



Pérdida habitual embrionaria secundaria a alteraciones inmunológicas

Daniel Flores Alatriste,¹ Sara Jacobo Nájera,² Mercedes Álvarez Goris,¹ Esther Macedo Torres,³ Jorge Jaroslav Stern Colin y Nunes⁴

RESUMEN

En la actualidad, las técnicas de reproducción asistida son una opción adecuada para pacientes con infertilidad. Es importante que el médico tratante cuente con un protocolo de estudio estandarizado y analítico que le permita elegir el tratamiento más adecuado y específico. Los estudios de primer nivel estarán encaminados a descartar las afecciones más frecuentes, como alteraciones anatómicas, hormonales o infecciosas. Si con estos estudios iniciales no se obtiene un diagnóstico, entonces deben realizarse estudios con mayor especificidad, como la búsqueda de alteraciones inmunológicas y trombofilias. En este artículo se comunica el caso de una paciente con tres embarazos, dos cesáreas y un aborto, con infertilidad secundaria y antecedente de cuatro ciclos de fertilización *in vitro* (FIV) realizados sin éxito en dos clínicas de reproducción asistida. En todos los ciclos se observó una buena respuesta ovárica, le fueron transferidos 10 embriones calidad 1+ y 2+ (en promedio, dos a tres embriones en cada transferencia). Las concentraciones de hormona gonadotropina coriônica fueron negativas en todos los ciclos. Cuando acudió al Centro, se corroboró la normalidad de los estudios de primer nivel y, debido al antecedente de falla de implantación, se realizó el estudio inmunológico y de trombofilias, que fue positivo para anticuerpos antinucleares y anticuerpos antifosfolípidicos. Se indicó tratamiento durante tres meses, al término de éste, se permitieron dos ciclos de relaciones sexuales sin protección. La paciente acudió con seis semanas de amenorrea, se corroboró embarazo intrauterino y se llevó a cabo control prenatal regular. Al cabo de 39 semanas de gestación se obtuvo un neonato de género femenino con peso de 2,495 g y APGAR 9/9.

Palabras clave: pérdida habitual embrionaria, alteraciones inmunológicas.

ABSTRACT

Currently, the assisted reproductive technologies had proved to be an appropriate option for patients with infertility. As physicians, it is important having a standardized and analytical protocol study that will allows us to choose the most appropriate and specific treatment. First level studies help us to dismiss the most common diagnosis, such as anatomical dysfunctions, hormone-related pathologies or infectious diseases. If these initial studies do not provide a diagnosis, we have to perform more specific studies to search for immunological disorders and thrombophilias. We submit the case of a patient, GPA 3-2-1 (2 C-section), with secondary infertility and a background history of four cycles of *in vitro* fertilization (IVF) carried out in two assisted reproduction clinics, with no successful results. It was observed in every cycle a good ovarian response; the patient had 10 embryos transferred in total (with an average of 2-3 embryos per transference) the quality of each embryo was 1+ and 2+. The levels of human chorionic gonadotropin hormone (HCG) were negative in all cycles. When the patient came to our hospital, it was confirmed the normality in all the first level studies that were performed to her and due to the fact of the history of implantation failure, we performed the immunological studies and searched for thrombophilias, finding antinuclear antibodies and antiphospholipids antibodies, with positive levels. We prescribed a medical treatment for three months allowing, at the end of this treatment, two cycles of unprotected sexual intercourses. Our patient attended with six weeks of amenorrhea; we corroborated an intrauterine pregnancy and started with regular prenatal control. Giving birth to a female, gestational age 39 weeks, weight of 2,495 g and APGAR 9/9.

Key words: embryo usual loss, immune disorders.

¹ Residente de segundo año de ginecología y obstetricia.

² Ginecología y Obstetricia.

Hospital Ángeles del Pedregal, Universidad La Salle.

³ Radiología e Imagenología.

⁴ Director.

IMMUNOREP.

Correspondencia: Dr. Jaroslav Stern. IMMUNOREP. Camino a Santa Teresa 1055, Torre de consultorios 1027, colonia Héroes de Padierna, CP 10700, México, DF. Correo electrónico: immunorep@yahoo.com

Recibido: febrero, 2013.

