proceso en mujeres con varios ciclos previos **(Figura 11).**

Fig.11: Protocolo de supresión hipofisaria



Respecto a las unidades de gonadotropinas empleadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las pacientes de los tres grupos **(Tabla 23)**.

Curiosamente, aunque el empleo y la dosis de LH fue similar en todo el grupo de riesgo, fueron las pacientes del grupo problema las que requirieron, en valor absoluto, menor aporte de este fármaco **(Tabla 23)**.

Tabla 23: Unidades de gonadotropinas empleadas en la estimulación ovárica

		Intervalo de Confianza		
Unidades FSH	**Media**	**inferior**	**Superior**	**p-valor***
1º ciclo FIV	2426,6	2230,90	2622,31	0,566
2º ciclo FIV	2498,05	2208,86	2787,25	
3º o más ciclos FIV	2563,11	2277,64	2848,64	

* contraste ANOVA (p-valor Kolmogorov-Smirnov 0,197)

		Intervalo de Confianza		
Unidades LH	**Media**	**inferior**	**Superior**	**p-valor***
1º ciclo FIV	317,22	186,62	447,83	0,654
2º ciclo FIV	339,55	156,86	522,23	
3º o más ciclos FIV	229,02	79,48	378,56	

* contraste de Kruskal Wallis (p-valor Kolmogorov-Smirnov 0,000)

Ampollas MHG	Media	Intervalo de Confianza inferior	Intervalo de Confianza Superior	p-valor*
1º ciclo FIV	1,4	0,56	2,24	0,136
2º ciclo FIV	3,42	1,49	5,35	
3º o más ciclos FIV	2,95	1,26	4,63	

* contraste de Kruskal Wallis (p-valor Kolmogorov-Smirnov 0,000)

El número medio de días de estímulo se situó en torno a 10 en toda la cohorte de riesgo **(Tabla 24)**.

Tabla 24: Días de estimulación ovárica

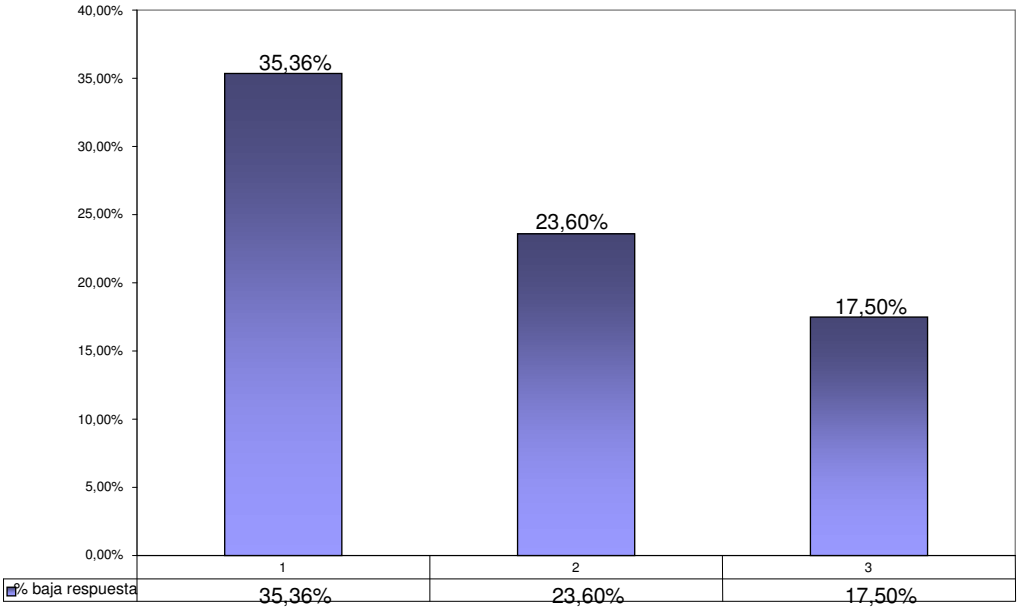
DÍAS DE ESTÍMULO	Media	Intervalo de Confianza inferior	Intervalo de Confianza Superior	p-valor*
1º ciclo FIV	9,72	9,34	10,11	0,390
2º ciclo FIV	10,04	9,52	10,55	
3º o más ciclos FIV	10,05	9,61	10,50	

* contraste de Kruskal Wallis (p-valor Kolmogorov-Smirnov 0,000)

Según los datos analíticos y ecográficos recogidos en la consulta de seguimiento del ciclo se analizaron los porcentajes de bajas respondedoras, atendiendo a la definición de un nivel de estradiol < 500 pg/ml o menos de 4 folículos el día de la administración de la hCG[71].

En la presente muestra, el menor porcentaje de baja respuesta se observó en el tercer grupo, probablemente por tratarse de pacientes sometidas a varias pautas de estimulación previas, lo cual permite ir escogiendo la mejor opción en sucesivos tratamientos. No obstante, con un p-valor asociado al contraste Chi-cuadrado de 0.056, las diferencias no resultaron significativas **(Figura 12)**.

Fig.12: Porcentaje de baja respuesta al ciclo de estimulación ovárica



En relación al semen empleado en los tratamientos, no hubo diferencias significativas respecto al REM/ml en ninguno de los subgrupos; si bien, la categoría de 2º ciclo FIV fue la que mostró mejores cifras de espermatozoides recuperados. El tercer grupo, sin embargo, contaba con las peores muestras **(Tabla 25).**

Tabla 25: REM/ml del semen capacitado para los tratamientos FIV

		Intervalo de Confianza		
REM/ml	**Media**	**Inferior**	**Superior**	**p-valor***
1ºciclo FIV	27,66	22,17	33,15	0,347
2º ciclo FIV	35,07	24,90	45,24	
3º o más ciclos FIV	23,32	15,13	31,50	

* contraste de Kruskal Wallis (p-valor Kolmogorov-Smirnov 0,000)

RESULTADOS DEL CICLO

En las tablas expuestas a continuación, se recoge la información para cada uno de los grupos referente al número total de ovocitos recuperados, la cantidad de ovocitos en metafase II y al número de ellos que fueron inseminados **(Tablas 26, 27 y 28)**.

Los valores medios resultaron prácticamente iguales en todos los casos, con un p-valor asociado al contraste de Kruskal Wallis siempre superior a 0.05.

Tabla 26: Número de ovocitos totales recuperados

		Intervalo de Confianza		
Nº OVOCITOS	**Media**	**inferior**	**Superior**	**p-valor***
1º ciclo FIV	8,98	7,99	9,97	0,817
2º ciclo FIV	9,44	8,07	10,81	
3º o más ciclos FIV	8,88	7,62	10,13	

* contraste de Kruskal Wallis (p-valor Kolmogorov-Smirnov 0,014)

Tabla 27: Número de ovocitos recuperados en metafase II

		Intervalo de Confianza		
OVOCITOS METAFASE II	**Media**	**inferior**	**Superior**	**p-valor***
1º ciclo FIV	7,69	6,78	8,61	0,408
2º ciclo FIV	8,64	7,33	9,94	
3º o más ciclo FIV	7,66	6,40	8,92	

* contraste de Kruskal Wallis (p-valor Kolmogorov-Smirnov 0,023)

Tabla 28: Número de ovocitos inseminados

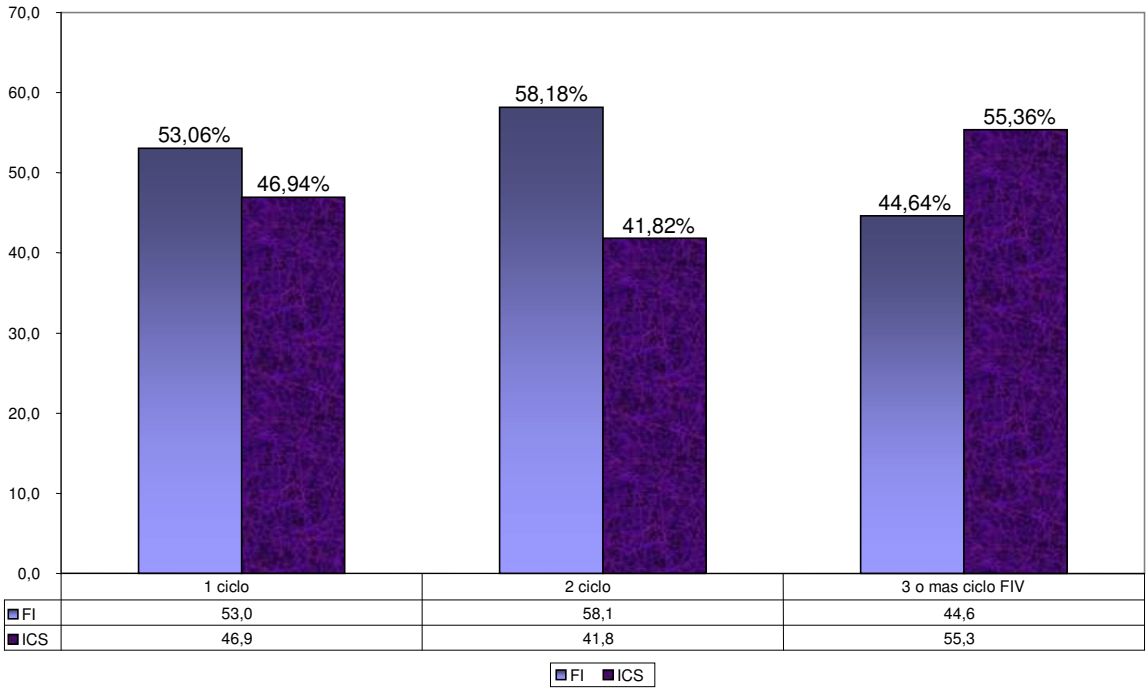
OVOCITOS INSEMINADOS	Media	Intervalo de Confianza inferior	Intervalo de Confianza Superior	p-valor*
1º ciclo FIV	8,17	7,26	9,09	0,548
2º ciclo FIV	8,75	7,48	10,02	
3º o más ciclo FIV	7,93	6,68	9,18	

* contraste de Kruskal Wallis (p-valor Kolmogorov-Smirnov 0,017)

En los tres grupos se realizaron un número similar de técnicas FIV clásica y FIV-ICSI, con un porcentaje medio aproximado en todo el grupo caso de 52,20% y 47,80% respectivamente.

En el subgrupo de 3º o más ciclos se observó un menor porcentaje de FIV clásica a favor de FIV-ICSI, si bien, esta diferencia no resultó significativa (p-valor asociado al contraste Chi-cuadrado 0.350 > 0.05) **(Figura 13)**.

Fig.13: Técnica de inseminación ovocitaria



No se registraron diferencias estadísticamente significativas en relación al número medio embriones obtenidos, p-valor de 0,973 >0.05, el cual fue superior a 6 en los tres subgrupos **(Tabla 29)**.

Tabla 29: Número medio de embriones obtenidos

Nº EMBRIONES	Media	Intervalo de Confianza		p-valor*
		inferior	Superior	
1ºciclo FIV	6,24	5,46	7,03	0,973
2º ciclo FIV	6,33	5,33	7,32	
3º o más ciclos FIV	6,50	5,34	7,66	

* contraste de Kruskal Wallis (p-valor Kolmogorov-Smirnov 0,008)

Tabla 30: Grado de embriones transferidos

GRADO	1º ciclo FIV			2º ciclo FIV			3º o más ciclo FIV		
	1º embr	2º embr	3º embr	1º embr	2º embr	3º embr	1º embr	2º embr	3º embr
no procede	0,00	8,16	96,94	0,00	5,56	96,36	0,00	5,45	87,27
A	71,43	55,10	3,06	69,09	42,59	1,82	61,82	47,27	0,00
B	19,39	22,45	0,00	25,45	37,04	1,82	29,09	32,73	1,82
C	4,08	4,08	0,00	1,82	1,85	0,00	1,82	3,64	1,82
D	0,00	4,08	0,00	0,00	3,70	0,00	1,82	3,64	5,45
Blasto	3,06	1,02	0,00	1,82	1,85	0,00	5,45	5,45	3,64
Mórula	2,04	5,10	0,00	1,82	7,41	0,00	0,00	1,82	0,00

Actualmente se aboga por transferir 1 ó, como máximo 2 embriones, con el fin de reducir la incidencia de gestación múltiple asociada a TRA sin deteriorar la tasa de éxito del tratamiento[2].

En la muestra analizada la tendencia evidente se centró en la transferencia de dos embriones, destacando un repunte estadísticamente significativo en el grupo diagnosticado de fallo de implantación, en el que la transferencia de tres embriones fue 5 veces superior al resto de grupos (p-valor asociado al contraste Chi-cuadrado de 0.028) **(Tabla 31)**.

Quedaron embriones para congelar en el 20,41% de los casos en el grupo de 1º FIV, en el 18,52% de 2º FIV y en el 16,10% de 3º o más ciclos.

Tabla 31: Número de embriones transferidos

Nº EMB TRANSF	1º ciclo FIV		2º ciclo FIV		3º o más ciclo FIV	
	frecuencia	porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	frecuencia	porcentaje
uno	8	8,16%	3	5,45%	3	5,45%
dos	87	88,78%	50	90,91%	43	78,18%
tres	3	3,06%	2	3,64%	9	16,36%

En lo referente a la tasa de éxito del ciclo en estudio, se documentó una cifra de β-HCG positiva en aproximadamente, la mitad de las pacientes del grupo de riesgo, con el mayor porcentaje de gestación centrado en los subgrupos de 1º y 2º FIV **(Tabla 32)**.

