



UNIVERSIDADE DO PORTO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR

Dissertação – Artigo de revisão bibliográfica

**BIOMARCADORES DE RECETIVIDADE ENDOMETRIAL E
IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA**

Vera Adelaide de Jesus Cardoso Santos Felisberto
| Mestrado Integrado em Medicina |

Porto, 2015

Dissertação – Artigo de Revisão Bibliográfica

Mestrado Integrado em Medicina

Ano letivo 2014/2015

BIOMARCADORES DE RECETIVIDADE ENDOMETRIAL E IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA

Vera Adelaide de Jesus Cardoso Santos Felisberto¹

Orientadora: Dr.^a Isabel Sousa Pereira²

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto

Endereço: Rua de Jorge Viterbo Ferreira n. 228, 4050-313, Porto

¹ Aluna do 6.º ano profissionalizante do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar,

Universidade do Porto; número de aluno: 201006089

Endereço eletrónico: vera.felisberto@gmail.com

² Professora auxiliar convidada do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar,

Universidade do Porto; Assistente hospitalar do Centro Hospitalar do Porto –

Maternidade de Júlio Dinis

Tese redigida de acordo com as regras preconizadas pela Comissão de Vancouver.

Texto redigido ao abrigo do novo acordo ortográfico em vigor.

RESUMO

O endométrio é um dos tecidos mais fascinantes do corpo humano. A sua grande finalidade é permitir a implantação embrionária durante uma curta janela de oportunidade que ocorre em cada ciclo menstrual. A recetividade endometrial durante essa janela de implantação requer uma coordenação subtil entre variadíssimos fatores. Têm sido identificados, até à data, um grande número de mediadores moleculares, incluindo, moléculas de adesão, citocinas, fatores de crescimento, entre outros. Adicionalmente, um grande número de estudos tem-se focado em alvos genómicos, proteómicos e lipidómicos. Apesar das limitações atuais no conhecimento acerca da recetividade endometrial, a compreensão da função dos biomarcadores de recetividade endometrial e o seu papel na determinação da janela de implantação, ajudar-nos-á a diagnosticar e tratar a infertilidade de um modo mais eficiente. O objetivo desta revisão é destacar certos grupos de biomarcadores apontados como tendo um papel fundamental no mecanismo de implantação.

Palavras-chave: recetividade endometrial, implantação embrionária, biomarcadores, infertilidade

ABSTRACT

The endometrium is one of the most fascinating tissues in the human body. Its sole purpose is to enable implantation of an embryo during a relatively short window of opportunity in the menstrual cycle. Endometrial development resulting in endometrial receptivity during the window of implantation requires the subtle collaboration of an extremely large number of different factors. A large number of molecular mediators have been identified to date, including adhesion molecules, cytokines, growth factors and others. And a large number of studies have focused on genomic, proteomic and lipidomic targets. Although our knowledge of endometrial receptivity is limited, understanding the function of biomarkers of endometrial receptivity and their role in determining the implantation window, will help us to diagnose and treat infertility more efficiently. The purpose of this review is to provide a discussion of certain groups of molecules that are considered to have key roles in the mechanism of implantation.

Key Words: endometrial receptivity, embryo implantation, biomarkers, infertility

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	6
LISTA DE SIGLAS	7
INTRODUÇÃO	8
MECANISMO DE IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA	9
A RECETIVIDADE ENDOMETRIAL COMO UM FATOR DETERMINANTE DA FERTILIDADE	10
AVALIAÇÃO CLÍNICA DA FUNÇÃO ENDOMETRIAL	11
ANÁLISE ULTRASSÓNICA DO ENDOMÉTRIO	11
ANÁLISE DA FUNÇÃO SECRETÓRIA	12
ANÁLISE DE BIÓPSIAS ENDOMETRIAIS	13
BIOMARCADORES DE RECETIVIDADE ENDOMETRIAL	13
MARCADORES MORFOLÓGICOS DE RECETIVIDADE ENDOMETRIAL	14
MARCADORES MOLECULARES DE RECETIVIDADE ENDOMETRIAL	14
OUTROS POSSÍVEIS BIOMARCADORES DE RECETIVIDADE ENDOMETRIAL	18
AVANÇOS RECENTES NA COMPREENSÃO DE NOVOS MARCADORES DE RECETIVIDADE ENDOMETRIAL	20
ESTUDOS GENÓMICOS E TRANSCRIPTÓMICOS	20
ESTUDOS PROTEÓMICOS	21
ESTUDOS LIPIDÓMICOS	23
MIRNA	24
CONCLUSÃO	25

AGRADECIMENTOS

À Dr.^a Isabel Sousa Pereira, pela generosidade com que aceitou o meu pedido, pela sua experiência e conhecimento, pela disponibilidade que sempre demonstrou e pela orientação que me proporcionou.

LISTA DE SIGLAS

CAM - Moléculas de Adesão Celular

CNTF - Fator Neurotrófico Ciliar

CT-1 - Cardiotrofina 1

ERA - *Endometrial receptivity array*

FIV - Fertilização *in Vitro*

hCG - Hormona Gonadotrofina Coriônica Humana

ICAM-1 - *intercellular adhesion molecule*

IL-6 - Interleucinas-6

LIF – *Leukaemia Inhibitory Factor*

miRNA - MicroRNA

MUC-1- Mucin-1

MUC-6 – Mucin-6

OSM - Oncostatina M

pET - Transferência Personalizada de Embriões

PG- Prostaglandinas

PP14- Proteína Placentária 14 ou Glicodelina A

r-hLIF - LIF recombinante humano

RIF - *Recurrent Implantation Failure*

RPL - *Recurrent Pregnancy Loss*

sICAM-1- *soluble form of ICAM-1*

INTRODUÇÃO

A implantação embrionária é considerada a etapa mais crítica do processo reprodutivo em muitas espécies, incluindo a espécie humana. Consiste num fenómeno biológico único em que o blastocisto se liga intimamente ao endométrio uterino para formar a placenta (trofoblasto) e prosseguir o desenvolvimento embrionário (embrioblasto) ^[1,2].

Uma implantação bem-sucedida depende de dois fatores importantes: a qualidade do embrião e a recetividade do endométrio, ambos responsáveis pela interação materno-embrionária necessária para a adesão e invasão do blastocisto no endométrio ^[1,4].

O comprometimento da recetividade uterina é uma das principais razões de insucesso das técnicas de reprodução assistida, sendo o fenómeno da implantação considerado o fator mais limitante no estabelecimento de uma gravidez e, conseqüentemente, uma causa major de infertilidade ^[3,5].

O valor médio da taxa de implantação nos ciclos de FIV, de acordo com vários estudos publicados, é cerca de 25% ^[1,37]. Da totalidade dos casos de insucesso na implantação, estima-se que cerca de dois terços serão causados por uma recetividade uterina inadequada, sendo apenas um terço associado ao embrião, cuja qualidade tem vindo a ser otimizada pela evolução das técnicas de reprodução assistida ^[1].

Adicionalmente, os métodos mais antigos de avaliação da recetividade endometrial, como os histológicos ou ecográficos, não trouxeram uma melhoria significativa nas taxas de gravidez. Estes factos têm motivado um interesse crescente na investigação dos biomarcadores envolvidos na recetividade endometrial, tendo sido identificados, até à data, um grande número de mediadores moleculares, incluindo moléculas de adesão, citocinas, mucinas, prostaglandinas, entre outros ^[13].

Esta revisão bibliográfica pretende destacar os conhecimentos recentes acerca dos biomarcadores de recetividade endometrial que se pensa terem um papel crucial na interação materno-embrionária, incluindo os novos alvos, genómicos, proteómicos, lipidómicos e microRNA que se têm revelado promissores na compreensão da complexidade do processo de implantação e, conseqüentemente, na melhoria do diagnóstico e tratamento da infertilidade.