Aceptado: marzo, 2013.

Este artículo debe citarse como: Flores-Alatriste D, Jacobo-Nájera S, Álvarez-Goris M, Macedo-Torres E, Stern-Colin y Nunes JJ. Pérdida habitual embrionaria secundaria a alteraciones inmunológicas. Rev Mex Reprod 2013;5:195-201.

La infertilidad se define como la falta de embarazo en una pareja después de un año de tener relaciones sexuales regulares sin protección (afecta a 5% de la población en general). Determinar la causa de la infertilidad permite establecer el tratamiento más adecuado. El estudio inicial debe analizar de manera integral a la pareja. Debe incluirse el perfil hormonal basal tomado entre el día 3 y 5 del ciclo menstrual, en el que se analiza la hormona folículo estimulante, la hormona luteinizante, las concentraciones de estradiol, de progesterona, de prolactina y de la hormona estimulante de tiroides. La valoración de la integridad anatómica del útero y anexos se evalúa con ultrasonido transvaginal entre los días 3 a 5 del ciclo, mientras que la cavidad uterina y las trompas de Falopio se estudian con una histerosalpingosonografía entre los días 6 y 10 del ciclo menstrual. El estudio del varón comprende la valoración de la espermatobioscopia directa, para la que se obtiene la muestra por masturbación en el laboratorio, con tres días de abstinencia sexual, cultivos generales y específicos (*Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*). Si no hay un diagnóstico en el estudio inicial o no sobreviene el embarazo después de ciclos de fertilización *in vitro*-inyección intracitoplasmática del espermatozoide (FIV-ICSI), se justifica una investigación de segundo nivel en la pareja.¹ Estos estudios están encaminados a determinar alteraciones durante el proceso de implantación.² Para ello es necesario comprender los fenómenos normales de adaptación materna que permiten el proceso de implantación, además del reconocimiento de alteraciones y falla del mismo.

El estudio de segundo nivel comprende: *a)* análisis del perfil inmunológico:^{1,2} anticuerpos lúpicos, antifosfolipídicos, antinucleares, antitiroideos, complemento, así como el perfil inmunofenotípico y el perfil embriotoxicóxico,³⁻⁵ y *b)* perfil trombofilico¹ que incluye: factor V de Leiden (genotipos G1691A y H1299R), alteraciones en el gen protrombina o factor II G20210A), alteraciones en el factor XII (V34L), mutación en el gen de metilentetrahidrofolato reductasa que genera hiperhomocisteinemia (genotipos C77T y H1299R), alteraciones en el gen que codifica para la producción de proteína C, proteína S, deficiencia de antitrombina III, polimorfismos sobre el inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1) y de los antígenos plaquetarios tipo 1 (HPA-1).⁶

CASO CLÍNICO

Paciente femenina de 28 años de edad, proveniente de Guadalajara, Jalisco, México, profesionista, con antecedente de tres embarazos, dos cesáreas y un aborto. El primer embarazo se logró seis años antes y culminó de manera espontánea a las 10 semanas de gestación, por lo que se le realizó aspiración manual endouterina. El segundo embarazo se logró cinco años antes y culminó a las 39 semanas de gestación, vía cesárea a solicitud de la paciente, se obtuvo una recién nacida viva, con Apgar 9/9, peso de 3,210 g, sin complicaciones perinatales. El tercer embarazo se logró cuatro años antes y culminó a las 39.4 semanas de gestación vía cesárea, se obtuvo una recién nacida viva, con Apgar 9/10. Ambos embarazos fueron normoevolutivos. La paciente refirió uso de preservativo como único método anticonceptivo previo a sus embarazos. Tres años antes acudió a dos diferentes centros de reproducción debido a su deseo de embarazarse, lo que no pudo lograrse a causa de infertilidad secundaria. En esos centros se le realizaron exámenes de primer nivel para el estudio inicial de infertilidad. En total se le realizaron cuatro ciclos de fertilización *in vitro* (FIV) bajo protocolos conocidos de hiperestimulación ovárica con gonadotropinas recombinantes. En todas las inducciones de ovulación tuvo buena respuesta ovárica y, en promedio, se capturaron 16 ovocitos por ciclo (± 2), la mayor parte con datos de buena maduración ovocitaria, en promedio 14 (± 2) en metafase II, y se fertilizaron 12 (± 2). Se le transfirieron 10 embriones calidad 1+ (seis embriones) y 2+ (cuatro embriones) de la clasificación de Veeck, sin éxito. El resto se criopreservó (dos embriones). Se realizaron cuatro transferencias embrionarias en fresco y una criotransferencia.