La gestación única resultó la más frecuente, seguida del embarazo gemelar. La tasa de aborto registrada fue de 7,14%, 15,45% y 14.04% respectivamente, esto es, en el grupo problema se consiguieron menor número de embarazos y el porcentaje de abortos fue superior **(Tabla 33).**

Tabla 32: Porcentaje de β-HCG positiva tras el ciclo FIV en estudio

%GESTACIÓN	1º ciclo FIV	2º ciclo FIV	3º o más ciclos FIV
NO	43,00	41,82	61,40
SÍ	55,00	58,18	38,60

Tabla 33: Tipo de gestación obtenida en el ciclo FIV a estudio

GESTACIÓN	1º ciclo FIV		2º ciclo FIV		3º o más ciclos FIV	
	frecuencia	porcentaje	frecuencia	porcentaje	frecuencia	Porcentaje
No procede	43	43,88%	23	41,82%	35	61,40%
Única	32	32,65%	19	34,55%	12	21,05%
Doble	14	14,29%	9	16,36%	2	3,51%
Triple	2	2,04%	0	0,00%	0	0,00%
Aborto 1º tr	7	7,14%	3	5,45%	8	14,04%
Ectópica	0	0,00%	1	1,82%	0	0,00%

6.2 DESCRIPCIÓN ESPECÍFICA

6.2.1 ESTUDIO DE TROMBOFILIAS CONGÉNITAS EN CASOS Y CONTROLES

Tal como se especificaba en el proyecto de la presente investigación, todas las mujeres de la muestra se sometieron, en el momento indicado, a una extracción de sangre periférica en la que se realizaron los estudios de hipercoagulabilidad y marcadores de autoinmunidad.

Considerando globalmente las trombofilias congénitas, se detectaron 36 casos de alteración analítica clasificada como trombofilia familiar de las 211 pacientes que componían el grupo de riesgo, es decir, en el 17,06% de la población FIV de la muestra frente al 15,69% en el grupo control (8 mujeres de un total de 51).

Esta diferencia no resultó estadísticamente significativa, con un p-valor asociado al contraste Chi-cuadrado de 0.814.

Repasando de forma independiente cada trastorno, se observó que:

DÉFICIT DE PROTEÍNA C Y PROTEÍNA S

Atendiendo a un rango de normalidad para niveles de proteína C entre 80-120%, resultaron 6 analíticas con niveles inferiores a la normalidad, 4 pacientes del grupo caso y 2 del control; sin que esta diferencia alcanzara la significación estadística (p-valor de 0.300) **(Tabla 34)**. Los 6 resultados se confirmaron en una segunda determinación.

Respecto al estudio de la proteína S, se registraron 7 pacientes de población FIV y 2 mujeres control con niveles de proteína por debajo del rango de normalidad (60-140%), sin que la diferencia resultara significativa (p-valor de 0.7259) **(Tabla 35)**.

Tabla 34: Déficit de proteína C en casos y controles

	proteína C baja		
	frecuencia	Porcentaje	p-valor
Grupo control	2	25,00%	0,300
Grupo caso	4	11,11%	

Tabla 35: Déficit de proteína S en casos y controles

	proteína S baja		
	frecuencia	Porcentaje	p-valor
Grupo control	2	25,00%	0,725
Grupo caso	7	19,44%	

MUTACIÓN G(20210)A DEL GEN DE LA PROTROMBINA

Todos los casos positivos para mutación del gen de la protrombina se detectaron entre las pacientes del grupo de riesgo, con 8 mujeres heterocigotas y una homocigota.

Como se puede observar en la siguiente tabla **(Tabla 36)**, con un p-valor de 0.284, la diferencia no resultó estadísticamente significativa.

Tabla 36: Portadoras de la mutación del gen de la protrombina

	Portadora heterocigótica		Portadora homocigótica		
	frecuencia	porcentaje	Frecuencia	porcentaje	p-valor
Grupo control	0	0,00%	0	0,00%	0,284
Grupo caso	8	22,22%	1	2,78%	

DÉFICIT DE ANTITROMBINA III

Como se expuso anteriormente, el déficit de antitrombina III supone uno de los trastornos de hipercoagulabilidad con mayor capacidad trombogénica.

Considerando el rango de normalidad entre el 80-120%, se documentaron 8 analíticas con niveles de proteína por debajo de la normalidad, todos ellos correspondían con pacientes del grupo de riesgo. Sin embargo, el p-valor del Test exacto de Fisher resultó mayor de 0.05, por lo que no se alcanzó la significación estadística **(Tabla 37)**.

Tabla 37: Déficit de Antitrombina III en casos y controles

	Déficit Antitrombina III		
	frecuencia	**Porcentaje**	**p-valor**
Grupo control	0	0,00%	0,273
Grupo caso	8	22,22%	

RESISTENCIA A LA PROTEÍNA C ACTIVADA

Se detectaron 7 casos (19,44%) y 2 controles (25,00%) con una resistencia a la actividad de la proteína c activada (p-valor de 0.725) **(Tabla 38)**.

En 6 de las 7 pacientes, 5 casos y 1 control, la resistencia a la proteína C activada se producía en el contexto de una positividad para el factor V Leiden, como es habitual. Todas estas mujeres resultaron portadoras heterocigotas de la mutación R506Q en el factor V (p-valor de 0.986).

No se detectó ninguna paciente portadora de un factor V Leiden sin resistencia a la proteína C activada.

Tabla 38: Resistencia a la proteína C activada en casos y controles

	Ratio proteína C bajo		
	frecuencia	Porcentaje	p-valor
Grupo control	2	25,00%	0,725
Grupo caso	7	19,44%	

MUTACIÓN C677T DE LA MTHFR

Se registraron 6 portadoras de la mutación del gen de la MTHFR en el grupo control y 23 casos entre las pacientes de la población FIV, con un p-valor no significativo (p-valor de 0.536) **(Tabla 39).**

De este amplio grupo de portadoras, se detectaron niveles elevados de homocisteína en tres pacientes, dos en grupo caso y una en el control sin que esta diferencia resultara estadísticamente significativa (p-valor 0.364).

Tabla 39: Portadoras de la mutación C677T del gen de la MTHFR

	Heterocigota		Homocigota		
	frecuencia	porcentaje	Frecuencia	porcentaje	p-valor
Grupo control	3	37,50%	3	37,50%	0,536
Grupo caso	16	44,44%	7	19,44%	

Cabe reseñar que, se identificaron 6 pacientes portadoras simultáneas de más de una alteración analítica de este tipo.

Se recogieron, una mujer FIV con déficit concomitante de proteína S y antitrombina III, una paciente con proteína S baja y ratio de proteína C activada alterado, una paciente

heterocigota para la mutación del gen de la protrombina y ratio de proteína C activada alterado, dos caso con déficit de proteína C y proteína S y una paciente portadoras de la mutación del gen de la protrombina y déficit de proteína C.

Todas estas mujeres con más de un parámetro alterado pertenecían al grupo FIV.

6.2.2 ESTUDIO TROMBOFILIAS ADQUIRIDAS EN CASOS Y CONTROLES

Se detectaron anticuerpos antifosfolípido en 24 de las 211 pacientes de la población FIV, esto es, en el 11.37 % de los casos recogidos, y 9 analíticas positivas entre las 51 pacientes del grupo control, es decir, un 17.65 %.

Las diferencias no fueron estadísticamente significativas con un p-valor asociado al contraste Chi-cuadrado de 0.226.

ANTICOAGULANTE LÚPICO

Se recogieron un total de 23 resultados positivos para AL circulante en la primera determinación sanguínea. De ellos, 17 pertenecían al grupo caso (70.83%) y 6 al grupo control (66.66 %).

Tabla 40: Resultados positivos para AL circulante (1º determinación)

	positivo débil		positivo moderado		
	frecuencia	porcentaje	Frecuencia	porcentaje	p-valor
Grupo control	4	44,44%	2	22,22%	0,713
Grupo caso	14	58,33%	3	12,50%	

No hubo ningún caso de presencia de AL positivo fuerte, todos fueron positivos débiles o moderados **(Tabla 40).** En una segunda determinación realizada a los 3-4 meses, únicamente se confirmaron 15 resultados positivos, 13 casos y 2 controles.

La diferencia en la tasa calculada en ambos grupos no fue significativa (p-valor 0.713).

ANTICUERPOS ANTICARDIOLIPINA

Se recogieron 3 analíticas con IgM-ACL positiva, todos del grupo de riesgo, y 9 con títulos indeterminados.

Igualmente, se aportaron 3 estudios con IgG-ACL positivos, 2 casos y 1 control y 7 indeterminados.

6 pacientes fueron portadoras de analítica con títulos positivos para IgM e IgG, de las cuales 5 pertenecían al grupo FIV, sin que esta diferencia fuera significativa (p-valor de 0.519)

La distribución por grupos de pacientes se muestra en las tablas inferiores, sin diferencias significativas entre ellos (p-valor de 0.274 y p-valor de 0.114 respectivamente) **(Tablas 41 y 42)**.

Tabla 41: Determinación de IgM-ACL

	IgM **indeterminado**		IgM **positivo**		
	frecuencia	**Porcentaje**	**frecuencia**	**porcentaje**	**p-valor**
Grupo control	4	44,44%	0	0,00%	0,274
Grupo caso	5	20,83%	3	12,50%	

Tabla 42: Determinación de IgG-ACL

	IgG **indeterminado**		IgG **positivo**		
	frecuencia	**Porcentaje**	**frecuencia**	**porcentaje**	**p-valor**
Grupo control	4	44,44%	1	11,11%	0,114
grupo caso	3	12,50%	2	8,33%	

ANTI-β2-GLICOPROTEÍNA

Se analizaron los resultados positivos para IgM e IgG anti-β2-glicoproteína, obteniendo los resultados que se muestran en los cuadros inferiores.

Hay que destacar que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos estudiados (p-valor de 0.805 y 0.097, respectivamente) **(Tabla 43)**.

Tabla 43: determinación de IgM e IgG anti-β2-glicoproteína

	IgM **positivo**		
	frecuencia	**porcentaje**	**p-valor**
Grupo control	1	11,11%	0,805
Grupo caso	2	8,33%	

	IgG **positivo**		
	frecuencia	**porcentaje**	**p-valor**
Grupo control	1	11,11%	0,097
Grupo caso	0	0,00%	

No se documentó ninguna paciente que asociara dos o más alteraciones analíticas propias de una trombofilia adquirida, es decir, no hubo mujeres con varios tipos de anticuerpo antifosfolípido positivo.

Sin embargo, sí se recogieron un total de 7 pacientes, 4 casos y 3 controles, portadoras de varias alteraciones simultáneas tanto en el estudio de hipercoagulabilidad familiar como adquirido **(Tabla 44)**.

Tabla 44: Siete portadoras de varias alteraciones en el estudio de trombofilias congénitas y adquiridas

	1	2	3	4	5	6	7
Proteína C	bajo	normal	bajo	normal	bajo	normal	bajo
Proteína S	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
Antitrombina III	normal	normal	normal	bajo	normal	bajo	normal
Factor VIII activado	normal	alto	normal	normal	normal	normal	normal
Protrombina	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
Ratio proteína C	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
Factor V Leiden	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
AL	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	negativa	positiva
IgM-ACL	negativa	negativa	negativa	Indeter	negativa	positivo	negativa
IgG-ACL	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
IgM-Anti-β2-GP	positivo	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
IgG-Anti-β2-GP	positivo	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa

6.2.3 MARCADORES DE AUTOINMUNIDAD EN CASOS Y CONTROLES

Como marcadores de actividad del sistema autoinmune, se consideraron las determinaciones de anticuerpos antinucleares (ANAs), anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos (ANCAs), anticuerpos antitiroideos (antitiroglobulina (ATG) y antiperoxidasa (APO) en mujeres eutiroideas, y factor reumatoide (FR).

En las siguientes tablas se recogen los datos obtenidos en las analíticas de ambos grupos de trabajo **(Tabla 45).**

En todos los parámetros se objetivó una evidente superioridad numérica en el porcentaje de positivos para presencia de autoanticuerpos en la población FIV, sin alcanzar la significación estadística en ningún caso.

