

Falha de Implantação nas Técnicas de Reprodução Assistida

Implantation Failure in Assisted Reproductive Technologies

Mario Cavagna^{1,2}, Dirceu Mendes-Pereira¹, Paolo E. Levi-Setti³, Edir Catafesta¹, Litsuko Shimabukuro¹, Moacir Netto Ladeira¹, Felipe Cavagna¹, João C. Mantese²

¹ PROFERT – Clínica de Reprodução Assistida, São Paulo, Brasil

² Programa de Pós-graduação em Saúde Materno-infantil,

Faculdade de Medicina da Universidade de Santo Amaro – UNISA, São Paulo, Brasil

³ Unità Operativa di Medicina della Riproduzione, Istituto Clinico Humanitas, Rozzano (MI), Italia

Correspondência para:

Mario Cavagna PROFERT- Reprodução Assistida
Av. Indianópolis, 395 04063-000 – São Paulo – SP – Brasil
mariocavagna@yahoo.it

ABSTRACT

The present study aims to review the major causes of implantation failure in assisted reproductive technologies. Diagnostic criteria and the possibility of various treatment options in order to improve implantation rates are considered.

Key words: embryo implantation, implantation failure, assisted reproductive technology

IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA

Entende-se por implantação o fenômeno pelo qual o blastocisto adquire uma posição estável no endométrio materno, mantendo com este um sistema constante de trocas metabólicas, dependendo o sucesso desse fenômeno de uma série de eventos que estabelecem de modo coordenado um diálogo

molecular entre o embrião e o endométrio (Tabibzadeh, 1998). A implantação é dividida em três fases: aposição, adesão e invasão. Na aposição, o blastocisto entra em contato com o sítio de implantação, seguindo-se a fase de adesão, na qual ocorre a aderência do blastocisto à decídua materna. Essas fases dependem de uma interação mediada por citocinas, fatores de crescimento e hormônios, que atuam dentro do período conhecido como janela de implantação. Nesse período, o endométrio apresenta a maior receptividade ao blastocisto, coincidindo com o aparecimento de organelas progesterona-dependentes chamadas de pinópodes (Nikas, 1999, 2000). A janela de implantação dura cerca de 48 horas e inicia-se aproximadamente no sétimo dia após o pico de LH (**Figura 1**).

No período da janela de implantação, ocorrem alterações na morfologia epitelial do endométrio, caracterizadas pelo aparecimento de projeções da

Recebido em: 13/12/2004
Avaliado e aceito em: 10/01/2005

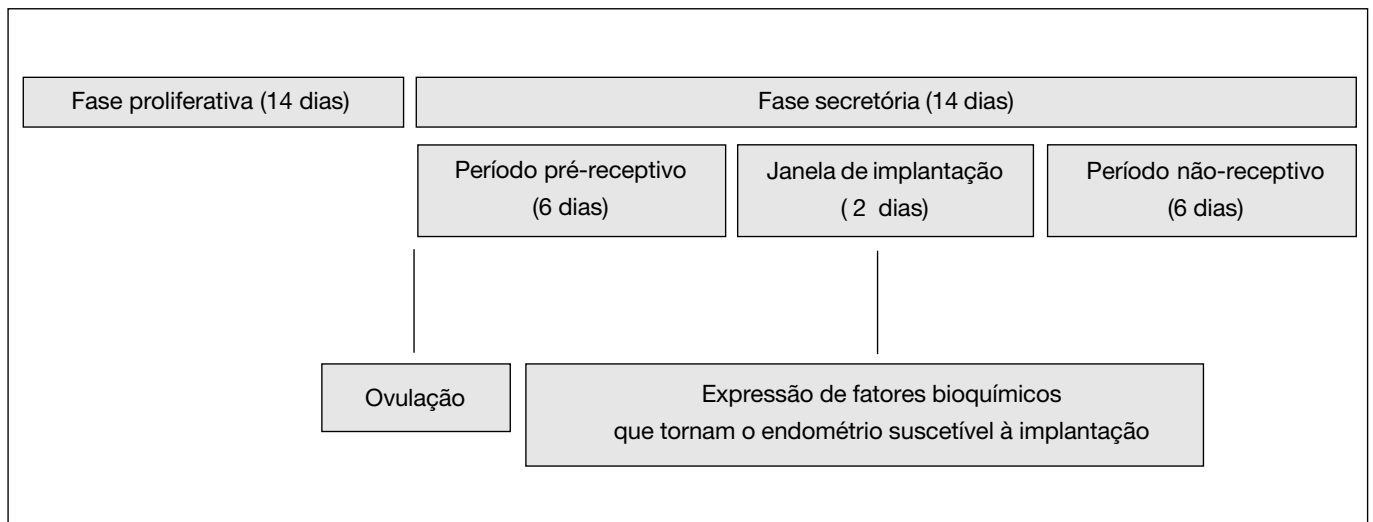


Figura 1. Receptividade endometrial no ciclo menstrual.