Cuando acudió a nuestro centro se le realizaron nuevamente estudios de primer nivel para determinar el origen de su infertilidad y en el ultrasonido pélvico se encontró un útero homogéneo en AVF 10 x 4 x 3 cm, endometrio lineal, cuello uterino cerrado de 4 cm, ovarios de 2 x 3 cm. El perfil hormonal basal estaba en límites normales (Cuadro 1). Se le practicó histerosalpingosonografía con permeabilidad tubaria bilateral y cavidad íntegra; no se observaron datos de miomatosis uterina o pólipos endometriales en su interior. Al varón se le realizó una espermatobioscopia directa (Cuadro

Cuadro 1. Perfil hormonal basal con la técnica de radioinmunoensayo

Parámetro	Resultado	Límites de referencia	Interpretación
Estradiol (pg/mL)	64	21-251	Normal
FSH (mUI/mL)	3.5	3.03-8.08	Normal
LH (mUI/mL)	1.4	2.39-6.60	Normal
Progesterona (ng/mL)	0.3	<0.1-0.3	Normal
Prolactina (ng/mL)	6.32	5.2-20	Normal

FSH: hormona folículo estimulante; LH: hormona luteinizante.

2) sin alteraciones del factor masculino con base en la clasificación de la OMS cuarta edición (por la fecha en la que el paciente acudió a consulta). Al no encontrar alteraciones en el protocolo inicial de estudio y por el antecedente de falla de implantación en su historia clínica, se realizaron estudios específicos para descartar factor inmunológico o trombofilias hereditarias.

En el panel de anticuerpos se observaron anticuerpos antinucleares y antifosfolípidos positivos (Cuadros 3 y 4), que se confirmaron seis semanas después; el resto del estudio fue negativo (perfil de trombofilias). Cuadro 5

Ante la positividad de los anticuerpos antinucleares se inició el tratamiento con ácido acetilsalicílico, ácido fólico, vitamina C y tiamina. Al corregir la causa de falla de implantación e infertilidad, aunado a que no se encontraron fallas en el proceso biológico (ovulación, formación espermática y receptividad uterina), se les permitió intentar el embarazo de manera natural durante dos meses. La paciente se presentó a consulta dos meses después del tratamiento con seis semanas de amenorrea.

Cuadro 2. Espermatobioscopia directa

Parámetros	Resultados	Límites de referencia*	Interpretación
pH	7.4	7.2-7.8	Normal
Volumen (mL)	2	2.0	Normal
Concentración	$20 \times 10^6/\text{mL}$	$20 \times 10^6/\text{mL}$	Normal
Motilidad (%)	50	50	Normal
Morfología (%)	15	15	Normal
Vitalidad (%)	75	75	Normal
Leucocitos	$0.3 \times 10^6/\text{mL}$	$<1 \times 10^6/\text{mL}$	Normal
Bacterias	0	0	Normal
Licuefacción (min)	60	60	Normal

* Según la OMS, 4^a edición.²²

Cuadro 3. Perfil inmunológico: anticuerpos antinucleares

Parámetro evaluado	Resultado	Parámetro de referencia	Interpretación
ssDNA	7	99	Negativo
dsDNA	1	40	Negativo
Sm	15	89	Negativo
RNP/sm*	101*	83*	Positivo
SSA	25	91	Negativo
SSB	7	73	Negativo
Histona	41	96	Negativo
Scl-70	22	32	Negativo

Los valores indican UI.