Tabla 45: Marcadores de autoinmunidad en casos y controles

	ANAs positivo		
	Frecuencia	**porcentaje**	**p-valor**
Grupo control	7	13,73%	0,371
Grupo caso	20	9,48%	

	ANCAs positivo		
	Frecuencia	**porcentaje**	**p-valor**
Grupo control	0	0,00%	0,322
Grupo caso	4	1,90%	

	FR positivo		
	Frecuencia	porcentaje	p-valor
Grupo control	5	9,80%	0,356
Grupo caso	13	6,16%	

	ATG			APO			ATG+APO		
	Frecue	%	p	Frecue	%	p	Frecue	%	p
Grupo control	3	5,88%	0,532	5	9,80%	0,860	1	1,96%	0,390
Grupo caso	18	8,53%		24	11,37%		11	5,21%	

6.3 ANÁLISIS MULTIVARIANTE

6.3.1 TROMBOFILIAS COMO RASGO DE POBLACIÓN FIV

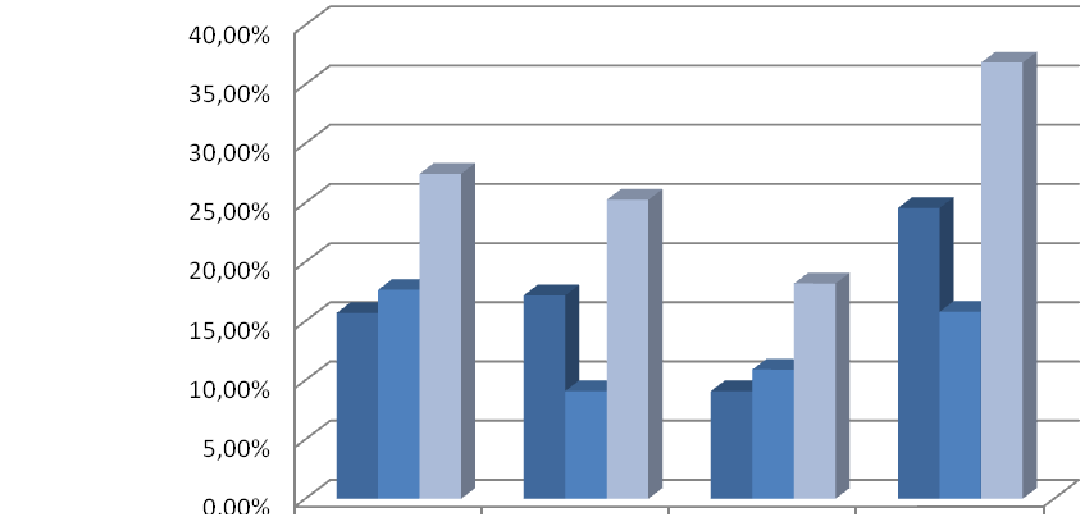
Una vez comparada la prevalencia de las distintas trombofilias en todas mujeres de la muestra, se realizó un análisis multivariante para determinar si los trastornos de hipercoagulabilidad, o alguno de ellos, era más frecuente en la población FIV que en la general; y si esta patología afectaba de manera especial al grupo problema; pudiendo establecer una posible relación de causalidad con el fallo de implantación.

Para ello, se estudiaron los dos grandes grupos de patologías, trombofilias familiares y adquiridas, en los controles y en cada una de las categorías del grupo caso, dando paso al posterior análisis de cada trastorno de forma independiente **(Figura 14)**.

Al valorar la frecuencia global con la que aparecieron alteraciones en los estudios de coagulación, se observó una evidente superioridad numérica del grupo del 3º o más ciclos FIV

con respecto a los otros grupos FIV y al grupo control, si bien, esta diferencia únicamente resultó **estadísticamente significativa (p-valor de 0.025)** al comparar el grupo de fallo de implantación con el resto de población FIV.

Fig.14: Distribución de los trastornos de hipercoagulabilidad



	controles	1 ciclo FIV	2 ciclo FIV	3 o mas ciclo FIV
trombofilias congenitas	15,69%	17,17%	9,09%	24,56%
trombofilias adquiridas	17,65%	9,09%	10,91%	15,79%
trombofilias totales	27,45%	25,25%	18,18%	36,84%

Desglosando el resultado por patologías, no se objetivaron diferencias con respecto a los trastornos adquiridos en ninguno de los grupos; sin embargo, al centrar el análisis en las trombofilias congénitas, se observó que esta patología es **significativamente más frecuente en el grupo problema que en el resto de población FIV (14.28% con p-valor de 0.042)**, y sin embargo, la diferencia entre el tercer subgrupo y el grupo control no fue significativa (p valor de 0.123).

La conclusión obtenida de este análisis es que, las pacientes diagnosticadas de un fallo de implantación padecen trastornos de hipercoagulabilidad congénita con más

frecuencia que el resto de población FIV, si bien, esta patología no es más habitual que en la población general, ni tan siquiera en el subgrupo de pacientes con fracasos repetidos de las técnicas de reproducción.

6.3.2 TROMBOFILIAS CONGÉNITAS

En la tabla referida a continuación **(Tabla 46)**, se observa la distribución de los distintos trastornos de hipercoagulabilidad familiar en la muestra estudiada, tratados de forma independiente.

Como se puede comprobar, el déficit de proteína S, la resistencia a la proteína C activada y la mutación del gen de la protrombina resultaron los trastornos más frecuentes.

Tabla 46: Trastornos de hipercoagulabilidad familiar en la muestra estudiada

TROMBOFILIAS CONGÉNITAS (n=44)	frecuencia	porcentaje
Déficit de proteína C	6	2,29%
Déficit de proteína S	9	3,43%
Déficit de ATIII	8	3,05%
Resistencia proteína C activada (RpCA)	9	3,43%
Portadoras Factor V Liden homo y heterocigoto	6	2,29%
Mutación G20210A Protrombina	9	3,43%
Mutación MTHFR+Nivel alto de homocisteína	7	2,67%

Al valorar cada trastorno de forma independiente en cada una de las categorías del estudio, se objetivaron diferencias estadísticamente significativas (p-valor de 0.044) entre las

pacientes de 3º o más ciclos FIV y el resto de la muestra en cuanto a la presencia de factor VIII elevado. Sin embargo, tal como se aclaró en apartados anteriores, esta alteración aparecía de forma aislada, por lo que, en principio, carece de impacto clínico.

Además, resultó evidente que entre las pacientes del grupo problema existía una frecuencia superior de ciertas alteraciones como el déficit de antitrombina III, mutación del gen de la protrombina y resistencia a la proteína C activada, para las cuales se encontraron diferencias estadísticamente significativas con el grupo de 2 ciclos FIV (p-valor ≤ 0.05 en los tres casos) **(Tabla 47)**.

Tabla 47: Análisis independiente de cada trastorno de hipercoagulabilidad familia

	Control (n = 51)		1ºc FIV (n = 99)		2ºc FIV (n = 55)		3 ó más FIV (n=57)		p-valor
TROBOFILIAS CONGÉNITAS	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	
Déficit de proteína C	2	3,92%	2	2,02%	1	1,82%	1	1,75%	0,857
Déficit de proteína S	2	3,92%	5	5,05%	0	0,00%	2	3,51%	0,428
Déficit ATIII	0	0,00%	5	5,05%	1	1,82%	3	5,26%	0,308
RpCA	2	3,92%	4	4,04%	1	1,82%	3	5,26%	0,816
Factor V Leiden	1	1,96%	3	3,03%	1	1,82%	2	3,51%	0,928
factor VIII activado	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	2	3,51%	0,044
Mutación gen protrombina	1	1,96%	4	4,04%	2	3,64%	5	8,77%	0,352
Mutación MTHFR+homocisteína alta	2	3,92%	2	2,02%	1	1,82%	2	3,51%	0,855

6.3.3 TROMBOFILIAS ADQUIRIDAS

En la siguiente tabla se resumen a forma de recordatorio la relación de trastornos adquiridos de la coagulación detectados en la muestra a estudio **(Tabla 48)**.

Tabla 48: Alteraciones adquiridas en los estudios de coagulación

TROMBOFILIAS ADQUIRIDAS (n=33)	frecuencia	porcentaje
IgM-Anti-β2-GP	3	1,14%
IgG-Anti-β2-GP	1	0,38%
IgM-ACL +	3	1,14%
IgM-ACL indeterminado	9	3,43%
IgG-ACL +	3	1,14%
IgG-ACL indeterminado	7	2,67%
AL	15	5,72%

Al valorar la distribución de cada alteración analítica se constató que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos; excepto, en la presencia de IgG-anti-β2-GP en el grupo control cuya positividad sí alcanza la significación con respecto al resto de grupos (p-valor de 0.040) **(Tabla 49).**

Por tanto, se concluye que, la presencia de anticuerpos antifosfolípido es más habitual entre las mujeres del grupo control, población asintomática; sin que estas diferencias sean estadísticamente significativas respecto a la población FIV ni respecto a los subgrupos que la componen.

No obstante cabe resaltar la presencia de IgG- Anti-β2-GP en las mujeres control significativa con respecto a cada subcategoría FIV, sin que esto tenga ninguna repercusión clínica.

Tabla 49: Presencia de anticuerpos antifosfolípido en la muestra

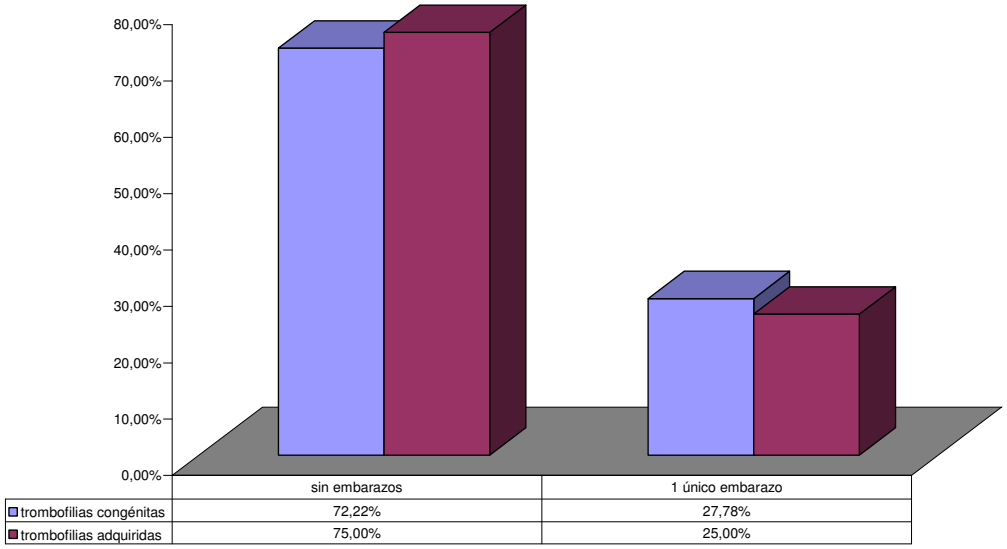
	controles (n = 51)		1 ciclo FIV (n = 99)		2 ciclo FIV (n = 55)		3 o más ciclo FIV (n=57)		
	N	%	N	%	N	%	N	%	p-valor
IgM-Anti-β2-GP	1	1,96%	0	0,00%	1	1,82%	1	1,75%	0,603
IgG- Anti-β2-GP	2	3,92%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0,040
IgM-ACL+ ó indeterminado	4	7,84%	5	5,05%	2	3,64%	1	1,75%	0,485
IgG-ACL+ ó indeterminado	5	9,80%	2	2,02%	3	5,45%	3	5,26%	0,222
AL	3	5,88%	5	5,05%	2	3,64%	5	8,77%	0,680

TASA DE EMBARAZO EN POBLACIÓN FIV PORTADORA DE TRASTORNO DE HIPERCOAGULABILIDAD:

Centrando el análisis en la tasa de embarazo de la población FIV portadora de algún trastorno de hipercoagulabilidad, se registraron 10 gestaciones tras FIV entre las 36 pacientes portadoras de una trombofilia congénita subsidiarias de TRA en la muestra y, 6 embarazos entre las 24 pacientes FIV portadoras de anticuerpos antifosfolípido.

La diferencia en el porcentaje de embarazos conseguidos mediante estas TRA en pacientes con uno u otro tipo de trombofilia no fue estadísticamente significativa (p-valor de 0.226) **(Figura 15)**.

Fig.15: Tasa de gestación entre pacientes FIV portadoras se una trombofilia



6.3.4 MARCADORES DE AUTOINMUNIDAD

En la siguiente tabla **(Tabla 50)**, se recogen los resultados positivos para marcadores de autoinmunidad y su distribución en la muestra.

Tabla 50: Distribución en la muestra de marcadores autoinmunes

MARCADORES +	frecuencia	Porcentaje
Población general	16	21,92%
1º ciclo FIV	24	32,88%
2º ciclo FIV	19	26,03%
3º o más ciclo FIV	14	19,18%

Se registraron 73 analíticas positivas para algún marcador de autoinmunidad considerado en el estudio. Tal como se observa en el gráfico **(Tabla 50)**, la mayoría, el 78,36%

(57 pacientes), pertenecían al grupo de riesgo o grupo FIV, si bien, la distribución fue homogénea en todos los grupos (p-valor de 0.477). Tampoco se detectaron diferencias significativas al comparar frecuencia en el grupo problema de 3 ó más ciclos y el resto de categorías.

Del mismo modo que se realizó un análisis detallado de cada uno de los trastornos de hipercoagulabilidad de forma independiente, se efectuó una revisión paralela de los marcadores autoinmunes **(Tabla 51)**.

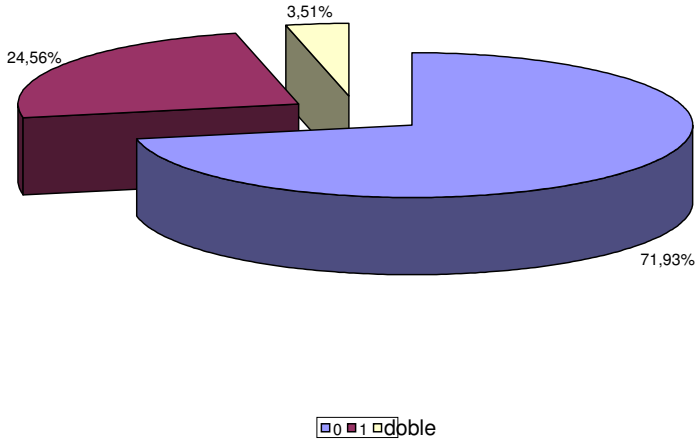
Tabla 51: Marcadores de actividad autoinmune independientes en la muestra

	Control (n = 51)		1ºc FIV (n = 99)		2ºcFIV (n = 55)		3º o más c FIV (n=57)		p-valor
MARCADOR	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	
ATG	3	5,88%	7	7,07%	4	7,24%	7	12,28%	0,597
APO	5	9,80%	9	9,09%	8	14,55%	7	12,28%	0,744
FR	5	9,80%	7	7,07%	3	5,45%	3	5,26%	0,778
ANAs	7	13,73%	9	9,09%	8	14,55%	3	5,26%	0,329
ANCAs	0	0,00%	2	2,02%	2	3,64%	0	0,00%	0,326

TASA DE EMBARAZO EN POBLACIÓN FIV PORTADORA DE MARCADOR DE ACTIVIDAD AUTOINMUNE:

Nuevamente, de forma paralela al análisis de las trombofilias, se recogieron los embarazos conseguidos tras FIV en las pacientes del grupo de riesgo con títulos positivos para algún marcador de actividad autoinmune (p valor>0.05) **(Figura 16)**.