membrana denominadas pinópodes (Parr e Parr, 1974; Psychoyos e Martel, 1990; Nikas et al., 1995). Os pinópodes são organelas progesterona-dependentes, que aparecem como protrusões celulares entre os dias 20 e 21 de um ciclo menstrual normal (Beier e Beier-Hellwig, 1998; Nikas e Aghajanova, 2002). Os mecanismos dessas estruturas ainda não estão claros, mas tais estruturas podem evitar o “varrimento” dos blastocistos pelo aparelho ciliar e promover a retirada do fluido uterino, facilitando a aderência do blastocisto às moléculas dos pinópodes (Psychoyos e Nikas, 1994; Stavreus-Evers et al., 2002). Nos ciclos estimulados, os pinópodes aparecem mais precocemente, entre os dias 19 e 20, e nos ciclos artificiais aparecem entre os dias 21 e 22. Portanto, há uma variação nos dias do ciclo nos quais são formadas essas organelas, além de uma variação individual, que pode chegar a cinco dias (Nikas e Aghajanova, 2002). Nikas (2000) demonstrou que nos ciclos estimulados para reprodução assistida, a formação dos pinópodes pode variar entre os dias 18 e 22 (dia 14 = dia da aspiração folicular), e nos ciclos artificiais com administração exógena de estrogênios e progesterona, os pinópodes aparecem entre os dias P6 e P8 (P1 = dia de início da progesterona). Lessey (2000) investigou a dinâmica da expressão dos pinópodes e concluiu que os pinópodes não persistem por mais de 48 horas em todos os ciclos. Dessa forma, a detecção do aparecimento dos pinópodes pode ser útil na determinação do melhor momento para a transferência embrionária, sendo um potencial marcador biológico da receptividade endometrial (Nikas, 2000).

IMPLANTAÇÃO E TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

A falha de implantação é o fator mais importante que limita a obtenção de uma gravidez e influencia

negativamente os resultados das técnicas de reprodução assistida (TRA) (Edwards, 1995; Herrler et al., 2003). Em reprodução assistida, costuma-se definir falhas repetidas de implantação (RIF) como a ausência de gravidez em três ou mais transferências de embriões, desde que estes tenham boa qualidade definida morfollogicamente (Munné, 2003). Entretanto, visando interesses clínicos, preferimos considerar como RIF a ausência de gravidez em duas transferências de embriões, desde que tenham sido transferidos, em cada ciclo, pelo menos três embriões de boa qualidade. Isso porque, feito o diagnóstico de RIF, se fazem necessárias medidas investigativas e terapêuticas que visem melhorar o prognóstico em um próximo ciclo, e a espera de três insucessos não atende aos interesses do casal infértil.

A qualidade embrionária e a receptividade endometrial, mediada por marcadores biológicos, hormonais e genéticos, são os fatores dos quais depende o fenômeno da implantação (Cavagna e Mantese, 2003). Abordaremos algumas situações que podem interferir nesses fatores: estimulação ovariana, alterações na cavidade endometrial, presença de hidrossalpinge, contratilidade endometrial, fatores imunológicos, *hatching* assistido, transferência de blastocistos, diagnóstico genético pré-implantacional e técnicas de transferência embrionária.

ESTIMULAÇÃO OVARIANA

Nos ciclos de TRA, o primeiro agravante no que se refere à receptividade endometrial é a estimulação ovariana: os altos níveis de estradiol que decorrem desse processo, habitualmente superiores a 3.000 pg/ml, embora não afetem a qualidade embrionária mostram-se prejudiciais à receptividade endometrial (Simon et al., 1995; Valbuena et al., 1999). Consideramos que o primeiro passo para a obtenção

de sucesso na implantação reside em um esquema de estimulação ovariana que não leve a concentrações de estradiol superiores a 3.000 pg/ml e que não tenha uma fase folicular prolongada. Algumas dúvidas surgiram com o emprego dos antagonistas do GnRH para a prevenção da luteinização prematura, tendo sido postulado que tais medicamentos poderiam ter efeito deletério sobre a implantação embrionária (Devaux et al., 2004). Entretanto, até o presente momento, não há evidências comprovadas de que os antagonistas possam prejudicar a implantação. Recentemente, Kolibianakis et al. (2004) demonstraram que, com o emprego de gonadotrofinas recombinantes e antagonistas do GnRH, o prolongamento da fase folicular está associado a uma menor taxa de gravidez, embora não se note alteração na qualidade embrionária. Esses autores preconizam a administração de hCG tão logo se verifique a presença de três folículos³ de 17 mm.