MECANISMO DE IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA

A implantação embrionária é considerada um processo progressivo e sequencial cujo sucesso requer o desenvolvimento coordenado de um blastocisto competente e de um endométrio recetivo [2].

Apesar dos avanços significativos na investigação reprodutiva, muitas questões fundamentais sobre a implantação continuam por esclarecer [3]. No entanto, é globalmente aceite, que o processo de implantação possa ser dividido em três fases: aposição, adesão e invasão [3-6].

Previamente à implantação, o embrião assume uma certa polaridade e uma orientação particular à medida que se aproxima do endométrio [10]. Na fase de aposição, o embrião deixa a zona pelúcida sobrepondo-se ao endométrio e as células do trofoblasto fixam-se de uma forma instável à superfície do epitélio endometrial recetivo. De seguida, o blastocisto adere de forma íntima ao epitélio endometrial, à lâmina basal endometrial e à matriz extracelular estromal. Nesta fase, a ligação entre o endométrio e o embrião é tão íntima que resiste ao deslocamento pelo fluxo uterino. Acredita-se que substâncias sinalizadoras parácrinas locais desencadeiem uma ligação mais forte, auxiliando na fixação do blastocisto. O primeiro sinal da reação de adesão ocorre por volta do 20º - 21º dia do ciclo menstrual em humanos e coincide com um aumento da permeabilidade vascular, no local da fixação do blastocisto. Seguidamente ocorre a penetração do blastocisto, invadindo o estroma para estabelecer uma relação com a vascularização materna e em resposta a essa invasão, as células do estroma endometrial sofrem decidualização [4-6,15].

A implantação na espécie humana parece ser relativamente ineficiente quando comparada com a de outras espécies animais, por exemplo, estima-se que a taxa de sucesso de implantação em humanos seja de 30% por ciclo, muito mais baixa que a dos babuínos que é cerca de 70% [15]. Muitos estudos têm procurado responder se as baixas taxas de implantação estarão relacionadas com o embrião, que na espécie humana exhibe geralmente alta incidência de aneuploidias e apoptose, ou se estarão relacionadas com uma falha no desenvolvimento de uma recetividade endometrial adequada para a implantação embrionária. Há evidências que apoiam a hipótese de que uma recetividade endometrial inadequada contribui significativamente para o insucesso da implantação, tendo sido identificado um grande número de mediadores moleculares que, sob a influência de hormonas ováricas, parece estar envolvido na interação materno-embriónica [13,15]. Alterações morfofuncionais durante este período podem impedir ou dificultar a implantação. Por este motivo, o estudo do endométrio

nesta fase é importante para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na interação materno-embrionária ^[13].

A RECETIVIDADE ENDOMETRIAL COMO UM FATOR DETERMINANTE DA FERTILIDADE

A relativa ineficácia do processo de implantação é considerada paradoxal, já que a reprodução é crítica para a sobrevivência das espécies e permanece um problema por resolver na medicina reprodutiva, sendo considerada uma causa major de infertilidade na mulher saudável ^[13].

Nas mulheres com falhas inexplicáveis na implantação, apesar de uma boa resposta hormonal, de embriões com qualidade otimizada, com um desenvolvimento endometrial satisfatório e sem patologia identificável, uma recetividade endometrial sub-ótima é considerada um fator limitante na implantação embrionária ^[1,13].

A recetividade endometrial pode ser definida como a capacidade da mucosa uterina facilitar uma implantação embrionária com sucesso. O endométrio humano está recetivo à implantação do blastocisto apenas durante um breve período de tempo na fase lútea média do ciclo menstrual, que começa aproximadamente seis a sete dias após a ovulação e que não dura mais que dois a quatro dias ^[33]. A este período chama-se “janela de implantação” e corresponde a um período de máxima recetividade uterina para a implantação ^[9], tendo a sua existência sido sugerida, pela primeira vez por Psychoyos, McLaren e Finn, e Martin ^[19].

O endométrio sofre alterações morfológicas precisas até que se torne recetivo, essas alterações ocorrem sob a influência de hormonas esteroides ováricas e de substâncias mediadoras parácrinas relacionadas com o embrião ^[8,14]. O aumento dos níveis de estrogénio durante a fase folicular do ciclo menstrual está associado à proliferação das células endometriais ^[8,14]. Após a ovulação, o aumento de progesterona secretada pelo corpo lúteo leva à diferenciação das células endometriais, deixando o endométrio maduro e pronto para a implantação ^[12-14]. O estreito período de tempo que caracteriza a “janela de implantação” é crucial e parece estar parcialmente sob influência de PG. O blastocisto entra na cavidade uterina, cerca de 4 dias após a ovulação, onde se move livremente sob influência da L-selectina. Para evitar que a adesão do blastocisto ocorra num local inadequado para a implantação, um outro mediador -MUC-1- expresso pelas células endometriais desempenha um papel importante pela sua ação repelente, impedindo que a adesão ocorra num local com baixa probabilidade de implantação. Em determinadas áreas

endometriais, ocorre secreção de quimiocinas e citocinas que atraem o blastocisto para o melhor local de implantação e nesta fase, o blastocisto expressa moléculas de adesão como integrinas e caderinas para assegurar a adesão entre o embrião e o endométrio ^[13]. Apesar desta sequência de eventos ser apresentada de modo simplista, sabe-se atualmente que diferentes marcadores de recetividade endometrial são cruciais em determinados momentos ^[13].

AVALIAÇÃO CLÍNICA DA FUNÇÃO ENDOMETRIAL

O sucesso da implantação é o fator determinante no estabelecimento de uma gravidez e está intimamente dependente da recetividade endometrial e, como já foi referido, o comprometimento desta recetividade é responsável por cerca de dois terços dos casos de insucesso das técnicas de reprodução assistida. Assim, a avaliação clínica, das condições do endométrio para receber um embrião e promover uma implantação bem-sucedida, assume uma importância extrema em todo o processo.

Idealmente, as técnicas de avaliação da função endometrial, deveriam ser capazes de prever eficazmente a sua recetividade, ser minimamente invasivas e de fácil realização na prática clínica quotidiana. A determinação da espessura do endométrio e do seu padrão ecográfico com recurso a ultrassons é o método mais utilizado, no entanto, têm sido desenvolvidas técnicas de avaliação de outros parâmetros da função endometrial como a perfusão, a função secretória e o recurso a biopsias.

Análise ultrassónica do endométrio

A ultrassonografia do endométrio foi uma das primeiras técnicas aplicadas na avaliação da função endometrial e é talvez a mais utilizada. Tem a grande vantagem de ser uma técnica não-invasiva e, para além disso, é fácil de realizar. No entanto, a sua utilidade como forma de prever o sucesso de uma implantação e consequente gravidez é muito limitada ^[9,20].

A determinação da espessura do endométrio é o parâmetro mais utilizado para a avaliação da recetividade endometrial, uma vez que esta sofre variações durante o ciclo menstrual, atingindo o valor máximo durante a ovulação. Sugeriu-se que uma espessura abaixo de 6-8 mm seria indicativa de uma baixa recetividade e, conseqüentemente, de uma elevada probabilidade de insucesso. Contudo, apesar desta constatação, o oposto, ou seja, um endométrio com uma espessura superior a este valor não implica necessariamente uma indicação positiva de maior recetividade e

não pode, por isso, ser considerado como indicador de sucesso na implantação. Para além disso, estudos comparativos de ciclos que resultaram em gravidez e ciclos em que esta não ocorreu, demonstraram que a espessura média do endométrio era muito semelhante em ambos os casos. Porém, estes factos não excluem uma relação entre a espessura do endométrio e a gravidez. A recente análise de alguns estudos publicados indica que essa relação provavelmente existe mas, dada a complexidade do processo de implantação, a sua determinação e utilização como forma de prever o sucesso da mesma não é exequível. Ainda assim, a monitorização da espessura do endométrio continua a ser útil porque, apesar de a deteção de uma espessura dentro dos parâmetros normais não ser indicativa de sucesso, permite identificar as situações em que este está comprometido devido à sua reduzida ou excessiva espessura ^[9,20].

