



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

ANA RITA FERREIRA AMADO ALVES

***O IMPACTO DO FLUIDO ENDOMETRIAL NA IMPLANTAÇÃO
EMBRIONÁRIA***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE GINECOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

PROFESSORA DOUTORA MARIA MARGARIDA DE OLIVEIRA FIGUEIREDO DIAS

PROFESSORA DOUTORA ISABEL MARGARIDA FIGUEIREDO SILVESTRE

JANEIRO/2018

ÍNDICE

RESUMO	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. MATERIAIS E MÉTODOS	9
2.1- FONTES DE INFORMAÇÃO	9
2.2-TERMOS DE PESQUISA	9
2.3- METODOLOGIA DE SELEÇÃO DE ESTUDO	10
2.4- AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO ESTUDO	11
2.5- RISCO DE BIAS NOS ESTUDOS INDIVIDUAIS	11
3. RESULTADOS	12
3.1- FLUIDO ENDOMETRIAL	12
3.2- MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE NIDAÇÃO	22
3.2.1- PROPRTEÍNA CONVERTASE 6 (PC6)	22
3.2.2- FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF)	25
3.2.3- INTEGRINA BETA-3	28
3.2.4- FATOR ESTIMULADOR DE COLÓNIAS-3 (CSF-3).....	29
3.2.5- FATOR INIBIDOR DE LEUCEMIA (LIF)	31
3.2.6 - GLICODELINA	34
4. DISCUSSÃO	36
5. CONCLUSÃO	39
AGRADECIMENTOS	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

RESUMO

Introdução: A implantação do embrião no endométrio é um processo biológico complexo que requer um diálogo sincronizado entre o útero recetivo e um embrião funcional em estadio de blastocisto. Contudo, o endométrio apenas apresenta uma adequada recetividade à implantação durante um muito curto período de tempo.

A falência recorrente de implantação é um desafio importante nas técnicas de procriação medicamente assistida (PMA) que se mantém insuficientemente caracterizado. Atualmente, a implantação é considerada o passo limitante no sucesso destas técnicas, principalmente por alterações na recetividade endometrial. Nesse sentido, tem vindo a ser estudada a importância do fluido endometrial e das suas alterações durante a janela de implantação.

Métodos: Realizou-se uma revisão da literatura nas bases de dados PubMed e Cochrane de forma a identificar publicações entre 2007 e 2017.

Resultados: Foram descritos vários tipos de proteínas no fluido endometrial, nomeadamente PC6, VEGF, Integrina β 3, CSF-3, LIF e Glicodelina, com uma importância crítica no sucesso da transferência embrionária.

Conclusão: Existem fortes indicadores de que o fluido endometrial poderá ser utilizado como biomarcador rápido e não invasivo de avaliação da recetividade endometrial, o que poderá resultar num aumento das taxas de sucesso das técnicas de PMA.

Palavras-chave: Infertilidade; Endométrio; Implantação do embrião; Biomarcadores; Técnicas de Reprodução Assistida

ABSTRACT

Problem statement: Embryo implantation is a complex biologic process which requires a synchronized dialogue between the receptive endometrium and activated blastocyst. However, the endometrium is receptive to embryo implantation only for a very short period of time. Recurrent implantation failure (RIF) is a major challenge in assisted reproductive techniques that still remains poorly characterized. Actually, implantation is considered the limiting step in the success of assisted reproductive techniques mainly due to impaired receptivity, and endometrial fluid has been recently studied for its role as it undergoes profound molecular changes during the transient window of implantation.

Methods: A review literature search of the PubMed and Cochrane database was conducted to identify studies published between 2007 and 2017.

Results: Besides, several different proteins presented in endometrial cavity fluid have been recently described, namely PC6, VEGF, $\beta 3$ integrin, CSF-3, LIF and glycodeclin, which are critical predictive markers of successful embryo transfer.

Conclusions: There are strong indicators supporting that endometrial fluid collection and assessment could be used as rapid non-invasive biomarker for the assessment of endometrial receptivity. Therefore, it can predict and improve assisted reproductive techniques outcomes.

Keywords: Infertility; Endometrium; Embryo implantation; Biomarkers; Reproductive Techniques, Assisted

1. INTRODUÇÃO

A implantação do embrião no endométrio é um processo biológico complexo que requer um diálogo sincronizado entre o útero recetivo e um embrião funcional em estadio de blastocisto. O endométrio apenas se encontra recetivo durante um período temporal muito restrito, que corresponde à fase secretora média do ciclo menstrual, cerca de seis a dez dias após a ovulação, designado como janela de implantação.

Durante este bem-definido e limitado espaço de tempo, de máxima recetividade, a interação embrião-endométrio é ótima, iniciando-se com a aposição e culminando com a adesão e invasão do epitélio endometrial. No tecido endometrial, sob níveis crescentes de progesterona, verifica-se um incremento da secreção glandular e as células epiteliais glandulares, em estado de relativa inatividade transformam-se em células polarizadas altamente secretoras, importantes no transporte e na síntese de mediadores para o interior da cavidade endometrial que dão suporte e modulam a implantação embrionária.¹

O processo de implantação entre as células do epitélio endometrial e o trofoblasto (membranas ectodérmicas) envolve interações apicais de ligação e adesão apenas possíveis durante este período de recetividade, no qual se observa uma perda das microvilosidades e uma diminuição na quantidade de glicocálix. Geralmente a adesão entre as células epiteliais ocorre através de interações da membrana lateral e não da membrana apical.²

A implantação representa um evento crítico no estabelecimento da gravidez, da qual depende a formação de uma placenta eficiente. Perante uma recetividade uterina inadequada, todo o processo está comprometido, o que resulta numa falha de implantação ou na implantação inadequada do embrião.