AValiação DA CAVIDADE ENDOMETRIAL

Pólipos, miomas submucosos e processos inflamatórios que acometem a cavidade endometrial podem ser responsáveis por falhas de implantação após a transferência embrionária. A cavidade endometrial pode ser avaliada por meio de ultra-sonografia, histerossalpingografia, histerossonografia e histeroscopia. Muitos consideram a histeroscopia como padrão-ouro no diagnóstico de anormalidades na cavidade endometrial, embora seja um exame relativamente invasivo e nem sempre passível de ser realizado em ambulatório. O emprego rotineiro da histeroscopia em pacientes que serão submetidas a TRA é discutível, havendo argumentos favoráveis e contrários. Oliveira et al. (2003) encontraram alta incidência de achados anormais à histeroscopia em pacientes com RIF. Schiano et al. (1999) preconizam a realização obrigatória de histeroscopia quando esta ainda não tenha sido feita, com duas falhas de implantação em ciclos de TRA, conduta com a qual concordamos inteiramente.

HIDROSSALPINGE

A presença de hidrossalpinge, pela ação embriotóxica do fluido represado nas tubas, pode afetar negativamente o processo de implantação embrionária; existem, porém, discussões com relação à conduta a ser tomada. Há controvérsias quanto à realização rotineira da salpingectomia em mulheres com hidrossalpinge antes de um procedimento de reprodução assistida (Johnson et al., 2001). Investigações recentes sugerem que a salpingectomia prévia às TRA seria de grande benefício em mulheres com hidrossalpinge (Hammadieh et al., 2004). Acreditamos que, conforme preconizado pelo estudo multicêntrico escandinavo de Strandell e Lindhard (2000), mulheres que apresentem hidrossalpinge visível à ultra-sonografia antes da estimulação ovariana devem ser sub-

metidas a salpingectomia, preferivelmente por via laparoscópica. Consideramos, em concordância com Hinckley e Milki (2003), que a drenagem da hidrossalpinge com agulha não traz benefícios, em virtude do rápido reacúmulo de líquido tubário que se verifica após o procedimento.

CONTRATILIDADE UTERINA

Postula-se que os altos níveis estrogênicos obtidos com a estimulação ovariana controlada possam aumentar a contratilidade uterina, o que pode se tornar prejudicial à implantação embrionária (Fanchin et al., 1998; Lesny et al., 1999). Além disso, as técnicas de transferência de embriões podem promover contrações uterinas, especialmente se houver dificuldades ou se o cateter tocar o fundo do útero. Tsirigotis et al. (2000) estudaram os efeitos da ritodrina, um agonista b2- adrenérgico, no período periimplantacional, concluindo que tal procedimento aumenta as taxas de implantação. Entretanto, mais recentemente, Pinheiro et al. (2003), em estudo randomizado e com casuística maior, compararam as taxas de gravidez e implantação com o uso de terbutalina, ritodrina e placebo no período periimplantacional, não observando diferenças significativas nos resultados entre os três grupos. Da mesma forma, outras investigações mostram que o emprego de inibidores da prostaglandina não melhora as taxas de implantação (Bernabeu et al., 2004). Assim, acreditamos não haver evidências aceitáveis para o emprego de medicamentos inibidores da contratilidade uterina no período da implantação embrionária.

FATORES IMUNOLÓGICOS

É possível que fatores imunológicos atuem no processo de implantação, e a presença de anticorpos antifosfolípidos, antinucleares e antitireoidianos pode estar envolvida na gênese das falhas de implantação (Kutteh, 2002). Atualmente, os maiores estudos dizem respeito à chamada síndrome antifosfolípide, que é uma doença sistêmica caracterizada por trombose venosa e arterial, abortamentos recorrentes, morte fetal e infertilidade, havendo a presença de anticorpos antifosfolípidos (Vinatier et al., 2001). Os principais anticorpos que devem ser investigados são o anticoagulante lúpico e a anticardiolipina. A presença desses anticorpos em pacientes com RIF justifica a terapia com heparina, que, além de seu efeito anticoagulante, parece estar envolvida nos processos de adesão e invasão do blastocisto no endométrio materno. O tempo de tratamento com heparina, nesses casos, não deve ser menor do que 14 dias (Fiedler e Wurfel, 2004).