Cuadro 4. Perfil inmunológico: anticuerpos antifosfolípidos*

Parámetros evaluados	Resultado	<Neg (Límite) a >Pos	Interpretación
IgG CL	0.037	0.209-0.254	Negativo
IgG PE*	0.9	0.160-0.360	Positivo
IgG PI	0.04	0.175-0.242	Negativo
IgG PA	0.028	0.139-0.175	Negativo
IgG PG	0.001	0.143-0.185	Negativo
IgG PC*	0.2	0.082-0.188	Positivo
IgG PS	0.05	0.199-0.321	Negativo
IgM CL*	0.86	0.136-0.215	Positivo
IgM PE	0.028	0.261-0.346	Negativo
IgM PI	0.05	0.136-0.213	Negativo
IgM PA	0.01	0.137-0.214	Negativo
IgM PG	0.02	0.118-0.188	Negativo
IgM PC	0.08	0.090-0.108	Negativo
IgM PS	0.01	0.152-0.165	Negativo
IgA CL	0.01	0.153-0.220	Negativo
IgA PE	0.01	0.036-0.068	Negativo
IgA PI	0.04	0.093-0.122	Negativo
IgA PA	0.02	0.103-0.166	Negativo
IgA PG	0.03	0.093-0.161	Negativo
IgA PC	0.04	0.101-0.128	Negativo
IgA PS	0.029	0.080-0.144	Negativo

*Técnica de ELISA; CL: cardiolipina; PG: fosfatidilglicerol; PS: fosfatidilserina; PA: ácido fosfatídico; PI: fosfatidilinositol; PE: fosfatidiletanolamina.

Los valores indican U/mL.

El ultrasonido transvaginal mostró un saco gestacional intrauterino, con polo fetal y primordio cardiaco.

Se inició control prenatal y se prescribió tratamiento con heparina de bajo peso molecular por alteraciones en el flujo doppler de la arteria uterina. La vigilancia

Cuadro 5. Perfil de trombofilias*

Parámetro	Genotipo	Resultado	Referencia	Interpretación
Factor V Leiden	G1691A	Negativo	Neg/homocito/heterocigoto	Normal
	H1299R	Negativo	Neg/homocito/heterocigoto	Normal
Hiperhomocisteinemia	C677T	Negativo	Neg/homocito/heterocigoto	Normal
	A1298	Negativo	Neg/homocito/heterocigoto	Normal
Factor II	G20210A	Negativo	Neg/homocito/heterocigoto	Normal
Factor XII	V34L	Negativo	Neg/homocito/heterocigoto	Normal
Factor I	455G-A	Negativo	Neg/homocito/heterocigoto	Normal
PAI-I	4G/5G	Negativo	Neg/homocito/heterocigoto	Normal
HPA1	a/b(L33P)	Negativo	Neg/homocito/heterocigoto	Normal

*Técnica de *strip assay* (tiras reactivas).

del tratamiento fue semanal en el primer mes, con análisis de los tiempos de coagulación, tiempo parcial de tromboplastina), así como con ultrasonidos pélvicos y abdominales obstétricos de manera mensual hasta el término del embarazo, el cual fue vía cesárea por antecedente de cesárea iterativa, se obtuvo una recién nacida viva, con peso de 2,495 g y Apgar 9/9.

DISCUSIÓN

Este caso muestra la importancia de la realización de una buena semiología del padecimiento y de una historia clínica completa. El análisis de la información que proporcionó la paciente al acudir al centro de reproducción permitió hacer el diagnóstico presuntivo de falla de implantación. Los estudios básicos realizados en las otras dos clínicas donde acudió previamente fueron normales, por lo que es comprensible que en ambas clínicas le ofrecieran tratamiento convencional con FIV-ICSI cuando hay un diagnóstico de infertilidad inexplicable. Sin embargo, la falta de éxito en los tratamientos de reproducción asistida avanzada nos llevó a indicar a la pareja la realización de estudios de segundo nivel, mismos que permitieron hacer un diagnóstico del problema real y pudo darse el tratamiento específico, con lo que la pareja pudo lograr el embarazo con éxito.