Fig.16: Embarazos tras FIV en pacientes del grupo de riesgo portadora de marcador de actividad autoinmune



Embarazos	1º ciclo FIV		2º ciclo FIV		3º o más ciclo FIV	
	frecuencia	%	frecuencia	%	frecuencia	%
No embarazo	19	79,17%	11	57,89%	11	78,57%
Único	4	16,67%	7	36,84%	3	21,43%
Doble	1	4,17%	1	5,26%	0	0,00%

6.3.5 ANÁLISIS CONJUNTO DE TROMBOFILIAS Y AUTOANTICUERPO

Se registraron 22 mujeres con algún trastorno de hipercoagulabilidad y títulos elevados de autoanticuerpos de forma simultánea.

La mayor parte de estas pacientes, el 77,27% (n:17), pertenecían al grupo de riesgo aunque la distribución por grupos no resultó significativa (p-valor de 0.970) **(Tabla 52)**. De estas 17 pacientes, 5 (29,41%) consiguieron quedar gestantes tras el tratamiento.

Tabla 52: Pacientes con trastorno de hipercoagulabilidad + autoanticuerpos

Trombofilia + autoanticuerpo	frecuencia	%
Población general	5	29,41%
1º ciclo FIV	8	47,06%
2º ciclo FIV	4	23,53%
3º o más ciclo FIV	5	29,41%

DISCUSIÓN:

7.1 ETIOPATOGENIA DEL FALLO DE IMPLANTACIÓN

Las técnicas de reproducción asistida suponen una práctica habitual en la terapéutica de la patología reproductiva.

Según datos publicados por la ESHRE en el año 2009[78], el 0.1 - 3.9% de los nacidos vivos en Europa desde 2005 han sido concebidos mediante estos procedimientos.

Es un hecho que la reproducción en el ser humano es un proceso relativamente ineficaz. La probabilidad de concepción es del 25-30% por ciclo menstrual y tan solo el 50-60% de las fecundaciones exitosas evolucionaran por encima de la semana 20 de gestación[74].

La etapa inminentemente limitante, tanto en ciclos naturales como estimulados, es la implantación embrionaria. El fracaso en su desarrollo se estima responsable del 75% de las pérdidas gestacionales. Si bien, la precocidad de la interrupción hace que un importante número de casos no lleguen tan siquiera a documentarse por no ser clínicamente reconocidos como embarazos[79].

En la actualidad, el fallo de implantación se considera uno de los principales motivos del fracaso repetido de los tratamientos de fertilidad en mujeres jóvenes. El diagnóstico de esta patología queda definido por la ausencia de gestación tras un mínimo de tres ciclos realizados con embriones frescos o congelados y adecuada transferencia de, al menos, cuatro embriones de buena calidad en mujer menor de 40 años[30].

La controversia y el desconocimiento en torno a esta patología la convierten en un frustrante inconveniente para los profesionales de la reproducción y un estresante retraso para las parejas que lo padecen[30,31].

La trascendencia del conflicto condiciona que la mayoría de grupos dedicados a la investigación en el campo de la reproducción humana tengan abiertas líneas para contribuir al esclarecimiento de sus causas, su manejo o las posibles soluciones.

Existen factores ampliamente reconocidos como causales, favorecedores o predictores del problema implantatorio tales como la biología ovocitaria, la receptividad endometrial y el

desarrollo y calidad embrionaria. Si bien, no todos los casos de fallo de implantación pueden explicarse con estos tres argumentos por lo que resulta imprescindible dirigir esfuerzos a la búsqueda de otros condicionantes[30,79].

Al considerar este objetivo, múltiples investigadores coinciden al afirmar que varios factores, posiblemente causales, pueden pasar desapercibidos por tratarse de circunstancias preexistentes, asociadas con los hábitos y el estilo de vida y aparentemente no relacionados con la fertilidad[80].

En la revisión del tema, los equipos de Penzias AS[81], Kupka MS[82], Hajshafiha M[83] y Waylen AL[84] recopilaron evidencia a cerca del fallo de implantación y su posible relación con la obesidad y el tabaquismo, tanto activo como pasivo.

Según la OMS, el sobrepeso queda definido como un IMC (índice de masa corporal) igual o superior a 25 y la obesidad a partir de un IMC igual o superior a 30.

Hace años se conoce la relación de la **obesidad** con la esterilidad y subfertilidad femenina a consecuencia de un incremento de la patología ovulatoria, el síndrome de ovario poliquístico y la resistencia insulínica[74]. Bellver J, et al[85].concluyen que, al comparar la tasa de éxito de un ciclo de FIV en mujer obesa y no obesa, no hay diferencias en el número de ovocitos recuperados, ni en la tasa de fecundación, ni en la calidad o el número de embriones a transferir o criopreservar, ni en el día de la transferencia. Sin embargo, la tasa de implantación, la tasa de embarazo evolutivo y de recién nacido vivo es significativamente inferior en mujeres con IMC>30.

Estos resultados son respaldados por el estudio de Luke B, et al. al frente de la Society for Assisted Reproductive Technology (SART)[86], publicado en 2011, en el que ratifican una menor tasa de implantación y embarazo tras FIV en mujeres obesas, especialmente por encima de los 35 años. Añade el dato de que este efecto parece mitigarse en los ciclos con ovocitos de donante, por lo que deja entender que el IMC también condiciona la calidad ovocitaria.

Kupka MS, et al[82],este mismo año, completa el estudio afirmando que, la obesidad en el varón también reduce de forma significativa la tasa de embarazo tras FIV. El grupo de Anifandis G[87], especifica que el IMC masculino no influye rigurosamente en los parámetros seminales pero si reduce la calidad de los embriones resultantes, condicionando con ello la tasa de gestación.

En España, según los datos aportados en 2012 por el INE (Instituto Nacional de Estadística) y la SEEDO (Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad); el 17% de la población adulta tiene un IMC>30, problema que se incrementa hasta un 53,7% cuando consideramos población obesa y población con sobrepeso[88].

A pesar de no suponer un objetivo del presente estudio, la descripción epidemiológica de la muestra permite puntualizar que, la obesidad es el segundo antecedente médico más relevante después del tabaquismo activo tanto en hombres como en mujeres. El 7% de las pacientes FIV presentan un IMC≥25, porcentaje que asciende al 22% cuando analizamos esta variable de forma independiente en el grupo diagnosticado de un fallo de implantación. En el caso de los varones, el porcentaje es menor, sin embargo, los obesos registrados presentan mayor IMC.

No obstante, aunque la obesidad se considera un importante factor asociado a una menor tasa de implantación y embarazo tras FIV; en la bibliografía consultada, la obesidad no se reconoce como una causa independiente de fallo de implantación[85,86].

Del mismo modo, se puede comprobar que, el **tabaquismo** activo, considerado como un consumo superior a 5 cigarrillos/día, aparece como el antecedente médico más frecuente entre las pacientes del grupo de riesgo muestral, afectando a un 36% de las mujeres y a un 33% de los hombres FIV, sin diferencias entre los distintos subgrupos.

Este dato presenta cierta relevancia ya que, tanto en el meta-análisis realizado por Waylen AL, et al[84]. como en el estudio de Benedict MD, et al[89]. queda patente que, el tabaquismo activo y, en menor medida el pasivo, ocasionan una reducción significativa de la tasa de implantación y embarazo tras FIV, sin que los datos disponibles puedan concluir que el tabaquismo suponga una causa independiente para el fallo de implantación.

Existen múltiples revisiones en las que se valoran otros agentes causales del problema relacionados con la técnica empleada para la transferencia embrionaria, el tiempo de maduración del embrión, alteraciones en el proceso de hatching de la zona pelúcida, la anatomía uterina, la presencia de fibroadenomas, la fragmentación del DNA espermático, hipersecreción de LH, secreción inadecuada de progesterona por el cuerpo lúteo, etc. Si bien, en ninguno de ellos, se alcanza evidencia suficiente para considerarlos factores etiológicos independientes del fallo de implantación [58,81,91].

7.2 TROMBOFILIAS Y AUTOINMUNIDAD EN EL FALLO DE IMPLANTACIÓN:

Aceptando cierta inexactitud en los porcentajes, si se analizan las pérdidas embrionarias tras TRA consecutivas a una transferencia exitosa, se estima que, aproximadamente, el 30% de los embriones transferidos se pierden antes de la implantación; son las llamadas pérdidas preimplantacionales. El 30% lo hacen durante el período de implantación o inmediatamente después, pérdidas postimplantacionales ocultas o no detectables. En ambos casos la precocidad impide que conste una evidencia clínica; exceptuando las más tardías, que pudieran ser diagnosticadas por escasa elevación de la β-HCG conocidas entonces como abortos bioquímicos. Por tanto, tan solo el 10% de los abortos tras TRA son interrupciones clínicamente evidentes en distintas etapas de la gestación[92].

Desde un punto de vista teórico cabría esperar que todos estos eventos pudieran compartir etiologías similares aunque su mecanismo de acción fuera diferente en cada etapa.

Las trombofilias, tanto congénitas como adquiridas, han alcanzado una consideración relevante en el estudio de la infertilidad y el fracaso repetido de los tratamientos. En las últimas dos décadas se ha publicado multitud de información referente a los estados de hipercoagulabilidad y su relación con las grandes lacras de la reproducción humana: las pérdidas fetales de repetición, la infertilidad inexplicable y el fallo de implantación[93].

7.2.1 IMPLICACIÓN DE LAS TROMBOFILIAS EN EL FALLO DE IMPLANTACIÓN:

La implantación del embrión es una etapa mal conocida y rodeada de gran controversia, la cual es considerada como el principal factor limitante de un ciclo reproductivo tanto espontáneo como artificial[74].

Debido a las importantes implicaciones clínicas, económicas y de laboratorio, la patología implantatoria suscita especial interés entre los investigadores y clínicos. No obstante, a día de hoy, los datos disponibles son controvertidos con exposición de varias hipótesis no consensuadas, heterogeneidad de muestras, sesgos estadísticos y series poco numerosas, lo cual, sin duda, debe animar a seguir investigando.

Las trombofilias o trastornos de hipercoagulabilidad sanguínea son alteraciones con cierta prevalencia que en ocasiones, se asocian a otras enfermedades sistémicas dominantes en mujer joven lo que llevaron a plantear su relación con la patología reproductiva desde hace años[92,94].

El primer y más extenso campo de investigación respecto a las trombofilias y trastornos de fertilidad se abrió con los abortos repetidos (AR) que, por tratarse de una patología con gran impacto social es la que más bibliografía recopila.

Atendiendo a la definición clásica de aborto de repetición como la pérdida de tres o más gestaciones consecutivas o no antes de la 20 semana siendo el peso fetal igual o inferior a 500 gramos; esta patología afectaría al 1-2% de las parejas en edad fértil. La ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists) más rigurosa, considera un diagnóstico de aborto repetido cuando se registran tan solo dos o más pérdidas fetales antes de semana 20, lo cual afectaría al 5% de la población fértil[95].

Queda ampliamente demostrado que existe una clara relación de causalidad entre las pérdidas fetales repetidas y las trombofilias, especialmente con el síndrome antifosfolípido, responsable del 10-15% de los casos[92,96,97].

El mecanismo fisiopatológico más probable se centra en la formación de trombos en la microcirculación placentaria a nivel de las vellosidades terciarias, impidiendo el correcto intercambio sanguíneo maternofetal[94,98].

Esta teoría mecanicista a nivel placentario no parece justificar satisfactoriamente las pérdidas precoces por fallo de implantación ya que, la microcirculación se establece de forma más tardía, en torno a la 10º semana de gestación. A pesar de ello, no se desestima la posibilidad de que las trombofilias pudieran ser causa implicada en la patología implantacional de mujeres portadoras[94].

Se sabe que, la correcta implantación embrionaria requiere un balance adecuado entre la capacidad invasora del blastocisto y la actividad receptora del endometrio en el útero materno. Esto se ve favorecido por una perfecta interacción célula-célula y célula-matriz extracelular mediada por diversos encimas, metaloproteasas, citoquinas y factores de crecimiento, desconocidos muchos de ellos[99-101].

Biólogos, embriólogos e inmunólogos como Coulam and cols.[99,100,102], el Di Nisio M and cols.[103] y Christiansen and cols[92], pretenden explicar la implicación de las alteraciones del sistema hemostático y fibrinolítico sanguíneo en el fallo de implantación considerando que estos factores cumplen un papel fundamental como mediadores y moduladores en la fase de adhesión e invasión del trofoblasto. Es decir, al margen de su actividad hemostática, desempeñan un papel fundamental como agentes remodeladores del tejido.

