

**VALORACIÓN DE LA SUPERFICIE ENDOMETRIAL EN  
EL DIAGNÓSTICO Y MANEJO DE ABORTOS DE  
REPETICIÓN: HISTEROSCOPIA Y MARCADORES DE  
RECEPTIVIDAD DEL ENDOMETRIO**

*TRABAJO FIN DE GRADO – MEDICINA*

*UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA*

*CURSO 2014-2015*



ALUMNO: ISABEL FERNÁNDEZ GRACIA

DIRECTOR: MERCEDES SOBREVIELA LASERRADA

## INDICE DE CONTENIDOS

Resumen .....	3
Palabras clave .....	4
Objetivo.....	4
Material y métodos .....	5
Introducción .....	5
Histeroscopia en abortos de repetición .....	7
Marcadores histológicos endometriales .....	8
Marcadores moleculares endometriales.....	9
<i>Interleukina-1</i> .....	9
<i>Interleukina-11</i> .....	10
<i>Interleukina-6</i> .....	10
<i>Factor Inhibidor de la Leucemia (LIF)</i> .....	11
<i>Integrinas</i> .....	11
<i>L-Selectina</i> .....	12
<i>E-cadherina</i> .....	13
<i>Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)</i> .....	14
<i>Familia del factor de crecimiento epidérmico</i> .....	14
<i>Osteopontina (OPN)</i> .....	15
<i>Mucinas (MUC1)</i> .....	16
<i>Leptina</i> .....	16
<i>Ciclina E y p27: EFT®</i> .....	17
Marcadores genéticos endometriales.....	18
<i>Genes homeóticos: HOXA-10 y 11</i> .....	18
Patrones histeroscópicos desfavorables relacionados con la alteración en los marcadores de receptividad endometrial .....	19
Discusión .....	20
Conclusiones .....	21
Referencias bibliográficas.....	22

## Resumen

La implantación resulta un proceso fundamental en la reproducción humana, en el cual intervienen principalmente dos elementos: el endometrio y el blastocisto.

El endometrio sólo es receptivo para la implantación del blastocisto durante un breve periodo de tiempo denominado ventana de implantación. Es sabido que para el establecimiento de una superficie endometrial receptiva se necesita de la participación de numerosas moléculas y de la expresión de genes cuyas funciones exactas y relevancia en el proceso todavía deben ser descifradas más concretamente.

De acuerdo con los conocimientos actuales, las selectinas parecen jugar un papel clave en las fases más tempranas de la implantación mediante su expresión en la superficie del blastocisto, lo cual le permitirá adherirse al endometrio desde la cavidad uterina, donde se encuentra moviéndose libremente. Para evitar que la adhesión ocurra en una región donde no se ha producido el suficiente desarrollo de la mucosa endometrial, tiene lugar la expresión de la mucina MUC-1. Además, en áreas particulares de la superficie uterina, la secreción de citoquinas y factores de crecimiento atraerá al blastocisto para su unión con microprotusiones del epitelio luminal endometrial denominadas pinópodos. Llegados a este punto, se producirá la intervención de moléculas de adhesión como las integrinas y las cadherinas, que se encargarán de asegurar la adhesividad entre el endometrio y el blastocisto.

Todas estas moléculas que se van expresando de manera secuencial durante el proceso de la implantación se han señalado como marcadores de receptividad endometrial. A continuación, se trata de encontrar una clara correlación entre las anomalías anatómicas y bioquímicas en mujeres con abortos de repetición que condicionarían un endometrio no receptivo. En este sentido, el estudio de la cavidad uterina mediante histeroscopia y biopsia de la superficie endometrial han demostrado ser los métodos más eficaces para confirmar o descartar la presencia de factor endometrial como causa de abortos recurrentes.

*Implantation process represents an essential requirement for human reproduction, in which intervene basically two different elements: the endometrium and the blastocyst.*

*The endometrium is only receptive for the implantation for a brief of time called implantation window. It's known that for the establishment of a receptive endometrial surface lots of molecules and gene expression must be involved, but the exact functions and relevance in the implantation process have to be deciphered more specifically yet.*

*According to current knowledge, selectins appear to play a key role in the early stages of the implantation process by their expression on the surface of the blastocyst, which will allow it to adhere to the endometrium from the uterine cavity, where it's moving freely. To prevent adhesion occurs in a region where there has not been enough development of the endometrial lining, the expression of the MUC-1 mucin takes place. Furthermore, in particular areas of the uterine surface, secretion of cytokines and growing factors attracts the blastocyst for its attachment to microprotusions in the endometrial luminal epithelium called pinopodes. At this point, the intervention of adhesion molecules such as integrins and cadherins occurs, and this fact will be responsible for ensuring the adhesiveness between the endometrium and the blastocyst.*

*All these molecules whose expression takes place in a sequential way during the implantation process have been identified as markers of endometrial receptivity. Now the main aim is to identify a clear correlation between anatomical and biochemical disorders in women with recurrent miscarriage due to a non-receptive endometrium. In this way, research in the uterine cavity through hysteroscopy and endometrial biopsy have shown to be the most effective ways to confirm or discard the presence of endometrial factor as cause of recurrent pregnancy loss.*

**Palabras clave:** *implantation, endometrial receptivity, implantation window, recurrent pregnancy loss, recurrent miscarriage, hysteroscopy, unexplained infertility, predictors of endometrial receptivity, pinopodes, LIF, integrin, osteopontin, IL-1, IL-11, IL-6, VEGF, EGF, TGF $\alpha$ , HB-EGF, L-selectin, E-cadherin, MUC1, leptin, homeobox gene family, HOXA-10, HOXA-11, cyclin E, p27, EFT®.*

## **Objetivo**

El objetivo de este trabajo es investigar sobre el papel de la histeroscopia en el diagnóstico y manejo de anomalías anatómicas uterinas así como revisar la evidencia científica disponible actualmente referida a los principales factores involucrados en el proceso de la implantación del blastocisto en la superficie endometrial, todo ello a fin de poder ayudar a determinar las causas de abortos recurrentes y la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas capaces de contribuir a su prevención.

## Material y métodos

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica en el motor de búsqueda de artículos científicos Pubmed sobre la evidencia científica disponible acerca de la histeroscopia en abortos de repetición y los principales marcadores histológicos, moleculares, y génicos, de la receptividad del endometrio recopilando los principales estudios llevados a cabo a este respecto a nivel mundial en los últimos 15 años.

## Introducción

El término abortos de repetición viene definido como la pérdida de tres o más gestaciones consecutivas de menos de 20 semanas desde la fecha de la última menstruación. De acuerdo con esta definición se considera que afecta en torno a un 1-2% de las parejas en edad reproductiva, y que un 12-15% de los embarazos clínicamente identificados acaban en aborto. <sup>1</sup> Si incluimos el embarazo bioquímico el porcentaje es mucho mayor, estimándose de entre un 40-60%.

Los motivos para la pérdida gestacional se relacionan con la edad materna, de tal forma que por encima de los 35 años predominan las causas genéticas embrionarias, y de ahí que numerosos estudios hayan demostrado el valor del análisis genético previa implantación en el manejo de abortos recurrentes en mujeres de edad avanzada. <sup>2,3</sup>

Otros factores etiológicos para la pérdida gestacional incluyen: causas inmunitarias (20%), endocrinas (17-20%), anatómicas (10-15%), e infecciosas (0,5-5%). <sup>4,5,6</sup>

Respecto a las causas anatómicas engloban: malformaciones uterinas congénitas (útero unicorn, didelfo, bicorne, tabicado), leiomiomas y adherencias intrauterinas. <sup>7</sup> La patogenia no está clara aunque se cree que el mecanismo es doble: disminución del volumen de la cavidad uterina y vascularización defectuosa. <sup>8</sup> En la actualidad resulta de gran relevancia el papel de la histeroscopia en el diagnóstico y manejo de las causas anatómicas de abortos recurrentes, puesto que permite descartar, confirmar, y en tal caso tratar, la patología existente como causa de infertilidad femenina. <sup>9</sup>

La implantación embrionaria, por su parte, representa un paso imprescindible para el proceso reproductivo del ser humano. Curiosamente, se ha observado que es un fenómeno altamente ineficaz. Esto se debe, en parte, a que una implantación exitosa requiere de un endometrio receptivo, así como de un embrión viable con un

grado de desarrollo acorde con el desarrollo endometrial. De este modo, puede establecerse un diálogo sincronizado entre los tejidos maternos y embrionarios.<sup>10</sup>

### *Fases de implantación*

Cuando el blastocisto lleva 72 horas en la cavidad uterina pierde la zona pelúcida dejando expuesto el trofoblasto, y esta reacción resulta imprescindible para que comience la implantación.

El proceso se divide en tres fases: aposición, adhesión e invasión.<sup>11</sup> La aposición es la fase en que el trofoblasto toma íntimo contacto con la superficie endometrial pero sin establecer todavía ningún tipo de conexión. En la adhesión, las microvellosidades trofoblásticas se interdigitan estrechamente con los pinópodos endometriales. La invasión es la fase en la cual el sincitiotrofoblasto se introduce en las células endometriales.

