



---

# Universidad de Valladolid

## Facultad de Medicina

**Trabajo Fin de Grado:** Estudio de la biopsia de endometrio en pacientes con fallo repetido de implantación en la Unidad de Reproducción del Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

**Presentado por:** Miguel Ángel Ángel Miñarro.

**Dirigido por:** Dra. Laura Barrero Real.

Valladolid, Junio de 2019



# ÍNDICE

---

Introducción	1
Metodología	4
Resultados	6
Discusión	10
Conclusiones	13
Bibliografía	14
Anexos	17



## INTRODUCCIÓN

La implantación embrionaria es un proceso de extraordinaria complejidad que requiere un embrión de buena calidad que sea capaz de ello y un endometrio receptivo, así como el establecimiento de una buena comunicación entre ambos[1]. Teniendo en cuenta todo lo anterior, actualmente se define como fallo repetido de implantación (FRI) la no consecución del embarazo en mujeres menores de 40 años, tras haber transferido al menos 4 embriones de buena calidad, procedentes de al menos dos ciclos de estimulación, repartidos en un mínimo 3 trasferencias, incluyendo tanto las realizadas en fresco como las de embriones criopreservados [2].

La transferencia de embriones de buena calidad morfológica, en un útero anatómica y funcionalmente receptivo es esencial para lograr el embarazo. Por ello es importante conocer que el diagnóstico de FRI se realiza por exclusión, ya que implica tanto factores embrionarios como maternos, y es preciso un estudio detallado de todos ellos, además de una minuciosa técnica de transferencia [3]. En base a los estudios recientes, el éxito de una implantación depende por un lado de la receptividad endometrial, que puede verse alterada por anomalías de la cavidad uterina, un endometrio poco proliferado, una expresión anómala del patrón de receptividad (genómico o molecular), endometritis, factores inmunológicos o trombofilias [4]. Por otro lado, depende de un adecuado desarrollo embrionario en relación con anomalías cromosómicas, endurecimiento de la zona pelúcida o condiciones subóptimas de cultivo. También puede depender de otras causas multifactoriales como son la endometriosis, el hidrosalpinx o la estimulación folicular subóptima.

Las parejas que no consiguen el embarazo después de tratamientos de fecundación in vitro, requieren una orientación multidisciplinar realizando una serie de estudios diagnósticos dirigidos a encontrar una causa que justifique el FRI.

Hoy en día disponemos de técnicas de biología molecular y genética que nos permiten analizar embriones. La existencia de un embrión aneuploide es una de las principales causas del fallo de implantación [5], por lo que a todas estas parejas que padecen FRI se les solicita un estudio del cariotipo a ambos en sangre periférica. Ante un resultado normal, se puede ofrecer a la pareja la realización de un screening genético preimplantacional de aneuploidias para asegurar la transferencia de un embrión euploide.

Adicionalmente, se realiza un estudio de los trastornos de la coagulación sanguínea en la mujer ya que pueden obstaculizar la implantación. Qublan et al. [6] sugirió que en los casos de FRI se debe solicitar un estudio de trombofilias pues la prevalencia aproximada en la población europea es del 15%, siendo la causa mas frecuente la resistencia a la proteína C activada por la mutación del Factor V Leyden.

La receptividad endometrial requiere de una valoración múltiple ya que, podría verse disminuida por alteraciones anatómicas (pólipos, miomas, sinequias o malformaciones uterinas), hormonales (niveles elevados de progesterona), genómicas, moleculares, infecciosas (endometritis), inflamatorias o inmunológicas. Por ello es necesario el estudio de imagen del útero mediante ecografía y ante cualquier sospecha de patología a través de la histeroscopia. La histeroscopia se considera el estándar para el diagnóstico de patología intrauterina y nos permite la confirmación visual del estado del canal cervical y de la cavidad uterina., así como la extirpación o biopsia de dicha patología orgánica.

El estudio del endometrio se completa con una biopsia dirigida durante la histeroscopia o simplemente con una biopsia a ciegas en consulta con cánula de Cornier, también conocido como "Scratch endometrial". Este método además de ser diagnóstico parece ser una herramienta terapéutica, que consiste en provocar un daño intencionado al endometrio que, mediante los procesos de reparación posteriores, consigue mejorar la futura receptividad del embrión. Se trata de un efecto empírico que todavía está en estudio para intentar conocer su mecanismo de acción.

Se han postulado diversos mecanismos que podrían estar implicados en el desarrollo de un endometrio con menor receptividad. La endometritis crónica es una inflamación persistente del endometrio caracterizada por la presencia de células plasmáticas creando un ambiente intrauterino subóptimo para la implantación. Se cree que los mediadores inflamatorios tipo citoquinas y agentes quimiotácticos, así como los propios microorganismos pueden provocar la apoptosis de las células del trofoblasto impidiendo la correcta implantación del embrión. El método diagnóstico de la endometritis crónica todavía es objeto de debate entre la tinción de Hematoxilina-Eosina y la Inmunohistoquímica del CD138. Aunque datos recientes indican que esta última técnica podría ser el método diagnóstico más adecuado, ya que con Hematoxilina-Eosina se identifican morfológicamente muchas células como plasmáticas que en realidad no lo son y por tanto, diagnosticando como falsa endometritis en muchos casos [7]. Diversos estudios [8], llegan a diagnosticar una endometritis crónica en el 30,3% al 57,5% de las pacientes con FRI. Además también

han demostrado que el diagnóstico de endometritis crónica y su consiguiente tratamiento antibiótico mejora las tasas de embarazo espontáneo y las tasas de niños nacidos vivos en pacientes con FRI [9]. Tras estos hallazgos se han abierto nuevas líneas de investigación para lo cual es necesario contar con muestras procedentes de biopsias endometriales para ser procesadas en estos estudios. Además de los resultados específicos de cada estudio se ha visto empíricamente que el “endometrial scratching” (daño local del endometrio) parece incrementar la receptividad endometrial en las pacientes con FRI [10, 11], pues induce un incremento significativo de macrófagos (células HLA-DR+, CD11c+), de citoquinas proinflamatorias, TNF- $\alpha$ , oncogenes GRO- $\alpha$ , IL-15 y proteínas inflamatorias de macrófagos 1B (MIP-1B), que producen un efecto estimulante directo, con una correlación positiva sobre la probabilidad de embarazo. En conclusión, la respuesta inflamatoria inducida por la biopsia podría facilitar la preparación del endometrio para la una mejor implantación embrionaria.