En fases precoces de la implantación embrionaria resulta crucial un perfecto equilibrio entre el proceso de coagulación y anticoagulación. Esto procura una adecuada fibrinogénesis y fibrinólisis, que permite avanzar al trofoblasto durante la invasión endometrial y asentar el nicho implantatorio en el que se establecerán las relaciones embrio-maternas a través del corion.

Partiendo de este hecho, se han expuesto distintos mecanismos por lo que las trombofilias y los trastornos en la fibrinólisis pudieran estar implicados en el fallo de implantación.

La invasión del trofoblasto requiere la degradación de la matriz extracelular a través de las metaloproteasas. La expresión de estos encimas en el sitio de implantación está regulada por serín-proteasas como la plasmina. Este encima, procedente de la activación del plasminógeno de producción hepática, interviene en procesos de degradación de fibrina y lisis tisular, repermeabilización vascular y procesos inflamatorios; impresicindibles todos para la implantación del embrión. Una hipoactividad del sistema fibrinolítico a consecuencia de una alteración a nivel de alguno de sus componentes o de sus moduladores como el activador tisular del plasminógeno (t-PA), o la mas prevalente mutación, en el factor inhibidor del plasminógeno (PAI-1 4G/5G), supondría una reducción en la formación de plasmina y la consecuente limitación de la actividad invasora del trofoblasto.

Por otro lado, alteraciones en genes de factores trombofílicos como la protrombina, el factor V o la proteína C y S, implicados en la formación de la maya de fibrina estable y la vasculogénesis implantatoria, podrían acarrear una fibrinogénesis excesiva que impidiera la correcta placentación[104].

En cualquier caso, el mecanismo por el que las trombofilias condicionarían un fracaso en la implantación no estaría específicamente relacionado con la formación de trombos a nivel de las vellosidades, sino con un deterioro a nivel molecular en el proceso de invasión y adhesión embrionaria[99,100].

TROMBOFILIAS FAMILIARES Y FALLO DE IMPLANTACIÓN:

Las trombofilias congénitas como causa del fracaso implantatorio y su consecuente inclusión en el estudio de esterilidad es un tema ampliamente debatido a la par que controvertido.

La generalización en el uso de anticoncepción hormonal y la terapia hormonal sustitutiva están contribuyendo a desenmascarar más casos de hipercoagulabilidad sanguínea entre las mujeres; si bien, más de un tercio de las formas hereditarias en la población general pasan desapercibidas[105].

En la actualidad, menos del 50% llegan a diagnosticarse a consecuencia de una manifestación clínica. A esto contribuye una mejor educación y conciencia sanitaria respecto a la profilaxis preoperatoria, la movilización precoz y el estricto control de los factores de riesgo cardiovascualr. No obstante, la capacidad trombogénica del defecto se encargará de marcar la diferencia[64].

Por esta razón, un número no desdeñable de portadores asintomáticos se localizan en los estudios de familiares enfermos o en pruebas de cribaje en el contexto de un tratamiento de fertilidad ya que, la falta de consenso y guías clínicas al respecto permite una conducta muy heterogénea en la inclusión sistemática de estas analíticas en el estudio de la pareja estéril[61,63].

Según series, se estima que la incidencia de trombofilias congénitas en la población general ronda el 15-17%[60,105]. En nuestro grupo control de gestantes sin patología la prevalencia fue del 15,69%, perfectamente acorde con los datos publicados.

El estudio de los trastornos de hipercoagulabilidad familiar en la población FIV de la muestra, revela una incidencia global superior a la de la población general, con un 17,06% de los análisis positivos. No obstante, la diferencia no resulta estadísticamente significativa, de lo cual se deduce que, al menos con el tamaño muestral disponible, las mujeres con trastornos de fertilidad no presentan mayor incidencia de trombofilias congénitas que el resto.

Sin embargo, al analizar específicamente el grupo del fallo de implantación, el porcentaje asciende al 24,56%, significativamente superior al resto de población FIV, pero no significativa al compararla con la incidencia de la patología en la población general.

A pesar de que la relación causal con el fallo implantatorio no queda patente, cabe buscar la aplicación práctica al hallazgo, el cual demostraría la poca utilidad del análisis de hipercoagulabilidad sistemático en la batería de pruebas de la paciente estéril, reservando su importancia en la valoración de mujeres con fallos terapéuticos repetidos.

Azem et al[106]. hicieron una comparativa entre un grupo de gestantes sanas y otro de 45 mujeres sometidas a 4 ó más ciclos FIV con transferencia de al menos tres embriones de buena calidad; detectando una incidencia de trombofilias congénitas del 44,4% frente al 18,2%

del grupo control ($p<0.05$). Esta cifra es similar a la publicada por Bellver[97] et al. en 2008 en su estudio de trombofilias y autoinmunidad en el fallo de implantación (FI), infertilidad inexplicable y pérdidas fetales de repetición. El grupo de FI, compuesto por 26 mujeres, presentaba una prevalencia de trombofilia hereditaria del 46,2%. Qublan et al[107]. también detectan como mínimo un trastorno en el estudio de trombofilias familiares o adquiridas en el 69% de las mujeres con 3 ó más ciclos de FIV fallidos frente al 25% del grupo control.

De forma paralela, encontramos datos como los aportados por Martinelli et al[108]. que en 2003 publicó en la revista Haematologica un ensayo caso-control con 234 mujeres sometidas a FIV frente a 234 gestantes espontáneas, descartando una posible relación entre las trombofilias hereditarias y el fracaso repetidos de las TRA. Vaquero et al[d15]. con una serie de 59 pacientes con al menos dos ciclos FIV fallidos frente a 20 controles de mujeres fértiles y sanas descarta toda relación entre las dos patologías.

Recientemente se referencian varios artículos de revisión como el publicado en 2012 por Steinvil et al[110]. con series más numerosas, de 594 mujeres FIV, donde se descarta una mayor prevalencia de trombofilias congénitas en este grupo de pacientes así como su relación con una menor tasa de embarazo tras el tratamiento.

Kuperman[105] recopila estudios difundidos por revistas inglesas especializadas entre 1996 a 2010 y Di Nisio[103] en un trabajo de revisión similar, coinciden que las trombofilias congénitas no son más prevalentes entre las mujeres con fracaso repetido de las TRA y no encuentran asociación sólida con el fallo de implantación.

Ivanov et al.[28] plantean que, las trombofilias como trastorno específico, no son más frecuentes entre estas mujeres y, únicamente estarían implicadas en el fallo implantatorio como parte de una alteración mayor que afecta a varios factores remodeladores de tejido.

Sin olvidar que los estudios de trombofilias están diseñados para hacer diagnósticos en pacientes enfermos y no como prueba de cribaje, cabe considerar la posibilidad de que pruebas mejor adaptadas a este fin pudieran aportar algún dato diferente. No obstante, con los resultados y las analíticas disponibles, las trombofilias hereditarias, consideradas en global, no parecen tener una implicación definitiva en el fallo de implantación[111].

En un intento de no descartar definitivamente el peso de las trombofilias congénitas en el FI, distintos autores realizan una valoración independiente centrándose en un trastorno concreto[112]. En este aspecto, se recogen diversas conclusiones.

Grandone et al[113], Qublan et al[107] y Margalioth et al[111,] identifican el factor V Leiden (FVL) y la mutación en gen de la protrombina (G(20210)A) como posibles responsables de trastornos de fertilidad, en especial de los abortos de repetición y el fallo de implantación. Bellver et al[97], corrobora la superioridad de estas mutaciones en población FIV y, específicamente, en pacientes diagnosticados de FI; si bien, no alcanzan significación estadística por lo que proponen la necesidad de elaborar estudios con mayor casuística.

La mutación R506Q del factor V es la trombofilia congénita más prevalente en E.E.U.U, y una de las causas de enfermedad tromboembólica más frecuente en población caucásica[28,64]. Baré et al[114].describe que, las portadoras de una mutación V Leiden presentan un riesgo 1.5 superior de tener un aborto espontáneo de primer trimestre y un 2.5 mayor de tener dos o más abortos espontáneos o un fracaso de los tratamientos por fallo de implantación.

Menos cuorum encuentra Glueck et al[115]. al implicar en el trastorno implantatorio el déficit congénito de proteína S.

Opiniones contrarias son las de Martinelli et al[108], quien reconoce una mayor prevalencia, no significativa, de factor V Leiden y Mutación G(20210)A en población estéril. Si bien, no encuentra una relación consistente entere ellas y el fallo de implantación. Incluso, deja abierta la posibilidad de que las portadoras del factor V presenten mayores tasas de implantación que las no portadoras en los tratamientos de fertilidad.

Esta idea, expuesta someramente por Martinelli[108], es considerada por Göpel y Juul en la revista Lancet (2001 y 2002 respectivamente)[116,117] quienes afirman que las portadoras de un factor V Leiden presentan un 90% de transferencias embrionarias con evolución exitosa frente al 45% en las no portadoras.

El grupo de Coulam[100,104] de la Clínica Mayo (Rochester, MN, EEUU), en varias de sus publicaciones, intenta esclarecer las razones de esta presunta paradoja. La explicación se basa

en la implicación del sistema de coagulación y fibrinólisis en la remodelación tisular durante la fase de implantación.

Las portadoras de la mutación en el factor V producen menor cantidad de trombina y con ello menor paso de fibrinógeno a fibrina. Si, como se expuso anteriormente, la hipofibrinolisis es un importante factor limitante para la correcta invasión endometrial del trofoblasto y vasculogénesis en el lecho implantatorio, cabría esperar que un incremento en la destrucción de redes de fibrina o una menor producción de las mismas favoreciera la implantación embrionaria [28,104]. Esta teoría justificaría de forma consistente el hecho de que la mutación heterocigota del factor V sea tan frecuente entre las mujeres[100,118,119].

Acorde con la bibliografía, las trombofilias familiares mas prevalentes en la muestra del presente estudio fueron el déficit congénito de proteína S, la mutación del gen de la protrombina y una resistencia a la proteína C activada secundaria siempre, a la presencia del factor V Leiden.

La prevalencia de todas ellas fue superior entre la población FIV que en población general, con 5 portadoras del FVL en el grupo caso frente a una sola entre las gestantes sanas y un 22% de mutaciones G(20210)A en el gen de la protrombina, todas entre población FIV. No obstante, no se alcanzó la significación estadística en ningún caso.

Coincidiendo con las observaciones de Coulam, todos estos trastornos resultaron más evidentes al considerar de forma independiente el subgrupo de mujeres diagnosticadas de un fallo de implantación. La diferencia en relación al resto de pacientes FIV y especialmente, con respecto a la población general llega a resultar llamativa, fundamentalmente en la prevalencia de la mutación G(20210)A; sin embargo, no se alcanza un resultado estadísticamente relevante para ninguna de las tres alteraciones (p-valor > 0.05).

Como se refiere anteriormente, el déficit de Factor VIII activado sí resulta más evidente entre las mujeres del grupo problema (p=0,04), no obstante, este dato de forma aislada carece de significación clínica.

TROMBOFILIAS ADQUIRIDAS Y FALLO DE IMPLANTACIÓN:

Como se refiere anteriormente, las trombofilias adquiridas, y en concreto el SAF, han sido objeto de estudio en el contexto de la infertilidad desde los inicios de esta disciplina.

Branch et al.[120], fueron los primeros en comprobar los efectos de los anticuerpos antifosfolípido sobre la fertilidad en modelos animales; induciendo la muerte fetal en ratones embarazados mediante la instilación del suero de cinco pacientes con elevados títulos de autoanticuerpos antifosfolípido.

A partir de entonces, la relación entre las trombofilias adquiridas y los abortos superiores a semana 10, tienen más seguidores que detractores[120,121].

A la vista de estas conclusiones sobre los abortos tardíos, Sthoeger et al[122] se centraron en la repercusión de los antifosfolípidos en el desarrollo embrionario precoz.

Inmunizaron con ACL un grupo de ratones previamente a la gestación, confirmando un deterioro en el proceso de invasión del trofoblasto, capaz de comprometer la implantación del embrión.

Estos hallazgos fueron posteriormente corroborados por Kaider y Coulam[123] en modelos in vitro.

En estas publicaciones se concluye que la presencia de ciertos títulos de anticuerpos antifosfolípidos parece ir paralela a una reducción de la proliferación, invasión y sincitialización del trofoblasto así como a una disminución en la producción de β-HCG[124]. Sin embargo, en múltiples estudios se ha demostrado que el 5-16% de mujeres sanas son positivas para, al menos, una isoforma de anticuerpo antifosfolípido sin que esto repercuta negativamente en su fertilidad o en la evolución de sus gestaciones.

En la muestra del estudio no existen diferencias significativas entre las analíticas de la población FIV y general respecto a la evaluación de trombofilias adquiridas. Acorde con las cifras publicadas, el 11.37% de los casos fueron seropositivas, sin registrar ninguna paciente

con más de una isoforma de autoanticuerpo. El porcentaje de portadoras entre los controles fue del 17.65%, ligeramente superior a lo establecido en la literatura.

El hecho de la seropositividad asintomática genera un gran debate en dos aspectos fundamentales. En primer lugar, se desconoce cuál es el punto de corte exacto a partir del cual se puedan considerar títulos patológicos. Y, por otro lado, resulta controvertido si la presencia de estas moléculas en sangre periférica son meros marcadores de infertilidad o verdaderos agentes causales[125,126].