Neste sentido, a implantação continua a constituir o principal passo limitante no sucesso das técnicas de PMA³ largamente utilizadas no tratamento da infertilidade que, por sua vez, constitui um problema de contornos complexos com repercussões clínicas, psicológicas e

socioeconômicas, cada vez mais comum nos dias de hoje e que afeta cerca de 9 a 18% da população mundial.⁴

Face a isso, e apesar dos muitos avanços nas técnicas de PMA, as taxas de sucesso permanecem reduzidas. Dados europeus apurados em 2013 mostraram taxas clínicas de gravidez após fertilização in vitro (FIV) de 29.6% (por aspiração) e 34.5% (por transferência) e após injeção intracitoplasmática (ICSI) de 27.8% (por aspiração) e 32.9% (por transferência).⁵

Estima-se que 10% das mulheres sofra de falência recorrente de implantação (RIF) após transferência por FIV.⁶ A falha recorrente de implantação, definida como a incapacidade de estabelecer uma gravidez após três ciclos completos de FIV, resulta de anomalias de etiologia embrionária ou uterina. São múltiplos os fatores responsáveis: alterações na qualidade do ovócito e do espermatozoides, anomalias cromossômicas embrionárias, anomalias genéticas ou metabólicas do embrião, receptividade endometrial diminuída, distúrbios imunológicos no local de implantação e alguns tipos de patologias ginecológicas, tais como endometriose, patologia tubária, miomas uterinos, pólipos endometriais, e até o próprio procedimento de FIV pode exercer uma influência negativa.⁶ Contudo, considera-se que se deva essencialmente a uma receptividade endometrial comprometida, tendo em conta os progressos realizados na seleção embrionária (nomeadamente pela utilização do rastreio genético pré-implantatório) e na consequente transferência de embriões de elevada qualidade.

Assim, em situações de falha recorrente de implantação de causa inexplicada com resposta hormonal favorável, sem patologia conhecida, com elevada qualidade dos embriões e desenvolvimento endometrial satisfatório, considera-se que a receptividade endometrial subótima constitui o fator chave de inibição da implantação embrionária.³

Embora a implantação represente um dos mais importantes desafios com que a área da medicina da reprodução contemporânea se depara, permanece insuficientemente caracterizada, o que se deve sobretudo à inexistência de marcadores bioquímicos confiáveis que permitam

avaliar o grau de receptividade do endométrio não só numa fase inicial, mas também no momento de transferência do embrião.

Perante a evidente urgência de um maior conhecimento do processo de nidação (nomeadamente da atividade e função dos fatores envolvidos) e da necessidade de marcadores de avaliação da receptividade uterina, vários autores têm recentemente proposto o fluido endometrial como um agente determinante.

O líquido endometrial é um fluido biológico complexo composto por citocinas, enzimas proteolíticas, nutrientes, antiproteases, proteínas e fatores biológicos ativos que contribui para o microambiente uterino, providenciando suporte, imunossupressão e modulando determinadas funções do blastocisto relevantes para a comunicação endométrio-embrião durante o período pré-implantatário.⁷ A importância do microambiente uterino vai muito além da contribuição para a implantação, proporcionando também nutrição ao embrião e moldando a programação do seu desenvolvimento.⁸ Sabe-se que um excesso de fluido endometrial compromete a implantação, resultando em reduzidas taxas de gravidez, uma vez que o microambiente uterino de forma a permitir a implantação deverá conter pequenas quantidades de fluido, mas a questão que agora se coloca é de se a sua composição não terá também uma influência decisiva em todo o processo.

Assim, o objetivo desta revisão bibliográfica é o de relacionar o papel do fluido endometrial com o sucesso ou insucesso do processo de implantação nas técnicas de procriação medicamente assistida.

Tendo como ponto de partida a literatura atualmente existente, este trabalho pretende identificar possíveis biomarcadores, fidedignos e não invasivos da receptividade endometrial presentes no líquido endometrial, que possam vir a contribuir para a individualização das tomadas de decisão, com base em informação de suporte que não é facultada por rotina e tendo em vista um objetivo muito específico – o aumento de sucesso das técnicas.

Portanto, no enfoque deste trabalho estão as seguintes questões às quais se pretende dar resposta: porque razão após o mesmo esquema de estimulação ovárica e preparação do endométrio, após FIV/ICSI e transferência do embrião, apenas numa pequena percentagem se verifica nidadação? Seria possível prever o insucesso? Seria possível reverter condições endometriais adversas?

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Fontes de informação

Foi conduzida uma pesquisa da literatura médica nas bases de dados Pubmed e Cochrane Library, entre junho de 2017 e janeiro de 2018, tendo em vista a identificação de estudos publicados sobre o papel do fluido endometrial no processo de implantação embrionária.

Foi realizada uma restrição temporal de artigos publicados entre 2007 e 2017. Na base de dados PubMed utilizou-se um filtro: "humanos" e foi colocada restrição linguística incluindo apenas a língua inglesa.

Esta revisão abordará a literatura atual sobre o papel do fluido endometrial no processo de implantação embrionária, possíveis fatores que comprometam esse processo e destacará avanços recentes na área da medicina da reprodução.

A revisão será assim dividida em duas partes principais: a primeira secção abordará o fluido endometrial no seu todo (composição, avaliação e implicações na recetividade uterina), e a segunda, as moléculas envolvidas no processo de nidação.

2.2. Termos de pesquisa

Os seguintes termos de pesquisa foram utilizados, combinados e adaptados a cada base de dados conforme necessário: *endometrial fluid (OR endometrial cavity fluid OR fluid accumulation of the uterine cavity OR endometrial fluid accumulation OR endometrial fluid collection OR uterine fluid OR endometrial fluid collection OR endometrial fluid accumulation) AND (uterine cavity OR endometrial cavity) AND (Assisted Reproductive Techniques OR IVF OR embryo OR infertility OR recurrent implantation failure OR repeat implantation failure OR biomarkers)*. Em conjugação com os seguintes termos Mesh: *infertility; endometrium; embryo implantation; biomarkers e reproductive techniques, assisted*.

2.3. Metodologia de seleção de estudo

Os sete critérios de inclusão definidos foram: 1) artigos científicos ou de revisão; 2) língua inglesa; 3) indexados na Pubmed ou Cochrane; 4) publicação entre 2007 e 2017; 5) “humanos”; 6) processo de implantação endometrial; 7) moléculas presentes no fluido uterino (e endométrio humano).

Os artigos foram excluídos caso correspondessem a: estudos de avaliação exclusivamente do endométrio e não do fluido uterino; estudos sobre moléculas exclusivamente presentes no endométrio; estudos exclusivamente sobre excesso de fluido uterino; estudos referentes à importância da qualidade e otimização do embrião no processo de implantação nas técnicas de FIV e estudos realizados em animais.