Respecto a la receptividad del endometrio, deben producirse cambios en la superficie estromal para que el tejido endometrial se transforme en receptivo. Un proceso fundamental es la llamada decidualización, que consiste en la proliferación de las células del estroma en el sitio donde se implantará el blastocisto, junto con la diferenciación hacia células más especializadas. A su vez, para una decidualización exitosa, resultan imprescindibles un aumento del número de vasos endometriales así como de la permeabilidad vascular, proceso en el cual intervienen factores angiogénicos como el VEGF y la Angiopoietina-1, cuya expresión es inducida por factores que producen hipoxia.<sup>12</sup> Con todo ello, el endometrio receptivo se vuelve más vascularizado y edematoso, las glándulas presentan actividad secretora, las células epiteliales se transforman en circulares y aparecen los pinópodos. Se abre entonces la llamada ventana de implantación, durante la cual la superficie endometrial está preparada para que el blastocisto competente se implante.

Clásicamente se ha sabido que para que todos estos cambios tengan lugar, resulta fundamental el papel del estradiol, la progesterona y la hCG. Actualmente, con el auge de la genómica y la biología molecular, se han llevado a cabo numerosos estudios a fin de determinar el perfil génico del endometrio durante la ventana de implantación, con el consiguiente descubrimiento de diversas moléculas imprescindibles en este proceso. Se abren así nuevas dianas terapéuticas potenciales que quizá en un futuro desempeñen un papel crucial en el manejo de abortos recurrentes por defectos de implantación del blastocisto, los cuales siguen siendo hoy en día un problema sin resolver para la medicina reproductiva, a pesar de ser considerados como la mayor causa de infertilidad en mujeres sanas.

## Histeroscopia en abortos de repetición

La histeroscopia resulta una herramienta sencilla, accesible y de gran utilidad para visualizar la cavidad uterina en su interior. Además permite, no sólo el estudio de las anomalías anatómicas congénitas y adquiridas, sino también la toma de biopsias de endometrio a fin de determinar alteraciones en su receptividad que sean capaces de explicar los abortos recurrentes. En este sentido, la histeroscopia diagnóstica debería ser considerada como un procedimiento a llevar a cabo en cualquier pareja infértil puesto que permite confirmar o descartar la presencia de factor endometrial como causa de infertilidad femenina.<sup>13</sup>

Diversos ensayos clínicos realizados en este campo afirman que su realización ya resulta útil después de dos gestaciones perdidas y una vez se hayan descartado otras causas iniciales de abortos.<sup>14</sup> Se concede de esta manera gran valor al diagnóstico precoz de patologías uterinas y, dado que los defectos estructurales son considerados la causa de abortos recurrentes que más se puede tratar, se considera que corregirlas lo antes posible resulta crucial para lograr un embarazo exitoso.<sup>15</sup> Por otro lado, la realización de una histeroscopia no afecta en modo alguno de forma negativa a un embarazo futuro, por lo que la mayoría de las fuentes coinciden en que debería incorporarse al estudio de rutina en los casos de abortos de repetición.<sup>16, 17</sup>

Respecto a la toma de biopsias de endometrio, se considera que la histeroscopia es el método que con más alta sensibilidad y especificidad permite sospechar patología endometrial (90% y 80% respectivamente), permitiendo además la toma de biopsias dirigidas y siendo el estudio anatomopatológico el que nos aportará el diagnóstico definitivo.<sup>18</sup> Dado el gran valor de la histeroscopia en la sospecha de patología endometrial, numerosos estudios demuestran que no existe indicación para la realización de manera rutinaria de biopsias endometriales en pacientes infértiles en las cuales no se han hallado anomalías uterinas en la histeroscopia.<sup>19</sup>

Por todo ello la histeroscopia resulta un procedimiento de gran utilidad en el diagnóstico y el tratamiento de anomalías estructurales de la cavidad uterina, así como en el estudio de los principales marcadores de receptividad del endometrio, y la base de los ensayos clínicos en auge en la actualidad a fin de determinar el perfil génico de la superficie endometrial durante la ventana de implantación.

## **Marcadores histológicos endometriales**

Las recomendaciones actuales para el manejo adecuado de los problemas de la implantación incluyen en primer lugar el estudio de la fase lútea del ciclo en relación con la histología endometrial. Con ello se persiguen dos objetivos fundamentales: por un lado, asegurar que se ha producido la ovulación con la consiguiente formación de un cuerpo lúteo activo en la liberación de progesterona y, como consecuencia, los cambios observados en las glándulas endometriales; y por otro lado asegurar que la edad endometrial está adecuadamente correlacionada con la edad embrionaria.<sup>20, 21, 22</sup> No obstante, recientemente se ha observado que la prevalencia de un desfase superior a dos días entre ambas edades es mayor en mujeres fértiles que en infértiles y por ello se considera que la datación histológica del endometrio aporta poca información de cara al tratamiento de defectos de la implantación, pasando a un segundo plano con respecto a otro tipo de marcadores que serán abordados más adelante.

### *Pinópodos*

Fueron descubiertos por primera vez en humanos en 1987. Se trata de microprotusiones del epitelio luminal endometrial en las cuales se interdigitan las microvellosidades de superficie del trofoectodermo durante la fase de adhesión de la implantación. Aparecen alrededor del día 20 del ciclo menstrual y tienen una vida breve que apenas excede las 48 horas, correspondiéndose así con la llamada ventana de implantación. Por este motivo los pinópodos han sido propuestos como marcadores que indican la apertura del periodo de receptividad endometrial.<sup>23</sup>

Su aparición está bajo el control estricto de la progesterona.<sup>24</sup> Además, se ha comprobado que la expresión de los genes HOXA-10 resulta imprescindible para el desarrollo de los pinópodos. De hecho, bloqueando su transcripción génica se observa un drástico descenso en el número de microprotusiones endometriales que aparecen.<sup>25</sup> Igualmente, el desarrollo de los pinópodos se asocia a un incremento de la expresión del Factor Inhibidor de Leucemia (LIF).<sup>26, 27</sup> Con todo ello, la detección de pinópodos durante la fase secretora del ciclo puede ser de gran utilidad para determinar la receptividad endometrial a fin de aumentar las tasas de implantación. No obstante, cabe mencionar que sólo marcan cuándo se abre la ventana de implantación y además se ha comprobado que es altamente variable entre una paciente y otra. Por tanto, su utilidad como marcador resulta todavía controvertida.<sup>28, 29</sup>

## **Marcadores moleculares endometriales**

El objetivo de identificar una o varias moléculas que puedan ser consideradas marcadores inequívocos de receptividad endometrial ha sido perseguido durante décadas por investigadores a nivel mundial. Esta molécula o conjunto de moléculas, para poder ser consideradas marcadores, deberían estar presentes en toda mujer con fertilidad probada durante la ventana de implantación, y por extensión estar ausentes en todas aquellas pacientes con abortos recurrentes, así como poder correlacionarse con una implantación exitosa.<sup>30,31</sup>

No obstante, aunque durante mucho tiempo los esfuerzos se han centrado en descifrar el rol de cada una de las moléculas implicadas en el proceso de la implantación, hoy en día se sabe a ciencia cierta que para que el endometrio se transforme en receptivo deben sucederse cientos de procesos moleculares distintos que en su conjunto juegan un papel determinante para la implantación exitosa del blastocisto.<sup>32</sup>

A continuación se abordan algunas de las moléculas implicadas en este proceso que se han propuesto como posibles candidatas a marcadores moleculares de la ventana de implantación. En cualquier caso cabría destacar que, aunque se conoce mucho al respecto, es sabido que son cientos los procesos y las moléculas implicadas las que todavía quedan por descubrir.

### *Interleukina-1*

La IL-1 fue la primera descrita y ha sido la más estudiada. El sistema IL-1-receptor está compuesto por dos tipos de ligandos (IL-1 $\alpha$  y IL-1 $\beta$ ) y dos tipos de receptores (IL-1RT1 y IL-1RT2). Asimismo, existe un receptor antagonista: el IL-1Ra, que actúa como antagonista completo previniendo que la IL-1 se una al receptor y se exprese durante el ciclo menstrual.

El endometrio humano expresa el receptor IL-1RT1 en las células epiteliales endometriales durante todo el ciclo pero aumenta su expresión durante la fase secretora. El receptor IL-1RT2, por su parte, está menos ampliamente distribuido que el tipo 1 pero también se expresa en forma ciclo-dependiente.<sup>33, 34</sup>

La expresión de IL-1 $\beta$ , IL-1RT1, y IL-1Ra está regulada por la leptina en forma up-regulation, y a su vez la IL-1 $\beta$  actuaría como regulador del receptor del LIF incrementando sus niveles.<sup>33</sup>

Se ha demostrado que el bloqueo del receptor IL-1RT1 en el endometrio materno impide la implantación interfiriendo en la adhesión del blastocisto, por eso se

cree que esta interleukina está involucrada en la patogenia de abortos recurrentes sin causa aparente.<sup>35</sup>

### *Interleukina-11*

Ha sido también ampliamente estudiada y su participación en la decidualización del endometrio es bien conocida.