En la actualidad, es un error común no tomar en cuenta los resultados de los tratamientos previos a los que se han sometido nuestras pacientes en otros centros de reproducción. En el caso aquí comunicado, a la paciente se le realizaron cuatro ciclos de FIV y le fueron transferidos 10

embriones en distintas ocasiones, de manera no exitosa. Los estudios realizados en nuestro centro confirmaron el diagnóstico presuntivo de falla de implantación. Esta entidad la describieron Bustillo y colaboradores⁷ en 1995. Se determina por la imposibilidad clínica de lograr un embarazo después de más de dos ciclos de FIV, en los que se hubieran transferido 10 o más embriones al útero.

Para entender la falla en la implantación embrionaria es necesario comprender los mecanismos fisiológicos que ocurren durante la implantación en condiciones normales, esto nos permite confirmar el diagnóstico o sospechar otro posible origen del problema para realizar estudios específicos de segundo nivel.

La implantación es dependiente de diversos factores, los más importantes son la recepción endometrial⁸ y la calidad embrionaria.⁹ Estos factores interactúan a nivel microambiental en donde se desarrollan mecanismos inmunológicos que permiten la evolución del embarazo.⁸ Estos cambios, totalmente fisiológicos, están encaminados a crear la tolerancia inmunológica ante los antígenos paternos que muestra el embrión como aloinjerto (50% de la información genética de un embrión es de origen paterno, información ajena a la madre), la madre genera la formación del *idiotipo 1*, es decir, el reconocimiento de un embrión y, posteriormente, la creación de un *idiotipo 2*, encargado de proteger al embrión del sistema inmunitario de la madre para que no sea atacado como si fuera un agente extraño. Una de las principales adaptaciones evolutivas maternas es la formación y el equilibrio entre estos sistemas de reconocimiento. Otra adaptación es la existencia de moléculas de histocom-

patibilidad no clásicas, como HLA-C, HLA-E y HLA-G que mantienen la inmunidad materna celular bloqueada⁹ (macrófagos, linfocitos T citotóxicos y linfocitos *natural killer* o células asesinas maternas).⁹

Cuando se pierde la tolerancia inmunológica sobreviene el rechazo microcelular de la madre al embrión, lo que genera la pérdida del embarazo por falla de implantación.¹ Su causa más frecuente es por anticuerpos antifosfolipídicos.^{1,2} La incidencia de esta afección en etapa reproductiva es mayor cuando hay falla de implantación,¹⁰ antecedente de abortos recurrentes¹¹ (incluso 40%) y sus manifestaciones secundarias, como la trombosis en la vasculatura decidua.^{12,13} Estos anticuerpos actúan sobre proteínas cargadas negativamente¹³ como los fosfolípidos vasculares, específicamente la beta-2-glico-proteína-1 (b2GPI),¹⁴ y factores como la protrombina, la anexina V, trombina, proteína C y S, así como los factores VII/VIIa, XI y XII.

Otra causa inmunológica de infertilidad que genera falla de implantación son los anticuerpos antinucleares en mujeres con falla de implantación y pérdidas gestacionales recurrentes.¹⁵ Son anticuerpos que se dirigen contra los componentes nucleares de las células que afectan el proceso de transcripción, transporte y maduración del ácido ribonucleico. Estas células muestran de manera característica un incremento en su apoptosis celular.¹⁵ Por su presentación, los anticuerpos antinucleares se dividen en cinco familias diferentes: anticuerpos anti-Smith (Sm), anti-ribonucleoproteínas (RNP), anti-Ro/SSA, anti-La/SSB y anti-Scl 70.