A monitorização do padrão ecográfico do endométrio é outro dos métodos utilizados para determinar a recetividade e baseia-se nas alterações de textura que este apresenta durante o ciclo. Durante a fase proliferativa o endométrio apresenta três linhas hiperecogénicas definindo, respetivamente, a cavidade uterina e as duas junções entre o miométrio e o endométrio. A identificação desta estrutura trilaminar, tem sido descrita por alguns autores, como um bom indicativo para o sucesso da implantação mas, mais uma vez, há opiniões contraditórias. Tal como no caso da avaliação da espessura, a utilidade da monitorização da textura endometrial é limitada pelo facto de a não observação das linhas hiperecogénicas ser um forte indicador de insucesso, uma vez que a sua identificação não é suficiente para concluir que a implantação irá ser bem-sucedida ^[9,20].

A avaliação da perfusão do endométrio com recurso a doppler também tem tentado determinar a influência deste fator no sucesso da implantação e ainda que um estudo prospetivo tenha dado indicações no sentido de ser um fator indicativo da recetividade do endométrio, outros estudos acabaram por não confirmar esta correlação ^[9,20].

Análise da função secretória

Este método permite avaliar a função secretória do endométrio, tendo por base a análise bioquímica serológica ou das secreções ^[9].

A análise serológica foi avaliada em alguns estudos, que sugeriram uma potencial utilidade da medição de valores de determinadas proteínas (Ex: PP14) como método não-invasivo de avaliação da adequação da fase lútea. Essa utilidade acabou por vir a ser posta em causa mais tarde por outros estudos, que concluíram que este método não é capaz de fornecer uma indicação fiável sobre a função endometrial ^[9].

A análise das secreções uterinas é outro método não-invasivo de avaliar a função secretória e pode ser efetuado recorrendo a várias técnicas, nomeadamente, “microdiálise intrauterina”, “flushings uterinos” ou aspiração das secreções endometriais. A “microdiálise intrauterina” é um procedimento que permite analisar as citocinas e os fatores de crescimento endometriais, contudo, é um procedimento muito moroso e, por isso, não tem utilidade na prática clínica. Os “flushings uterinos” e a aspiração das secreções têm alguma utilidade, no entanto, e tal como muitos outros métodos, a sua capacidade para prever a recetividade do endométrio é bastante limitada e, por isso, a sua utilização na prática clínica é reduzida ^[9].

Análise de biópsias endometriais

Este método continua a ser o mais utilizado na avaliação endometrial mas apresenta algumas limitações. Por ser uma técnica invasiva, a obtenção de amostras não deve ser realizada durante o ciclo em que se pretende efetuar a transferência, mas sim num dos ciclos prévios e, este facto torna a técnica muito dependente da reprodutibilidade dos ciclos menstruais da paciente. Além disso, está descrita uma grande variabilidade intra-observador. Estas limitações diminuem muito a capacidade preditiva deste método levando mesmo alguns autores a sugerir uma reavaliação da sua utilidade ^[9].

Nenhum dos métodos disponíveis permite prever com elevada fiabilidade o sucesso do processo de implantação pelo que é necessário efetuar novos estudos para desenvolver e validar marcadores fidedignos que possam ser utilizados na prática clínica quotidiana ^[9].

BIOMARCADORES DE RECETIVIDADE ENDOMETRIAL

Por ser considerada uma componente essencial do processo reprodutivo, um conhecimento mais profundo da recetividade endometrial poderá melhorar significativamente os tratamentos de infertilidade feminina ^[12]. Sabe-se que os protocolos de estimulação ovárica têm um efeito marcado na diferenciação endometrial e que o endométrio durante os ciclos de FIV está longe de ser considerado normal ^[30,31], pelo menos em parte, devido aos elevados níveis de progesterona e, prematuramente, aos altos níveis de hCG ^[32]. Adicionalmente, a transferência do embrião nos ciclos de FIV poderá ocorrer, muitas vezes, num estágio mais precoce do que aquele em que um embrião “in vivo” atingiria o lúmen uterino. Isto origina a possibilidade de assincronia entre o desenvolvimento endometrial e o

embrião. No entanto, a determinação da receptividade do endométrio tem-se revelado mais difícil de avaliar, relativamente ao embrião, já que a sua investigação depende fundamentalmente da experimentação animal, cujos resultados, nem sempre são transponíveis para a espécie humana ^[13,18]. Ainda assim, muitos dos avanços na investigação apoiam a existência de biomarcadores que ajudam a compreender melhor a relação temporal e espacial durante a implantação embrionária.

Marcadores morfológicos de receptividade endometrial

Noyes *et al.* (1950), através da análise das características histológicas de biópsias endometriais realizadas durante ciclos espontâneos, instituíram os critérios histológicos de datação endometrial, que foram aceites como padrão na avaliação da receptividade endometrial ^[13]. Embora esses critérios clássicos ainda sejam utilizados para a análise cronológica das alterações endometriais, têm sido identificadas deficiências. A datação é mais específica na fase lútea inicial e na tardia, mas não no período da "janela de implantação", com demonstração de poucos parâmetros histológicos e grande variabilidade intra e inter-observadores, principalmente nas mulheres inférteis nessa fase do ciclo ^[39,40].

A microscopia eletrónica permitiu a avaliação de projeções da membrana das células epiteliais endometriais denominadas "pinópodes", estruturas dependentes da progesterona e cujo aparecimento coincide com o início da fase recetiva do endométrio ^[11]. Durante algum tempo pensou-se que teriam um papel importante na receptividade endometrial já que, estudos *in vitro*, demonstraram que a adesão do blastocisto ocorria preferencialmente nas células endometriais que exibiam pinópodes ^[11,15]. No entanto, estudos mais recentes vieram demonstrar que estas estruturas estão presentes durante a totalidade da fase lútea e que, por isso, o seu papel como biomarcadores de receptividade endometrial é considerado controverso ^[18].

Marcadores moleculares de receptividade endometrial

CAM

A família de moléculas de adesão celular é composta por quatro membros: as integrinas, as caderinas, as seletinas e as imunoglobulinas ^[16].

As integrinas são glicoproteínas transmembranares, cuja expressão no endométrio foi descrita pela primeira vez em 1992 e, a partir daí, têm sido intensivamente estudadas ^[19]. São formadas pela associação de duas subunidade α e β através de uma ligação não covalente ^[11,15]. As integrinas participam

na adesão célula-matriz extracelular e adesão célula-a-célula em muitos processos fisiológicos, incluindo o desenvolvimento embrionário, hemostase, trombose, cicatrização de feridas, mecanismos de defesas imunes e não imunes e transformação oncogénica ^[13]. Uma grande variedade de integrinas tem sido identificada no epitélio endometrial glandular e luminal, a maioria delas são expressas durante a totalidade do ciclo menstrual, no entanto, outras apresentam um padrão de expressão limitado no ciclo. Foi descrito um aumento no endométrio das integrinas $\alpha 1 \beta 1$, $\alpha 4 \beta 1$ e $\alpha V \beta 3$ na fase lútea média (20^o-24^o dia do ciclo menstrual), sendo que, apenas a subunidade $\beta 3$ mostrou um aumento na sua expressão depois do 19^o dia e não antes ^[13,19]. Além disso, a integrina $\alpha V \beta 3$ tendo sido detetada por estudos imunohistoquímicos na superfície epitelial do endométrio luminal que interage primeiramente com o trofoblasto, tendo sido proposta como um potencial recetor da adesão embrionária. O padrão de expressão das integrinas durante o ciclo é sugestivo de uma regulação hormonal em que altos níveis de estrogénio durante a fase proliferativa inibem a expressão das integrinas, enquanto que o aumento de progesterona na fase lútea aumenta a sua expressão ^[13,17]. A expressão anormal da integrina $\alpha V \beta 3$ tem sido associada a situações de infertilidade inexplicável, endometriose, deficiência da fase lútea e, mais recentemente, à síndrome do ovário poliquístico ^[13,16]. Estudos demonstram que os níveis de integrina $\alpha V \beta 3$ no 21^o dia do ciclo podem predizer a taxa de sucesso da FIV já que, níveis normais estão associados ao dobro da taxa de gravidez, quando comparados com baixos níveis. Considerando a literatura, a integrina $\alpha V \beta 3$ representa um biomarcador promissor no processo de implantação humana ^[13,16].