Actúa a través de su receptor específico (IL-11R) y se ha demostrado que dicho receptor es necesario para el normal desarrollo de la decidua previo a la implantación del blastocisto.<sup>36</sup> Además, determina las capacidades de invasión y migración del trofoblasto en la pared del endometrio.<sup>37</sup>

De hecho, el déficit del receptor 11R $\alpha$  condiciona infertilidad por defectos en la decidualización.<sup>38</sup> Por ello, se cree que en muchos casos de infertilidad de causa no conocida están implicadas mutaciones en los genes que codifican para IL-11 y IL-11R y que cambios en su secuencia contribuirían al éxito de técnicas de reproducción asistida.<sup>39</sup> Respecto a la patogenia de las mutaciones se cree que no influyen directamente sobre el desarrollo del endometrio sino que más bien contribuyen a crear un desbalance de citocinas que tiene repercusiones sobre la decidualización y la consiguiente implantación del trofoblasto.<sup>40</sup>

### *Interleukina-6*

Se encuentra englobada dentro de la Familia IL-6, que también comprende, entre otras, a la IL-11 y al LIF.

La IL-6 es una citokina proinflamatoria que es secretada en su mayor parte por el epitelio endometrial y las células estromales en el momento de la implantación.<sup>41</sup>

Se encuentra sometida a una regulación cíclica de tal forma que alcanza sus niveles máximos durante la ventana de implantación y durante la menstruación.<sup>42</sup> Su expresión está bajo el control de diversos factores, entre los que destacan la IL-1 y los estrógenos como estimuladores de su secreción, y la  $\beta$ hCG como inhibidor.<sup>42</sup>

Estudios recientes han demostrado que bajos niveles de IL-6 mRNA se relacionan con abortos recurrentes, probablemente como resultado del descenso en las funciones de la IL-6 en cuanto al remodelado de los tejidos endometriales, decidualización y desarrollo del trofoblasto.<sup>43</sup> Sin embargo, niveles excesivos de IL-6 se han relacionado igualmente con gestaciones perdidas por exceso de función proinflamatoria, que conllevaría una implantación defectuosa del blastocisto.<sup>44</sup>

### *Factor Inhibidor de la Leucemia (LIF)*

Es también miembro de la familia de las citokinas.

Sus niveles ascienden de forma significativa en la mitad de la fase secretora del ciclo menstrual tanto a nivel del epitelio glandular endometrial como a nivel estromal, con un pico máximo el día 20. Recientes estudios han demostrado que se expresa en las glándulas endometriales el día 4 postfecundación y en las células del estroma próximas al lugar de implantación en el momento de la adherencia. Por ello, se ha deducido que el LIF tiene una acción triple: actúa en un primer momento en la preparación del útero durante la decidualización; además favorece el desarrollo del blastocisto preimplantatorio; y finalmente participa en la fase de adhesión.<sup>45, 46</sup>

Diversos estudios llevados a cabo en mujeres con problemas de fertilidad han puesto de manifiesto que la expresión de LIF endometrial en estos casos es inferior con respecto a mujeres control.<sup>47</sup> Los estudios llevados a cabo más recientemente a este respecto han demostrado que la formación de pinópodos es directamente proporcional a la expresión de LIF, resultando ambos factores disminuidos en mujeres con infertilidad asociada a problemas de implantación.<sup>48</sup>

### *Integrinas*

Dentro de las moléculas de adhesión han sido las más ampliamente estudiadas en humanos por su rol potencial en la receptividad del endometrio.<sup>49</sup>

Las integrinas son una familia de glicoproteínas transmembrana que sirven como receptores de varios ligandos de la matriz extracelular, así como a su vez modulan la adhesión célula-célula y participan en señales de transducción.

A pesar de que muchas de ellas se expresan de manera constitutiva, muchas otras van variando su concentración a lo largo del ciclo menstrual. Del mismo modo, algunas se expresan exclusivamente en el epitelio luminal, mientras que otras están limitadas al compartimento glandular, e incluso en muchos casos su localización también va cambiando a lo largo del ciclo.

Así, más que la síntesis de novo, lo que tiene un significado funcional en la receptividad del endometrio es su distribución a lo largo de la membrana celular. Por ejemplo, la integrina  $\alpha6\beta1$  se expresa habitualmente a lo largo de la membrana basal y cambia su ubicación a la región ápico-lateral en el momento de la implantación.<sup>49</sup> De la misma manera, la  $\alpha v\beta3$  se re-localiza de la región baso-lateral a la apical cuando el endometrio es receptivo.<sup>49</sup>

Diversos estudios han demostrado que son a su vez expresadas en el trofoblasto en el momento de la implantación, y por eso se cree que la unión de las integrinas endometriales junto con las del trofoblasto juega un papel determinante para una implantación exitosa.<sup>50</sup> Dentro de las integrinas expresadas en el blastocisto merece especial interés la expresión de la  $\alpha\beta1$ . De hecho, se ha observado que su bloqueo reduce el número de sitios de implantación e igualmente se ha registrado una reducción de esta integrina en pacientes con abortos recurrentes de causa inexplicable.<sup>51, 52</sup>

Estudios más recientes se han centrado en el papel que desempeñan en el fenómeno de la implantación otras moléculas de esta misma familia cuyas funciones no eran tan conocidas hasta el momento. Así, se ha observado que la integrina  $\beta8$  juega un rol crucial durante la implantación del blastocisto puesto que regula la actividad del Factor de crecimiento transformante Beta 1 (TGF- $\beta1$ ), el cual induce el crecimiento y la diferenciación celular. Asimismo, se ha comprobado que la expresión de esta integrina aumenta a nivel endometrial durante el periodo peri- y post-implantatorio y consecuentemente su inhibición hace que el fenómeno de la implantación se vea comprometido.<sup>53</sup>

Otra integrina en estudio recientemente es la  $\beta3$ . En su caso parece desempeñar también un papel crucial para la receptividad del endometrio puesto que se ha visto que se encuentra significativamente disminuida en pacientes con abortos recurrentes de causa desconocida en comparación con mujeres control.<sup>54</sup> De hecho, se ha propuesto su uso como predictor de éxito en terapias de fecundación in vitro (IVF). El motivo reside en que se ha observado que las pacientes con niveles normales de esta integrina presentaban unas tasas de embarazo tras IVF dobles a aquellas con bajos niveles. Por ello, se cree que la estimulación de su expresión podrá ser utilizada en el futuro como herramienta clave para incrementar el éxito de programas de IVF.<sup>55</sup>

### *L-Selectina*

Al igual que las integrinas, son glicoproteínas de adhesión celular que han sido descritas como fundamentales en la regulación de los primeros pasos de la adhesión del blastocisto al endometrio materno.<sup>56</sup>

La L-selectina se expresa en la superficie del blastocisto, mientras que los oligosacáridos que actúan como ligandos, tales como MECA-79 o HECA-452, se encuentran formando parte del glicocáliz endometrial, siendo máxima su concentración a nivel de los pinópodos.<sup>57</sup> De esta manera, la interacción entre las selectinas y sus ligandos permitirá la adhesión del trofoblasto a la decidua materna.<sup>58</sup> Una vez producido el contacto, tiene lugar un pico de secreción de  $\beta hCG$  por parte del blastocisto, hormona que a su vez actúa sobre el epitelio endometrial induciendo la

secreción de trofinina, una proteína que será determinante en fases posteriores para la implantación del trofoblasto.<sup>59</sup>

La expresión de los ligandos de la L-selectina en la superficie endometrial es ciclo-dependiente. Así, alcanza niveles máximos durante el periodo periovulatorio y a mitad de la fase secretora, mientras que sus niveles más bajos se detectan durante la fase proliferativa del ciclo.<sup>60</sup>

Estudios recientes han demostrado que existen diferencias significativas en la expresión de los ligandos de la L-selectina entre mujeres fértiles e infértiles, por lo que se sugiere que su determinación podría tener un papel clave para tratar de predecir las posibilidades de éxito de tratamientos de reproducción asistida previo inicio de los mismos.<sup>61</sup> De este modo, se ha visto que altos niveles de ligandos de la L-selectina se correlacionan con mayores tasas de éxito de IVF.<sup>62</sup> Por extensión, el screening de la ausencia de los mismos podría ayudar a evitar ciclos repetidos de técnicas de reproducción asistida que resultarían fallidos.<sup>63, 64</sup>

No obstante, todavía falta mucho por aclarar respecto a los mecanismos de acción de la L-selectina como molécula de adhesión, todo ello a fin de poder revelar su implicación en abortos recurrentes de causa no conocida.<sup>65</sup>

### *E-cadherina*

Al igual que las selectinas, las cadherinas constituyen un grupo de glicoproteínas de adhesión celular que en este caso actúa por un mecanismo calcio-dependiente. Se dividen en varias subclases pero en lo referente al fenómeno de la implantación, la E-cadherina ha sido la más ampliamente estudiada.