Este trabalho inclui artigos de revisão e artigos originais.

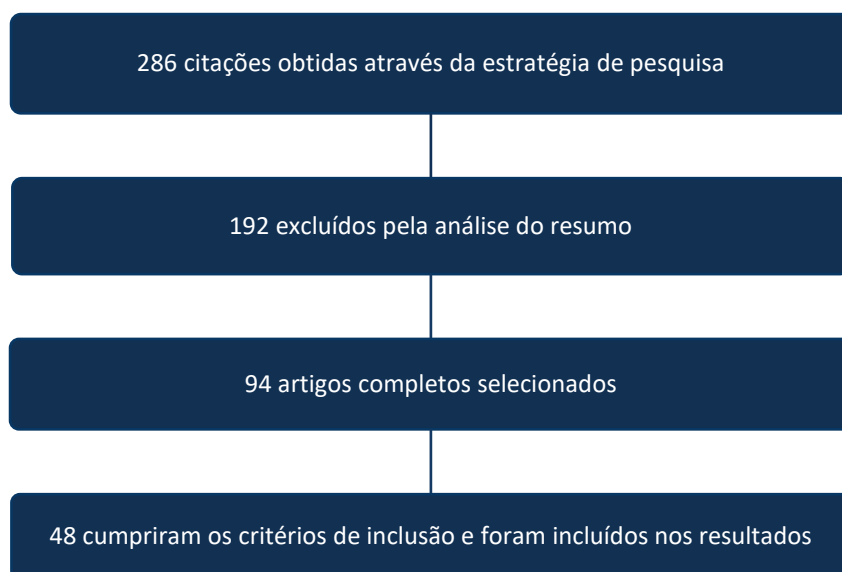


Figura 1. Diagrama de procedimento de seleção dos artigos

2.4. Avaliação da qualidade do estudo

Não foi realizada uma avaliação da qualidade do estudo.

2.5. Risco de bias nos estudos individuais

Os estudos não foram avaliados quanto ao viés e heterogeneidade devido à natureza desta revisão.

3. RESULTADOS

3.1. FLUIDO ENDOMETRIAL

O líquido endometrial é um fluido biológico complexo, em contacto direto com a cavidade endometrial, constituído por uma multiplicidade de moléculas como proteínas e enzimas proteolíticas secretadas pelo próprio endométrio.⁹

Embora a sua constituição exata não seja inteiramente conhecida, sabe-se que inclui moléculas biologicamente ativas como: aminoácidos, esteroides, glicose, lípidos, iões e uma grande variedade de proteínas (proteínas de transporte, citocinas, hormonas, enzimas, fatores de crescimento, proteases, inibidores e fatores imunomoduladores).¹⁰

Os seus componentes provêm de diversas fontes: da transudação seletiva a partir do soro, de onde provêm 90% do total de proteínas presentes no fluido, o que pode mascarar a menor abundância de proteínas no fluido uterino exigindo a sua remoção antes da análise proteómica¹¹; dos fluidos peritoneal, ovárico e das tubas uterinas; da libertação de leucócitos presentes na cavidade uterina, possivelmente ativados por via local e também de produtos solúveis resultantes da clivagem de proteínas de superfície e glicocálix (camada rica em mucina que recobre a superfície celular apical do endométrio), assim como das secreções do epitélio das glândulas endometriais, naturalmente.¹⁰ Estas glândulas desempenham um papel relevante na regulação dos componentes do fluido, incluindo a manutenção de uma normal concentração iónica e a secreção de proteínas, tais como o fator inibidor de leucemia (LIF), que contribui para o desenvolvimento embrionário e nidação.¹²

Contudo, o conhecimento relativamente ao contributo específico da secreção glandular para a composição total do fluido uterino (nomeadamente durante o período de implantação), assim como aos efeitos das alterações dessa composição, não só ao nível glandular, mas também de outras fontes, no processo de implantação, é ainda muito limitado.¹²

A abundante secreção glandular é assegurada pela elevada densidade glandular do endométrio humano, que contém cerca de quinze aberturas glandulares por cada mm² de superfície uterina.¹⁰

O fluido endometrial está envolvido em funções de lubrificação do endométrio, de defesa contra agentes patogénicos, de migração dos espermatozóides e no estabelecimento de uma gravidez.⁹ Para além destas, considera-se que possa também desempenhar um papel fulcral na imunossupressão e desenvolvimento embrionário, ainda durante o período pré-implantatário.¹³ Uma outra potencial ação, não molecular, do fluido uterino é a de regulação do movimento do embrião no interior da cavidade uterina durante a fase secretora média, atingindo um máximo de aproximadamente 50 µl.¹⁰

No período que antecede e durante a implantação do embrião, o fluido endometrial constitui a interface entre o embrião flutuante e o endométrio, permitindo a transferência de informação vital entre ambos.

O fluxo sanguíneo através da placenta apenas se estabelece no final do primeiro trimestre de gestação; até esse momento, o embrião está dependente de mediadores bioativos produzidos pelas glândulas uterinas e consequentemente também presentes no fluido uterino.

Sabe-se que uma quantidade excessiva de fluido na cavidade endometrial compromete a implantação do embrião, devido aos seus efeitos tóxico (ação direta no desenvolvimento embrionário devido à sua natureza inflamatória) e/ou mecânico (interferência dinâmica durante o processo de aposição embrionária; arrastamento do embrião e alteração da receptividade endometrial com alteração da expressão génica). Isto traduz-se na necessidade de um controlo preciso do volume de fluido uterino; na prática clínica, um controlo volumétrico estrito é mantido durante a transferência embrionária, em que apenas 20 – 60ml de fluido podem ser transferidos para o útero juntamente com o(s) embrião(ões), de forma a evitar uma sobrecarga excessiva ou a descarga do embrião.^{12,14}

A origem desta questão permanece controversa, embora determinadas situações como: produção excessiva de fluido em resposta a terapêutica com gonadotrofinas; hidrossalpinge; infecções uterinas subclínicas e obstrução do canal cervical após administração de gonadotrofina coriônica humana (hCG) tenham vindo a ser associadas a esta situação.¹⁵

Nos últimos anos, face à falência recorrente de implantação, tem-se dado primazia ao estudo do embrião, com conseqüente otimização da seleção e transferência do mesmo. Como apesar disso, as taxas de implantação permaneciam reduzidas, as atenções viraram-se para o estudo do endométrio.