As caderinas constituem um grupo de glicoproteínas responsáveis pelo mecanismo de adesão célula-a-célula cálcio-dependente. Estão divididas em subclasses: E, P e N-caderinas, distintas na sua especificidade imunológica e distribuição tecidual. Em relação à implantação, a subunidade E-caderina é a mais estudada; localizada na membrana celular plasmática, é importante para a adesão entre as células epiteliais ^[13,16]. Estudos sobre a implantação embrionária em ratos têm mostrado que mutações genéticas da E-caderina originam defeitos na pré-implantação ^[13]. O papel desta proteína na implantação humana não é bem conhecido, contudo os seus níveis têm-se mostrado aumentados na fase lútea, embora não tenham sido evidenciadas variações no ciclo menstrual por estudos imunohistoquímicos. Estudos *in vitro* mostraram um aumento transitório do cálcio intracelular desencadeado pela calcitonina, suprimindo a expressão da E-caderina nos locais de contato celular. A

progesterona induz a expressão da calcitonina no epitélio endometrial na fase secretora média do ciclo menstrual, provavelmente regulando a expressão da E-caderina. É possível que a E-caderina tenha uma dupla função: na fase inicial, é necessária para a adesão celular e, na altura da implantação, diminui para possibilitar a invasão do blastocisto ^[13,18].

As selectinas são glicoproteínas e incluem a P-selectina, L-selectina e E-selectina. O sistema de adesão das selectinas está bem estabelecido na interface materno-fetal. A L-selectina tem sido encontrada no lado do embrião e, no lado materno, a expressão dos ligandos da selectina, como MECA-79 ou HECA-452, está aumentada durante a "janela de implantação" ^[13]. Adicionalmente, a imunorreatividade do ligando da L-selectina MECA-79 parece ser mais forte no epitélio endometrial luminal que no epitélio glandular ^[41]. A importância fisiológica da interação entre a L-selectina e os seus ligandos oligossacáridos foi investigada no endométrio e nas células trofoblásticas, sugerindo que este processo possa constituir o passo inicial da implantação do blastocisto. No entanto, apesar dos avanços na investigação, pouco se sabe sobre o envolvimento das selectinas na implantação embrionária, sugerindo que a sua participação ocorra nos estágios iniciais, sinalizando o melhor local da implantação do blastocisto na parede uterina ^[13].

Entre os componentes da família CAM, as imunoglobulinas são as mais extensas. A ICAM-1 ou CD54 é uma glicoproteína transmembranar que pertence à superfamília das imunoglobulinas e é expressa na superfície de vários tipos celulares, como os fibroblastos, leucócitos, células endoteliais e epiteliais. Esta molécula é regulada pelas citocinas inflamatórias e não inflamatórias. A interação da ICAM-1 é essencial para a migração transendotelial de leucócitos e para várias funções imunológicas ^[42]. Está estabelecido que o endométrio, sob condições normais, contém uma larga população de leucócitos, incluindo macrófagos, linfócitos T e granulócitos, que tem importância em muitos mecanismos fisiológicos como a decidualização, menstruação ^[43] e parto ^[44], e que esta população de leucócitos expressa ICAM-1 no endométrio. Adicionalmente foi demonstrado que, tanto nas células epiteliais como no estroma, há uma forte expressão da ICAM-1, sugerindo que esta proteína possa ter um papel na fisiopatologia do endométrio ^[45]. Estudos sobre a expressão da ICAM-1 e RPL têm demonstrado que a ICAM-1 é expressa de forma idêntica nas células endometriais na fase lútea de pacientes com e sem perdas de gestações inexplicadas ^[13,46]. Contudo, a libertação endometrial da sICAM-1 mostrou-se mais baixa nos

doentes com RPL. Embora ainda não se tenha demonstrado que a ICAM-1 seja indispensável nos estádios iniciais da interação do blastocisto com o endométrio, suspeita-se que possa participar indiretamente nesse processo por interagir com o sistema imunitário^[47].

Mucinas

As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular que podem ser encontradas numa grande variedade de tecidos, incluindo as células epiteliais endometriais^[7,11]. No endométrio humano, apenas a MUC1 e, em menor extensão, a MUC6 têm sido encontradas^[13]. A superfície apical da maioria das células epiteliais encontra-se revestida por um espesso glicocálice, composto essencialmente por mucinas, que protegem a superfície celular de processos patológicos^[7,11]. No endométrio, a MUC1 estende-se para além do glicocálice e é, provavelmente, a primeira molécula que o blastocisto encontra no seu trajeto^[7,13]. Pensa-se que a MUC-1 exerça uma ação repelente sobre o blastocisto até que ele encontre o local adequado para a implantação^[11,13]. A distribuição e regulação da MUC-1 variam ao longo do ciclo menstrual e entre as espécies. Em algumas espécies animais, como no rato e no porco, o aumento dos níveis de progesterona na fase lútea está associado a uma diminuição da expressão da MUC-1, facilitando a interação entre o embrião e o endométrio. Surpreendentemente, na espécie humana, descobriu-se que há um aumento de MUC-1 no período de pré-implantação, sugerindo que tem um papel crucial em direcionar o embrião temporal e espacialmente para o local adequado e que é necessário um mecanismo local de remoção da barreira de MUC-1 para ocorrer a implantação^[7]. Foi ainda demonstrado em estudos *in vitro* que, à superfície dos pinópodes uterinos onde ocorre a implantação embrionária, não há expressão de MUC-1, mantendo-se a restante barreira inalterada durante uma longa extensão a partir do local de implantação, sugerindo que fatores expressos à superfície do blastocisto ou secretados por ele, desencadeiam a perda local de MUC-1^[11]. Adicionalmente, tem-se verificado que, mulheres com RPL demonstram uma menor expressão de MUC-1 na fase lútea média, em comparação com mulheres férteis, apoiando a hipótese de que o efeito repelente da MUC-1 possa ter importância em direcionar o blastocisto para o melhor local de implantação^[13,17]. No entanto, novos estudos serão necessários para definir com maior precisão o seu papel na implantação embrionária e a sua relevância como biomarcador de recetividade endometrial^[13,17].

Citocinas

As citocinas constituem um grupo de proteínas que regulam uma grande variedade de funções celulares, com a proliferação celular e sua diferenciação. Para além de terem um papel importante na reparação do endométrio relacionada com os ciclos menstruais, também estão implicadas no processo reprodutivo, nomeadamente na ovulação e implantação ^[13].