Las funciones de adhesión celular mediadas por las cadherinas se correlacionan estrechamente con los niveles de calcio intracelular. De este modo, un incremento en los niveles del ion calcio provocará que las cadherinas disminuyan su expresión a nivel epitelial con la consiguiente disociación celular.<sup>66</sup>

En el endometrio, este hecho determina que las cadherinas adquieran una doble función. En un primer momento los niveles de calcio intracelular son bajos, lo cual permite la expresión de las cadherinas manteniendo las células del epitelio endometrial fuertemente unidas entre sí, y esto resulta clave para que el blastocisto se pueda adherir a la decidua materna. Posteriormente, una vez que el blastocisto se encuentra ya adherido, un aumento en los niveles de progesterona induce la expresión de calcitonina con el consiguiente aumento del calcio intracelular, lo cual a su vez inhibirá a las cadherinas, provocando una disociación celular a nivel del epitelio endometrial que resultará clave para la invasión trofoblástica de la decidua.<sup>67</sup>

Por ello, se considera que la progesterona es probablemente el principal regulador de la expresión de la E-cadherina a nivel endometrial por medio de la vía de la calcitonina.<sup>68</sup>

Además, la E-cadherina se expresa en los tejidos embrionarios, siendo considerada una molécula fundamental para la organogénesis.<sup>69</sup>

#### *Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)*

Es un factor de permeabilidad vascular, estimula la mitosis de las células endoteliales, y regula factores de crecimiento para la vasculogénesis y angiogénesis. De este modo, su función principal es la de modular la angiogénesis durante el periodo peri-implantatorio en la decidua materna, estableciendo los cambios en la vascularización endometrial que son necesarios para el desarrollo del embrión hasta que se establezca la placenta funcionalmente activa.<sup>70</sup>

Sus efectos son mediados por dos receptores con actividad tirosínquinasa: VEGFR1 y VEGFR2. La expresión de estos receptores está regulada fundamentalmente por los estrógenos, y en menor medida por progesterona y situaciones de hipoxia tisular.<sup>71</sup>

La alteración en la expresión génica a nivel endometrial del VEGF y sus receptores, así como sus variaciones en los niveles séricos maternos, se cree que desempeñan un papel importante en la patogenia de los abortos recurrentes de causa no conocida.<sup>72</sup>

#### *Familia del factor de crecimiento epidérmico*

Incluye al factor de crecimiento epidérmico en sí mismo (EGF), al factor transformador del crecimiento  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) y al factor de crecimiento epidérmico fijador de heparina (HB-EGF).

Juegan un papel clave para el desarrollo y diferenciación del epitelio glandular endometrial, favorecen el desarrollo embrionario y participan en la fase de adhesión de la implantación.

Diversos estudios han demostrado que la mutación de los genes que codifican para el EGF o el TGF- $\alpha$  no condiciona alteraciones en la implantación puesto que se ven compensados por otras moléculas de la misma familia. Sin embargo, las mutaciones en el gen que codifica para el receptor del EGF acarrea defectos del proceso implantatorio.<sup>73</sup>

El HB-EGF es responsable del aumento de la permeabilidad de los capilares próximos al blastocisto que está implantándose. Por ello, su función es fundamental para una implantación exitosa.

Su pico de secreción máxima coincide con la formación de los pinópodos<sup>74</sup>, es decir, en el momento de máxima receptividad endometrial, y es capaz de estimular la expresión de otras moléculas que aparecerán más adelante en el proceso de la implantación, como el LIF.<sup>75</sup>

El blastocisto, a su vez, contiene receptores que son capaces de reconocer al HB-EGF interpretándolo como una señal para el crecimiento y desprendimiento de la zona pelúcida. Por tanto, se dice que la acción del HB-EGF es doble: por un lado ejerce su función sobre el endometrio y por otro promueve la diferenciación del blastocisto pre-implantatorio jugando así un papel decisivo en el diálogo embrio-uterino.<sup>76</sup>

Además, el HB-EGF posee una acción protectora contra la hipoxia y la formación de radicales libres tóxicos productores de isquemia, que junto con la inhibición de los genes que favorecen la apoptosis le han convertido en el factor de crecimiento más potente para el desarrollo embrionario.<sup>77, 78</sup>

### *Osteopontina (OPN)*

Es una glicoproteína secretada por el epitelio endometrial cuya síntesis es máxima en el día 4 post-fecundación pasando a ser secretada por las zonas donde se implantará el blastocisto durante los días 5 a 8.<sup>79</sup>

La OPN se ha visto que guarda una estrecha relación con la formación de los pinópodos, por lo que su participación en el desarrollo del endometrio receptivo está fuertemente demostrada.<sup>80</sup> Así, se ha visto que el bloqueo en la traducción del OPN mRNA atenúa la adhesión e invasión del blastocisto en las células del estroma endometrial a través de la inhibición de la actividad enzimática de las metaloproteinasas en la matriz extracelular.<sup>79</sup>

La expresión de la OPN está regulada fundamentalmente por la progesterona y las gonadotropinas.<sup>81</sup> De este modo, se ha comprobado que la expresión de la OPN aumenta en respuesta a las gonadotropinas a través de una vía que implica al factor de crecimiento epidérmico, el cual a su vez estimula la síntesis de progesterona durante la fase lútea del ciclo menstrual.<sup>82, 83</sup>

No obstante, cabría decir que se conoce bastante acerca del rol de esta glicoproteína durante la ventana de implantación en mujeres fértiles. No obstante, su papel como marcador en mujeres infértiles por abortos recurrentes es todavía limitado.

### *Mucinas (MUC1)*

Las mucinas con glicoproteínas de elevado peso molecular debido a su alto contenido en carbohidratos. De entre las 14 mucinas descritas en humanos, la única que se expresa en la superficie endometrial es la Mucina-1 (MUC1).

La MUC1 se encuentra formando parte del glicocálix de la superficie epitelial del endometrio. Su expresión va variando a lo largo del ciclo menstrual y se cree que la progesterona es el principal regulador de sus niveles en epitelio luminal endometrial.

<sup>84</sup>

Está compuesta por un dominio intracelular citoplásmico y un dominio extracelular en forma de cola sobresaliente 200-500nm de la membrana celular epitelial. Dado que se piensa que las mucinas funcionan como moléculas de anti-adhesión, y teniendo en cuenta su estructura extracelular, la MUC-1 podría inhibir la interacción entre el embrión y las moléculas de adhesión apicales del epitelio endometrial materno, creando una barrera que impediría la implantación del blastocisto.<sup>85</sup>

Por todo ello, elevados niveles de progesterona durante la fase peri-implantatoria determinarían una pérdida de la MUC-1 a nivel epitelial, lo cual se considera un hecho clave para la implantación exitosa.<sup>86</sup>

Por extensión, estudios recientes sugieren que bajos niveles de MUC-1 podrían estar implicados en la patología de los abortos recurrentes de causa no conocida.<sup>87</sup> No obstante, aunque inicialmente se pensó que en mujeres infértiles pudiesen existir polimorfismos genéticos en los alelos que codifican para MUC-1<sup>88</sup>, estudios más recientes han puesto de manifiesto que dichos polimorfismos no aparecen como tal, sino que la causa estaría más a nivel de las interacciones de la MUC-1 con otras moléculas durante la ventana de implantación.<sup>89</sup>

### *Leptina*

La leptina es un polipéptido no glicosilado que actúa a través de su receptor OB-R, el cual se localiza a nivel del epitelio luminal y glandular endometrial. El receptor de la leptina está presente en el endometrio a lo largo de todo el desarrollo peri-implantatorio, mientras que la leptina es secretada por el embrión humano únicamente en la fase de blastocisto.<sup>90</sup> Por ello, se sugiere que esta molécula podría llegar a considerarse, no sólo como marcador de receptividad endometrial, sino también de viabilidad embrionaria.<sup>91</sup>

El papel de la leptina en el proceso de la implantación se justifica por un mecanismo indirecto, puesto que su función es la de incrementar los valores del LIF y de su receptor, los cuales a su vez, como ya se ha dicho, resultan imprescindibles para una implantación exitosa.<sup>92</sup>

Numerosos estudios han demostrado que niveles de leptina excesivos, insuficientes, o bien una resistencia a sus acciones, se han asociado a anomalías de la función reproductiva por defectos en la implantación.<sup>93</sup> Así, se vio que el bloqueo de la señalización del sistema de la leptina producía una reducción significativa en las tasas de implantación embrionaria.<sup>94</sup> No obstante, también existen evidencias científicas recientes que no han hallado diferencias significativas entre los niveles séricos de leptina en mujeres fértiles e infértiles, lo cual sugiere que la función de esta molécula en el proceso de adhesión del trofoblasto quizá no sea tan imprescindible.<sup>95</sup>

#### *Ciclina E y p27: EFT®*

Ya en el año 2003, el investigador norteamericano Harvey Kliman y su grupo de la universidad de Yale propusieron, mediante la realización de un estudio retrospectivo en mujeres fértiles e infértiles, la utilidad de la ciclina E y p27 como reguladores de los procesos bioquímicos implicados en el desarrollo de la decidua y, por tanto, como marcadores de la receptividad del endometrio.<sup>96</sup>

Dado que, como ya se ha mencionado, la mayor parte de los casos de infertilidad de causa no conocida se deben a fallos en la implantación, este grupo norteamericano vio la necesidad de evaluar con precisión el endometrio a fin de diferenciar entre el desarrollo normal y anormal del mismo para detectar anomalías que, potencialmente, pudieran ser corregidas antes de iniciar los ciclos de IVF.