O HATCHING ASSISTIDO

O *hatching* assistido consiste na abertura da zona pelúcida do embrião, efetuada em laboratório. Para isso, são utilizados métodos mecânicos, químicos e o *laser*; atualmente, este último é o método prefe-

rido pela maioria dos laboratórios de reprodução assistida (Baruffi et al., 2000). O *hatching* assistido facilita a saída do embrião da zona pelúcida, favorecendo sua implantação. A maioria das investigações relata que não se justifica a utilização rotineira do *hatching* laboratorial; entretanto, as mulheres com mau prognóstico para implantação, devido a idade, zona pelúcida espessada e falhas repetidas de implantação, apresentam melhores resultados, em termos de taxas de gravidez e implantação, após a realização do *hatching* (Magli et al., 1998; De Vos e Van Steirteghem, 2000; Frydman, 2004; Sallam, 2004). O *hatching* assistido com diodo a *laser* pode ser realizado por meio das técnicas de abertura completa ou de afinamento de um quarto da zona pelúcida. Nosso grupo encontrou resultados semelhantes com ambas as técnicas em pacientes com mau prognóstico para implantação (Cavagna et al., 2002). Recentemente, Petersen et al. (2004), em estudo prospectivo e randomizado, concluíram que a técnica de afinamento da zona pelúcida é um método eficiente para melhorar as taxas de gravidez em mulheres com falhas repetidas de implantação.

Em conclusão, a técnica do *hatching* assistido laboratorialmente mostra-se de grande importância no arsenal terapêutico de mulheres com falhas de implantação nas técnicas de reprodução assistida.

A TRANSFERÊNCIA DE BLASTOCISTOS

Com o desenvolvimento de condições de cultura que permitem o desenvolvimento *in vitro* de embriões até blastocistos, surgiu uma nova e importante perspectiva nas TRA. A transferência de embriões no estágio de blastocisto colocou-se como vantajosa em relação à transferência mais precoce, pela sincronização do desenvolvimento embrionário com o endométrio (Utsonomyia et al., 2002) e a identificação dos embriões com maior potencial de implantação (Gardner et al., 1998), culminando com melhores taxas de gravidez e implantação (Gardner e Lane, 1998). Muitas outras investigações surgiram enfatizando as vantagens da cultura embrionária até blastocisto, que poderia ser responsável por um aumento nas taxas de implantação (Cruz et al., 1999; Schoolcraft et al., 1999; Ladeira et al., 2002; Gardner et al., 2004). Atualmente, o melhor momento da transferência ainda permanece como motivo de controvérsias, inclusive devido à possibilidade de determinação eficiente da qualidade embrionária em estágios iniciais de desenvolvimento. De los Santos et al. (2003), utilizando o modelo de doação de oócitos, estudaram as taxas de implantação com embriões em estágio inicial de desenvolvimento e com blastocistos. Esses autores mostraram que quando há menos de três embriões de sete células no terceiro dia, a transferência de blastocistos não melhora as ta-

xas de gravidez em evolução; entretanto, se houver três ou mais embriões de sete células no terceiro dia, a transferência de blastocistos aumenta as taxas de gravidez e implantação em relação à transferência no terceiro dia (65,6 *versus* 50,6% e 37,4 *versus* 24,7%). Vale referir que Shapiro et al. (2001) verificaram que as taxas de implantação caem com repetidas transferências de blastocistos: 30% no primeiro ciclo, 18% no segundo e 8% no terceiro ciclo de transferência. A cultura até blastocisto, portanto, representa uma alternativa para melhorar as taxas de implantação, embora não deva ser considerada como fundamental para o manuseio das falhas repetidas de implantação.

ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS

As aneuploidias representam causa importante de falha de implantação; dessa forma, a identificação de embriões cromossomicamente anormais, que seriam descartados para a transferência, poderia melhorar as taxas de sucesso nas TRA (Munné et al., 1993). A identificação de aneuploidias é feita pelo diagnóstico genético pré-implantacional (PGD), mediante a análise de um blastômero ou do corpúsculo polar. A hibridização *in situ* (FISH) por fluorescência permite realizar a enumeração cromossômica nos núcleos das células em interfase sem a necessidade de culturas celulares (Munné, 2003). Atualmente, podem ser utilizadas de modo simultâneo sondas para os cromossomos X, Y, 13, 14, 15, 16, 18, 21 e 22 (Bahçe et al., 2000).