Siguiendo esta línea de investigación, el objetivo principal de nuestro estudio es determinar la incidencia de endometritis en las pacientes con FRI de la Unidad de Reproducción del Hospital Clínico Universitario y estudiar el efecto de la biopsia de endometrio sobre la receptividad uterina posterior en estas mujeres.

## METODOLOGÍA

Estudio descriptivo, retrospectivo, analítico, de pacientes con FRI en ciclos de FIV/ICSI con transferencias de embriones de buena calidad en fresco y/o congelados, procedentes de al menos dos ciclos de estimulación, desde enero de 2017 hasta diciembre de 2018 en la Unidad de Reproducción del Hospital Clínico de Valladolid. Los datos han sido obtenidos de las historias clínicas, y del programa informático de la Unidad (SARA).

Se recogen datos relativos a la edad de la mujer (<40años), tipo de transferencia (embriones congelados vs fresco), día de la transferencia y números de embriones transferidos, así como el resultado del test de embarazo y su evolución. En cuanto a las pruebas complementarias, a todas las parejas se solicitó un estudio de FRI que consiste en el estudio genético con los cariotipos de ambos miembros de la pareja, junto con un estudio en la mujer de trombofilias (alteraciones de la proteína C y S, homocisteína y mutación del gen MTHFR, mutación del factor V Leyden, gen 20210 protrombina), del síndrome antifosfolipídico y un estudio ecográfico detallado del útero.

El estudio de FRI se completa con la realización de una biopsia de endometrio a ciegas en consulta con cánula de Cornier en la fase secretora del ciclo previo al que se va a realizar la transferencia embrionaria. Se coloca el espejuelo dentro de la vagina y se expone el orificio cervical externo, a través del cual se introduce la cánula hasta llegar al fondo del útero. Se extrae el émbolo hacia atrás y se aspiran varias muestras de endometrio que se remiten para su estudio en formol a anatomía patológica. Esta prueba puede ser algo dolorosa y puede provocar un leve sangrado durante el día de realización de la misma, pero presenta buena tolerancia por parte de las pacientes [12].

Las muestras de la biopsia se remitieron al Servicio de Anatomía Patológica del HCUV. El estudio de las muestras se llevó a cabo por un mismo observador, mediante un estudio microscópico básico y un estudio específico de inmunohistoquímica para valorar la presencia de células plasmáticas.



Una vez realizada la biopsia de endometrio, las muestras fueron procesadas y analizadas por el mismo patólogo, especialista en patología endometrial. Se fijaron con formol y a continuación se procedió a su parafinado para poder realizar el análisis histológico. Inicialmente, todas las biopsias se analizaron mediante la tinción de H&E en busca de células plasmáticas y aquellas preparaciones donde se sospechaba la presencia de ellas se sometieron a técnicas de inmunohistoquímica para confirmar la presencia del marcador de células plasmáticas syndecan-1 (CD138) que identifica la endometritis crónica. Syndecan-1 es un proteoglicano de superficie celular expresado por células plasmáticas muy útil para el diagnóstico de endometritis crónica. La inmunohistoquímica de las muestras susceptibles se realizó mediante la incubación de las mismas con una dilución 1:100 de anticuerpos monoclonales de ratón contra syndecan-1, durante una hora a temperatura ambiente. Para considerar positivo el diagnóstico de endometritis crónica tendría que darse la presencia de 1-5 células plasmáticas/campo o un clúster de <20 células plasmáticas teñidas [13].

A los 14 días de realizar la transferencia embrionaria, tanto de embriones en fresco como de embriones congelados, si no ha tenido la menstruación, la paciente se realiza un test de embarazo en orina de primera hora de la mañana. Si el test en orina es positivo, se confirma el embarazo con la realización de los niveles de B-HCG en sangre periférica, considerando un embarazo bioquímico si los niveles son superiores a 50UI. Para el diagnóstico de embarazo clínico, se realiza una ecografía en consulta a las 7 semanas de gestación para confirmar la existencia de un embrión con latido cardíaco fetal positivo.

El análisis estadístico se realiza utilizando el programa IBM SPSS Statistics 22.0 considerando una significación estadística una  $p < 0.05$ . Se valora si el scratch endometrial mejora la tasa de implantación, así como un estudio de la prevalencia de patología endometrial, con especial hincapié en la endometritis.

## RESULTADOS

La muestra total de pacientes estudiadas con FRI que cumplían los criterios de inclusión para este estudio fue de 100 mujeres. En los estudios complementarios de FRI, solo se encontró un caso de alteración del cariotipo en uno de los progenitores. Sin embargo, un total de 12 mujeres presentaban alteraciones de la coagulación y se indicó el correspondiente tratamiento de la trombofilia que padecían.

Para el estudio de la prevalencia de endometritis crónica en nuestras pacientes se recogieron un total de 100 muestras mediante biopsia endometrial para su posterior análisis anatómo-patológico, del que se obtuvieron los siguientes resultados:

**Tabla 1:** datos de anatomía patológica mediante análisis microscópico de las muestras de biopsia endometrial.

<b>Clasificación de anatomía patológica</b>	Muestra	Patología	Endometrio	Linfocitos	Células plasmáticas
	insuficiente	orgánica (pólipo)	secretor (neutrófilos)	CD3+ sin plasmáticas	CD138+
<b>n(%)</b>	18(18%)	6(6%)	37(37%)	39(39%)*	0(0%)

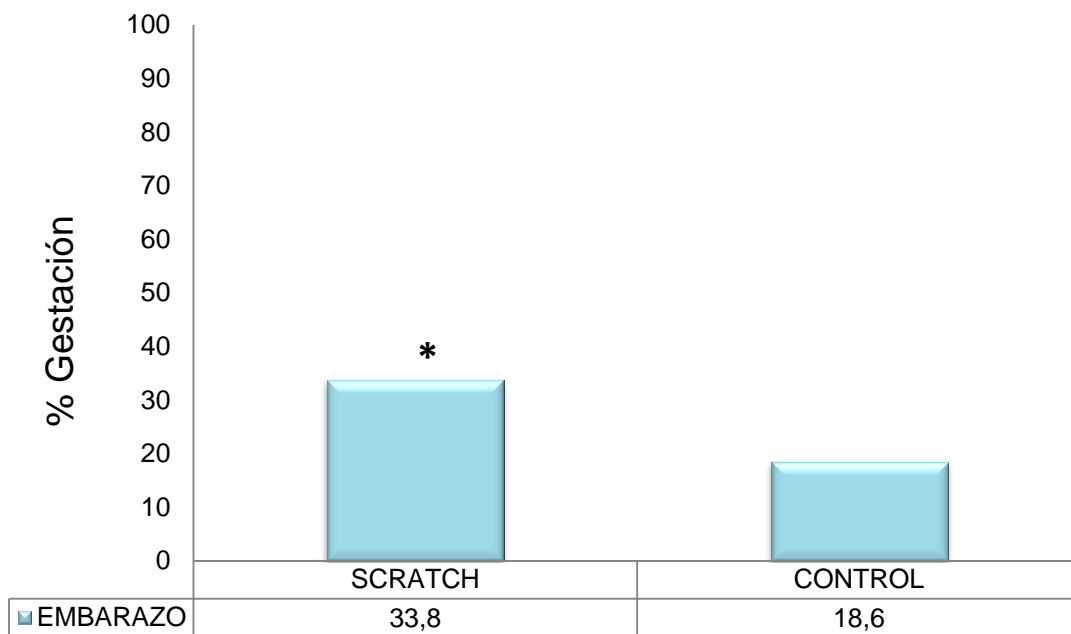
\* Dos de estas muestras presentaron una importante reacción inflamatoria.