A pesar de que se conoce mucho acerca de las moléculas y procesos que tienen lugar a nivel endometrial durante el proceso pre- y peri-implantatorio, las herramientas actuales para la evaluación endometrial son, sin embargo, limitadas. A este respecto, sobre la base de la expresión endometrial de la ciclina E y p27, han desarrollado una prueba de función endometrial patentada (EFT®). Esta prueba ha sido llevada a cabo sobre pacientes con infertilidad y abortos recurrentes.

El test tiene como objetivo predecir si el endometrio de la paciente se encuentra receptivo para la implantación embrionaria o no. El proceso comienza con la toma de una biopsia endometrial que será teñida antes de mirarla al microscopio. Por microscopía óptica se comprueba en primer lugar que no exista ningún defecto en la arquitectura global de las glándulas endometriales y, a continuación, se buscan los marcadores moleculares específicos sobre la superficie endometrial. En caso de estar

éstos alterados se deduce que la decidua no se desarrollará adecuadamente y por ello será necesaria alguna intervención para corregir la anomalía previa IVF.

Según ha observado el grupo de investigación en las pacientes sometidas al EFT, los trastornos que subyacen más frecuentemente en pacientes con test alterados son: endometriosis, hidrosálpinx, IMC por encima o por debajo del establecido para la talla, situaciones de estrés, y peri-menopausia.

No obstante, aunque los estudios realizados hasta el momento demuestran un gran valor predictivo del test de cara al éxito de un embarazo futuro, han sido desarrollados con un número muestral demasiado pequeño, lo cual hace que los resultados no adquieran la significación estadística necesaria para que las conclusiones sean válidas.<sup>97</sup> Por ello, el EFT está siendo sometido a ensayos multicéntricos prospectivos de casos y controles por parte del grupo de investigación del Dr. Harvey Kliman sobre los diferentes grupos de pacientes infértiles, a fin de investigar el valor del test en la predicción de las tasas de embarazo tanto en casos de ciclos naturales normales como en fecundación in vitro o pacientes con ovocitos de donantes.

## **Marcadores genéticos endometriales**

### *Genes homeóticos: HOXA-10 y 11*

Los genes homeobox están formados por una secuencia de ADN que codifica 61 aminoácidos. Cabe destacar que se conservan idénticos a lo largo de la evolución actuando como moduladores de la morfogénesis y la diferenciación celular.<sup>98</sup> Así, regulan la organogénesis durante el periodo embrionario, mientras que en el adulto se expresan a nivel del epitelio glandular y del estroma endometrial durante el ciclo menstrual, con un marcado incremento durante el período peri-implantatorio.<sup>99</sup>

A nivel del endometrio, HOXA-10 y 11 regulan la expresión de moléculas y factores de transcripción que a su vez van a coordinar el desarrollo del endometrio en respuesta al estradiol y la progesterona.<sup>100</sup> Por ello, se ha demostrado que su expresión resulta imprescindible para una decidualización adecuada, de tal forma que una disminución en su expresión a nivel del estroma endometrial se ha asociado a la disminución de la receptividad uterina en mujeres con endometriosis.<sup>101</sup> Así, se dice que el bloqueo de HOXA-10 induce un fenotipo infértil por defectos en la implantación del blastocisto, y lo mismo sucede en ausencia de HOXA-11, debido en ambos casos a un desarrollo anómalo de la decidua.<sup>102</sup>

Por lo tanto, una desregulación en la expresión génica de este grupo de genes podría ser la causa de abortos de repetición de origen desconocido.<sup>103, 104, 105.</sup>

No obstante, y a pesar de tantas evidencias, la participación de estos genes en la implantación humana resulta todavía poco convincente. El desarrollo de la genómica permitirá, en investigaciones futuras, desvelar el mecanismo exacto por el que la transcripción alterada de estos genes se relaciona con abortos recurrentes por defectos de la implantación del blastocisto y quizá puedan ser utilizados en un futuro como marcadores de receptividad del endometrio.

### **Patrones histeroscópicos desfavorables relacionados con la alteración en los marcadores de receptividad endometrial**

Son numerosos los estudios que se han llevado a cabo en la búsqueda de una correlación entre las anomalías anatómicas observadas mediante histeroscopia y los defectos en la expresión de los marcadores de receptividad endometrial obtenidos en la biopsia. De este modo, se compara la expresión génica y molecular durante la ventana de implantación en mujeres con infertilidad asociada a patologías tales como endometriosis, pólipos o fibromas uterinos hallados por histeroscopia, con respecto a mujeres control sin problemas reproductivos.<sup>106</sup>

En este sentido, la presencia de pólipos endometriales se ha relacionado con un marcado descenso en la expresión de los genes homeóticos HOXA-10 y 11, lo cual representaría un claro mecanismo molecular subyacente a los abortos recurrentes en relación a pólipos endometriales.<sup>107</sup>

En el caso de los leiomiomas uterinos sucede algo similar. Si bien es cierto que su efecto sobre la implantación del blastocisto no está nada claro, se sabe que ocasionan una distorsión mecánica de la cavidad endometrial que puede alterar el transporte y adhesión embrionarios, y a su vez se ha visto que los fibromas pueden afectar al patrón de expresión génica del endometrio causando alteraciones relevantes en la ventana de implantación.<sup>108,109</sup> Respecto a los miomas intramurales, parecen no mostrar diferencias significativas en la expresión génica y molecular con respecto a los controles, pero en el caso de los submucosos existe un marcado descenso global en la expresión de los marcadores de receptividad del endometrio, lo cual podría representar en gran medida la causa de los abortos recurrentes asociados a la presencia de fibromas uterinos.<sup>110</sup>

En el campo de la endometriosis, se ha constatado un déficit en la expresión de integrinas y moléculas de adhesión en mujeres afectas frente a mujeres control, lo cual vendría a justificar en parte los defectos en la implantación. Así, en mujeres con

endometriosis la expresión de la integrina  $\alpha V\beta 3$  se encuentra regulada en menos.<sup>111</sup> Además, se ha podido comprobar la expresión aberrante de genes y productos génicos tales como la aromatasa, el 17- $\beta$ -hidroxiesteroide, los genes HOXA-10 y 11, el LIF, y el factor de sangrado endometrial.<sup>112, 113</sup> Respecto a la aromatasa, cabe destacar que sólo se produce en el endometrio ectópico de mujeres con endometriosis, pero no en el de mujeres sanas. El factor de sangrado endometrial, por su parte, es un marcador de no receptividad uterina que es expresado de forma abundante durante la ventana de implantación en mujeres con endometriosis e infertilidad.<sup>114</sup> No obstante, en estas pacientes no se ha observado un anómalo desarrollo de los pinópodos durante la ventana de implantación, así como numerosos estudios concluyen que el perfil génico y molecular no difiere suficientemente del de los controles como para ser considerado la causa única de los defectos de la implantación en la endometriosis. Por ello, se piensa que la infertilidad asociada a esta patología podría estar igualmente relacionada con los ovocitos de mala calidad que son consecuencia de las citoquinas liberadas por la mucosa ectópica, las cuales influirían tanto en la foliculogénesis como en el desarrollo del embrión pre y post-implantatorio.<sup>115</sup>

Con todo ello, se trata no sólo de estudiar los diversos mecanismos endocrinos y moleculares necesarios para el establecimiento de la ventana de implantación, sino también de intentar dilucidar el porqué de la disfunción de estos sistemas en los casos de infertilidad asociados a defectos de la implantación en mujeres con patología ginecológica subyacente observada mediante histeroscopia.

## **Discusión**

La implantación del blastocisto es el resultado de una secuencia perfectamente coordinada de eventos que incluyen la adhesión celular, invasión y mecanismos reguladores inmunes. Resulta sorprendente que en la mayor parte del ciclo menstrual el endometrio es hostil a la implantación embrionaria, por lo que el establecimiento de la ventana de implantación está rigurosamente controlado en el tiempo y en el espacio mediante la expresión de una serie de moléculas en la superficie endometrial.