O PGD normalmente é oferecido a casais com risco de transmissão de doenças genéticas para a prole. Porém, nas TRA também pode ser indicado nos casos de idade materna avançada. Gianaroli et al. (2003) realizaram o PGD em 2.231 embriões obtidos em 435 ciclos de reprodução assistida em mulheres³ 36 anos de idade, observando apenas 688 embriões cromossomicamente normais (31%) e 1.543 (69%) com anomalias cromossômicas incompatíveis com a implantação. Além disso, os mesmos autores salientam que nas falhas de implantação repetidas e nos casos de abortamento recorrente o emprego do PGD pode ter indicação precisa. Recentemente, Turkaspa et al. (2004), avaliando 432 gestações advindas de fertilização *in vitro* nas quais foi realizado o PGD, concluíram que o PGD aumenta significativamente as taxas de sucesso das TRA. Dessa forma, deve ser oferecido aos casais não só para melhorar os resultados das TRA, mas também para permitir a transferência de apenas um ou dois embriões, evitando, assim, as gestações múltiplas.

A TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA

A transferência de embriões (ET) para o útero, realizada por via transcervical, é a etapa final das técni-

cas de reprodução assistida (TRA). É realizada, normalmente, após 48 a 72 horas da inseminação dos oócitos, com a paciente em posição de litotomia, podendo ser utilizada a visualização ultra-sonográfica abdominal para acompanhar o procedimento.

A ET é realizada, geralmente, na mesma sala onde se faz a aspiração folicular, visando-se reduzir o tempo de permanência dos embriões fora das condições de cultura e obter condições de esterilidade e controle da toxicidade ambiental (Hill, 2001). Entretanto, trabalho realizado em nosso meio relata os mesmos resultados quando a ET é realizada em local afastado do laboratório de gametas (Cavagna et al., 2001). Ressalte-se, porém, que a permanência prolongada dos embriões no cateter acarreta esfriamento e acidificação do meio de cultura, com um impacto negativo sobre a possibilidade de implantação embrionária. Mais de 80% das mulheres que se submetem a TRA chegam à transferência de pelo menos um embrião, mas somente cerca de 5 a 40% obtêm uma gravidez. Calcula-se que a idade da mulher e a qualidade oocitária participem em mais de 40% no sucesso da implantação; a qualidade do laboratório de embriologia, a experiência dos médicos, a escolha dos meios de cultura e o controle adequado das condições de toxicidade ambiental participam em outros 40%, enquanto os 20% restantes são decididos no momento da ET (Naaktgeboren et al., 1998).

A técnica de ET, a escolha do cateter utilizado, a experiência do profissional, a necessidade de repouso após a transferência, a colonização bacteriana do colo, a visão ecográfica e a transferência de prova são alguns fatores em torno dos quais se pode abrir uma discussão (Cavagna et al., 2004). O conhecimento prévio do tamanho e da posição do útero, por exemplo, pode propiciar melhores resultados e reduzir as taxas de gestação ectópica. A padronização da técnica de transferência embrionária em um amplo estudo randomizado faz-se necessária para que conclusões definitivas sejam apresentadas; justificam-se esforços nesse sentido para que melhores taxas de implantação e gravidez possam ser obtidas (Levi-Setti et al., 2003).

DROGAS VASODILATADORAS

Recentemente, o grupo espanhol de Valencia apresentou relato de 16 pacientes com falhas de implantação anteriores que foram submetidas a novo ciclo de TRA, recebendo 100 mg de sildenafila duas vezes ao dia nos primeiros quatro dias de estimulação ovariana, observando uma taxa de gravidez por ciclo de 37,5% e uma taxa de gravidez por transferência de 40% (Vidal et al., 2004). Obviamente, estudos mais amplos são necessários, mas abre-se uma perspectiva interessante no manuseio das falhas repetidas de implantação.