LIF

Trata-se de uma glicoproteína pertencente à família das IL-6, que também inclui a OSM, o CNTF e a CT-1 ^[13]. O LIF atua em diferentes células e tecidos através da ligação ao seu recetor de membrana LIF-R, e a uma segunda molécula transmembranar, a gp130. A expressão do mRNA do LIF tem sido demonstrada em biópsias endometriais de mulheres férteis, durante o 18º e 28º dia do ciclo menstrual, com um pico ao 20º dia ^[13,15]. Foi ainda demonstrado que a concentração de LIF em lavados uterinos é máxima durante essa fase ^[13,15]. A associação de infertilidade com alguns genótipos nos quais há menor produção ou baixa atividade de LIF também reforçam o seu papel na implantação ^[13]. A importância do LIF na implantação embrionária humana tem sido também estabelecida com base em níveis anormais de LIF em mulheres inférteis, especialmente em mulheres com RIF. Tem sido demonstrado que em mulheres com infertilidade inexplicável, a secreção de LIF apenas aumenta ligeiramente da fase proliferativa para a fase secretora e em mulheres com RIF, esse aumento é ainda menor; e o mesmo acontece quando se analisam os lavados uterinos de mulheres inférteis ^[13]. Um r-hLIF tem sido investigado em ensaios clínicos e pré-clínicos no sentido de melhorar a recetividade endometrial em mulheres com RIF, o que poderá vir ajudar a esclarecer a sua importância na implantação ^[13].

Outros possíveis biomarcadores de recetividade endometrial

Calcitonina

A calcitonina é uma hormona secretada pelas células parafoliculares da tiroide, importante para a homeostasia do cálcio e que se encontra presente em vários tecidos, como fígado, pulmões, intestino, sistema nervoso central e útero ^[11]. Estudos demonstraram que a expressão de mRNA calcitonina aumenta durante a fase secretora média do ciclo menstrual, com máxima expressão entre os dias 19 e 21,

coincidindo com a janela de implantação. Adicionalmente foi demonstrado que a expressão do gene da calcitonina no endométrio humano é induzida pela progesterona e que não foi detectada imunorreatividade para o mRNA calcitonina durante a fase proliferativa e ovulatória, sugerindo que a síntese desta hormona está aumentada apenas durante o período de implantação ^[11]. Foi também realizado um estudo em ratos que consistiu na administração de um antagonista da síntese de mRNA calcitonina, onde foi observado um decréscimo de 50-80% da taxa de implantação. Portanto, há evidências de que a calcitonina possa ser um dos marcadores da receptividade uterina, ainda que o mecanismo pelo qual ela promove as interações materno-embrionárias ainda não seja totalmente conhecido ^[11].

Genes HOX

Os genes HOX são fatores de transcrição nuclear que têm sido apontados como sendo importantes para o processo de implantação ^[5,11]. Os genes HOXA-10 e HOXA-11 são expressos nas glândulas endometriais e estroma e acredita-se que possam regular o crescimento e desenvolvimento do endométrio humano. A sua expressão varia em resposta às hormonas esteroides durante o ciclo menstrual, com um aumento significativo na fase secretora média, coincidindo com a janela de implantação ^[11]. Estudos realizados em ratos têm demonstrado que mutantes homozigóticos para qualquer um dos genes HOXA-10 e HOXA-11 são inférteis devido a causas endometriais e que a resposta das células estromais à progesterona fica comprometida se houver deficiência do gene HOXA-10 ^[5,11]. Estudos realizados em mulheres com endometriose demonstraram que a expressão dos genes HOX se encontra alterada no endométrio e que o aumento insuficiente dos níveis de mRNA de HOXA-10 e HOXA-11 durante a janela de implantação pode ser um dos mecanismos responsáveis pela infertilidade. Todas estas observações sugerem que a expressão de cada um destes genes é necessária para uma receptividade adequada e que uma terapêutica que envolva a manipulação dos genes HOX pode vir a melhorar a receptividade endometrial e implantação ^[5].

AVANÇOS RECENTES NA COMPREENSÃO DE NOVOS MARCADORES DE RECETIVIDADE ENDOMETRIAL

Com a sequenciação do genoma humano têm-se desenvolvido novas tecnologias que estão a revolucionar a biomedicina e o diagnóstico médico. Nesta linha, as chamadas ciências “ômicas” têm ocasionado uma mudança na perspectiva de análise ao realizar um estudo conjunto das moléculas ^[34]. De maneira que o sufixo “oma” significa “conjunto de” e a adição deste sufixo a diferentes estudos em Biologia constitui novas abordagens em que se está a focar a ciência atualmente. A genómica estuda o genoma, ou seja, todo o conjunto de ADN presente nas células; a transcriptómica estuda o conjunto de genes expressos, o transcriptoma; a proteómica estuda o conjunto de proteínas e a lipidómica estuda o conjunto de lípidos ^[34].

Estudos genómicos e transcriptómicos

Antes da era genómica, as investigações estavam limitadas a determinar as alterações moleculares subjacentes aos processos biológicos, estudando um gene de cada vez. Com o desenvolvimento da tecnologia de microarray DNA, houve um progresso crescente no conhecimento dos perfis de expressão genética ^[38]. O transcriptoma reflete os genes que são ativamente expressos num determinado tempo e num determinado tecido ^[22].

A transcriptómica tem sido utilizada na medicina reprodutiva para o estudo do endométrio e avaliação da recetividade endometrial ^[22-26] e tem sido investigada em muitas perspectivas diferentes ^[22]: inicialmente foram estudados perfis genómicos em diferentes fases do ciclo menstrual e, mais especificamente, durante a decidualização; depois, o transcriptoma endometrial em pacientes com falha recorrente de implantação foi analisado e comparado com o de mulheres férteis; foram ainda comparadas mulheres saudáveis com mulheres com patologia endometrial, como cancro endometrial e endometriose; finalmente foram estudadas as modificações no padrão de expressão de genes durante ciclos de substituição hormonal e ciclos de estimulação ovárica controlada ^[22,25]. Estes estudos têm demonstrado que existem diferentes padrões de expressão de genes consoante a fase do ciclo menstrual e conduziram à definição de assinatura genómica da recetividade endometrial humana, que pode ser usada como uma estratégia para superar os problemas de subjetividade causados pelas variações inter e intracíclicas na datação da recetividade endometrial pelos critérios de Noyes ^[22,27].

Com base na tecnologia de microarray é, atualmente, possível classificar um endométrio como recetivo ou não, em função do seu perfil de expressão de genes ^[20].

Um importante avanço foi conseguido, recentemente, com o desenvolvimento do ERA, uma matriz personalizada baseada na assinatura transcriptômica da recetividade endometrial humana. Essa matriz é constituída por 238 genes regulados de forma diferente consoante a fase endometrial e 134 dos genes representam uma assinatura transcriptômica específica do período recetivo do endométrio ^[21]. Trata-se de uma ferramenta promissora na avaliação da recetividade endometrial, com uma sensibilidade de 0.99758 e especificidade de 0.8857 ^[20,21] e cuja precisão, reprodutibilidade e consistência foram testadas num ensaio clínico prospetivo comparativo, onde foi demonstrado ter maior precisão que a datação histológica, maior reprodutibilidade na datação endometrial e na avaliação da recetividade endometrial ^[28].

A aplicação clínica do teste ERA tem sido testada num ensaio clínico multicêntrico, prospetivo e intervencionista em que um grupo de pacientes com RIF e um grupo controlo foram submetidos ao diagnóstico da recetividade endometrial através de biópsias obtidas no dia LH+7 num ciclo natural ou no dia P+5 num ciclo de tratamento de substituição hormonal ^[29]. A contribuição mais importante do teste ERA foi o diagnóstico objetivo da janela de implantação, levando assim à criação do conceito de pET ^[54]. O teste informa se o endométrio está recetivo ou não, se estiver recetivo faz-se a transferência de embrião, caso contrário, um segundo teste ERA deverá ser feito para confirmar a janela de implantação que pode ter sido deslocada por fatores genómicos intrínsecos a cada doente, como foi verificado no estudo mencionado. A aplicação da transferência personalizada de embriões baseada no teste ERA em doentes com RIF demonstrou um aumento na taxa de implantação e taxa de gravidez para valores semelhantes aos pacientes do grupo controlo ^[22,29,54].