Para considerar positivo el diagnóstico de endometritis crónica, diversos estudios describen la presencia característica de un mínimo de células plasmáticas CD138+ en la muestra estudiada por el patólogo. En nuestro estudio, como se puede observar en la tabla 1, en ninguna de las pacientes se observaron células plasmáticas, lo que significa que la prevalencia de endometritis crónica en las pacientes con fallo de implantación de nuestra Unidad de Reproducción Asistida fue del 0%. Por otro lado, fue llamativo el hallazgo de un infiltrado linfocitario CD3+ en casi la mitad de las muestras estudiadas.

Para estudiar el efecto de la biopsia de endometrio sobre la receptividad uterina posterior se determinaron las tasas de embarazo de mujeres con antecedentes de FRI y se compararon con un grupo control de mujeres que ya han realizado dos ciclos previos de estimulación y varias transferencias, pero que no cumplen con los criterios de buena calidad para ser un fallo repetido de implantación.

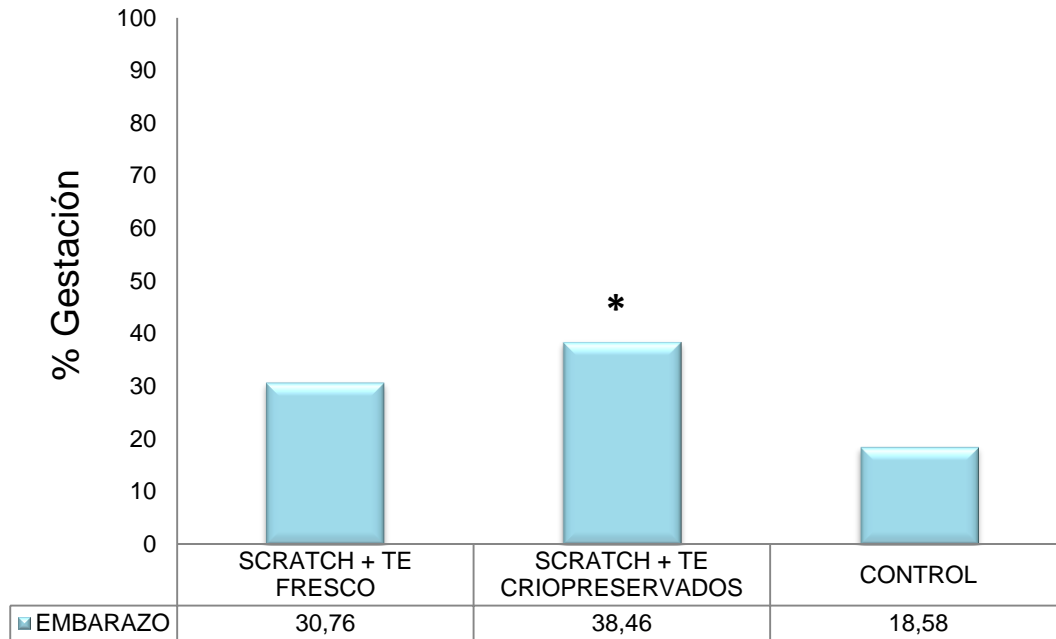
Se estudiaron un total de 65 pacientes tras excluir los FRI en los que se encontraron algunas alteraciones de las pruebas complementarias: cariotipo (1), coagulación sanguínea (12) y estudio ecográfico cavidad (6). Al no poder aclarar en qué grado podrían estar interfiriendo estas patologías en las tasas de gestación, fueron descartadas en esa parte del estudio. En el caso de las trombofilias, quedaron fuera del análisis debido a que no había forma de diferenciar el efecto de nuestra intervención del efecto del tratamiento de la trombofilia en relación a los datos de embarazo. Finalmente, otro grupo de 16 pacientes no pudo incluirse en este análisis por no haber llegado a realizar la transferencia, bien por no disponer de embriones en fresco para transferir o por no sobrevivir a la descongelación en caso de estar criopreservados.

La tasa de embarazo fue significativamente mayor (33,8%;  $p < 0,02$ ) en pacientes diagnosticadas de FRI con biopsia de endometrio en el ciclo previo al de tratamiento sin tener en cuenta el tipo de embrión (fresco o congelado), con respecto a nuestra propia tasa de gestación del grupo control en el tercer ciclo (18,6%), en el que se realizaron transferencias de embriones sin biopsia de endometrio previa por no presentar FRI (*Figura 1*).



**Figura 1:** Tasas de gestación en 3º ciclo en pacientes con FRI más scratch previo al ciclo de transferencia y tasas de embarazo en el 3º ciclo sin FRI (grupo control). El asterisco representa diferencias significativas ( $p < 0,02$ ) en la tasa de embarazo entre los dos grupos.

Si analizamos por separado según el tipo de embrión trasferido (39 en fresco y 26 congelados) este efecto beneficioso se mantiene pero sólo alcanza la significación estadística en las criotransferencias (38.5% gestación;  $p < 0.03$ ), como se puede observar en la *Figura 2*.



**Figura 2:** Tasas de gestación durante 3º ciclo de transferencia. Pacientes con FRI más scratch previo al ciclo de transferencia con embriones en fresco o criopreservados. Tasas de embarazo sin FRI (grupo control). El asterisco representa diferencias significativas ( $p < 0,03$ ) en la tasa de embarazo entre los grupos.