A ecografia, preferencialmente por via transvaginal, constitui o método não-invasivo mais simples de avaliação do endométrio. A associação ao Doppler permite a avaliação da vascularização de todo o endométrio, bem como a avaliação de determinados parâmetros como a espessura do endométrio, padrão e volume, índices de vascularização endometrial e subendometrial, índice de fluxo e índice de vascularização-fluxo.¹⁶ Os parâmetros referidos anteriormente têm vindo a ser utilizados como marcadores indiretos da recetividade uterina na prática clínica atual. De facto, uma espessura endometrial inferior a 7 mm é considerada subótima e está associada a reduzidas taxas de gravidez.^{17,18}

Além disso, uma apropriada vascularização com excelentes suprimentos de sangue endometrial e subendometrial representam uma adequada recetividade endometrial, estando associados a resultados satisfatórios.¹⁶

A existência de um padrão trilaminar também parece estar associado a maiores taxas de implantação do que um padrão hiperecogénico homogéneo. Este último, quando na fase folicular tardia, parece indicar uma maturação secretora precoce do endométrio, o que pode traduzir-se em assincronias de desenvolvimento embrião-endométrio e insucesso das taxas de implantação.¹⁹

Embora exista a referida correlação entre a espessura do endométrio e a gravidez, o potencial de implantação é complexo e não pode ser determinado exclusivamente por ecografia. Assim, a ecografia apesar de permitir a avaliação do endométrio durante os ciclos de FIV constitui um método limitado, pela interpretação subjetiva inerente, tornando-a um pobre preditor da recetividade endometrial.²⁰ Esta avaliação pode ser expandida a histeroscopia diagnóstica, histerossonossalpingografia e histerossalpingografia.

A histeroscopia constitui o *gold standard* para investigação da cavidade uterina, principalmente perante a suspeita de patologia. É um exame muito eficaz e seguro para diagnóstico de anomalias intrauterinas. Permite a visualização direta de toda a cavidade revelando a localização, natureza, forma, dimensões e padrão vascular de anomalias da cavidade uterina como pólipos, miomas submucosos, disparidades na espessura endometrial, sinequias, septos e nichos. Permite ainda a realização de uma biópsia e eventual intervenção terapêutica.²¹

Ao contrário das modalidades imagiológicas existem outros métodos, nomeadamente histológicos e moleculares, que são invasivos.

A biópsia endometrial é um método controverso de avaliação histológica e funcional, que permite o conhecimento da composição do endométrio, com uma significativa subjetividade inter-observador.¹⁹

Uma questão que se coloca é qual o melhor material para realizar o teste molecular, de entre várias opções como: tecido obtido por curetagem ou biópsia, fluido uterino obtido por aspiração ou lavagem, plasma sanguíneo ou ainda, o soro e urina que embora disponíveis não refletem o adequado estado de recetividade.¹¹

O recurso a amostras de tecido foi amplamente utilizado neste contexto e é relativamente fácil de obter de mulheres não nulíparas, contudo a população-alvo destes testes é

essencialmente constituída por mulheres nulíparas, o que poderá condicionar o acesso à cavidade uterina.¹¹

A análise do fluido uterino na prática clínica atual resume-se apenas à avaliação por rotina do seu volume, através de quantificação por métodos imagiológicos como a ecografia. Por vezes, durante os ciclos de PMA, é possível detetar a sua acumulação o que corresponde a uma configuração de anel ecogénico distendido por uma determinada quantidade de fluido.

A monitorização do volume de líquido endometrial constitui um indicador útil de avaliação do momento ideal para transferência do embrião. Estudos recentes definiram que existe uma grande quantidade de fluido uterino se o diâmetro anterior-posterior do fluido máximo for igual ou superior a 3,5 mm e uma pequena quantidade, se este for inferior a 3,5 mm.²²

Nos últimos anos têm surgido técnicas inovadoras de proteómica, transcritómica e multiplex para análise do fluido endometrial (colhido por aspiração ou lavagem da cavidade uterina), o que permite identificar a totalidade das proteínas aí presentes e estabelecer a ponte com o processo de implantação embrionária, bem como reconhecer alterações de fase específicas. Esses avanços permitiram a avaliação de mediadores biologicamente ativos, presentes no fluido uterino, mesmo que em concentrações muito baixas contribuindo para o conhecimento de processos biológicos, vias bioquímicas e de sinalização que atuam na janela de implantação. Ambas as formas de colheita de fluido endometrial, por lavagem ou por aspiração, têm sido utilizadas para análise proteómica (Fig. 2).

A lavagem permite mostrar toda a cavidade uterina, ao passo que os aspirados fornecem um instantâneo da composição do fluido, especificamente no local de colheita da amostra. Ambas as abordagens permitiram recentemente a identificação de biomarcadores de recetividade uterina potencialmente úteis na prática clínica, com diferenças evidentes entre o endométrio recetivo e não recetivo, assim como durante a fase secretora média em mulheres férteis,

comparativamente a mulheres cujos ciclos de FIV falharam na presença de embriões de boa qualidade.¹¹