Embora os ensaios clínicos com o teste ERA tenham incidido em pacientes com RIF, estão em vista novos ensaios em pacientes com endometriose e hidrossalpinge. Adicionalmente, já está em curso um ensaio clínico randomizado e prospetivo para avaliar a eficácia do teste ERA no tratamento de infertilidade, ao orientar a transferência personalizada de embriões em pacientes submetidos a procriação medicamente assistida ^[22].

Estudos proteómicos

A tecnologia de microarray é provavelmente a técnica aplicada em maior extensão na área da reprodução humana. Contudo, está associada a obstáculos práticos relacionados com a sua natureza invasiva, já que depende da realização de biópsia endometrial, o que dificulta o seu uso como meio de diagnóstico para avaliação da recetividade endometrial em tempo real ^[34].

Como alternativa, o fluido uterino, tem sido considerado, há já algum tempo, uma fonte de informação molecular que reflete a fisiologia endometrial ^[34]. O endométrio humano passa por duas fases bem definidas em cada ciclo: a proliferativa e a secretora, que exibem achados morfológicos e fisiológicos distintos. É durante a fase secretora média que ocorre a janela de implantação e, por conseguinte, as secreções endometriais libertadas no lúmen uterino interagem diretamente com o blastocisto. O fluido uterino é um histotrofo rico em proteínas que contém, entre outros componentes, secreções das glândulas endometriais e produtos de degradação das proteínas secretadas e do glicocálice, representando um microambiente para a fase final do desenvolvimento do blastocisto e implantação. Uma vez que muitas das moléculas endometriais com importância na implantação são produzidas e secretadas pelas glândulas ^[38], acredita-se que a análise proteómica do fluido uterino pode fornecer biomarcadores da recetividade endometrial ^[21]. A proteómica começou por definir a composição proteica global do fluido uterino na fase secretora e examinou as diferenças entre as fases proliferativa e secretora inicial e proliferativa e secretora média e as diferenças entre as fases secretoras, em mulheres férteis e inférteis.

Alguns autores têm defendido que a proteómica fornece uma informação fisiológica mais relevante do que a genómica já que alterações na expressão de genes podem não refletir, necessariamente, alterações nas proteínas codificadas ^[21,33].

Ainda que a grande maioria das proteínas presentes no fluido uterino tenha origem sérica, existe um grande número de proteínas originadas no endométrio que podem ser alvo de estudo. A análise do fluido endometrial de mulheres saudáveis, na fase secretora, recorrendo a três métodos diferentes, permitiu identificar um enorme número de proteínas, das quais, cinquenta e seis eram comuns a todas as amostras estudadas. Vários estudos têm demonstrado uma variabilidade intra e interpessoal da composição proteica do fluido endometrial ao longo do ciclo de mulheres saudáveis. Um estudo que comparou o conteúdo do fluido endometrial entre a fase secretora média (dias 19-23) e a fase proliferativa média de mulheres férteis identificou sete proteínas que são mais abundantes na fase secretora média. Um outro estudo comparou a composição proteica do fluido endometrial entre mulheres férteis e inférteis e detetou alterações nas concentrações de dezoito proteínas, sendo que, seis delas eram menos abundantes nas mulheres inférteis e doze eram mais abundantes ^[20].

Estes dados suportam a ideia de que a proteómica pode fornecer, no futuro, um método não-invasivo e fiável de avaliar a recetividade uterina. É necessário, no entanto, realizar mais estudos, de forma a conseguir compreender o papel das

proteínas na determinação da recetividade endometrial, tendo como objetivo final a definição de um perfil proteico específico do endométrio recetivo para os ciclos normais e sujeitos a estimulação ^[20].

Estudos lipidómicos

Tal como o nome indica, têm por base a determinação qualitativa e quantitativa das moléculas lipídicas isoladas a partir de tecidos, células ou fluidos biológicos. Neste caso específico, visa aplicar estas técnicas na identificação de moléculas lipídicas que possam ser usadas com facilidade e fiabilidade como biomarcadores, na previsão do sucesso da implantação do embrião no endométrio, na fertilização assistida ^[34,35].

A determinação do perfil lipidómico do fluido endometrial, obtido num ciclo menstrual normal, revelou a presença de nove moléculas lipídicas distintas, das quais se destacam as prostaglandinas PGF1 α , PGE₂ e PGE₂ α . Destas, a PGE₂ e a PGE₂ α apresentam valores significativamente superiores durante a “janela de implantação”, relativamente às restantes fases do ciclo menstrual. Para além disso, constatou-se que este facto é válido, não só para ciclos normais, mas também em situações de doação de óvulos e de fertilização *in vitro* ^[34,35].

A importância das prostaglandinas no processo da implantação embrionária é conhecida e está demonstrada quer em modelos animais, quer em humanos e sabe-se também que, deficiências na sua síntese ao nível do endométrio estão diretamente relacionadas com repetidos insucessos de implantação em situações de fertilização *in vitro*. Estudos recentes demonstraram que as sintetases das prostaglandinas, necessárias para a síntese de PGE₂ e PGE₂ α , estão localizadas no epitélio endometrial e são reguladas hormonalmente durante a “janela de implantação” por recetores localizados no embrião. Além disso, a inibição das PGE₂ e PGE₂ α ou dos recetores resulta na diminuição da adesão embrionária que pode ser revertida pela reposição das moléculas ou pelo uso de agonistas dos recetores. Por fim, ficou também demonstrado que é possível quantificar e datar as alterações que as concentrações de PGE₂ e PGE₂ α sofrem durante os ciclos ^[34,35].

Tendo em conta estes dados, estas novas técnicas lipidómicas vieram demonstrar que o perfil das prostaglandinas PGE₂ e PGE₂ α pode ser usado para detetar com precisão a “janela de implantação”, com a vantagem de isso poder ser feito no próprio ciclo em que o embrião vai ser implantado e de forma não-invasiva ^[34,35].

miRNA

Recentemente, o miRNA tem sido apontado como um novo grupo de moléculas reguladoras com um papel importante no processo de implantação e desenvolvimento embrionário, tendo sido referido, inclusivamente, como um potencial marcador de recetividade endometrial ^[48].

Sabe-se, atualmente, que a regulação de numerosos processos fisiológicos depende não só dos mecanismos de transcrição clássicos, mas também de outros fenómenos reguladores como os mecanismos epigenéticos, incluindo miRNAs ^[48].

Os miRNAs são pequenos fragmentos de RNA, constituídos por cerca de 18-25 nucleotídeos que não codificam proteínas, mas que atuam como reguladores pós-transcricionais de muitos genes-alvo, sendo capazes de regular vários genes ao mesmo tempo e podendo, cada gene, ser regulado por diferentes miRNAs ^[48,53].

O miRNA intervém em vários processos biológicos básicos como diferenciação celular, proliferação e apoptose, que por sua vez, estão envolvidos na embriogénese, implantação e desenvolvimento embrionário ^[48, 51].

Vários miRNAs já foram identificados em diferentes órgãos do trato reprodutor feminino e a sua expressão relaciona-se com o seu funcionamento normal. Da mesma forma, a expressão anómala de algum miRNA está associada ao desenvolvimento de patologias distintas, como alteração da recetividade endometrial, hemorragia uterina anómala, endometriose, entre outras ^[48,50].

Neste contexto, a investigação do miRNA como elemento que pode modificar a função dos genes no trato reprodutor tem-se revelado um método promissor na compreensão da implantação, quer em condições fisiológicas, quer em condições fisiopatológicas. Além disso, por serem estáveis e detetáveis na corrente sanguínea ou noutros fluidos biológicos, possibilitam o seu uso como biomarcadores de patologias específicas ^[48, 52].