Como ya describíamos antes en el análisis de anatomía patológica, de las 100 pacientes estudiadas, alrededor de un 40% presentaban linfocitos CD3+ sin células plasmáticas asociadas. En principio, este infiltrado celular se describe como un hallazgo, que no se relaciona con ningún otro parámetro y no se conoce su repercusión. Pero una vez eliminadas del estudio las pacientes que presentaron algún inconveniente, se realizó el análisis combinado de la presencia de linfocitos CD3+ y las tasas de gestación de las 65 mujeres seleccionadas.

A pesar de no haber encontrado diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en ninguno de los grupos estudiados (*tabla 2*), se observó un infiltrado CD3+ en 34 de esas pacientes, lo cual supone más de la mitad de las muestras. Además, el 50% de las gestaciones tras el scratch (n=11) han tenido lugar en endometrios con infiltrados linfocitarios, manteniéndose este efecto tanto en transferencias de embriones en fresco como en criotransferencias.

	<b>Gestación con embriones en Fresco</b>	<b>Gestación con embriones Criopreservados</b>	<b>Gestación con embriones Totales</b>
	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>
<b>Biopsia endometrial con linfocitos CD3+</b>	5(31,3)	6(33,3)	11(32,4)
<b>Biopsia endometrial sin linfocitos CD3+</b>	7(30,4)	4(50)	11 (35,5)

**Tabla 2:** tasas de gestación en función de la presencia o ausencia de linfocitos CD3+ en la muestra de endometrio sin tener en cuenta el tipo de embrión y tras analizar los embriones por separado según hayan sido trasferencias de embriones en fresco o congelados.

## DISCUSION

Una de las principales patologías que se postula como responsable del fallo repetido de implantación es la endometritis crónica. Se define como una inflamación crónica de la capa endometrial del útero, que se caracteriza por la presencia de células plasmáticas identificadas mediante la tinción H&E y/o inmunohistoquímica (CD138+). Con respecto a la última, algunos estudios señalan el aumento de prevalencia de endometritis crónica al utilizar la inmunohistoquímica desde un 11% a un 56% (Dana B. McQueen et al 2015). Al igual que el anterior estudio mencionado, otros autores coinciden en una prevalencia de endometritis crónica de alrededor del 50% en pacientes con fallo repetido de implantación [13, 14, 15, 16], sugiriendo una fuerte correlación entre la endometritis crónica y el fallo de implantación. Se cree que la presencia de microorganismos, y en consecuencia, de citoquinas y mediadores inflamatorios, puede provocar la apoptosis de las células del trofoblasto, dificultando su implantación, recomendándose tratamiento antibiótico previo.

Por todo esto, y basándonos en resultados previos donde recomiendan la implementación rutinaria de inmunohistoquímica para aumentar la sensibilidad en el diagnóstico de endometritis crónica [7], en nuestro estudio se analizaron 100 biopsias de endometrio procedentes de mujeres con FRI, de las cuales tras una exhaustiva revisión se obtuvo un 0% de muestras compatibles con endometritis crónica. Por lo tanto, nuestros resultados no son similares al resto de datos publicados al respecto. Puede explicarse porque nosotros hemos realizado una biopsia a ciegas del endometrio y no una biopsia dirigida con histeroscopia o bien porque no se usen los mismos criterios diagnósticos a la hora de definir la presencia de endometritis crónica.

Para solucionar estas diferencias y poder dilucidar si realmente es un diagnóstico a tener en cuenta en el estudio de FRI, habría que definir adecuadamente las características diagnósticas en un protocolo universal, para que los datos de diferentes autores fueran comparables y aportaran la evidencia necesaria para poder integrarlo como una causa importante de FRI.

Actualmente, la efectividad real del scratch endometrial en pacientes incluidas en un programa de reproducción asistida es un tema que suscita un gran debate en la literatura. Algunos autores consideran la técnica inefectiva, incluso la consideran un riesgo para la paciente, incrementando la probabilidad de sufrir el síndrome de Asherman [17, 18]. Otros están a favor de la técnica, defendiendo su efectividad, que se traduce en mejores tasas de implantación embrionaria tras el uso del scrach [12]. A pesar de este debate, muchos son los investigadores que recomiendan el uso del scratch, sobre todo en los casos de FRI [19].

En la segunda parte del proyecto se incluyeron 65 pacientes en su tercer ciclo de transferencia de embriones, diagnosticadas de fallo repetido de implantación y a las que se realizó el estudio y fue negativo. Las pacientes seleccionadas se sometieron a un scratch endometrial en el ciclo previo al de la estimulación ovárica, mientras las pacientes controles en tercer ciclo de transferencia de embriones no recibieron ninguna intervención. En nuestro caso, el grupo sometido al scratch mostró tasas de gestación significativamente más altas que el grupo control (33,8% vs. 18,6%,  $p = 0,02$ ), sin diferencias en el resto de parámetros estudiados. Por lo tanto, podemos decir que estos resultados siguen la misma línea de otros autores con datos similares publicados recientemente [20, 21]. De acuerdo con los resultados publicados [12, 21], donde se demuestran diferencias significativas en tasas de embarazo, la realización de la biopsia en la fase secretora del ciclo en pacientes con dos o más fallos de implantación previos, como también se hizo en nuestro estudio, puede jugar un papel clave en estos casos, y podría haber contribuido a los buenos resultados de embarazo obtenidos.

Como hemos visto anteriormente, hay muchos factores que pueden influir en el resultado del scratch. En estudios previos, no solo se ha tenido en cuenta el número del ciclo o la fase del endometrio, también son importantes otras variables como son el tipo de embrión que se transfiere. En este caso, estamos hablando de que debido a los resultados dispares que hay en la literatura [22, 23] no está claro todavía si hay evidencia a favor o en contra de transferir embriones en fresco o criopreservados después de la biopsia.

Nuestros resultados, tras analizarlos por separado según el tipo de embrión ( $n = 39$  en fresco y  $n = 26$  criopreservados) demostraron que la tasa de gestación con embriones criopreservados, previo scratch endometrial en pacientes diagnosticadas de FRI, es significativamente mayor en comparación con el grupo control (38.5% vs 18,6%;  $p < 0.03$ ). Este efecto beneficioso en el embarazo se mantiene en el grupo de

embriones transferidos en fresco (31% de tasa de gestación) pero no alcanza la significación estadística, respecto al grupo control. Estos resultados confirman otros previamente descritos [3], concluyendo que podría ser favorable la criopreservación de embriones y posterior transferencia de los mismos, previa biopsia de endometrio. Este efecto positivo en relación con una transferencia de embriones diferida está apoyado por múltiples ensayos [24, 25] que incrementan la evidencia científica a favor de transferencias de embriones en un ciclo sin tratamiento de estimulación ovárica, ya que el ambiente uterino es más fisiológico y por tanto más adecuado para la implantación.