De cualquier forma, los mecanismos etiopatogénicos que pudieran relacionar trombofilias adquiridas y fallo de implantación se desconocen por el momento.

Existen múltiples detractores de esta hipótesis, como Qublan[107], Steinvil[110], quienes rechazan cualquier tipo de conexión entre los antifosfolípidos y el fallo de implantación, los cuales desestiman la necesidad de pruebas complementarias orientadas a su despistaje.

En la muestra del presente estudio se pone de manifiesto la escasa repercusión que tendría el incluir la determinación sistemática de antifosfolípidos en mujer FIV asintomática, ya que no aporta información beneficiosa para mejorar el resultado del tratamiento. En esta tesis se registró una superioridad numérica de portadoras de anticuerpos antifosfolípidos en el grupo control, sin diferencias significativas respecto al grupo caso, ni tan siquiera respecto a la subcategoría de tres ó más ciclos fallidos.

El grupo del St Mary´s Hospital de Londres rechaza por completo la implicación de los anticuerpos antifosfolípido en el fallo de implantación reiterando la ineficacia de su determinación sistemática en las pacientes sometidas a FIV-TE. Efectivamente, publican mayor porcentaje de mujeres seropositivas entre la población con problemas reproductivos, aludiendo que forma parte de un síndrome autoinmune generalizado implicado, de forma indeterminada, en la infertilidad[127].

Egbase PE[128] y su grupo, defienden una postura más conservadora. Reconocen que el porcentaje de estudios seropositivos para anticuerpos antifosfolípidos es superior entre las mujeres subsidiarias de una FIV-TE con respecto a la población general no gestante. Sin

embargo, esta diferencia no alcanza la relevancia suficiente para ser incluida de forma sistemática en los estudios de fertilidad, excepto en los casos con dos pérdidas fetales consecutivas o tres o más fracasos del tratamiento sin motivo aparente.

Los defensores de un posible vínculo de estas moléculas con el FI, orientan el mecanismo hacia una incorrecta decidualización del endometrio que alteraría el adecuado desarrollo del lecho implantatorio y, especialmente, a un ataque directo sobre la membrana de las células del trofoblasto que repercutiría negativamente en su capacidad replicativa e invasora[122-124].

Respecto al cofactor β2-glicoproteína-I, existe consenso respecto a su poca utilidad en pacientes seronegativas para AL y ACL[129,130]. En la muestra del estudio se detectaron más analíticas positivas para IgG- anti-β2-GPI entre la población sana, sin repercusión clínica aparente.

Como explica Gleicher et al[131] en su artículo de opinión `Wars of the Roses´, lo más prudente sería mantener una opinión escéptica pendiente de nuevos estudios. Probablemente, los anticuerpos antifosfolípidos no supongan un agente causal independiente. Si bien, no se pueden obviar los resultados obtenidos por influyentes laboratorios que reconocen mayor prevalencia de autoanticuerpos en sangre periférica de pacientes con problemas de fertilidad, especialmente, en aquellas con fracaso repetido en los tratamientos.

La interpretación más plausible parece considerar un efecto deletéreo del mecanismo reproductivo secundario a una activación general del sistema inmune de estas pacientes.

7.2.2 IMPLICACIÓN DE LOS TRASTORNOS AUTOINMUNES EN EL FALLO DE IMPLANTACIÓN:

La evidencia disponible demuestra que los tratamientos de fertilidad y el propio embarazo alteran la expresión de las enfermedades autoinmunes y que a su vez, esta

patología deteriora la fertilidad del individuo que las padece, hombre o mujer, e influyen negativamente en los resultados de las técnicas de reproducción asistida [132-134].

En la búsqueda de factores que pudieran influir en el fracaso implantacional, numerosos autores aluden a una respuesta sistémica inespecífica negativa o de rechazo reflejada por un ascenso de los marcadores de actividad autoinmune y un incremento en los títulos de autoanticuerpos[135].

La mayoría de trabajos que tratan el tema incluyen los antifosfolípidos en la batería de autoinmunidad, lo cual dificulta el análisis independiente de esta hipótesis.

Se plantean distintos mecanismos por los que una enfermedad autoinmune podría estar relacionada con la infertilidad y, en casos, con el fallo de implantación.

En primer lugar, una lesión gonado-específica mediada por anticuerpos frente a antígenos ováricos, concretamente frente a la subunidad β-FSH[136] o anticuerpos antiesperma[134], detectados en sangre periférica del varón, en el propio líquido seminal o en las mucosas de la mujer.

Un segundo mecanismo de daño frente a órgano diana del aparato reproductor mediado por acción directa de autoanticuerpos o por vasculitis local o sistémica; y en tercer lugar, un deterioro en la función reproductiva por reacción sistémica en el contexto de un síndrome autoinmune como el lupus eritematoso, la artritis reumatoide o el propio síndrome antifosfolípido[136].

En la muestra del presente estudio, como marcadores básicos de autoinmunidad, se analizaron los ANAs, ANCAs, factor reumatoide (FR) y anticuerpos antitiroideos previa ratificación de normofunción glandular (antitiroglobulina (ATG) y antiperoxidasa (APO)).

Se detectó una evidente superioridad numérica en la positividad de todos los autoanticuerpos en las mujeres del grupo FIV-TE respecto a la población general, sin alcanzar en ningún caso la significación estadística. La diferencia tampoco resultó significativa al analizar de forma independiente el grupo diagnosticado de fallo de implantación, comprobando

una distribución muy parecida de autoanticuerpos circulantes entre las pacientes de las tres subcategorías del grupo caso.

Hay opiniones, como la defendida por el equipo del Dr.Christiansen[92], que reconocen una mayor prevalencia de autoanticuerpos en sangre periférica de mujeres con problemas de fertilidad e incluso apuntan un incremento de los mismos, especialmente de los ANAs, tras un ciclo de FIV-ICSI. Sin embargo, no parece tener un impacto negativo en el resultado del tratamiento por lo que consideran innecesario cualquier fármaco concomitante tipo corticoterapia, AAS o heparina[137].

Hace tiempo que se conoce la relación entre la disfunción tiroidea y los abortos repetidos, la menor tasa de éxito en las TRA, el incremento en las complicaciones durante la gestación y los peores resultados obstétricos[138,139].

En un intento de ahondar en este aspecto, en los últimos años, se plantea cierta relación entre la esterilidad de origen desconocido, el fracaso de los ciclos de reproducción y las pérdidas fetales de repetición en mujeres eutiroideas que, sin embargo, tienen anticuerpos antitiroideos positivos en sangre periférica[138,139].

En la muestra aquí referida se determinaron específicamente los anticuerpos antiperoxidasa (APO) y antitiroglobulina (ATG) en población FIV y población sana con función tiroidea mantenida. No se observaron diferencias entre ambos grupos ni tampoco en el análisis independiente de las muestras recogidas entre las mujeres diagnosticadas de un fallo de implantación.

Sin embargo, publicaciones dirigidas por Bussen et al[140], Poppe et al[141] o Bellver et al[85], revelan una mayor prevalencia de anticuerpos antitiroideos (APO y ATG) entre las mujeres con trastornos de fertilidad o bajo tratamiento de reproducción asistida a pesar de tener niveles de TSH y T4 libres en límites normales.

Todos ellos consideran un posible efecto deletéreo de carácter inmune que afectaría la función e incluso la estructura endometrial impidiendo el desarrollo embrionario[111].

Poppe et al[139,141] y Negro et al[142], coinciden en considerar que, detrás de esta aparente rebelión inmunitaria subyace una verdadera patología tiroidea enmascarada responsable de una disfunción gonadal y un deterioro hormonal poco favorecedor para la consecución de un embarazo normal, tal como se sabe desde hace tiempo.

Aunque el fallo de implantación no ha encontrado, por el momento, respuestas fehacientes en los trastornos autoinmunes; el futuro inmediato va dirigido a esclarecer alteraciones genéticas, quizás expresados en el HLA de la pareja[34], o disfunciones inmunitarias específicas, inespecíficas, locales o sistémicas, responsables de un microambiente inadecuado que impide o dificulta la implantación del embrión.

Actuales y futuras líneas de investigación parecen buscar el origen del fallo de implantación en defectos inmunológicos con repercusión local a nivel del endometrio como estructura base, del microambiente en la ventana implantatoria, a nivel sistémico o a nivel genómico.

En cualquier caso, es necesario continuar investigando para obtener respuestas que permitan adoptar conductas y terapéuticas consensuadas basadas en datos contrastados y no sólo en la experiencia o la costumbre.

CONCLUSIONES

1. El fallo de implantación, definido como la ausencia de gestación tras un mínimo de tres ciclos realizados con embriones frescos o congelados y adecuada transferencia de, al menos, cuatro embriones de buena calidad en mujer menor de 40 años, se considera uno de los principales motivos del fracaso repetido de los tratamientos de fertilidad en pacientes jóvenes.

2. La prevalencia de **trombofilias congénitas** en el grupo diagnosticado de fallo de implantación es significativamente superior a la detectada en el resto de población estéril (p-valor 0.042) y sin embargo, no alcanza la significación estadística al compararla con la población general (p-valor 0.123), hecho probablemente relacionado con el tamaño muestral.

3. Las trombofilias familiares mas prevalentes son el déficit de proteína S, la mutación del gen de la protrombina y la resistencia a la proteína C activada secundaria, siempre, a la presencia del factor V Leiden. Todos ellos aparecen más evidentes al considerar independientemente el grupo con fallo de implantación sin alcanzar un resultado estadísticamente relevante para ninguna de las tres alteraciones (p-valor > 0.05).

4. Las **trombofilias adquiridas**, analizadas en global o por trastornos aislados, no resultan más prevalentes en la población estéril respecto a la general. Esta diferencia no alcanza la significación estadística tan siquiera al contemplar de forma independiente las pacientes con fracaso repetido del tratamiento por implantación fallida (p-valor >0.05).

5. Se observa una evidente superioridad numérica en la positividad de todos los **marcadores inespecíficos de actividad autoinmune e**n las mujeres del grupo FIV-TE respecto a la población general, sin alcanzar en ningún caso la significación estadística (p-valor 0.477). La distribución de autoanticuerpos circulantes resulta muy parecida entre las pacientes de

las tres subcategorías del grupo caso, sin marcar diferencia con el grupo problema diagnosticado de un fallo de implantación.

6. Del presente estudio se concluye la ineficacia de realizar de forma sistemática los estudios de trombofilia y marcadores autoinmunes en el estudio de pareja estéril asintomática. Únicamente se podría contemplar una determinación de trombofilias congénitas y anticuerpos antifosfolípidos en mujeres seleccionadas con fracaso de los tratamientos de reproducción en tres o más ocasiones sin causa aparente.

7. Es necesario continuar investigando para obtener respuestas que permitan adoptar conductas y terapéuticas consensuadas basadas en datos contrastados y no sólo en la experiencia o la costumbre.

BIBLIOGRAFÍA

1. Troude P, Bailly E, Guibert J, Bouver J, et al. Methodology and epidemiology:O6-5.6 Spontaneous live birth after in vitro fertilization treatment: frequency and associated factors. J Epidemiol Community Health 2011;65:Suppl 1.

2. Agramunt S, Checa MA, Carreras R. Eficacia de los tratamientos reproductivos. En: Matorras R, editor. "La infertilidad en España: situación actual y perspectivas". Libro blanco sociosanitario. Ed. Imago Concept & Image Development. Madrid, 2011. pp.123-134.

3. Viswanathan K, Hansen P, Rahman MH, Steinhardt L, et al. Can community health workers increase coverage of reproductive health services?. J Epidemiol Community Health 2012;66:10 894-900 Published Online.

4. Kazlauskas S, Coroleu B, Bajo JM. Esterilidad. Definiciones, epidemiología y etiología. En: Bajo Arenas JM, Coroleu Lletget, editores. Fundamentos de reproducción. Madrid 2009. S.E.G.O. pp.41-47.

5. Información estadística: Demografía y población. Instituto Nacional de Estadística. www.ins.es

6. Giannakouris K. Statistics in focus. Population and social conditions. Regionalpopulationprojections EUROPOP2008.epp.eurostat.ec.europa.eu/cache/ITY-_OFFPUB /KSSF-08-072/EN/K.

7. López V. Fertilidad en España. Análisis de la evolución de los indicadores recogidos en España. En: Matorras R, editor. "La infertilidad en España: situación actual y perspectivas". Libro blanco sociosanitario. Ed. Imago Concept & Image Development. Madrid, 2011. pp.53-69.

8. Matorras R, Crisol L, Ferrando L. Epidemiología de la esterilidad. En: J.Remohí, editor. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Editorial médica Panamericana. Madrid, 4ªedición, 2012. Cp1.pp.5-12.

9. Hendershot GE, Pratt WF. Infertility and age: An unresolved issue. *Fam Plan Perspect* 1982;14(5):287-289.

10. McLaren JF. Infertility evaluation. Obstet Gynecol Clin North Am 2012;39(4):453-463.

11. Ballesteros A, Izquierdo A, Casas AB, Castillón G. Estudio de la pareja estéril. En: J.Remohí, editor. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Editorial médica Panamericana. Madrid, 4ªedición, 2012. Cp3.pp.25-38.

12. Badajoz V, Delgado JA, Bajo JM. Factor masculino. Estudio del varón estéril. En: Bajo Arenas JM, Coroleu Lletget, editores. Fundamentos de reproducción. Madrid. S.E.G.O. pp.57-66.