A este respecto, la presente revisión bibliográfica pone de manifiesto que los marcadores de receptividad del endometrio que están siendo objeto de investigaciones actuales son muy numerosos. Todo ello con el fin de establecer el perfil bioquímico de la superficie endometrial durante la ventana de implantación, lo cual se ha convertido en uno de los principales objetivos de los estudios desarrollados hoy en día en materia de reproducción humana.

Si bien es cierto que todavía falta mucho por conocer acerca de las funciones concretas que desarrollan durante el periodo peri-implantatorio cada una de estas moléculas, el desarrollo de modelos in vitro ha permitido estudiar las interacciones embrio-uterinas entre los marcadores que expresa el blastocisto y aquellos de la cavidad uterina.

En cualquier caso, tratar de descifrar el perfil génico y molecular del endometrio receptivo representa sólo la mitad del proceso. La otra mitad reside en el estudio de las variantes anatómicas uterinas mediante métodos asequibles y reproducibles como la histeroscopia. En este sentido, el fin último sería establecer una clara correlación entre la anatomía y las alteraciones demostradas a nivel bioquímico-molecular mediante la realización de biopsias de endometrio.

No obstante, las principales limitaciones actuales residen en el desconocimiento de la medida en que la alteración de estos marcadores bioquímicos influye negativamente sobre la implantación embrionaria, así como el hecho de no ser capaces de establecer todavía una estrecha relación entre anomalías anatómicas y moleculares en mujeres con abortos de repetición.

Por tanto, las investigaciones futuras tendrán como objetivo descifrar de manera más precisa las características funcionales y morfológicas de la receptividad endometrial. El conocimiento adquirido en esta línea de investigación orientará hacia el desarrollo de estrategias terapéuticas capaces de establecer nuevas dianas en el manejo de los problemas de fertilidad femenina así como el desarrollo de nuevos métodos contraceptivos.

## **Conclusiones**

- La implantación embrionaria es un paso imprescindible para el proceso reproductivo del ser humano y para pueda producirse son necesarios previamente una serie de cambios a nivel de la superficie estromal endometrial que la transformen en receptiva.
- Son numerosas las moléculas que se han señalado hasta el momento como marcadores de receptividad endometrial por su papel relevante en la transformación estromal. Las alteraciones morfológicas endometriales, que son causa de abortos recurrentes, se relacionan estrechamente con el funcionamiento bioquímico de estas moléculas.
- De todas ellas, las citoquinas han sido las más ampliamente estudiadas. Se trata de un grupo de proteínas con acción local autocrina-paracrina encargadas de

modular gran variedad de funciones celulares fundamentales en el proceso de la implantación.

- Al igual que las citoquinas, se ha señalado de forma destacada el papel regulador de la ciclina E y p27 sobre los procesos bioquímicos que tienen lugar a nivel endometrial, lo cual ha motivado la creación de la prueba de función endometrial patentada (EFT®), con el objetivo de determinar si el endometrio de la paciente se encuentra receptivo para la implantación o no previo procedimiento de reproducción asistida.

- A su vez, la histeroscopia representa una herramienta de gran utilidad en el diagnóstico y manejo de las anomalías a nivel de la superficie endometrial que son causa de pérdida gestacional.

- De cara al futuro se trata de encontrar una correlación evidente entre las anomalías endometriales observadas a nivel molecular y los hallazgos morfológicos obtenidos con histeroscopia. El objetivo final persigue el desarrollo de métodos diagnósticos y terapéuticos asequibles en la práctica clínica diaria que permitan valorar el factor endometrial como causa de abortos de repetición sin necesidad de recurrir a estudios más complejos como la genómica o la biología molecular.

#### **Referencias bibliográficas**

1. Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol.* 2009 Spring;2(2):76-83.
2. Marquard K1, Westphal LM, Milki AA, Lathi RB. Etiology of recurrent pregnancy loss in women over the age of 35 years. *Fertil Steril.* 2010 Sep;94(4):1473-7.
3. Hyde KJ1, Schust DJ2. Genetic considerations in recurrent pregnancy loss. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015 Feb 6;5(3).
4. Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol.* 2009 Spring;2(2):76-83.
5. Garrido-Gimenez C1, Alijotas-Reig J2. Recurrent miscarriage: causes, evaluation and management. *Postgrad Med J.* 2015 Mar;91(1073):151-162.
6. Sugiura-Ogasawara M1, Ozaki Y, Suzumori N. Management of recurrent miscarriage. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014 May;40(5):1174-9.
7. Devi Wold AS1, Pham N, Arici A. Anatomic factors in recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med.* 2006 Feb;24(1):25-32.
8. Propst AM1, Hill JA 3rd. Anatomic factors associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med.* 2000;18(4):341-50.
9. Indraccolo U, Greco P, Scutiero G, Marrocchella S, Sorrentino F, Masticci L, Matteo M. The role of hysteroscopy in the diagnostic work-up of infertile asymptomatic patients. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2014;41(2):124-7.

10. Simon C, Martin JC and Pellicer A (2000) Paracrine regulators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 14,815–826.
11. Norwitz E, Schust D, Fisher S. Implantation and the Survival of Early Pregnancy *New England Journal of Medicine* 2001; 345:1400-1408.
12. Ponnampalam AP, Weston GC, Trajstman AC, Susil B, Rogers PA. Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling. *Mol Hum Reprod* 2004; 10:879-893.
13. Indraccolo U, Greco P, Scutiero G, Marrocchella S, Sorrentino F, Masticci L, Matteo M. The role of hysteroscopy in the diagnostic work-up of infertile asymptomatic patients. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2014;41(2):124-7.
14. Cogendez E1, Dolgun ZN, Sanverdi I, Turgut A, Eren S. Zeynep. Post-abortion hysteroscopy: a method for early diagnosis of congenital and acquired intrauterine causes of abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011 May;156(1):101-4.
15. G. Ventolini, M. Zhang, J. Gruber. Hysteroscopy in the evaluation of patients with recurrent pregnancy loss: a cohort study in a primary care population. *Surgical Endoscopy And Other Interventional Techniques.* December 2004, Volume 18, Issue 12, pp 1782-1784.
16. Moffat R, Bergsma N, Sartorius G, Raggi A, Güth U, De Geyter C. Does prior hysteroscopy affect pregnancy outcome in primigravid infertile women? *Am J Obstet Gynecol.* 2014 Aug;211(2):130.e1-6.
17. Makled AK1, Farghali MM, Shenouda DS. Role of hysteroscopy and endometrial biopsy in women with unexplained infertility. *Arch Gynecol Obstet.* 2014 Jan;289(1):187-92.
18. Ahmadi F, Rashidy Z, Haghighi H, Akhoond M, Niknejadi M, Hemat M, Shamsipour M. Uterine cavity assessment in infertile women: sensitivity and specificity of three-dimensional hysterosonography versus hysteroscopy. *Iran J Reprod Med.* 2013 Dec;11(12):977-82.
19. Radwan P, Radwan M, Polać I, Wilczyński JR. Detection of intracavitary lesions in 820 infertile women: comparison of outpatient hysteroscopy with histopathological examination. *Ginekol Pol.* 2013 Oct;84(10):857-61.
20. Acosta AA, Elberger L, Borghi M, Calamera JC, Chemes H, Doncel GF, Kliman H, Lema B, Lustig L and Papier S (2000) Endometrial dating and determination of the window of implantation in healthy fertile women. *Fertil Steril* 73,788–798.
21. Sudoma I1, Goncharova Y, Zukin V. Optimization of cryocycles by using pinopode detection in patients with multiple implantation failure: preliminary report. *Reprod Biomed Online.* 2011 Jun;22(6):590-6.
22. Coutifaris C, Myers ER et al. (2004) Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status. *Fertil Steril* 82,1264–1272.
23. Dey S, Lim H, Das S, Reese J, Paria B, Daikoku T, Wang H. Molecular Cues to Implantation. *Endocrine Reviews* 2004; 25:341-373.
24. Sharkey A. Cytokines and implantation. *Reviews of Reproduction* 1998; 3:52-61.
25. Bagot CN, Kliman HJ and Taylor HS (2001) Maternal Hoxa10 is required for pinopod formation in the development of mouse uterine receptivity to embryo implantation. *Dev Dyn* 222,538–544
26. Aghajanova L, Stavreus-Evers A, Nikas Y, Hovatta O and Landgren BM (2003) Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium. *Fertil Steril* 79 (Suppl. 1), 808–814.
27. Mikołajczyk M1, Skrzypczak J, Wirstlein P. No correlation between pinopode formation and lif and mmp2 expression in endometrium during implantation window. *Folia Histochem Cytobiol.* 2011;49(4):615-21.
28. Quinn CE1, Casper RF. Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity. *Hum Reprod Update.* 2009 Mar-Apr;15(2):229-36.
29. Quinn C1, Ryan E, Claessens EA, Greenblatt E, Hawrylyshyn P, Cruickshank B, Hannam T, Dunk C, Casper RF. The presence of pinopodes in the human endometrium does not delineate the implantation window. *Fertil Steril.* 2007 May;87(5):1015-21.