En este trabajo publicamos por primera vez, la existencia de un infiltrado linfocitario CD3+ en el endometrio que parece tener un efecto beneficioso en la receptividad uterina, facilitando la implantación del embrión. Al comparar la tasa de gestación con los resultados de anatomía patológica, la mitad de las gestaciones tras el scratch han tenido lugar en endometrios con infiltrados linfocitarios CD3+, manteniéndose este efecto tanto en transferencias de embriones en fresco como en criotransferencias. Aunque no sepamos su repercusión real, ni su mecanismo de acción, parece un hallazgo interesante y se abre una nueva vía de estudio en este sentido. Para ello, son necesarios más estudios con un mayor tamaño muestral, que nos permita explicar estos resultados con más detalle.



## CONCLUSIONES

A pesar de que la endometritis crónica es una entidad cada vez con más relevancia en el fallo repetido de implantación, ninguna de nuestras pacientes presentó esta patología tras una revisión exhaustiva de las muestras. Lo que es frecuente, es la existencia de linfocitos por lo que tal vez es necesario consensuar los criterios anatomopatológicos y realizar cultivos de las muestras para poder hablar de los mismos términos y comparar los resultados.

En el FRI el scratch endometrial mejora la tasa de gestación, manteniéndose el efecto tanto para transferencias de embriones en fresco como criotransferencias.

La existencia de un infiltrado linfocitario en el endometrio parece tener un efecto beneficioso en la receptividad endometrial, pero son necesarios más estudios para poder explicar estos resultados con un mayor tamaño muestral.

El fallo repetido de implantación, genera frustración en parejas y personal clínico. Por ello, debemos aunar nuestros esfuerzos en unificar criterios, y en la búsqueda de nuevas estrategias, que permitan incrementar nuestras probabilidades de éxito.

## BIBLIOGRAFIA

1. Cha HH, Hwang JR, Kim HY, Choi SJ, Oh SY, Roh CR. Autophagy induced by tumor necrosis factor  $\alpha$  mediates intrinsic apoptosis in trophoblastic cells. *Reprod Sci*. 2014 May;21(5):612-22.
2. Coughlan C, Ledger W, Wang Q, Liu F, Demirol A, Gurgan T, Cutting R, Ong K, Sallam H, Li TC. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online*. 2014 Jan;28(1):14-38.
3. Coates A, Kung A, Mounts E, Hesla J, Bankowski B, Barbieri E, Ata B, Cohen J, Munné S. Optimal euploid embryo transfer strategy, fresh versus frozen, after preimplantation genetic screening with next generation sequencing: a randomized controlled trial. *Fertil Steril*. 2017 Mar;107(3):723-730.
4. El Hachem H, Crepaux V, May-Panloup P, Descamps P, Legendre G, Bouet PE. Recurrent pregnancy loss: current perspectives. *Int J Womens Health*. 2017 May 17;9:331-345.
5. Werner M1, Reh A, Grifo J, Perle MA. Characteristics of chromosomal abnormalities diagnosed after spontaneous abortions in an infertile population. *J Assist Reprod Genet*. 2012 Aug;29(8):817-20.
6. Qublan HS1, Eid SS, Ababneh HA, Amarin ZO, Smadi AZ, Al-Khafaji FF, Khader YS. Acquired and inherited thrombophilia: implication in recurrent IVF and embryo transfer failure. *Hum Reprod*. 2006 Oct;21(10):2694-8.
7. McQueen DB, Perfetto CO, Hazard FK, Lathi RB. Pregnancy outcomes in women with chronic endometritis and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2015 Oct;104(4):927-931.
8. Vitagliano A, Saccardi C, Noventa M, Di Spiezio Sardo A, Saccone G, Cicinelli E, Pizzi S, Andrisani A, Litta PS. Effects of chronic endometritis therapy on in vitro fertilization outcome in women with repeated implantation failure: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2018 Jul 1;110(1):103-112.
9. Cicinelli E, Matteo M, Trojano G, Mitola PC, Tinelli R, Vitagliano A, Crupano FM, Lepera A, Miragliotta G, Resta L. Chronic endometritis in patients with unexplained infertility: Prevalence and effects of antibiotic treatment on spontaneous conception. *Am J Reprod Immunol*. 2018 Jan;79(1). doi: 10.1111/aji.12782.
10. El-Toukhy T, Sunkara S, Khalaf Y. Local endometrial injury and IVF outcome: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2012; 25 (4): 345–54.