CONCLUSÕES

Com relação a falhas de implantação em ciclos de TRA, podemos concluir:

- A estimulação ovariana deve merecer particular atenção no sentido de se evitarem altas concentrações de estradiol e fases foliculares prolongadas.
- A boa qualidade embrionária e a presença de uma boa coorte de embriões nas fases iniciais da clivagem influenciam positivamente as taxas de implantação.
- Com duas falhas de implantação, indica-se a avaliação histeroscópica da cavidade endometrial caso esta ainda não tenha sido realizada.
- A cultura até blastocistos pode aumentar as taxas de implantação.
- Medicamentos como β -adrenérgicos e inibidores de prostaglandinas não aumentam as taxas de implantação.
- Quando a hidrossalpinge for visível à ultra-sonografia antes da estimulação ovariana, deve ser realizada a salpingectomia.
- A pesquisa de anticorpos antifosfolípidos e eventual terapia com heparina podem ajudar no aumento das taxas de implantação e evitar abortamentos de repetição.
- O PGD pode ser considerado importante arma para aumentar a eficiência das TRA, especialmente nas falhas de implantação repetidas.
- A transferência embrionária deve ser considerada etapa crucial nas TRA, influenciando significativamente as taxas de gravidez e implantação.

RESUMO

O presente trabalho tem por objetivo fazer uma revisão das principais causas de falhas de implantação nas técnicas de reprodução assistida, bem como avaliar as possíveis alternativas diagnósticas e terapêuticas que podem ser utilizadas para melhorar as taxas de implantação.

Unitermos: implantação embrionária, falha de implantação, técnicas de reprodução assistida.

REFERÊNCIAS

1. Bahçe M, Escudero T, Sandalinas M, Morrison L, Legator M, Munné S. Improvements of preimplantation diagnosis of aneuploidy by using microwave-hybridization, ceel recycling and monocolor labeling of probes. *Molec Human Reprod*, 9: 849-854, 2000.
2. Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Ferreira RC, Coelho J, Franco JG Jr. Zona thinning with noncontact diode laser in patients aged \geq 37 years with no previous failure of implantation: a prospective randomized study. *J Assist Reprod Genet*, 17: 557-560, 2000.
3. Beier HM, Beier-Hellwig K. Molecular and cellular aspects of endometrial receptivity. *Hum Reprod Update*, 4: 448-458, 1998.
4. Bernabeu R, Ariza N, Roca M, Ten J, Garrido E, Torres A. Indomethacin effect on implantation rates in oocytes receptors. *Hum Reprod*, 19(Suppl. 1): i59, 2004.
5. Cavagna M, Levi-Setti PE, Mantese JC, Cavagna F, Albani E, Baggiani A, Zannoni E, Negri L. A transferência de embriões nas técnicas de reprodução assistida. *J Bras Reprod Assist*, 8: 26-31, 2004.
6. Cavagna M, Mantese JC. Biomarkers of the endometrial receptivity – A Review. *Placenta*, 24 (Suppl.B): S39-S47, 2003.
7. Cavagna M, Mendes-Pereira D, Shimabukuro L, Catafesta E, Ladeira MN, Aranki JT. Taxas de gravidez e implantação com o emprego de