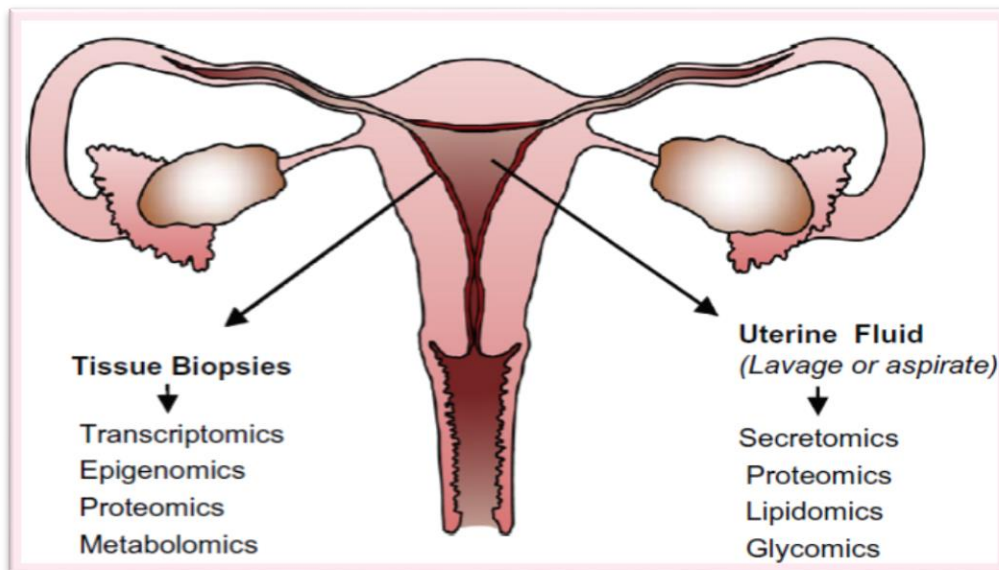


Figura 2. Adaptado de Edgell TA et al: Potenciais abordagens para descoberta de marcadores de receptividade endometrial (11)

A análise dos componentes do fluido uterino, por lavagem ou por aspiração, proporcionou resultados substancialmente diferentes no que se refere a perfis proteicos. Embora tenham sido observadas semelhanças em termos de composição proteica total, o mesmo não se observou relativamente às proteínas mais específicas examinadas, que apesar de terem sido detetadas em ambos os fluidos, os resultados entre pacientes não foram comparáveis a nível qualitativo e quantitativo.²³

A explicação mais consistente é, como referido anteriormente, que o lavado abrange toda a cavidade uterina ao passo que a aspiração é muito focalizada, fornecendo informação apenas de uma área específica da cavidade uterina, o que torna expectáveis estas diferenças.

A lavagem do fluido endometrial além de possibilitar uma maior abrangência, embora não permita a total recolha do fluido, admite a remoção de fatores solúveis do interior do glicocálix e a colheita de uma maior quantidade de proteínas (cerca de dez vezes mais proteínas do que por aspiração). Por outro lado, o aspirado é mais difícil de obter livre de sangue e carece de

diluição, podendo ser insuficiente para realizar determinadas análises, principalmente porque mais de 90% da totalidade das proteínas solúveis na cavidade uterina são proteínas séricas.²³

O tubo flexível utilizado na lavagem tem menos propensão para danificar os tecidos; porém, por vezes o lavado contém fragmentos de tecido uterino nomeadamente durante a fase secretora tardia, momento em que o tecido se começa a desestabilizar com o início da menstruação. É possível ainda que haja alguma absorção de proteínas para os filtros de rotação utilizados para calcular a concentração.²³

A análise do fluido uterino contém um proteoma significativamente mais simples do que o do tecido endometrial, devido ao facto de não conter uma grande quantidade de proteínas celulares⁷ o que lhe confere vantagem relativamente à colheita por biópsia, além de constituir um método não invasivo e sem prejuízo nas taxas de gravidez subsequentes. Além disso, apresenta concentrações mais elevadas de proteínas produzidas localmente, quando comparado com outros tipos de amostras (como o sangue ou urina).⁷ A sua grande vantagem está no facto de poder ser avaliado no exato momento de transferência embrionária.

Uma das abordagens do aspirado é por eletroforese em gel de poliacrilamida, de forma a mostrar os padrões proteicos que se modificam ao longo do ciclo. No entanto, é um tipo de análise limitado, em que a técnica não fornece dados quantitativos sobre marcadores específicos de recetividade endometrial. A eletroforese bidimensional em gel (2D-PAGE) demonstrou que o fluido uterino, em fase secretora, contém determinadas proteínas que não estão presentes no soro nem no fluido uterino da fase proliferativa.¹³ A avaliação da recetividade endometrial engloba assim vários tipos de exames complementares de diagnóstico variando conforme a fase do ciclo menstrual. Durante a fase secretora tomam lugar a análise histológica e expressão génica endometrial e na fase que antecede a transferência embrionária a ecografia endometrial, a medição do nível de progesterona sérico e os estudos de genómica e proteómica (Fig.3).

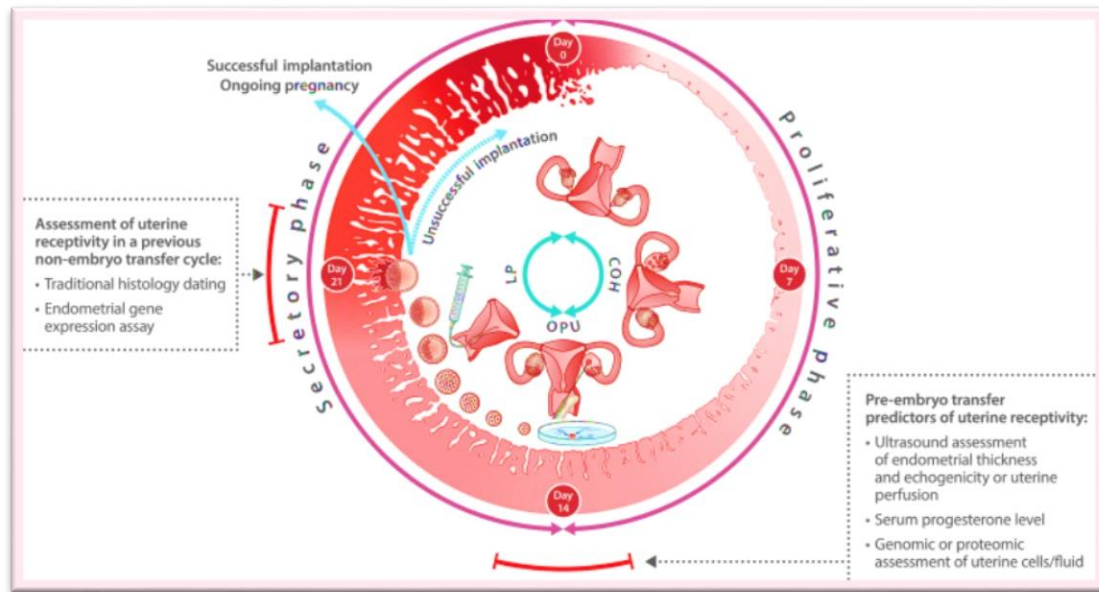


Figura 3. Adaptado de Teh WT et al: potenciais modalidades de avaliação da receptividade uterina (19)