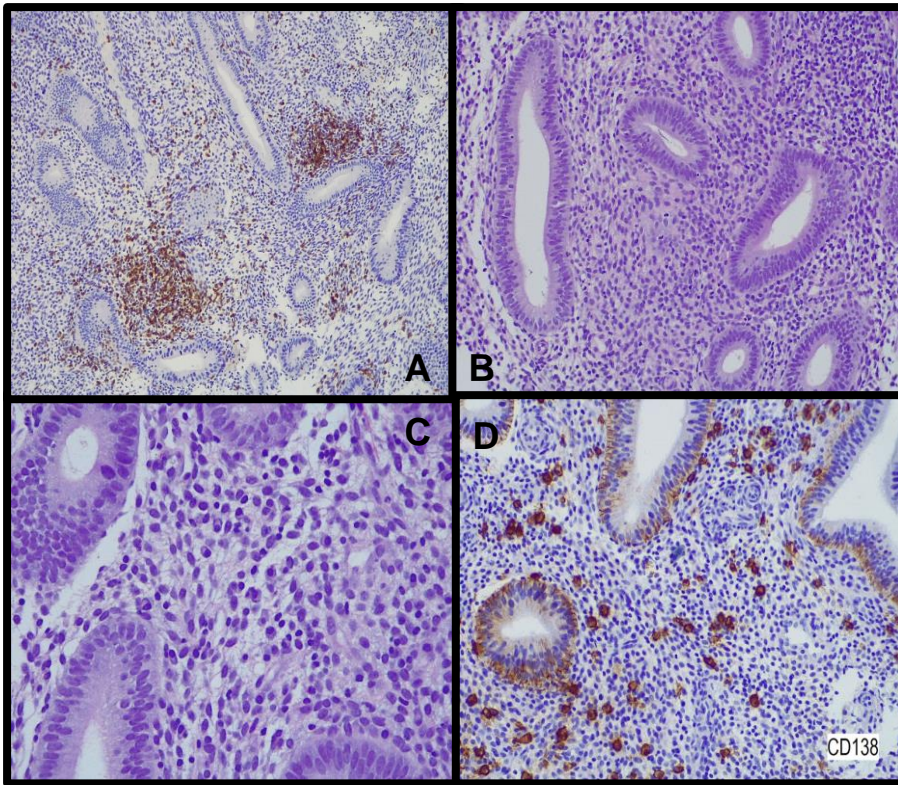
11. Potdar N, Gelbaya T, Nardo LG. Endometrial injury to overcome recurrent embryo implantation failure: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2012; 25 (6): 561–71.
12. Nastri CO, Lensen SF, Gibreel A, Raine-Fenning N, Ferriani RA, Bhattacharya S, Martins WP. Endometrial injury in women undergoing assisted reproductive techniques. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Mar 22;(3):CD009517. doi: 10.1002/14651858.
13. Cicinelli E, Trojano G, Mastromauro M, Vimercati A, Marinaccio M, Mitola PC, Resta L, de Ziegler D. Higher prevalence of chronic endometritis in women with endometriosis: a possible etiopathogenetic link. *Fertil Steril*. 2017 Aug;108(2):289-295.
14. Cicinelli E, Matteo M, Tinelli R, Pinto V, Marinaccio M, Indraccolo U, De Ziegler D, Resta L. Chronic endometritis due to common bacteria is prevalent in women with recurrent miscarriage as confirmed by improved pregnancy outcome after antibiotic treatment. *Reprod Sci*. 2014 May;21(5):640-7.
15. Tersoglio AE, Salatino DR, Reinchisi G, Gonzalez A, Tersoglio S, Marlia C. Repeated implantation failure in oocyte donation. What to do to improve the endometrial receptivity?. *JBRA Assist Reprod*. 2015 May 1;19(2):44-52.
16. Yang R1, Du X, Wang Y, Song X, Yang Y, Qiao J. The hysteroscopy and histological diagnosis and treatment value of chronic endometritis in recurrent implantation failure patients. *Arch Gynecol Obstet*. 2014 Jun;289(6):1363-9.
17. Santamaria X, Katzorke N, Simón C. Endometrial 'scratching': what the data show. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2016 Aug;28(4):242-9.
18. Levin D, Hasson J, Cohen A, Or Y, Ata B, Barzilay L, Almog B. The effect of endometrial injury on implantation and clinical pregnancy rates. *Gynecol Endocrinol*. 2017 Oct;33(10):779-782.
19. Lensen S, Sadler L, Farquhar C. Endometrial scratching for subfertility: everyone's doing it. *Hum Reprod*. 2016 Jun;31(6):1241-4.
20. Reljič M, Knez J, Kovač V, Kovačič B. Endometrial injury, the quality of embryos, and blastocyst transfer are the most important prognostic factors for in vitro fertilization success after previous repeated unsuccessful attempts. *J Assist Reprod Genet*. 2017 Jun;34(6):775-779.
21. Vitagliano A, Di Spiezio Sardo A, Saccone G, Valenti G, Sapia F, Kamath MS, Blaganje M, Andrisani A, Ambrosini G. Endometrial scratch injury for women with one or more previous failed embryo transfers: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril*. 2018 Sep;110(4):687-702.

22. Yeung TW, Chai J, Li RH, Lee VC, Ho PC, Ng EH. The effect of endometrial injury on ongoing pregnancy rate in unselected subfertile women undergoing in vitro fertilization: a randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2014 Nov;29(11):2474-81.
23. Taylor TH, Patrick JL, Gitlin SA, Michael Wilson J, Crain JL, Griffin DK. Outcomes of blastocysts biopsied and vitrified once versus those cryopreserved twice for euploid blastocyst transfer. *Reprod Biomed Online.* 2014 Jul;29(1):59-64.
24. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril.* 2011 Aug;96(2):344-8.
25. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Clinical rationale for cryopreservation of entire embryo cohorts in lieu of fresh transfer. *Fertil Steril.* 2014 Jul;102(1):3-9.

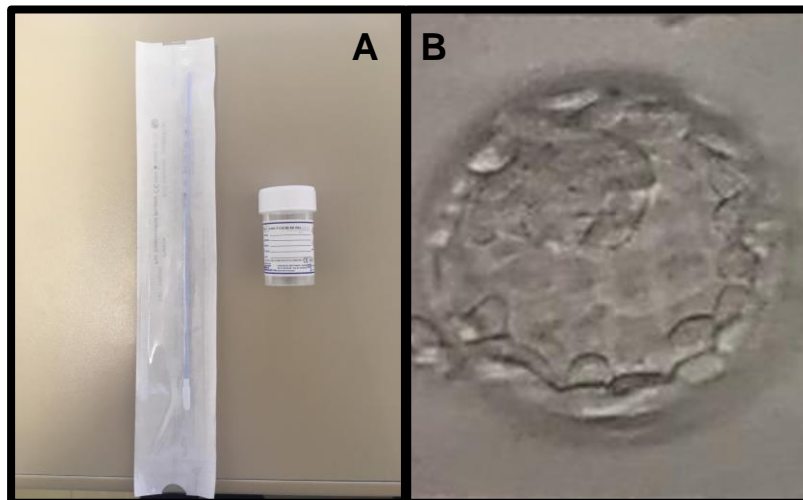
**ANEXOS**

---

**ANEXO I: Apéndice gráfico.**



**Apéndice gráfico 1:** tinción de H&E de las muestras de biopsia de endometrio a diferentes aumento (A: 10X; B: 20X; C: 40X) y tinción de inmunohistoquímica para células plasmáticas C138+ (D).



**Apéndice gráfico 2:** cánula de Cornier y bote de recogida de muestra (A). Embrión en día 5 en estadio de blastocisto antes de la transferencia (B).

**ANEXO II: Informe de solicitud de estudio de cariotipo.**



**HOJA PETICIÓN ANALISIS ESPECIALES – EXTRA HOSPITALARIOS**

NOMBRE DEL LABORATORIO: HOSPITAL RÍO HUATEGA

Dirección: \_\_\_\_\_

**1) SOLICITA ANALISIS:**

Servicio Peticionario: \_\_\_\_\_ Planta \_\_\_\_\_ Cama \_\_\_\_\_

Doctor \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

**2) DATOS DE FILIACIÓN DEL PACIENTE:**

**Nº PETICION**

Nº Hª Clínica: \_\_\_\_\_

Apellidos: \_\_\_\_\_

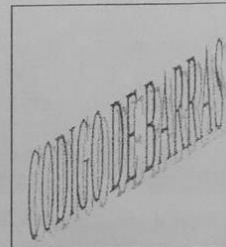
Nombre: \_\_\_\_\_

Fecha de Nacimiento: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Población: \_\_\_\_\_

Nº de S. Social \_\_\_\_\_



**3) RESUMEN HISTORIA CLÍNICA:**

FALLO DE IMPLANTACIÓN.