Vários estudos em ratos têm demonstrado que os miRNA intervém na recetividade endometrial e implantação embrionária através da regulação da expressão de genes ^[53]. Em humanos, alguns miRNA diferentes têm sido isolados, nos últimos anos, na fase secretora média do endométrio, enquanto que outros têm demonstrado uma sub-expressão na fase proliferativa, sugerindo que o miRNA, provavelmente regula os genes envolvidos na implantação embrionária, apesar do seu mecanismo exato ainda não estar totalmente esclarecido ^[49-51].

CONCLUSÃO

O endométrio humano é um tecido complexo e dinâmico que sofre alterações fisiológicas cíclicas. O embrião é incapaz de aderir ao endométrio durante a maior parte do ciclo menstrual em humanos, exceto durante um breve período regulado por hormonas esteroides e fatores genéticos, em que o tecido endometrial adquire um estado funcional e transitório que permite a adesão do blastocisto.

Durante mais de 60 anos, a avaliação histológica do endométrio foi considerada padrão na avaliação das alterações endometriais. No entanto, a sua especificidade e relevância funcional como preditiva da recetividade endometrial tem sido questionada em vários estudos.

Os pinópodes -projeções ectoplasmáticas à superfície das células epiteliais endometriais- chegaram a ser considerados bons marcadores morfológicos da recetividade endometrial. Contudo, tem sido demonstrado que permanecem presentes para além do período recetivo não devendo, por isso, ser usados como marcadores.

Os biomarcadores moleculares revelaram-se alternativas promissoras aos clássicos critérios de Noyes. Entre eles, as integrinas, mucinas, calcitonina, ciclo-oxigenase 2 e homeobox A10, são os exemplos mais notáveis. No entanto, dada a variabilidade considerável no seu padrão de expressão mesmo em mulheres férteis, nenhum deles tem tido tradução na prática clínica como biomarcador de recetividade endometrial.

O desenvolvimento nas tecnologias de microarray tem permitido investigar a transcriptómica do endométrio humano em diferentes fases do ciclo menstrual, incluindo o período recetivo, e classificar o estado molecular do endométrio de acordo com a sua assinatura transcriptómica, independentemente dos critérios histológicos.

A evolução das tecnologias “ómicas” tem aberto caminho para a identificação de potenciais marcadores de recetividade endometrial, apesar de a sua validação continuar a ser uma preocupação relevante.

Há evidências de que o miRNA endometrial atue como regulador da expressão de genes envolvidos no processo de implantação e desenvolvimento embrionário, sendo importante, no futuro, esclarecer essas possíveis alterações na expressão de miRNA e, conseqüentemente, no controlo da expressão genética, no sentido de encontrar o melhor momento de recetividade endometrial.

Pode concluir-se que a implantação embrionária humana é ainda um processo com muitos fatores e interações desconhecidas e que a investigação futura deve insistir no seu esclarecimento e na integração de dados de estudos genómicos, proteómicos, lipidómicos e do miRNA para a determinação de biomarcadores com

significado clínico. O maior e melhor conhecimento sobre a receptividade endometrial, permitirá detetar porque falha a implantação, possibilitando o desenvolvimento de tratamentos de infertilidade mais direcionados e individualizados no futuro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fatemi, HM; Popovic Todorovic, B. Implantation in assisted reproduction: a look at endometrial receptivity. *Reproductive BioMedicine Online* 2013; 27, 530-538.
2. Makrigiannakis, Antonis; Minas, Vassillis. Mechanisms of implantation. *Reproductive BioMedicine Online* 2007; Vol. 14, nº1: 102-109.
3. Minas, Vassillis; Loutradis, Dimitris; Makrigiannakis, Antonis. Factors controlling blastocist implantation. *Reproductive BioMedicine Online* 2005; Vol. 10, nº2: 205-216.
4. Emiliani, Serena; Delbaere Anne; Devreker, Fabienne; Englert, Yvon. Embryo-Matern interactive factors regulating the implantation process: implications in assisted reproductive treatment. *Reproductive BioMedicine Online* 2005; Vol. 10, nº4: 57-540.
5. Guzeloglu-Kayisli, Ozlem; Basar, Murat; Arici, Aydin. *Reproductive BioMedicine Online* 2007; Vol. 15, nº6: 728-739
6. Pellicer, A; Dominguez, F; Remohi, J; Simón, C. Molecular basis of implantation. *Reproductive BioMedicine Online* 2002; Vol. 5, Suppl.1: 44-51.
7. Hoozemans, Diederik; Schats, Roel; Lambalk, Cornelis; Homburg, Roy; Hompes, Peter. Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reproductive BioMedicine Online* 2004; Vol. 9, nº6: 692-715.
8. Horcajadas, José; Domínguez, Francisco; Martín, Julio; Pellicer, Antonio; Simón, Carlos. Implantation and uterine receptivity. *International Congress Series* 2004; 177-182.
9. Strowitzki, Thomas; Germeyer, A; Popovici, R; Wolff, M. The human endometrium as a fertility- determining factor. *Human Reproduction Update* 2006; Vol. 12, nº5: 617-630.
10. Diedrich, K; Fauser, B; Devroey, P; Griesinger, G. The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Human Reproduction Update* 2007; Vol. 13, nº4: 365-377.
11. Cavagna, M; Mantese, J. Biomarkers of endometrial receptivity – A review. *Placenta* 2003; 24: S39-S47.
12. Rashid, Najwa; Lalitkumar, Sujata; Lalitkumar, Parameswaran; Gemzell-Danielsson, Krisitna. Endometrial receptivity and human embryo implantation. *American Journal of Reproductive Immunology* 2011; 66(suppl. 1): 23-30.

13. Achache, Hanna; Revel, Ariel. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human Reproduction Update* 2006; Vol. 12, nº6: 731-746.
14. Young, Steven. Oestrogen and progesterone action on endometrium: a translational approach to understanding endometrial receptivity. *Reproductive BioMedicine Online* 2013; 27: 497-505.
15. Sharkey, Andrew; Smith, Stephen. The endometrium as a cause of implantation failure. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2003; Vol. 17, nº2: 289-307.
16. Koot, Y; Teklenburg, G; Salker, M; Brosens, J; Macklon, N. Molecular aspects of implantation failure. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1943-1950.
17. Lindhard, Anette; Betin-Ley, Ursula; Ravn, Vibeke; Islin, Henrik; Hviid, Thomas; Rex, Sven; Bangsboll, Susanne; Sorensen, Steen. Biochemical evaluation of endometrial function at the time of implantation. *Fertility and Sterility* 2002; Vol. 78, nº2: 221-233.
18. Quinn, C; Casper, R. Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity. *Human Reproduction Update* 2009; Vol. 15, nº2: 229-236.
19. Lessey, Bruce. Endometrial receptivity and the window of implantation. *Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2000; Vol. 14, nº5: 775-788.
20. Von Grothusen, Carolina; Lalitkumar, Sujata; Boggavarapu, Nageswara; Gemzell-Danielsson, Kristina; Lalitkumar, Parameswaran. Recent Advances in Understanding Endometrial Receptivity: Molecular Basis and Clinical Applications. *American Journal of Reproductive Immunology* 2014; 72: 148-157.
21. Edgell, Tracey; Rombauts, Luk; Salamonsen, Lois. Assessing receptivity in the endometrium: the need for a rapid, non-invasive test. *Reproductive BioMedicine Online* 2013; 27: 486-496.
22. Garrido-Gomez, Tamara; Ruiz-Alonso, Maria; Blesa, David; Diaz-Gimeno, Patricia; Villela, Felipe; Simon, Carlos. Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. *Fertility and Sterility* 2013; Vol. 99, nº4: 1078-1085.
23. Horcajadas, José; Riesewijk, Anne; Martín, Julio; Cervero, Ana; Mosselman, Sietse; Pellicer, Antonio; Simón, Carlos. Global gene expression profiling of human endometrial receptivity. *Journal of Reproductive Immunology* 2004; 63: 41-49.
24. Diaz-Gimeno, Patricia; Horcajadas, José; Martinez-Conejero, José; Esteban, Francisco; Alamá, Pilar; Pellicer, Antonio; Simón, Carlos. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertility and Sterility* 2011; Vol.95, nº1: 50-60.