Casado-Vela *et al.*, identificaram recentemente mais de 800 proteínas no fluido endometrial, com funções e complexidade variáveis, através do recurso a três estratégias proteômicas diferentes de identificação de proteínas.⁹

Hannan J. *et al.*, num dos mais vastos estudos realizados nesta área, identificaram cerca de dezassete potenciais moléculas reguladoras do processo de implantação: interleucina 1b (IL-1b), IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, fator de crescimento epidérmico de ligação à heparina (Hb-EGF), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferão gama (IFN- γ), eotaxina, fator inibidor da migração dos macrófagos (MIF), proteína 10 indutível pelo interferão γ (IP10), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), DKK1 (Dickkopf homolog 1) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).²⁴

Boomsma *et al.*, nos seus estudos de análise do fluido uterino identificaram dez destas moléculas: interleucina-1 beta, IL-6, IL-12, IL-18, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator inibidor de migração dos macrófagos (MIF), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), proteína 10 indutível pelo interferão γ (IP10), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e eotaxina. Contudo, o interferão gama não foi detetado em qualquer das amostras analisadas (Tabela 1).²⁵

Tabela 1: Resumo das funções de moléculas identificadas no fluido uterino (adaptado de Boomsma CM *et al.* (25))

Molécula	Função
IL-1b	Indução da expressão de integrinas na superfície do epitélio endometrial Estimulação de metaloproteinases da matriz
IL-5	Diferenciação, recrutamento e ativação de eosinófilos, que têm um papel na remodelação do tecido endometrial Evidência de que a gravidez está associada com um perfil de citocinas Th2
IL-6	Imunomodulação. Ativação de MMP. Contribuição para o crescimento do trofoblasto e desenvolvimento da placenta
IL-10	Inibição da proliferação e secreção de leucócitos Th1. Evidências de que a gravidez está associada a um perfil de citocinas Th2
IL-12	Remodelação vascular e ativação de célula NK
IL-15	Ativação de células NK. Remodelação vascular
IL-17	Angiogénese e imunorregulação
IL-18	Remodelação vascular. Ativação de células NK. Indução da produção MMP. Abortivo em altas doses
Hb-EGF	Mediação da adesão do embrião ao endométrio. Fator de crescimento para embriões derivados de FIV
TNF-α	Transformação de células NK em células LAK. Inibidor da divisão e adesão do embrião
IFN- γ	Ativador de células NK. Remodelação vascular. Inibição da proliferação das células do trofoblasto. Abortivo em altas doses
Eotaxina	Quimioatração de eosinófilos com papel na remodelação de tecido endometrial
IP10	Atração e ativação de células imunes. Estimulador da expressão de integrina pelo trofoblasto
MIF	Imunomodulação e angiogénese. Regulação positiva de MMP. Papel em proliferação e diferenciação celular
MCP-1	Atração e ativação de células imunes
VEGF	Promoção da vascularização, angiogénese e permeabilidade vascular. Estimula a proliferação de células endoteliais
Dkk-1	Indução da via de sinalização intracelular Wnt

Na última década, a análise de *Omic*s de todo o tecido endometrial e de determinados tipos de células bem como do fluido endometrial têm conduzido à determinação de "fatores de implantação", o que resultou numa expansão de novos dados e criação de potenciais biomarcadores para avaliação da receptividade endometrial.

As proteínas identificadas no fluido endometrial estão relacionadas com a regulação da apoptose, resposta ao stress, defesa, resposta inflamatória/imune, transporte molecular e homeostasia do ferro.²⁶

Maathuis *et al*, determinaram a concentração de proteínas totais e de hexose no fluido uterino em diferentes fases do ciclo menstrual. Os níveis proteicos mostraram-se significativamente menores na fase secretora comparativamente à fase proliferativa, o que sugere que as secreções uterinas estão presentes não só na fase secretora, mas também no período pré-ovulatório do ciclo.¹³

3.2. MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE NIDAÇÃO

3.2.1. Proproteína Convertase 6 (PC6)

A proproteína convertase 5/6 (PC6) é uma serina protease da família das proproteínas convertases, uma família de endoproteases dependentes de cálcio, importante na conversão de precursores proteicos inativos nas suas formas ativas, através de proteólise, que integra cerca de sete aminoácidos básicos específicos: furina, PC1/PC3, PC2, PC4, PC5/6, PACE4 e PC7/PC8.²⁷

A PC6 encontra-se expressa no endométrio, sobretudo no decorrer da fase de maior recetividade epitelial, assumindo um papel preponderante no processo de implantação embrionária. Os seus alvos incluem fatores de crescimento, hormonas peptídicas, neuropeptídeos, proteínas da matriz extracelular, moléculas de adesão, enzimas proteolíticas e proteínas de membrana.²⁷

Heng *et al.* demonstraram que a PC6 está presente no fluido endometrial e que as suas concentrações estão relacionadas com o estado de recetividade uterina, apresentando-se mais elevadas na fase recetiva (fase secretora do ciclo menstrual) comparativamente à não-recetiva (fase proliferativa do ciclo menstrual) quando em mulheres férteis, e marcadamente reduzidas durante a janela de implantação em mulheres inférteis. Os resultados apresentam-se representados sob a forma de gráfico (Fig. 4).²⁸