30. Navarro J, Rosenwaks Z, Levy D, Remohí J, Prado N. Human endometrium receptivity: from basic science to clinic. *Rev Iberoam Fertil* 2002; (19) 6:375-384
31. Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 185-199.
32. Aghajanova L, Hamilton AE, Giudice LC. Uterine receptivity to human embryonic implantation: Histology, biomarkers and transcriptomics. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19:204-211.
33. Boucher A, Kharfi A, Al-Akoum M, Bossu P, Akoum A. Cycle-dependent expression of interleukin-1 receptor type II in the human endometrium. *Biol Reprod* 2001; 65:890-898.
34. Bigonnesse F, Labelle Y, Akoum A. Triphasic expression of interleukin -1 receptor type I in human endometrium throughout the menstrual cycle of fertile women and women with unexplained infertility. *Fertil Steril* 2001; 75:79-87.
35. Simon C, Frances A, Piquette GN, et al. Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinology* 2000; 134:521-528.
36. Karpovich N, Klemmt P, Hwang JH, et al. The production of interleukin-11 and decidualization are compromised in endometrial stromal cells derived from patients with infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:1607-1612.
37. Winship A, Menkhorst E, Van Sinderen M, Dimitriadis E. Interleukin 11: similar or opposite roles in female reproduction and reproductive cancer? *Reprod Fertil Dev*. 2014 Aug 25.
38. Bischof P, Aplin JD, Bentin-Ley U, et al. Implantation of the human embryo: research lines and models. From the implantation research network "Fruitful". *Gynecol Obstet Invest* 2006; 62:206-216.
39. Sabry D1, Nouh O2, Marzouk S1, Hassouna A1. Pilot study on molecular quantitation and sequencing of endometrial cytokines gene expression and their effect on the outcome of in vitro fertilization (IVF) cycle. *J Adv Res*. 2014 Sep;5(5):595-600.
40. Lhotská P, Martínek P, Čedíková M, Lošan P, Králíčková M, Kališ V, Novotný Z. [Analysis of point mutations in interleukin-11 gene in the population of infertile patients and fertile control women]. *Ceska Gynekol*. 2014 Jan;79(1):48-52.
41. Cork, B. A., Tuckerman, E. M., Li, T. C., Laird, S. M. (2002) Expression of interleukin (IL)-11 receptor by the human endometrium in vivo and effects of IL-11, IL-6 and LIF on the production of MMP and cytokines by human endometrial cells in vitro *Mol. Hum. Reprod*. 8,841-848.
42. Perrier d'Hauterive, S., Charlet-Renard, C., Berndt, S., Dubois, M., Munaut, C., Goffin, F., Hagelstein, M. T., Noel, A., Hazout, A., Foidart, J. M., Geenen, V. (2004) Human chorionic gonadotropin and growth factors at the embryonic-endometrial interface control leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin 6 (IL-6) secretion by human endometrial epithelium *Hum. Reprod*. 19,2633-2643.
43. Jasper, M. J., Tremellen, K. P., Robertson, S. A. (2007) Reduced expression of IL-6 and IL-1 $\alpha$  mRNAs in secretory phase endometrium of women with recurrent miscarriage *J. Reprod. Immunol*. 73,74-84.
44. Dimitriadis, E., White, C. A., Jones, R. L., Salamonsen, L. A. (2005) Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation *Hum. Reprod. Update* 11,613-630.
45. Norwitz E, Schust D, Fisher S. Implantation and the Survival of Eearly Pregnancy. *New England Journal of Medicine* 2001; 345:1400-1408.
46. Filant J1, Spencer TE. Uterine glands: biological roles in conceptus implantation, uterine receptivity and decidualization. *Int J Dev Biol*. 2014;58(2-4):107-16.
47. Aghajanova L. Leukemia inhibitory factor and human embryo implantation. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1034:176-183.
48. Aghajanova L1, Altmäe S, Bjuresten K, Hovatta O, Landgren BM, Stavreus-Evers A. Disturbances in the LIF pathway in the endometrium among women with unexplained infertility. *Fertil Steril*. 2009 Jun;91(6):2602-10.
49. Farrell R, Gray D, Gindlesperger V, Arredondo F, Liu J, Loret de Mola JR. Treatment of avb3 integrin abnormalities increases pregnancy success rates after failed IVF cycles. *Fertility and Sterility* 2003; 80:58-59.

50. Wang J and Armant DR (2002) Integrin-mediated adhesion and signalling during blastocyst implantation. *Cells Tissues Organs* 172,190–201.
51. Illera MJ, Cullinan E, Gui Y, Yuan L, Beyler SA, Lessey BA. Blockade of the alpha beta integrin adversely affects implantation in the mouse. *Biol Reprod* 2000; 62:1285-1290.
52. Lessey BA, Castelbaum AJ. Integrins and implantation in the human. *Rev Endocr Mmetab Disord* 2002; 3:107-117.
53. Kumar V, Maurya VK, Joshi A, Meeran SM, Jha RK. Integrin beta 8 (itgb8) regulates embryo implantation potentially via controlling the activity of tgf-b1 in mice. *Biol Reprod*. 2015 Mar 18.
54. Germeyer A, Savaris RF, Jauckus J, Lessey B. Endometrial beta3 integrin profile reflects endometrial receptivity defects in women with unexplained recurrent pregnancy loss. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014 Jun 20;12:53.
55. Revel A (2005) Implementation of integrin 3 level as predictor of implantation in an IVF program. ASRM/CFAS Annual Meeting, Montreal, Canada.
56. Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, et al. Trophoblast L-selectin mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science* 2003; 17; 299(5605): 405-8.
57. Subcellular localization of L-selectin ligand in the endometrium implies a novel function for pinopodes in endometrial receptivity. Nejatbakhsh R, Kabir-Salmani M, Dimitriadis E, Hosseini A, Taheripanah R, Sadeghi Y, Akimoto Y, Iwashita M. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012 Jun 15;10:46.
58. Carson DD, Julian J, Lessey BA, Prakobphol A, Fisher SJ. MUC1 is a scaffold for selecting ligands in the human uterus. *Front Biosci* 2006; 11:2 903-8.
59. Fukuda MN, Sugihara K. An integrated view of L-selectin and trophinin function in human embryo implantation. *J Obstet Gynaecol Res*. 2008 Apr;34(2):129-36.
60. 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 Apr;83 Suppl 1:1297-302.
61. Margarit L, Gonzalez D, Lewis PD, Hopkins L, Davies C, Conlan RS, Joels L, White JO. L-selectin ligands in human endometrium: comparison of fertile and infertile subjects. *Hum Reprod*. 2009 Nov;24(11):2767-77.
62. Wang B, Sheng JZ, He RH, Qian YL, Jin F, Huang HF. High expression of L-selectin ligand in secretory endometrium is associated with better endometrial receptivity and facilitates embryo implantation in human being. *Am J Reprod Immunol*. 2008 Aug;60(2):127-34.
63. Foulk RA, Zdravkovic T, Genbacev O, Prakobphol A. Expression of L-selectin ligand MECA-79 as a predictive marker of human uterine receptivity. *J Assist Reprod Genet*. 2007 Jul;24(7):316-21.
64. Yucha RW, Jost M, Rothstein D, Robertson N, Marcolongo MS. Quantifying the biomechanics of conception: L-selectin-mediated blastocyst implantation mechanics with engineered "trophospheres". *Tissue Eng Part A*. 2014 Jan;20(1-2):189-96.
65. Eskicioglu F, Laçin S, Ozbilgin K, Köse C. The role of selectins in the first trimester pregnancy loss. *Ginekol Pol*. 2014 Apr;85(4):287-93.
66. Comijn J, Bex G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D and van Roy F (2001) The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 7,1267–1278.
67. Li Q, Wang J, Armant DR, Bagchi MK and Bagchi IC (2002) Calcitonin down-regulates E-cadherin expression in rodent uterine epithelium during implantation. *J Biol Chem* 277,46447–46455.
68. White MD, Plachta N. How adhesion forms the early mammalian embryo. *Curr Top Dev Biol*. 2015;112:1-17.
69. Fagotto F. Regulation of cell adhesion and cell sorting at embryonic boundaries. *Curr Top Dev Biol*. 2015;112:19-64.