13. Murray KS, James A, McGeady JB, Reed ML, et al. The effect of the New 2010 World Health Organization Criteria for semen analyses on male infertility. Fertil Steril 2012;98(6):1428-1431.

14. Cooper TG, Noonan E, Von Eckardestein S, Auger J, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update 2010;16(3):231-245.

15. Vieira M. New World Health Organization reference values for semen analysis: where do we stand?. Einstein 2013;11(2):263-264.

16. Niederberger C. The effect of the New 2010 World Health Organization Criteria for semen analyses on male infertility. J Urol 2013;190(2):648.

17. Pinbourg A, et al. Prospective longitudinal cohort study on cumulative 5-year delivery and adoption rates among 1338 couples initiating infertility treatment. Hum Reprod 1990:24(4):991-999.

18. Boivin J. International estimates of infertility prevalence and treatment seeking: potencial need and demand for infertility medical care. Hum Reprod 2007;22(6):1506-1512.

19. Karlström PO, Bergh C. Reducing the number of embryos transferred in Sweden-impact on delivery and multiple birth rates. Hum Reprod 2007;22(8):2202-2207.

20. Romany L, Garrido N, Meseguer M. Técnicas en reproducción asistida. En: J.Remohí, editor. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Editorial médica Panamericana. Madrid, 4ªedición, 2012. Cp38.pp.429-438.

21. Caballero P, Ardoy M, Bruna I, Gómez JL, et al. Recomendaciones sobre IAC. En: Matorras R, Hernández J, editores. Estudio y tratamiento de la pareja estéril: recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), 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.pp.135-146.

22. Marina S, Ballesteros A, Brassesco M, Parés P, et al. Recomendaciones sobre IAD. En: Matorras R, Hernández J, editores. Estudio y tratamiento de la pareja estéril: recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), 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. Pp.149-165.

23. Monzo A, Domingo J, Sánchez I, Crespo J, et al. Indicaciones de la FIV-ICSI. En: Matorras R, Hernández J, editores. Estudio y tratamiento de la pareja estéril: recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), 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.pp.169-179.

24. Remohí J, Nadal J, Domingo FJ, Mendoza R, et al. Recomendaciones sobre donación de ovocitos. En: Matorras R, Hernández J, editores. Estudio y tratamiento de la pareja estéril: recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), 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.pp.349-367.

25. Humm KC, Sakkas D. Role of increased male age in IVF and egg donation: is sperm DNA fragmentation responsible?. Fertil Steril 2013;99(1):30-36.

26. Hernández ER, Nieto M, Gómez-Palomares JL. Fecundación e implantación embrionaria. En: Bajo Arenas JM, Coroleu Lletget, editores. Fundamentos de reproducción. Madrid. S.E.G.O. pp.36-40.

27. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of pregnancy. N Eng J Med 2001;345(19):1400-1408.

28. Ivanov P, Tsvyatkovska T, Konova E, Komsa-Penkova R. Inherited thrombophilia and IVF failure: the impact of coagulation disorders on implantation process. Am J Reprod Immunol 2012;68(3):189-198.

29. Grossmann M, Pons MC. El laboratorio en las técnicas de reproducción. En: Bajo Arenas JM, Coroleu Lletget, editores. Fundamentos de reproducción. Madrid 2009. S.E.G.O. pp.244-251.

30. Coughlan C, Ledger W, Wang Q, Liu F. Recurrent implantation failure: definition and management. Reprod Biomed Online 2014;28(1):14-38.

31. Fernández-Sánchez M, Salazar AI. Fallo de implantación. En: J.Remohí, editor. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Editorial médica Panamericana. Madrid, 4ªedición, 2012. Cp25.pp.273-280.

32. ASEBIR. Recomendaciones sobre recursos humanos y físicos para el laboratorio de Reproducción Humana asistida. RECCO, Madrid.2006. ISSN: 1134-4424.

33. Alejos O, Espinos JJ. Endocrinopatías con repercusión en la patología reproductiva de la mujer. En: Bajo Arenas JM, editor. Fundamentos de ginecología. Madrid 2009. S.E.G.O. pp.81-99.

34. Simon A, Laufer N. Repeated implantation failure: clinical approach. Fertil Steril 2012;97(5):1039-1043.

35. Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, et al. Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. Hum Reprod 1995;10(9):2427-2431.

36. JOINT SOGC-CFAS (Joint Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada-Canadian Fertility and Andrology Society Clinical Practice Guideliness Committee). Elective single embryo transfer following in vitro fertilization. J Obstet Gynaecol Can 2010;32(4):363-377.

37. Alikani M, Calderón G, Tomkin G, et al. Cleavage anomalies in early embryos and survival after prolonged culture. Hum Reprod 2000;15:2634-2643.

38. Ziebe S, Petresen K, Lindenberg S, Andersen AG, et al. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. Hum Reprod 1997;12:1545-1549.

39. De Placido G, Wilding M, Strina I, Alviggi E, et al. High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate. Hum Reprod 2002;17(9):2402-2409.

40. Bos-Mikich A, Mattos AL, Ferrari AN. Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. Hum Reprod 2001;16(12):2658-2661.

41. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. Hum Reprod Update 2003;9:251-62.

42. Vidal F, Arán B, Fernández E, Giménez C, et al. Recomendaciones sobre diagnóstico genético preimplantacional. En: Matorras R, Hernández J, editores. Estudio y tratamiento de la pareja estéril: recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), 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.pp.331-346.

43. Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Use of preimplantation genetic diagnosis for serious adult onset conditions: a committee opinion. Fertile Steril 2013;100(1):54-57.

44. Vidal F, Jiménez C, Rubio C et al. FISH preimplantacion diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage. J Assist Reprod Genet 1998;5(15):310-313.

45. Rubio C, Martín JL, Rodrigo L, Cervero A, et al. Diagnóstico genético preimplantacional. En: J.Remohí, editor. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Editorial médica Panamericana. Madrid, 4ªedición, 2012. Cp33.pp.373-386.

46. Ferraretti AP, Goossens V, Kupka M, Bhattacharya S, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2009: results generated from European registers by ESHRE (The European Society of human Reproduction and Embryology. Hum Reprod 2013;Jul9.

47. Laufer N, Simon A. Recurrent implantation failure: current update and clinical approach to an ongoing challenge. Fertil Steril 2012;97(5):1019-1020. Winger EE, Reed JL, Ashoush S, El-Toukhy T, et al. Elevated preconception CD56+ 16+ and/or Th1:Th2 levels predict benefit from IVIG therapy in subfertile women undergoing IVF. Am J Reprod Immunol 2011;66(5):394-403.

48. 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):561-571.

49. Clark DA. Aspirin and heparin to improve live birth rate in IVF for unexplained implantation failure?. Reprod Biomed Online 2013;26(6):538-541.

50. Ruiz Alonso M, Blesa D, Díaz Gieno P, Gómez E. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. Fertil steril 2013;100(3):818-824.

51. Coroleu B, Calderón G, Fabregas F, López M, et al. Fracaso de implantación. En: Matorras R, Hernández J, editores. Estudio y tratamiento de la pareja estéril: recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), 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.pp 377-381.

52. Brinsden MK, Alam V, de Moustier B, Engrand P. Recombinant human leukemia inhibitory factor does not improve implantation and pregnancy outcomes after assisted reproductive techniques in women with recurrent unexplained implantation failure. Fertil Steril 2009;91(4suppl):1445-1447.

53. Gleicher N, Vidali A, Barad DH. Successful treatment of unresponsive thin endometrium. Fertil Steril 2011;95(2123):e13-17.

54. Heilmann L, Schorsch M, Hahn T. CD3-CD56+CD16+ Natural Killer cells and improvement of pregnancy outcome in IVF/ICSI failure after additional IVIG-treatment. Am J Reprod Immunol 2010;63(3):263-265.

55. Sak ME, Gul T, Evsen MS, Soydinc HE, et al. Fibroblast growth factor-1 expression in the endometrium of patients with repeated implantation failure after in vitro fertilization. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2013;17(3):398-402.

56. Narvekar SA, Gupta N, Shetty N, Kottur A. Does local endometrial injury in the non transfer cycle improve the IVF-ET outcome in the subsequent cycle in patients with previous unsuccessful IVF?. A randomized controlled pilot study. J Hum Reprod Sci 2010;3(1):15-19.

57. Kwak-Kim J, Han AR, Gilman-Sachs A, Fishel S. Current trends of reproductive immunology practices in in-vitro fertilization (IVF)-a first world survey using IVF-Worldwide.com. Am J Reprod Immunol 2013;69(1):12-20.

58. Shufaro Y, Schenker JG. Implantation failure: etiology, diagnosis and treatment. Int J Infertil Fetal Med 2011;2:1-7.

59. Llamas P, Martínez O. Fertilización in vitro. En: Fontcuberta J, coordinador. Trombosis en la mujer. Aspectos prácticos. Ed. Grupo Acción Médica S.A. © LEO 2012. Madrid. pp.143-159.

60. Subirá M, Fontcuberta J. Cuestiones generales y diagnóstico. En: Fontcuberta J, coordinador. Trombosis en la mujer. Aspectos prácticos. Ed. Grupo Acción Médica S.A. © LEO 2012. Madrid. pp. 2-29.

61. Nelson SM. Prophylaxis of VTE in women during reproduced techniques. Thromb Res 2009;123(suppl 3):S8-S15.

62. Stern C, Chamley L, Norris H, Hale L, et al. 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.

63. Martínez F. Factores de riesgo adquiridos y congénitos del tromboembolismo venoso. En: Rocha E, Martínez F, Monreal M, editores. Manejo práctico y pautas de actuación en la enfermedad tromboembólica venosa. Ed. Grupo Acción Médica S.A. © LEO 2004. Madrid. pp. 2-24.

64. Ruiz-Giménez N, Suárez C. Profilaxis del tromboembolismo venoso en pacientes no quirúrgicos. En: Rocha E, Martínez F, Monreal M, editores. Manejo práctico y pautas de actuación en la enfermedad tromboembólica venosa. Ed. Grupo Acción Médica S.A. © LEO 2004. Madrid. pp.99-122.

65. Rudick B, Su HI, Sammel MD, Kovalevsky G, et al. Is factor V Leiden mutation a cause of in vitro fertilization failure?. Feril Steril 2009;92(4):1256-1259.

66. Dawood F, Mountford R, Farquharson R, Quenby S. Genetic polymorphisms on the factor V gene in women with recurrent miscarriage and acquired APCR. Hum Reprod 2007;9(22):2546-2553.

67. Marci R, Lisi F, Soave I, Lo Monte G, et al. Impact of C677T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase on IVF outcomes: is screening necessary for all infertile women?. Genet Test Mol Biomarkers 2012;16(9):1011-1014.

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

69. Información estadística de Aragón: Áreas sanitarias. Gobierno de Aragón. www.aragon.es.

70. Neyro JL, Calaf J, Matorras R, Parrilla JJ, et al. Grupo de endometriosis; documento de consenso de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. Meditex. Madrid 1996;65-113.

71. 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):124-140.

72. Awwad J, Farra C, Hannoun A, Abou-Abdallah M. Idiopathic premature ovarian failure: what is the most suitable ovarian stimulation protocol? Clin exp Obstet Gynecol2013;40(3):327-330.

73. Weissman A, Ravhon A, Steinfeld Z, Nahum H. Controlled ovarian stimulation using a long gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol: a proof of concept and feasibility study. Gynecol Obstet Invest 2013;76(2):113-118.

74. Messerlian C, Maclagan L, Basso O. Infertility and the risk of adverse pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod 2013:28(1):125-137.

75. Milton JS, Toscos JO. Estadística para biología y ciencias de la salud. Editorial Mc Graw-Hill / Interamericana de España S.A. Madrid, 4ªedición, 2007.

76. Doménech JM. Fundamentos de diseño y estadística. Unidad didáctica 15: Síntesis del curso. Barcelona: Signo; 2003.

77. Peña D. Análisis multivariante de datos. Editorial Mc Graw-Hill / Interamericana de España S.L. Madrid, 2ªedición, 2002.

78. Nyboe Andersen A, Goossens V, Bhattacharya S, et al. Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE. The European IVF Monitoring Programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Hum Reprod 2009;24(6):1267-1287.

79. Das M, Holzer HE. Recurrent implantation failure: gamete and embryo factors. Fertil Steril 2012;97(5):1021-1027.

80. Melford SE, Taylor AH, Konje JC. Of mice and (wo)men: factors influencing successful implantation including endocannabinoids. Hum Reprod Update 2013;dec4.

81. Penzias AS. Recurrent IVF failure: other factors. Fertil Steril 2012;97(5):1033-1038.

82. Kupka MS, Gnoth C, Buehler K, Dahncke W, et al. Impact of female and male obesity on IVF/ICSI: results of 700,000 ART cycles in Germany. Gynecol Endocrinol 2011;27(3):144-149.

83. Hajshafiha M, Ghareaghaji R, Salemi S, Sadegh-Asadi N, et al. Association of body mass index with some fertility markers among male partners of infertile couples. Int J Gen Med 2013;7(6):447-451.

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

85. Bellver J, Ayllon Y, Ferrando M, Melo M, et al. Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality. Fertil Steril 2010;93(2):447-454.

86. Luke B, Brown MB, Stern JE, Missmer SA, et al (SART Writing Group). Female obesity adversely affects assisted reproductive technology (ART) pregnancy and live birth rates. Hum Reprod 2011;26(1):245-252.