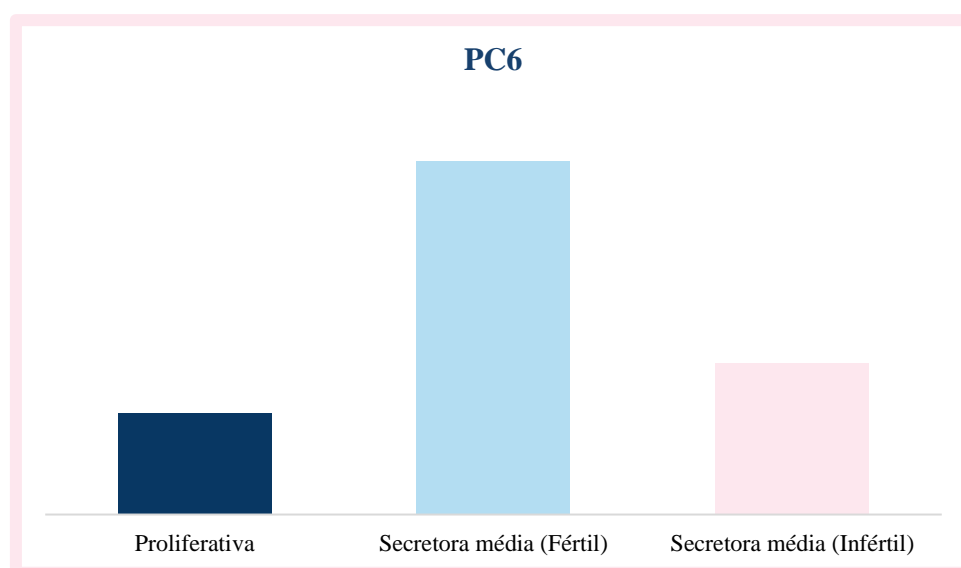


Figura 4. Adaptado de Heng, *et al.*: Níveis de PC6 em fase proliferativa e secretora (28)

Heng *et al.* demonstraram que a PC6 cliva a proteína Fosfoproteína Ezrina-radixina-moesina 50 (EBP50) afetando a sua interação com a proteína ezrina, que, por sua vez regula a interface entre a actina do citoesqueleto e a membrana plasmática, redistribuindo-se ao longo da membrana apical para o citoplasma conduzindo uma reorganização do citoesqueleto. Segundo o estudo, a localização apical destas proteínas contribui para o seu papel no controlo da formação de microvilosidades e polarização das células; por outro lado, o seu carácter antiaderente assume uma influência profunda na morfologia das células epiteliais endometriais e na aderência do embrião no momento de implantação. Na ausência de ezrina, as microvilosidades são curtas, espessas e encontram-se aleatoriamente orientadas ao invés de altas, uniformes e densamente agrupadas.²⁹

Paule *et al.* concluíram que a PC6 endometrial constitui um importante fator regulador na activação do fator de crescimento derivado de plaquetas tipo A (PDGFA). De acordo com os resultados obtidos, na fase média proliferativa os níveis de PDGFA eram muito reduzidos, contrariamente ao que se observou na fase média secretora, em que o PDGFA ativado era claramente detetado na superfície apical dos epitélios luminal e glandular. A não ativação pela PC6 implica que o PDGFA não se ligue aos respetivos recetores podendo comprometer a recetividade endometrial. Perante as evidências, os autores sugerem o PDGFA-ativado presente no fluido uterino como um potencial biomarcador de recetividade.²⁷

Heng *et al.* constataram que a função da α -DG (alfa-distroglicano), uma glicoproteína de superfície envolvida no processo de adesão, está dependente da remoção da sua parte terminal, α -DG-N, pela PC6. Quando não removida verifica-se uma retenção da alfa-distroglicano na superfície celular, com conseqüente perda da adesividade, constituindo assim uma barreira à implantação.³⁰ A quantidade de α -DG-N no fluido uterino poderá refletir a sua remoção do tecido endometrial e intuir sobre o estado de recetividade uterina.

As integrinas são glicoproteínas transmembranares heterodiméricas que desempenham um importante papel na adesão do blastocisto ao útero no momento da nidação, o que exige a sua clivagem pela PC6 durante a modificação pós-tradução.²

Heng *et al.* evidenciaram que a atividade da proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) depende também de um processo de clivagem controlado pela proteína PC6. A BMP-2 pertence à família das proteínas morfogenéticas ósseas envolvidas em processos como a proliferação celular, apoptose, diferenciação celular e morfogênese. Estão expressas no útero durante a gravidez contudo, apenas a BMP-2 está implicada no processo de decidualização, em conjugação com hormonas, citocinas, fatores de crescimento e proteases.³¹

Hannan N. *et al.* demonstraram que a PC6 existe sob a forma solúvel e também ligada à membrana, estando ativa tanto no aspirado uterino como na lavagem uterina, sendo de realçar que os seus níveis de atividade eram bastante reduzidos no aspirado e elevados em duas das amostras de lavagem uterina sugerindo que a sua forma ativa solúvel pode ser lavada pelo glicocálix. As suas enzimas específicas ligadas à membrana ADAM17 (metalopeptidase 17) e MT1- MMP (metaloproteinase da matriz tipo 1) também estavam ativas no microambiente uterino, tendo sido detetadas pelos mesmos métodos.²³

3.2.2. Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF)

O sucesso da implantação embrionária depende de um desenvolvimento vascular coordenado e de uma posterior manutenção da interface embrião-útero materno que providencie nutrição adequada. Assim, durante esse processo é imprescindível a existência uma vascularização uterina adequada e de células/fatores reguladores.

Geralmente, a angiogénese fisiológica não ocorre na maioria dos órgãos, a menos que esses sofram algum tipo de lesão. O sistema reprodutor feminino é uma exceção, no qual a angiogénese é um processo fundamental quer durante o ciclo menstrual quer depois na implantação.³²

O Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) é um potente fator promotor de angiogénese, com papel reconhecido enquanto fator de crescimento das células endoteliais vasculares, estando também envolvido na formação de tumores. A família VEGF e os seus recetores estão envolvidos em processos de crescimento dos vasos e na remodelação de uma grande variedade de tecidos nomeadamente, o endométrio humano.

A citocina VEGF e suas isoformas VEGFA121 e VEGFA 165 são moléculas abundantes no fluido uterino, sendo produzidas pelo epitélio endometrial glandular.

A sinalização mediada por esta molécula ocorre em várias células endometriais incluindo as dos vasos sanguíneos, do epitélio e do estroma. A VEGFA participa em duas vias de sinalização ligando-se a dois receptores de tirosina-quinase: o VEGF receptor 1 (VEGFR1) e o VEGF receptor 2 (VEGFR2), ambos localizados na zona apical do epitélio glandular endometrial.³³ Tem a capacidade de aumentar a atividade mitogénica das células endoteliais através de uma molécula de adesão, a integrina $\alpha v \beta 3$, um outro potencial biomarcador de recetividade uterina. Contribui para o significativo aumento da adesão entre o epitélio endometrial humano e a matriz extracelular do trofoblasto e para o crescimento do blastocisto.