25. Ruiz-Alonso, Maria; Blesa, David; Simón, Carlos. The genomics of the human endometrium. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1931-1942
26. Horcajadas, J.; Pellicer, A.; Simón, C. Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. *Human reproduction Update* 2007; Vol.13, nº1: 77-86.
27. Evans, G.; Phillipson, G.; Sin, I.; Frampton, C.; Kirker, J.; Bigby, S.; Evans, J.. Gene expression confirms a potentially receptive endometrium identified by histology in fértil women. *Human Reproduction* 2012; Vol. 27, nº9: 2747-2755.
28. Diaz-Gimeno, Patricia; Ruiz-Alonso, Maria; Blesa, David; Bosch, Nuria; Martinez-Conejero, José; Alamá, Pilar; Garrido, Nicolás; Pellicer, Antonio; Simón, Carlos. The accuracy and reproductibility of the endometrial receptivity array is superior to histology as a diagnostic method for endometrial receptivity. *Fertility and sterility* 2013; Vol.99, nº2: 508-517.
29. Ruiz-Alonso, Maria; Blesa, David; Diaz-Gimeno, Patricia; Gómez, Eva; Fernandez-Sanchez, Manuel; Carranza, Francisco; Carrera, Joan; Vilella, Felip; Pellicer, Antonio; Simón, Carlos. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertility and sterility* 2013; Vol.100, nº3: 818-824.
30. Kolibianakis, Efstratios; Bourgain, Claire; Platteau, Peter; Albano, Carola; Steirteghem, Andre; Devroey, Paul. Abnormal endometrial development occurs during the luteal phase of nonsupplemented donor cycle treated with recombinant follicle-stimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Fertility and sterility* 2003; Vol.80, nº2: 464-466.
31. Haouzi, Delphine; Assou, Said; Dechanet, Clothilde; Anahory, Tal; Dechaud, Hervé; De Vos, John; Hamamah, Samir. Controlled Ovarian Hyperstimulation for In vitro Fertilization Alters Endometrial Receptivity in Humans: Protocol Effects. *Biology of Reproduction* 2010; 82, 679-686.
32. Salamonsen, Lois; Edgell, Tracey; Rombauts, Luk; Stephens, Andrew; Robertson, David; Rainczuk, Adam; Nie, Guiying; Hannan, Natalie. Proteomics of human endometrium and uterine fluid: a pathway to biomarker discovery. *Fertility and sterility* 2013; Vol.99, nº4: 1086-1092.
33. Berlanga, O.; Bradshaw, H.; Vilella-Mitjana, F.; Garrido-Gómez, T.; Simón, C.. How endometrial secretomics can help in predicting implantation. *Placenta* 2011; S271-S275.
34. Vilella, Felipe; Ramirez, Leslie; Simón, Carlos. Lipidomics as a emerging tool to predict endometrial receptivity. *Fertility and sterility* 2013; Vol.99, nº4: 1100-110

35. Vilella, Felipe; Ramirez, Leslie; Berlanga, O.; Martínez, S.; Alamá, P.; Meseguer, M.; Pellicer, A.; Simón, C.. PGE₂ and PGE₂α Concentrations in Human Endometrial Fluid as Biomarkers for Embryonic Implantation. *J Clin endocrinol Metab* 2013; 98(10): 4123-4132.
36. Brouillet, S.; Hoffmann, P.; Thomas-cadi, C.; Bergues, U.; Feige, J.; Alfaidy, N.; Hennebicq, S.. PROK1, prognostic marker of embryo implantation? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 2013; 41: 562-565.
37. Salamonsen, Lois; Nie, Guiying; Hannan, Natalie; Dimitriadis, Evdokia. Preparing fertile soil: the importance of endometrial receptivity. *Reproduction, Fertility and Development*, 2009, 21: 923–934.
38. Borthwick, Jane; Charnock-Jones, Stephen; Tom, Brian; Hull, M.Louise; Teirney, Raewyn; Phillips, Stephen; Smith, Stephen. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Molecular Human Reproduction*, 2003, Vol.9, N°1: 19-33.
39. Myers ER, Silva S, Barnhart K, Groben PA, Richardson MS, Robboy SJ *et al.* Interobserver and intraobserver variability in the histological dating of the endometrium in fertile and infertile women. *Fertil Steril.* 2004;82:1278-82.
40. Myers, Evan; Silva, Susan; Barnhart, Kurt; Groben, Pamela; Richardson, Mary; Robboy, Stanley; Leppert, Phyllis; Coutifaris, Christos. Interobserver and intraobserver variability in the histological dating of the endometrium in fertile and infertile women. *Fertility and sterility* 2004; Vol.82, nº5: 1278-1282.
41. Lai TH, Shih IeM, Vlahos N, Ho CL, Wallach E, Zhao Y. Differential expression of L-selectin ligand in the endometrium during the menstrual cycle. *Fertil Steril.* 2005;83:1297-302.
42. Van De Stolpe A, VanDer Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med.* 1996;74:13-33.
43. King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update.* 2000;6:28-36.
44. Yellon SM, Mackler AM, Kirby MA. The role of leukocyte traffic and activation in parturition. *J Soc Gynecol Invest.* 2003;10:323-38.
45. Defrere S, Van Langendonck A, Moulin P, Befahy P, Gonzalez D, Martinez-Madrid B *et al.* Human endometrial epithelial cells (EEC) constitutively express more intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 than endometrial stromal cells (ESC) in culture. *Am J Re-prod Immunol.* 2005;54:5-12.

46. Gaffuri B, Airoidi L, Di Blasio AM, Vigano P, Miragoli AM, Santorsola R *et al.* Unexplained habitual abortion is associated with a reduced endometrial release of soluble intercellular adhesion molecule-1 in the luteal phase of the cycle. *Eur J Endocrinol.* 2000;142:477-80.
47. Germeyer A, Jauckus J, Zorn M, Toth B, Capp E, Strowitzki T. Metformin modulates IL-8, IL-1 β , ICAM and IGFBP-1 expression in human endometrial stromal cells. *Reprod Biomed Online.* 2011;22:327-34.
48. Galliano, Daniela; Pellicer, Antonio. MicroRNA and implantation. *Fertility & Sterility* 2014; Vol.101, N°6: 1531-1544.
49. Evans GE, Martínez-Conejero JA, Phillipson GT, Simón C, McNoe LA, Sykes PH, *et al.* Gene and protein expression signature of endometrial glandular and stromal compartments during the window of implantation. *Fertil Steril* 2012;97:1365-73.
50. Creighton CJ, Benham AL, Zhu H, Khan MF, Reid JG, Nagaraja AK, *et al.* Discovery of novel microRNAs in female reproductive tract using next generation sequencing. *PLoS One* 2010;5:e9637.
51. Kuokkanen S, Chen B, Ojalvo L, Benard L, Santoro N, Pollard JW. Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium. *Biol Reprod* 2010;82:791-801.
52. Scholer N, Langer C, Dohner H, Buske C, Kuchenbauer F. Serum micro- RNAs as a novel class of biomarkers: a comprehensive review of the literature. *Exp Hematol* 2010;38:1126-30.
53. Hu SJ, Ren G, Liu JL, Zhao ZA, Yu YS, Su RW, *et al.* MicroRNA expression and regulation in mouse uterus during embryo implantation. *J Biol Chem* 2008;283:23473-84.
54. Ruiz-Alonso M; Galindo N; Pellicer A; Simón C. What a difference two days make: “personalized” embryo transfer (pET) paradigm: A case report and pilot study. *Human Reproduction*, Vol.29, N°6 pp. 1244-1247; 2014.