**4) DIAGNOSTICO DE PRESUNCIÓN:**

FALLO DE IMPLANTACIÓN.

**5) OBSERVACIONES:**

**6) PRUEBAS ANALITICAS SOLICITADAS:**

Determinación de: cariotipo en sangre periférica

Determinación de: \_\_\_\_\_

Determinación de: \_\_\_\_\_

Determinación de: \_\_\_\_\_

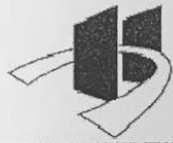
PLUV - PRODUCTIV

H.C.U.V.: 334

Firma Peticionarios.

Valladolid \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ /20\_\_

**ANEXO III: Informe de solicitud de estudio de trombofilias.**



HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO  
C/ Ramón y Cajal, 3  
47005 - VALLADOLID



**ANÁLISIS DE COAGULACIÓN – ESTUDIO AMPLIADO**  
**(EL PACIENTE DEBE HACERSE LA EXTRACCIÓN EN HEMATOLOGÍA PREVIA  
CITA EN SECRETARÍA DE HEMATOLOGÍA O EN CITACIONES DE  
POLICLINICAS)**

Etiqueta identificativa o datos del paciente:

- NHC:
- Nombre y apellidos:
- Fecha nacimiento:
- Nº Seguridad social:
- Planta y cama si ingresado:

**TIPO DE ESTUDIO:**

- Alteración de estudio de coagulación previo
- Determinación de anticoagulante lúpico
- Factores de riesgo de trombosis <sup>(1)</sup>
- Estudio de síndrome hemorrágico
- Otros

**MOTIVO DE ESTUDIO Y DATOS COMPLEMENTARIOS:**

FALLO DE IMPLANTACIÓN  
ESTUDIO DE TROMBOFILIAS

Medico solicitante: ..... Servicio: .....

Fecha de petición: ..... Firma: .....

H.C.U.V. 4-4-51

(1)

Estos estudios deben hacerse fuera de fase aguda y sin tratamiento anticoagulante oral.



**IS CHRONIC ENDOMETRITIS A POSSIBLE ETIOLOGY OF THE REPEATED IMPLANTATION FAILURE?**

**INTRODUCTION**

To know why,embryos of good quality do not manage to implant in patients with uterus and endometriums with normal ultrasound scan,supposes a true challenge for the reproductive medicine of the XXI century. Multiple factors have been proposed as implicated in the repeated failure of implantation, among them the existence of a chronic endometritis. The objective is to assess the incidence of this entity in our patients.

**MATERIAL AND METHODS**

Descriptive,retrospective,analytical study of patients with at least three transfers of good quality embryos from at least two stimulation cycles (January 2017- December 2018). The data have been obtained from the clinical records,and the program Computer Unit(SARA),and analyzed statistically through the IBM-SPSS-22-program. In all the couples, a study of the implant failure was requested,consisting of the genetic study (both karyotypes) and the study of thrombophilias (alterations of the protein C and S,homocysteine and mutation of the MTHFR gene,mutation of Factor V Leyden,gene 20210th prothrombin) and antiphospholipid syndrome in women. The patients underwent an endometrial aspiration biopsy (Cornier-type cannula), during the secretory phase of the cycle prior to the transfer,to rule out the existence of a chronic endometritis and treat it if necessary. The AP study was carried out by a single observer,by means of microscopic study and subsequent use of immunohistochemistry to assess the presence of plasma cells.

**RESULTS:**

Of 101 cases founded,only 1 presented karyotype's alterations,and 10 patients presented some type of thrombophilia. The anatomo-pathological study (n=100) reported:

- Insufficient sample: 18 patients (18%)
- Organic pathology (endometrial polyp): 6 patients (6%)
- Secretory endometrium with neutrophils and eosinophils: 37 patients (37%)
- CD3 + lymphocytes without plasma cells: 39 patients (39%).

Understanding chronic endometritis as the persistent inflammation of the endometrial mucosa caused by bacterial pathogens and characterized by the presence under the microscope of abundant CD38+ plasma cells, none of our patients presented it. It's believed that the presence of microorganisms, and consequently,of cytokines and inflammatory mediators,can cause apoptosis of the trophoblast cells,making their implantation difficult,recommending prior antibiotic treatment.

**CONCLUSIONS:**

Despite the fact that chronic endometritis is an increasingly important entity in the failure of implantation, none of our patients presented this pathology after an exhaustive review of the samples. What is frequent is the existence of lymphocytes so it may be necessary to reach a consensus on the anatomopathological criteria and perform cultures of them to be able to talk about the same terms and compare the results.



## CERTIFICATE OF PRESENTATION

P-60

***Elena García García, Laura Barrero Real, Lucía Pérez Gallego, Miguel Ángel Ángel Miñarro, Victoria Pascual Escudero, Julio Gobernado Tejedor, Luis Rodríguez Tabernero, Ana Belén Casas Marcos, Emilio Bayón Álvarez, Jose María Fernández Gómez, Maria Concepción Del Pino Ortega***

have participated in the 8<sup>th</sup> International IVIRMA Congress held in Palma de Mallorca (Spain), from April 4<sup>th</sup> to 6<sup>th</sup>, 2019, with the abstracts titled:

**“IS CHRONIC ENDOMETRITIS A POSSIBLE ETIOLOGY OF THE REPEATED IMPLANTATION FAILURE?”**

DOCUMENT SIGNED DIGITALLY

**Juan Antonio García-Velasco**  
Chairman, Scientific Committee

**IS THE PRESENCE OF A LYMPHOCITARY INFILTRATION IN THE SCRATCH INJURY BENEFICIAL IN THE RECURRENT IMPLANTATION FAILURE?**

**INTRODUCTION:**

Recurrent implantation failure (RIF) represents an exclusion diagnosis. It is defined as no consecution of pregnancy in healthy women aged less than 40 years, after having transferred 4 or more good quality embryos, in at least 3 transfer procedures (including fresh ones and cryopreserved).