- hatching assistido em pacientes com prognóstico desfavorável para gravidez: comparação entre as técnicas de afinamento e abertura da zona pelúcida com diodo laser. *Reproducción Humana*, 2: 21-25, 2002.
8. Cavagna M, Mendes-Pereira DH, Shimabukuro L, Catafesta E, Giacobbe M, Ladeira MN, Aranki JT. A transferência de embriões em local não contíguo ao laboratório de gametas não altera as taxas de gravidez. *J Bras Reprod Assist*, 5: 99-101, 2001.
9. Cruz JR, Dubey AK, Patel J, Peak D, Hartog B, Gindoff PR. Is blastocyst transfer useful as an alternative treatment for patients with multiple in vitro fertilization failures? *Fertil Steril*, 72:218-220, 1999.
10. De los Santos MJ, Mercader A, Galan A, Albert C, Romero JL, Pellicer A. Implantation rates after two, three, or five days of embryo culture. *Placenta*, 24 (Suppl. B): S13-S19, 2003.
11. De Vos A, Van Steirteghem A. Zona hardening, zona drilling and assisted hatching: new achievements in assisted reproduction. *Cells Tissues Organs*, 166:220-227, 2000.
12. Devaux A, Pouly JL, Bachelot A, Mourouvin Z, de Mouzon J. Biological effects of GnRH antagonists. *Gynecol Obstet Fertil*, 32:741-747, 2004.
13. Edwards RG. Clinical approaches to increasing uterine receptivity during human implantation. *Hum Reprod*, 10 (Suppl. 2): 60-66, 1995.
14. Fanchin R, Righini C, Olivennes F, Taylor S, Ziegler D, Frydman R. Uterine contractions at the time of embryo transfer alter pregnancy rates after in-vitro fertilization. *Hum Reprod*, 13:1968-1974, 1998.
15. Fiedler K, Wurfel W. Effectivity of heparin in assisted reproduction. *Eur J Med Res*, 9(4):207-214, 2004.
16. Frydman N. Assisted hatching: procedure and effectiveness. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 33(1 Pt 2):S25-S28, 2004.
17. Gardner DK, Lane M. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Hum Reprod*, 13(Suppl 3):148-159, 1998.
18. Gardner DK, Surrey E, Minjarez D, Leitz A, Stevens J, Schoolcraft WB. Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertil Steril*, 81:551-555, 2004.
19. Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril*, 69:84-88, 1998.
20. Gianaroli L, Magli MC, Fiorentino F, Baldi M, Ferraretti AP. Clinical value of preimplantation genetic diagnosis. *Placenta*, 24 (Suppl. B): S77-S83, 2003.
21. Hammadieh N, Afnan M, Evans J, Sharif K, Amso N, Olufowobi O. A postal survey of hydrosalpinx management prior to IVF in the United Kingdom. *Hum Reprod*, 19:1009-1012, 2004.
22. Herrler A, Von Rango U, Beier HM. Embryo-maternal signaling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation. *Reprod Biomed Online*, 6:244-256, 2003.
23. Hill DL. Role of the in vitro fertilization laboratory in a negative pregnancy outcome. *Fertil Steril*, 75:249-251, 2001.
24. Hinckley MD, Milki AA. Rapid reaccumulation of hydrometra after drainage at embryo transfer in patients with hydrosalpinx. *Fertil Steril*, 80(5):1268-1271, 2003.
25. Johnson NP, Mak W, Sowter MC. Surgical treatment for tubal disease in women due to undergo in vitro fertilization. *Cochrane Database Syst Rev*, 3: CD002125, 2001.
26. Kolibianakis EM, Albano C, Camus M, Tournaye H, Van Steirteghem AC, Devroey P. Prolongation of the follicular phase in in vitro fertilization results in a lower ongoing pregnancy rate in cycles stimulated with recombinant follicle-stimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Fertil Steril*, 82:102-107, 2004.
27. Kutteh WH. Autoimmune factors in assisted reproduction. *Minerva Ginecol*, 54:217-224, 2002.
28. Ladeira MN, Shimabukuro L, Maciel MCR, Aranki JT, Catafesta E, Mendes-Pereira D, Cavagna M. Comparação entre as taxas de gestação obtida com embriões transferidos no 3º e no 5º dia de cultura "in vitro". *Reprod Climat*, 17:94-96, 2002.
29. Lesny P, Killick SR, Robinson J, Raven G, Maguiness SD. Junctional zone contractions and embryo transfer: is it safe to use a tenaculum? *Hum Reprod*, 9:2367-2370, 1999.
30. Lessey BA. The role of the endometrium during embryo implantation. *Hum Reprod*, 15 (Suppl. 6):39-50, 2000.
31. Levi Setti PE, Albani E, Cavagna M, Bulletti C, Colombo GV, Negri L. The impact of embryo transfer on implantation - a review. *Placenta*, 24 (Suppl. B):S20-S26, 2003.
32. Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Fortini D, Aicardi G, Montanaro N. Rescue of implantation potential in embryos with poor prognosis by assisted zona hatching. *Hum Reprod*, 13(5):1331-1335, 1998.
33. Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod*, 8(12):2185-2191, 1993.
34. Munné S. Preimplantation genetic diagnosis and human implantation - A review. *Placenta*, 24(Suppl. B):S70-S76, 2003.