87. Anifandis G, Dafopoulos K, Messini CI, Polyzos N, et al. The BMI of men and not sperm parameters impact on embryo quality and the IVF outcome? Andrology 2013;1(1):85-89.

88. Información estadística: Datos sobre obesidad y sobrepeso en la población española 2012. SEEDO (Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad). Instituto Nacional de Estadística. www.ins.es

89. Benedict MD, Missmer SA, Vahratian A, Berry KF, et al. Secondhand tobacco smoke exposure is associated with increased risk of failed implantation and reduced IVF success. Hum Reprod 2011;26(9):2525-2531.

90. Simon A, Laufer N. Assessment and treatment of repeated implantation failure (RIF). J Assist Reprod Genet 2012;29(11):1227-1239.

91. Revel A. Defective endometrial receptivity. Fertil Steril 2012;97(5):1028-1032.

92. Christiansen OB, Nielsen HS, Kolte AM. Future directions of failed implantation and recurrent miscarriage research. Reprod Biomed Online 2006;13(1):71-83.

93. Simur A, Özdemir S, Acar H, et al. Reported in vitro fertilization failure and its relation with thrombophilia. Gynecol Obstet Invest 2009;67(2):109-112.

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

95. ACOG practice Bulletin. Management of recurrent early pregnancy loss. Int J Gynaecol Obstet 2002;78:179-190.

96. Carp HJ, Selmim C, Shoenfeld Y. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. J Autoimmun 2012;38(2-3):J266-274.

97. Bellver J, Soares S, Álvarez C, Muñoz E, et al. The role of thrombophilia and thyroid autoimmunity in unexplained infertility, implantation failure and recurrent spontaneous abortion. Hum Reprod 2008;23(2):278-284.

98. Santamaría A, Martínez O, Casellas M. Implicaciones de la hemostasia en mujeres con complicaciones vasculares gestacionales. En: Fontcuberta J, coordinador. Trombosis en la mujer. Aspectos prácticos. Ed. Grupo Acción Médica S.A. © LEO 2012. Madrid. pp.113-140.

99. Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. Multiple thrombophilic gene mutations are risk factors for implantation failures. Reprod Biomed Online 2006;12:322-327.

100. Coulam CB, et al. Implantation failure and immunotherapy. Hum Reprod 1995;10(6):1338-1340.

101. Coughlan C, Yuan X, Demirol A, Ledger W. Factors affecting the outcome of "endometrial scratch" in women with recurrent implantation failure. J reprod Med 2014;59(1-2):39-43.

102. Coulam CB, Jeyendran RS. Thrombophilic gene polymorphisms are risk factors for unexplained infertility. Fertile Steril 2009;91(4Suppl):1516-1517.

103. Di Nisio M, Rutjes AW, Ferrante N, Tiboni GM, et al. Thrombophilia and outcomes of assisted reproduction technologies: a systematic review and meta-analysis. Blood 2011;118(10):2670-2678.

104. Coulam CB, Acacio B. Does immunotherapy for treatment of reproductive failure enhance live births?. Am J Reprod Immunol 2012;67(4):296-304.

105. Kuperman A, Di Micco P, Brenner B. Fertility, infertility and thrombophilia. Womens Health (Lond Engl) 2011;7(5):545-553.

106. Azem F, Many A, Yovel I, Amit A, et al. Increased rates of thrombophilia in women with repeated IVF failures. Hum Reprod 2004;19(2):368-370.

107. Qublan HS, Eid SS, Ababneh HA, Amarin ZO, et al. Acquired and inherited thrombophilia: implication in recurrent IVF and embryo transfer failure. Hum Reprod 2006;21(10):2694-2698.

108. Martinelli I, Taioli E, Guido R, Levi-Setti P. Embryo implantation after assisted reproductive procedures and maternal thrombophilia. Hemat 2003; 88(7):789-793.

109. Vaquero E, Lezzarin N, Caserte D, Valensiese H. Diagnostic evaluation of women experiencing repeated in vitro failure. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2006;125(1):79-84.

110. Steinvil A, Raz R, Berliner S, Steinberg DM, et al. Association of common thrombophilias and antiphospholipid antibodies with success rate of in vitro fertilization. Thromb Haemost 2012;108(6):1192-1197.

111.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.

112.Younis JS, Ben-Ami M, Izhaki I, Jadaon J, et al. The association between poor ovarian response and thrombophilia in assisted reproduction. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2013;166(1):65-69.

113.Grandone E, Colaizzo D, Lo Bue A, Checola G. Inherited thrombophilia and in vitro fertilization implantation failure. Fertil Steril 2001;76(1):201-202.

114.Baré SN, Póka R, Balogh I, Aizner E. Factor V Laiden as a risk factor for miscarriage and reduced fertility. Aust NZJ Obstet Gynaecol 2000;40(2):186-190.

115.Glueck CJ, Awadalla SG, Phillips H, Cameron D. Polycystic ovary syndrome, infertility, familiar thrombophilia, familiar hypofibrinolysis, recurrent loss of in vitro fertilized embryos, and miscarriage. Fertil Steril 2000;74(2):394-397.

116.Göpel W, Ludwig M, Junge AK, Kohlmann T. Selection pressure for the factor V Leiden mutation and embryo implantation. Lancet 2001;358(9289):1238-1239.

117.Juul K, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Factor V Leiden: relation to fertility?. Lancet 2002;359(9309):894.

118.Coughlan C, Yuan X, Nafee T, Yan J, et al. The clinical characteristics of women recurrent implantation failure. J Obstet Gynaecol 2013;33(5):494-498.

119.Ricci G, Bogatti P, Fischer-Tamaro L, Giolo E, et al. Factor V Leiden and prothrombin gene G20210A mutation and in vitro fertilization: prospective cohort study. Hum Reprod 2011;26(11):3068-3077.

120.Branch DW, Dudley DJ, Mitchell MD, Creighton KA, et al. Immunoglobulin G fractions from patients with antiphospholipid antibodies cause fetal death in BALB/c mice: a model for autoimmune fetal loss. Am J Obstet Gynecol 1990;163(1pt1):210-216.

121.Cervera R, Balasch J. Autoimmunity and recurrent pregnancy losses. Clin Rev Allergy Immunol 2010;39(3):148-152.

122.Sthoeger ZM, Mozes E, Tartakovsky B. Anti-cardiolipin antibodies induces pregnancy failure by impairing embryonic implantation. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90(14):6464-6467.

123.Kaider BD, Coulam CB, Roussev RG. Murine embryos as a direct target for some human autoantibodies in vitro. Hum Reprod 1999;14(10):2556-2561.

124.Stern C, Chamley L. Antiphospholipid antibodies and coagulation defects in women implantation failure after IVF and recurrent miscarriage. Reprod Biomed Online 2006;13(1):29-37.

125.Mak IY, Brosens JJ, Christian M, Hills FA. Regulated expression of signal transducer and activator of transcription, Stat5, and its enhancement of PRL expression in human endometrial stromal cells in vitro. J Clin Endocrinol Metab 2002;87(6):2581-2588.

126.McIntyre JA. Antiphospholipid antibodies in implantation failures. Am J Reprod Immunol 2003;49(4):221-229.

127.Backos M, Rai R, Regan L. Antiphospholipid antibodies and infertility. Hum fertile 2002;5(1):30-34.

128.Egbase PE, Sharhan MAI, Diejomaoh M, Grudzinskas JG. Antiphospholipid antibodies in infertile couples with two consecutive miscarriages after in-vitro fertilization and embryo transfer. Hum Reprod 1999;16(6):1483-1486.

129.Balasch J, Reverter JC, Creus M, Tàssies D, et al. Human reproductive failure is not a clinical feature associated with β2-glycoprotein-I antibodies in anticardiolipin and lupus anticoagulant seronegative patients (the antiphospholipid/cofactor syndrome). Hum Reprod 1999;14(8):1956-1959.

130.Ozcan T, Copel JA. Deciphering the role of thrombophilias in recurrent miscarriage: impact on screening and treatment. Contemporary OB/GYN Archive 2002;June 1.

131.Gleicher N, Vidali A, Karande V. The immunological `Wars of the Roses´: disagreements amongst reproductive immunologists. Hum Reprod 2002;17(3):539-542.

132.Cervera R, Balasch J. Bidirectional effects on autoimmunity and reproduction. Hum Reprod Update 2008;14(4):359-66.

133.Cline AM, Kutteh WH. Is there a role of autoimmunity in implantation failure after in vitro fertilization?. Curr Opin Obstet Gynecol 2009;21(3):291-5.

134.Mariee NG, Tuckerman E, Laird S, Li TC. The correlation of autoantibodies and uNK cells in womwn with reproductive failure. J Reprod Immunol 2012;95(1-2):59-66.

135.Amy M, Kutteh C, Kutteh W. Is there a role of autoimmunity in implantation failure after in-vitro fertilization? Curr Opin Obstet Gynecol 2009;21(3):291-295.

136.Haller-Kikkatalo K, Salumets A, Uibo R. Review on autoimmune reactions in female infertility: antibodies to follicle stimulating hormone. Clin Dev Immunol 2012:2012:762541.

137.Kumar P, Mahajan S. Preimplantation and postimplantation therapy for the treatment of reproductive failure. J Hum Reprod Sci 2013;6(2):88-92.

138.Fumarola A, Grani G, Romanzi D, Del Sordo . Thyroid function in infertile patients undergoing assisted reproduction. Am J Reprod Immunol 2013;70(4):336-341.

139.Poppe K, Glinoer D, Tournaye H, Devroey P. Assisted reproduction and thyroid autoimmunity: and unfortunate combination?. J Clin Endocrinol Metab 2003;88(9):4149-4152.

140.Bussen S, Steck T, Dietl J. Increased prevalence of thyroid antibodies in euthyroid women with a history of recurrent in–vitro fertilization failure. Hum Reprod 2000;15:545-548.

141.Poppe K, Glinoer D, Van Steirteghem A, Tournaye H. Thyroid dysfunction and autoimmunity in infertile women. Thyroid 2002;12(11):997-1001.

142.Negro R, Formoso G, Coppola L. Euthyroid women with autoinmune disease undergoing assisted reproduction technologies: the role of autoimmunity and thyroid function. J Endocrinol Invest 2007;30(1):3-8.

ABREVIATURAS:

AAS: Ácido acetil-salicílico.

ACHO: Anticonceptivo hormonal oral.

ACL: Anticuerpo anticardiolipina.

ACOG: Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos.

AL: Anticoagulante lúpico.

AMH: Hormona antimulleriana.

ANAs: Anticuerpos antinucleares.

ANCAs: Anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos.

APO: Anticuerpos antiperoxidasa.

AR: Abortos de repetición.

ASEBIR: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción.

ASMR: American Society for Reproductive Medicine.

ATG: Anticuerpos antitiroglobulinas.

ATIII: Antitrombina III.

CSF: Factor estimulante de colonias.

CX: Cirugía.

DGP: Diagnóstico preimplantacional.

DM: Diabetes mellitus.

DO: Donación de ovocitos

E_2: Estradiol.

EOD: Esterilidad de origen desconocido.

ESHRE: European Society of Human Reproduction and Embryology.

ETEV: Enfermedad tromboembólica venosa.

ETS: Enfermedad de transmisión sexual.

FI: Fallo de implantación.

FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics.

FISH: Hibridación in situ con fluorescencia.

FIV: Fecundación in vitro.

FOP: Fallo ovárico precoz.

FQ: Fibrosis quística.

FR: Factor reumatoide.

FSH: Hormona folículo estimulante.

FVL: Factor V Leiden.

G-CFS: Factor estimulante del crecimiento de colonias de granulocitos.

HBPM: Heparina de bajo peso molecular.

HLA: Human Leukocyte Antigen (Complejo mayor de histocompatibilidad).

HSG: Histerosalpingografía.

HSSG: Histerosonosalpingografía.

HUMS: Hospital Universitario Miguel Servet.

IAC: Inseminación artificial conyugal.

IAD: Inseminación artificial de donante.

ICSI: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

IL: Interleucina.

IMC: Índice de masa corporal (peso (Kg)/altura^2(m)).

INE: Instituto Nacional de Estadística.

IQ: Intervención quirúrgica.

ITU: Infección del tracto urinario.

LH: Hormona luteinizante.

LIF: Factor inhibidor de la leucemia.

MN: Minesota (Estado de EEUU).

MTHFR: Metiltetrahidrofolato-reductasa.

NK: Linfocitos Natural Killer.

NP: No progresiva (movilidad de los espermios).

OMS: Organización mundial de la salud.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PR: Progresiva rápida (movilidad de los espermios).

QT: Quimioterapia.

RCOG: Royal College of Obstetricians and Gynaecologists.

REM: Recuperación de espermatozoides móviles.

RpCA: Ratio proteína C activada.

RT: Radioterapia.

SAF: Síndrome antifosfolípido.

SART: Society for Assisted Reproductive Technology.

SEEDO: Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad.

SEF: Sociedad Española de Fertilidad.

SEGO: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia.

SEHH: Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia.

SHO: Síndrome de hiperestimulación ovárica.

SOP: Síndrome de ovario poliquístico.

TBC: Tuberculosis.

TE: Transferencia embrionaria.

TEP: Tromboembolismo pulmonar.

THS: Terapia hormonal sustitutiva.

TRA: Técnicas de reproducción asistida.

TVP: Trombosis venosa profunda.

VHB: Virus de la hepatitis B.

VHC: Virus de la hepatitis C.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

β-HCG: Fracción β de la gonadotropina coriónica humana.