70. Douglas NC1, Tang H, Gomez R, Pytowski B, Hicklin DJ, Sauer CM, Kitajewski J, Sauer MV, Zimmermann RC. Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) functions to promote uterine decidual angiogenesis during early pregnancy in the mouse. *Endocrinology*. 2009 Aug;150(8):3845-54.
71. Kim M1, Park HJ, Seol JW, Jang JY, Cho YS, Kim KR, Choi Y, Lydon JP, Demayo FJ, Shibuya M, Ferrara N, Sung HK, Nagy A, Alitalo K, Koh GY. VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodelling during pregnancy. *EMBO Mol Med*. 2013 Sep;5(9):1415-30.
72. Amirchaghmaghi E, Rezaei A, Moini A, Roghaei MA, Hafezi M, Aflatoonian R. Gene expression analysis of VEGF and its receptors and assessment of its serum level in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Cell J*. 2015 Winter;16(4):538-45.
73. Xie H, Wang H, Tranguch S, et al. Heparin-binding-EGF deficiency limits pregnancy success in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:18315-18320.
74. Stavreus-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* 2002; 8:765-769.
75. Lessey BA, Gui Y, Apparo KB, Young SL, Mulholland J. Regulated expression of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) in the human endometrium: a potential paracrine role during implantation. *Mol Reprod Dev* 2002; 62:446-455.
76. Lim HJ1, Dey SK. HB-EGF: a unique mediator of embryo-uterine interactions during implantation. *Exp Cell Res*. 2009 Feb 15;315(4):619-26.
77. Kuhn MA, Xia G, Mehta VB, Glenn S, Michalsky MP, Besner GE. Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) decreases oxygen free radical production in vitro and in vivo. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4:639-646.
78. Michalsky MP, Kuhn A, Mehta V, Besner GE. Heparin-binding EGF-like growth factor decreases apoptosis in intestinal epithelial cells in vitro. *J Pediatr Surg* 2001; 36:1130-1135.
79. Qi QR1, Xie QZ1, Liu XL2, Zhou Y1. Osteopontin is expressed in the mouse uterus during early pregnancy and promotes mouse blastocyst attachment and invasion in vitro. *PLoS One*. 2014 Aug 18;9(8):e104955.
80. Aplin JD. Embryo implantation: the molecular mechanism remains elusive. *Reproductive BioMedicine Online* 2006; 13:833-839.
81. Mirkin S, Nikas G, Hsiu J, Díaz J, Oehninger S. Gene Expression Profiles and Structural/Functional Features of the Peri-Implantation Endometrium in Natural and Gonadotropin-Stimulated Cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:5742-5752.
82. Kuwabara Y1, Katayama A2, Tomiyama R2, Piao H2, Kurihara S3, Ono S2, Mine K2, Akira S2, Orimo H2, Takeshita T2. Gonadotropin regulation and role of ovarian osteopontin in the periovulatory period. *J Endocrinol*. 2015 Jan;224(1):49-59.
83. Racicot KE1, Wünsche V1, Auerbach B1, Aldo P1, Silasi M1, Mor G2. Human chorionic gonadotropin enhances trophoblast-epithelial interaction in an in vitro model of human implantation. *Reprod Sci*. 2014 Oct;21(10):1274-80.
84. Meseguer M, Pellicer A, Simon C., 2004. MUC1 and endometrial receptivity. *Mol. Hum. Reprod*. 4(12):1089-1098.
85. Aplin JD. 2006. The cell biology of human implantation. *Placenta*, 17: 269-275.
86. Inyawilert W1, Fu TY, Lin CT, Tang PC. Let-7-mediated suppression of mucin 1 expression in the mouse uterus during embryo implantation. *J Reprod Dev*. 2015 Apr 20;61(2):138-44.
87. Bastu E, Mutlu MF, Yasa C, Dural O, Nehir Aytan A, Celik C, Buyru F, Yeh J. Role of Mucin 1 and Glycodelin A in recurrent implantation failure. *Fertil Steril*. 2015 Apr;103(4):1059-1064.
88. Horne AW, White JO, Margara RA, Williams R, Winston RM, Lalani E. MUC 1: a genetic susceptibility to infertility? *Lancet*. 2001 Apr 28;357(9265):1336-7.

89. Dentillo DB, Souza FR, Meola J, Vieira GS, Yazlle ME, Goulart LR, Martelli L. No evidence of association of MUC-1 genetic polymorphism with embryo implantation failure. *Braz J Med Biol Res.* 2007 Jun;40(6):793-7.
90. Cervero A, Horcajadas JA, Martín J, et al. The leptin system during human endometrial receptivity and preimplantation development. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(5): 2442-51.
91. González RR, Caballero-Campo P, Jasper M, et al. Leptin and Leptin Receptor are expressed in the human endometrium and endometrial Leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 85:4883-88.
92. González RR, Rueda BR, Ramos MP, Littell RD, Glasser S, Leavis PC. Leptin induced increase in leukemia inhibitory factor and its receptor by human endometrium is partially mediated by interleukin 1 receptor signaling. *Endocrinology* 2004; 145:3850-3857.
93. Role of leptin in female reproduction. En: *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* 2015 Jan; 53(1):15-28.
94. Ramos MP, Rueda BR, Leavis PC, Gonzalez RR. Leptin serves as an upstream activator of an obligatory signaling cascade in the embryo-implantation process. *Endocrinology.* 2005 Feb;146(2):694-701.
95. Herrid M, Palanisamy SK, Ciller UA, Fan R, Moens P, Smart NA, McFarlane JR. An updated view of leptin on implantation and pregnancy: a review. *Physiol Res.* 2014;63(5):543-57.
96. Dubowy RL, Feinberg RF, Keefe DL, Doncel GF, Williams SC, McSweet JC, Kliman HJ. Improved endometrial assessment using cyclin E and p27. *Fertil Steril.* 2003 Jul;80(1):146-56.
97. E.B. Johnston-MacAnanny, H.J. Kliman, D.B. Maier, J.C. Nulsen, C.A. Benadiva The role of endometrial function test (EFT®) in recurrent implantation failure (RIF) in IVF. *Fertility and Sterility* September 2007 Volume 88, Supplement 1, Page S162.
98. Taylor HS. The role of HOX genes in the development and function of the female reproductive tract. *Semin Reprod Med* 2000; 18:81-89.
99. Eun Kwon H, Taylor HS. The role of HOX genes in human implantation. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Dec;1034:1-18.
100. Troy PJ, Daftary GS, Bagot CN, Taylor HS. Transcriptional repression of peri-implantation EMX2 expression in mammalian reproduction by HOXA10. *Mol Cell Biol.* 2003 Jan;23(1):1-13.
101. Kim JJ, Taylor HS, Lu Z, Ladhani O, Hastings JM, Jackson KS, Wu Y, Guo SW, Fazleabas AT. Altered expression of HOXA10 in endometriosis: potential role in decidualization. *Mol Hum Reprod.* 2007 May;13(5):323-32.
102. Das SK. Regional development of uterine decidualization: molecular signaling by Hoxa-10. *Mol Reprod Dev.* 2010 May;77(5):387-96.
103. Matsuzaki S, Canis M, Darcha C, Pouly JL, Mage G. HOXA-10 expression in the mid-secretory endometrium of infertile patients with either endometriosis, uterine fibromas or unexplained infertility. *Hum Reprod.* 2009 Dec;24(12):3180-7.
104. Szczepańska M, Wirstlein P, Skrzypczak J. [HOXA11 gene expression in women with and without impaired infertility]. *Ginekol Pol.* 2010 Jun;81(6):414-21.
105. Kosova G, Stephenson MD, Lynch VJ, Ober C. Evolutionary forward genomics reveals novel insights into the genes and pathways dysregulated in recurrent early pregnancy loss. *Hum Reprod.* 2015 Mar;30(3):519-29.
106. Donaghay M, Lessey BA. Uterine receptivity: alterations associated with benign gynecological disease. *Semin Reprod Med.* 2007 Nov;25(6):461-75.
107. Rackow BW, Jorgensen E, Taylor HS. Endometrial polyps affect uterine receptivity. *Fertil Steril.* 2011 Jun 30;95(8):2690-2.
108. Horne AW, Critchley HO. The effect of uterine fibroids on embryo implantation. *Semin Reprod Med.* 2007 Nov;25(6):483-9.

109. Makker A, Goel MM. Uterine leiomyomas: effects on architectural, cellular, and molecular determinants of endometrial receptivity. *Reprod Sci.* 2013 Jun;20(6):631-8.
110. Rackow BW, Taylor HS. Submucosal uterine leiomyomas have a global effect on molecular determinants of endometrial receptivity. *Fertil Steril.* 2010 Apr;93(6):2027-34.
111. García-Velasco JA, Arici A. Is the endometrium or oocyte/embryo affected in endometriosis? *Hum Reprod* 1999;14(suppl 2):77-89.
112. Jana SK, Banerjee P, Mukherjee R, Chakravarty B, Chaudhury K. HOXA-11 mediated dysregulation of matrix remodeling during implantation window in women with endometriosis. *J Assist Reprod Genet.* 2013 Nov;30(11):1505-12.
113. Guidice LC, Telles TL, Lobo S, Kao L. The molecular basis for implantation failure in endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2002; 955: 25-64.
114. Tomassetti C, Meuleman C, Pexters A, Mihalyi A, Kyama C, Simsa P, et al. Endometriosis, recurrent miscarriage and implantation failure: is there an immunological link? *Reprod Biomed Online* 2006; 13:58-64.
115. Saito H, Seino T, Kaneko T et al. Endometriosis and oocyte quality. *Gynecol Obstet Invest* 2002; 53: 46-51.