Existe evidencia que sugiere la relación entre la anormalidad inmunológica celular y las hormonas tiroideas como factor de riesgo de infertilidad.^{1,16} Estos anticuerpos antitiroideos actúan sobre los receptores endometriales y son capaces de incrementar el número de células proinflamatorias, linfocitos colaboradores o *helper* (Th1), interferón γ (INF-γ) y otras citocinas, como el factor de necrosis tumoral α (TNF-α), además de mostrar mayor actividad citolítica de las células *natural killer*.¹⁶ Otra relación entre la infertilidad y los anticuerpos antitiroideos se genera por la reacción cruzada contra los antígenos placentarios¹⁶ y antiesperma de manera tridimensional, lo que genera la falla de implantación o la pérdida temprana del embarazo.

Debido a que la mayor parte de las enfermedades autoinmunitarias se relaciona con un estado procoagu-

lante que afecta la microcirculación útero-placentaria, se han realizado diversos estudios que intentan corregir este proceso y favorecer la implantación (Cuadro 6).

CONCLUSIÓN

El diagnóstico etiológico preciso en las pacientes con falla repetida de implantación o antecedente de abortos recurrentes hace la diferencia entre el fracaso y el éxito de los tratamientos. Por tanto, es primordial obtener una buena historia clínica desde la primera consulta, que deberá ser completa, procurando evitar la omisión de antecedentes personales y familiares, como padecimientos autoinmunitarios, alteraciones vasculares, infertilidad o enfermedades degenerativas, así como estudios y protocolos de tratamientos previos (fármacos y dosis administradas, técnicas de reproducción asistida, etc.) y los resultados obtenidos a partir de éstos (número de ovocitos capturados, madurez, fertilización, segmentación, número de embriones y calidad de éstos, etcétera).

Mediante el adecuado protocolo de estudio podrá establecerse con certeza el origen de la infertilidad que afecta a las pacientes. La finalidad es integrar una sospecha diagnóstica que será corroborada mediante el estudio básico o de primer nivel; si resultara negativo, tendrán que realizarse los estudios de segundo nivel descritos: perfil inmunológico y de trombofilias. Una vez que se ha determinado el diagnóstico correcto podrá darse un tratamiento específico y, por tanto, eficaz.

El médico debe estar familiarizado con las tasas de eficiencia de los laboratorios donde trabaja, ya que esto le podrá dar la pauta para determinar si la causa por la que una pareja no logra el embarazo es un problema reproductivo o falla en las técnicas del laboratorio. Deben conocerse las tasas de éxito (logro de embarazo) y de fracaso (aborto, embarazo ectópico y falla de implantación), ya que cada factor (óvulo, espermatozoide, embrión y blastocito, endometrio) puede determinar una causa individual de infertilidad (falla en el protocolo de manejo, técnica inadecuada de fertilización, alteración en la calidad de los gametos y falla de implantación o aborto) que requerirá un tratamiento específico. En pacientes con problemas de implantación, la prioridad terapéutica será mejorar la interacción entre el embrión y su microambiente (endometrio).

Cuadro 6. Comparación de estudios publicados acerca del tratamiento de estados procoagulantes que afectan el proceso de implantación

Autor	Heparina	Aspirina	Heparina-aspirina	Estudio
Fiedler y colaboradores ¹⁷	+			Tratamiento con heparina con el que aumentó la tasa de embarazo en la población alemana
Stern y colaboradores ¹⁸			+	Estudio doble ciego, con distribución al azar, con mujeres seropositivas para anticuerpos antifosfolípidicos. Se aplicó heparina fraccionada y aspirina sin diferencia significativa en las tasas de embarazo o en la implantación
Ying y colaboradores ¹⁹		+		Pacientes tratadas con aspirina, metilprednisolona vs placebo antes de FIV. El tratamiento mejoró la tasa de implantación
Haapsamo y colaboradores ²⁰		+		Estudio con distribución al azar de mujeres que se sometieron a FIV/ICSI, en el que se administró aspirina vs placebo. Se encontró mejor hemodinamia en la arteria uterina
Berker y colaboradores ²¹	+			Estudio prospectivo, con distribución al azar y controlado, con administración de heparina de bajo peso molecular vs placebo. Se observó menor falla de implantación