35. Naaktgeboren N, Dieben S, Heijnsbroek I. Embryo transfer: easier said than done. *Fertil Steril*, 70:S352, 1998.
36. Nikas G, Aghajanova L. Endometrial pinopodes: some more understanding on human implantation? *Reprod Biomed Online*, 4 (Suppl. 3):18-23, 2002.
37. Nikas G, Drakakis P, Loutradis D, Mara-Skoufari C, Koumantakis E, Michalas S, Psychoyos A. Uterine pinopodes as markers of "nidation window" in cycling women receiving exogenous oestradiol and progesterone. *Hum Reprod*, 10:1208-1213, 1995.
38. Nikas G. Endometrial receptivity: changes in cell-surface morphology. *Sem Reprod Med*, 18:229-235, 2000.
39. Nikas G. Pinopodes as markers of endometrial receptivity in clinical practices. *Hum Reprod*, 14 (Suppl.2):99-106, 1999.
40. Oliveira FG, Abbelmassih VG, Diamond MP, Dozortsev D, Nagy ZP, Abdelmassih R. Uterine cavity findings and hysteroscopic interventions in patients undergoing in vitro fertilization - embryo transfer who repeatedly cannot conceive. *Fertil Steril*, 80:1371-1375, 2003.
41. Parr MB, Parr EL. Uterine luminal epithelium: protrusions mediate endocytosis, not apocrine secretion, in the rat. *Biol Reprod*, 11:220-233, 1974.
42. Petersen CG, Mauri AL, Baruffi RLR, Oliveira JBA, Franco Jr. JG. Implantation failure: success with quarter laser zona thinning assisted hatching. *Hum Reprod*, 19(Suppl. 1): i58, 2004.
43. Pinheiro OL, Cavagna M, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen C, Franco JG Jr. Administration of beta2-adrenergic agonists during the peri-implantation period does not improve implantation or pregnancy rates in intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles. *J Assist Reprod Genet*, 20:513-516, 2003.
44. Psychoyos A, Martel D. Receptivité uterine pout l'ovoimplantationet microscopie electronique a balayage. *Rech Gynecol*, 2:116-118, 1990.
45. Psychoyos A, Nikas G. Uterine pinopodes as markers of uterine receptivity. *Assist Reprod Rev*, 4:26-32, 1994.
46. Sallam HN. Assisted hatching. *Minerva Ginecol*, 56:223-234, 2004.
47. Schiano A, Jourdain O, Papaxanthos A, Hocke C, Horovitz J, Dally D. The value of hysteroscopy after repeated implantation failures with in vitro fertilization. *Contracept Fertil Sex*, 27:129-132, 1999.
48. Schoolcraft WB, Gardner DK, Lane M, Schlenker T, Hamilton F, Meldrum DR. Blastocyst culture and transfer: analysis of results and parameters affecting outcome in two in vitro fertilization programs. *Fertil Steril*, 72:604-609, 1999.
49. Shapiro BS, Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST. Dramatic declines in implantation and pregnancy rates in patients who undergo repeated cycles of in vitro fertilization with blastocyst transfer after one or more failed attempts. *Fertil Steril*, 76:538-542, 2001.
50. Simón C, Frances A, Lee BY, Mercader A, Huynh T, Remohi J, Polan ML, Pellicer A. Immunohistochemical localization, identification and regulation of the interleukin-1 receptor antagonist in the human endometrium. *Hum Reprod*, 10:2472-2477, 1995.
51. Stavros-Evers A, Aghajanova L, Brismar H, Eriksson H, Landgren BM, Hovatta O. Co-existence of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and pinopodes in human endometrium at the time of implantation. *Mol Hum Reprod*, 8:765-769, 2002.
52. Strandell A, Lindhard A. Hydrosalpinx and ART. Salpingectomy prior to IVF can be recommended to a well-defined subgroup of patients. *Hum Reprod*, 15(10):2072-2074, 2000.
53. Tabibzadeh S. Molecular control of implantation window. *Hum Reprod Update*, 4:465-471, 1998.
54. Tsigotis M, Pelekanos M, Gilhespié S, Gregorakis S, Pistofidis G. Ritodrine use during the peri-implantation period reduces uterine contractility and improves implantation and pregnancy rates post IVF. *Hum Reprod, Abstracts*, 16th Annual Meeting ESHRE, O-24, 2000.
55. Turkaspa I, Cieslak J, Morris R, Taranis M, Kuliev A, Verlinsky Y. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) for aneuploidy significantly improves ART and pregnancies outcome. *Fertil Steril*, 82(Suppl. 2):S28, 2004.
56. Utsunomiya T, Naitou T, Nagaki M. A prospective trial of blastocyst culture and transfer. *Hum Reprod*, 17:1846-1851, 2002.
57. Valbuena D, Jasper M, Remohi J, Pellicer A, Simón C. Ovarian stimulation and endometrial receptivity. *Hum Reprod*, 14(Suppl. 2):107-111, 1999.
58. Vidal C, Crespo J, Bellver J, Bosch E, Remohi J, Pellicer A. Sildenafil improves reproduction outcome in bad prognosis patients. *Fertil Steril*, 82(Suppl. 2):S241, 2004.
59. Vinatier D, Dufour P, Cosson M, Houpeau JL. Antiphospholipid syndrome and recurrent miscarriages. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 96:37-50, 2001.