The success of an implantation lays in many factors, such as endometrium. Endometrial receptivity could be diminished because of anatomic, hormonal, genomic, molecular, infectious, inflammatory and immunological causes. Because of that, we consider that its anatomopathologic study becomes an important part of our treatment. We can perform either an hysteroscopy with directed biopsy or a blind one using a Cornier pipelle. As a side effect, this scratching seems to be productive in achieving pregnancy in our patients.

**MATERIAL AND METHODS:**

Retrospective, analytic study of RIF patients, diagnosed during IVF/ICSI cycles with embryo transfer (fresh or frozen), between January 2017 and December 2018 in Hospital Clínico de Valladolid Reproduction Unit. We collect complementary data (couple karyotype, thrombophilia study, pelvic ultrasonography). The endometrial biopsy with Cornier pipelle was performed in all our patients during secretory phase of previous cycle. Pathologists carry out a microscopic study and a immunohistochemical determination of citokeratins in order to evaluate the incidence of endometritis. We assembled data regarding type of embryos transferred and gestation rate.

**RESULTS:**

We included 65 patients with no history of trombophilias or intracavitary pathology suspected in US. After scratching technique, we achieved a gestation rate of 33.84%. In comparison with our pregnancy rate after 3 IVF cycles (without RIF diagnosis), this represented a significant improvement (18.58% p: 0.02). Considering the type of embryo transferred (39 fresh, 26 frozen), this positive trend persists but only reaches statistical significance in cryotransfer (38.46% pregnancy rate, p=0.03).

According to the pathological report, we didn't have any chronic endometritis, with plasmatic cells detected. We noted the presence of CD3+ lymphocytes in more than half of our biopsies (n=34), ignoring its clinical implications. 50% of gestations achieved have occurred in endometriums with lymphocitary infiltration, either in fresh embryo transfer or frozen ones.

**CONCLUSIONS:**

In RIF, endometrial scratching seems to improve gestation rate, keeping the trend in both fresh or frozen embryo transfer. Analyzing our results, we suggest that the presence of lymphocytes is related with more endometrial receptivity. Further studies are mandatory to explain properly this theory.



## CERTIFICATE OF PRESENTATION

P-58

***Laura Barrero Real, Elena García García, Lucía Pérez Gallego, Miguel Angel Angel Miñarro, Victoria Pascual Escudero, Julio Alberto Gobernado Tejedor, Luis Rodríguez-Tabernerero Martín, Ana Belen Casas Marcos, Emilio Manuel Bayón Alvarez, Juana María Molina Villar, Reyes Velázquez Barbado***

have participated in the 8<sup>th</sup> International IVIRMA Congress held in Palma de Mallorca (Spain), from April 4<sup>th</sup> to 6<sup>th</sup>, 2019, with the abstracts titled:

**“IS THE PRESENCE OF A LYMPHOCITARY INFILTRATION IN THE SCRATCH INJURY BENEFICIAL IN THE RECURRENT IMPLANTATION FAILURE?”**

DOCUMENT SIGNED DIGITALLY

**Juan Antonio García-Velasco**  
Chairman, Scientific Committee



## Estudio de la biopsia de endometrio en pacientes con fallo repetido de implantación en la Unidad de Reproducción del HCUV.



Ángel Miñarro MA, Barrero Real L.

Grado en Medicina. Universidad de Valladolid. Servicio de Obstetricia y Ginecología. Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

### INTRODUCCIÓN

El fallo repetido de implantación (FRI) se define como la no consecución del embarazo en mujeres <40 años, tras la transferencia de al menos 4 embriones de calidad, procedentes de dos ciclos de estimulación, en un mínimo de 3 transferencias. El éxito de una implantación depende de muchos factores, entre ellos el endometrio.

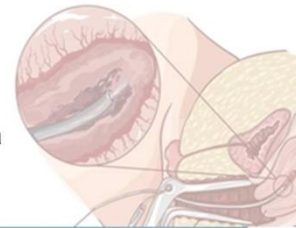


**Objetivo:** valorar la incidencia real de endometritis crónica en nuestra Unidad y estudiar si el scratch endometrial tiene un efecto beneficioso en la tasa de gestación.

### METODOLOGÍA

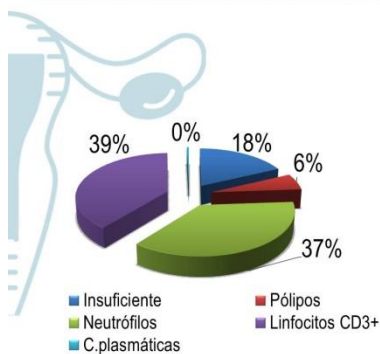
Estudio descriptivo, retrospectivo, analítico, de pacientes con FRI desde enero de 2017 hasta diciembre de 2018. En todas las parejas, se solicitó un estudio de FRI:

1. Estudio genético (cariotipos) de ambos miembros.
2. Estudio de trombofilias y síndrome antifosfolípido a la mujer.
3. Estudio ecográfico uterino.
4. Biopsia endometrial con cánula de Cornier en fase secretora para estudio anatómico-patológico: H&E e Inmunohistoquímica.



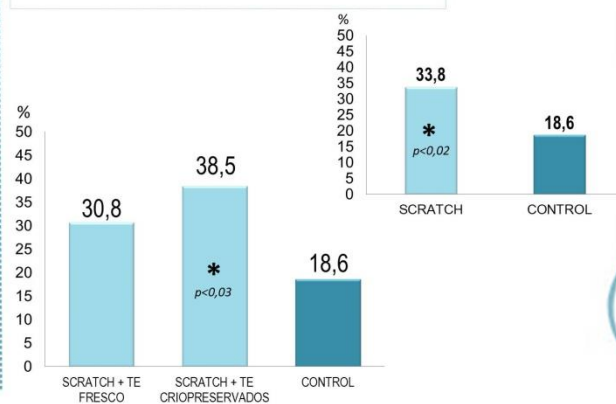
### RESULTADOS

Estudio de Anatomía Patológica (n=100)



% Gestación tras scratch endometrial (n= 65)

\* diferencias significativas en la tasa de embarazo con respecto al control.



### CONCLUSIONES

El scratch endometrial, mejora la tasa de gestación en nuestra población con FRI, manteniéndose el efecto tanto para transferencias de embriones en fresco como criotransferencias.

En ninguna de nuestras pacientes se encontró endometritis crónica (CD138+) tras una revisión exhaustiva de las muestras. Lo que es frecuente, es la existencia de un infiltrado linfocitario CD3+ en el endometrio que parece tener un efecto beneficioso en la receptividad endometrial, por lo que tal vez son necesarios más estudios para poder explicar estos resultados.