REFERENCIAS

- Putowski L, Darmochwal-Kolarz D, Rolinski J, Oleszczuk J, Jakowicki J. The immunological profile of infertile women after repeated IVF failure (preliminary study). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;10:112:192-196.
- Carp HJ, Selmi C, Shoenfeld Y. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. *J Autoimmun* 2012;38:266-274.
- Thomason EJ, Roussev RG, Stern JJ, Coulam CB. Prevalence of embryotoxic factor in sera from women with unexplained recurrent abortion. *Am J Reprod Immunol* 1995;34:338-341.
- Roussev RG, Stern JJ, Thorsell LP, Thomason EJ, Coulam CB. Validation of an embryotoxicity assay. *Am J Reprod Immunol* 1995;33:171-175.
- Roussev RG, Kaider BD, Price DE, Coulam CB. Laboratory evaluation of women experiencing reproductive failure. *Am J Reprod Immunol* 1996;35:415-420.
- 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;68:189-198.
- Bustillo M, Stern JJ, Coulam CB. Serum progesterone at the time of human chorionic gonadotrophin does not predict pregnancy in *in-vitro* fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1995;10:2862-2867.
- Bustillo M, Krysa LW, Coulam CB. Uterine receptivity in an oocyte donation programme. *Hum Reprod* 1995;10:442-445.
- Yoshinaga K. Reserch on blastocyst implantation essential factors (BIEFs). *Am J Reprod Immunol* 2010;63:413-424.
- Andreoli L, Fredi M, Nalli C, Reggia R, et al. Pregnancy implications for systemic lupus erythematosus and the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun* 2012;38:197-208.
- Lockshin MD, Druzin ML, GoeiQamar T, Magid MS, et al. Antibody to cardiolipin as a predictor of fetal distress or death in pregnant patients with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 1985;313:152-156.
- Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis and Rheumatism* 1999;42:1309-1311.
- Cuadrado MJ, Hughes GRV. Hughes (antiphospholipid) syndrome. Clinical features. *Rheum Dis Clin North Am* 2001;27:507-524.
- Rai RS, Regan L, Clifford K, Pickering W, et al. Antiphospholipid antibodies and beta-2-glycoprotein-1 in 500 women with recurrent miscarriage: results of a comprehensive screening approach. *Human Reproduction* 1995;10:2001-2005.
- Kikuchi K, Shibahara H, Hirano Y, Kohno T, et al. Antinuclear antibody reduces the pregnancy rate in the first IVF-ET treatment cycle but not the cumulative pregnancy rate without specific medication. *AJRI* 2003;50:363-367.
- Twig G, Shina A, Amital H, Shoenfeld Y. Pathogenesis of infertility and recurrent pregnancy loss in thyroid autoimmunity. *J Autoimmun* 2012;38:275-281.
- Fiedler K, Würfel W. Effectivity of heparin in assisted reproduction. *Eur J Med Res* 2004;30:207-214.
- Stern C, Chamley L, Norris H, Hale L, Baker HW. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of heparin and aspirin for women with *in vitro* fertilization implantation failure and antiphospholipid or antinuclear antibodies. *Fertil Steril* 2003;80:376-383.
- Ying Y, Zhong YP, Zhou CQ, Xu YW, et al. A retrospective study on IVF outcome in patients with anticardiolipin antibody: effects of methylprednisolone plus low-dose aspirin adjuvant treatment. *J Reprod Immunol* 2012;94:196-201.
- Haapsamo M, Martikainen H, Räsänen J. Low-dose aspirin and uterine haemodynamics on the day of embryo transfer

- in women undergoing IVF/ICSI: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Hum Reprod* 2009;24:861-866.
21. Berker B, Taskin S, Kahraman K, Taskin EA, et al. The role of low-molecular-weight heparin in recurrent implantation failure: a prospective, quasi-randomized, controlled study. *Fertil Steril* 2011;95:2499-2502.
22. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
23. Mettler L, Bachmann J, Schmutzler A. High prevalence of markers for immunological disorders in IVF patients. *Int J Gynaecol Obstet* 2004;86:59-60.
24. Coulam CB, Roussev R. Chemical pregnancies: Immunologic and ultrasonographic studies. *Am J Reprod Immunol* 2002;48:323-328.