Estudos tendo em vista a detecção desta proteína no fluido endometrial apresentaram níveis de VEGF significativamente reduzidos, durante a fase secretora média e em mulheres com infertilidade inexplicada quando comparados com mulheres férteis. Por sua vez, os níveis de VEGF em mulheres férteis mostraram-se mais aumentados na fase secretora do que na fase proliferativa.³³

Salamonsen *et al.* evidenciaram resultados ilustrados sob a forma de gráfico (Fig. 5).

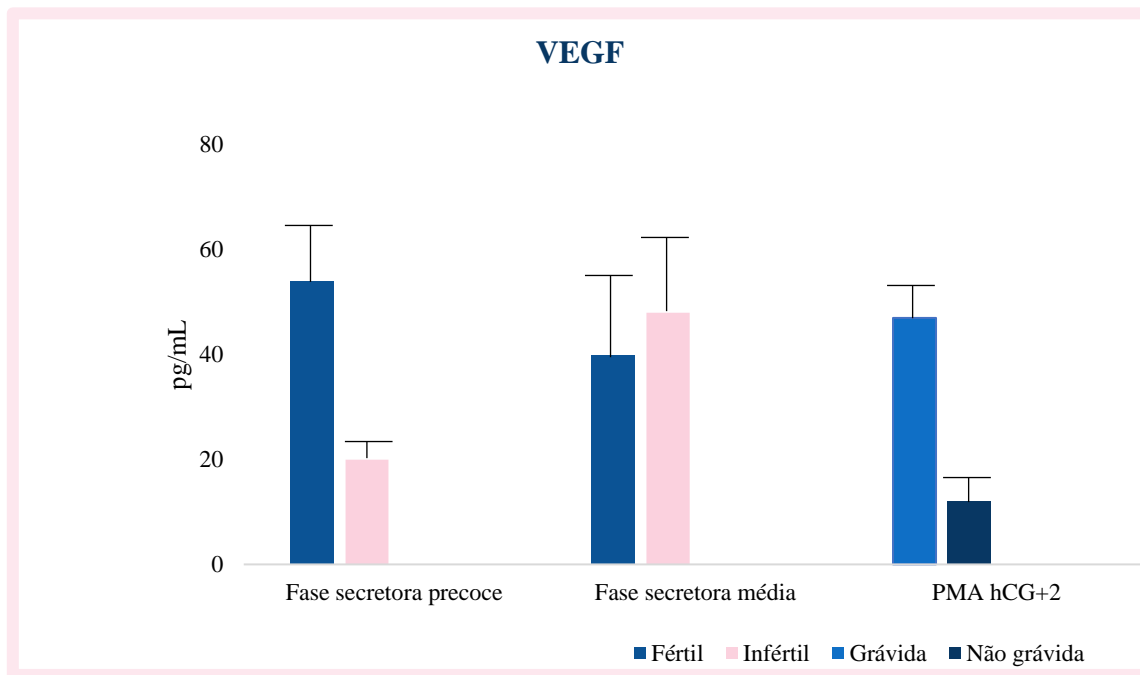


Figura 5. Adaptado de Salamonsen LA, *et al.*: Níveis de VEGF em fase secretora de mulheres férteis e inférteis (10)

Outros estudos permitiram ainda a identificação de uma molécula homóloga da VEGF no fluido endometrial - o fator de crescimento da placenta (PIGF) - o qual se liga exclusivamente ao recetor VEGFR1 com uma afinidade superior ao próprio VEGF. O PIGF atua sobre o crescimento celular do blastocisto, encontrando-se altamente expresso no trofoblasto placentário em todas as fases da gravidez, tendo funções de controlo de crescimento, diferenciação e invasão do trofoblasto na decídua materna. Além disso, tem efeitos sobre o epitélio endometrial e sobre a capacidade adesiva desse mesmo epitélio, no qual promove a mitose de células endoteliais e aumenta a quimiotaxia para os leucócitos. Localiza-se predominantemente nas células epiteliais luminais e glandulares do endométrio, ao longo de

todo o ciclo menstrual (em mulheres férteis e inférteis) e também nas células que circundam as artérias espiraladas maternas, durante a fase secretora do ciclo. Aliás, o padrão endometrial observado mostrou que durante a fase secretora precoce esta molécula se localiza na camada basal das células epiteliais ao passo que na fase secretora tardia se localiza mais na região apical dessas mesmas células sendo libertado para as secreções uterinas.¹

Além da sua presença no endométrio e no fluido endometrial também é detetável no soro materno, o que permite sinalizar uma situação de pré-eclampsia, quando há uma diminuição precoce e acentuada nos seus níveis séricos.¹

Em condições fisiológicas normais, encontra-se expressa em níveis reduzidos em vários outros órgãos adultos, incluindo o pulmão, coração, tiróide, tecido adiposo e músculo esquelético.¹

3.2.3. Integrina $\beta 3$

As integrinas são uma classe de moléculas de adesão celular, constituída por glicoproteínas heterodiméricas e que se encontram ancoradas à membrana citoplasmática.

A integrina $\alpha\beta 3$ é secretada pelo epitélio durante a fase secretora média. Enquanto molécula de adesão pensa-se que estará envolvida na fase inicial de ligação na implantação do blastocisto que regula interações intercelulares no útero.³⁴ Uma redução da sua expressão no endométrio durante a fase lútea tem vindo a ser associada a casos de infertilidade não explicada e a falência recorrente de transferência do embrião nos ciclos de FIV. A sua ausência assim como a de LIF tem sido associada, de forma independente, com o sucesso reduzido na FIV.³⁵

Alguns autores propuseram que um excesso de fluido uterino desencadeia um aumento da produção da integrina $\alpha\beta 3$, como forma de compensação para aumentar a probabilidade de implantação do embrião.¹⁴

Além disso, condições associadas a subfertilidade como endometriose, hidrossalpinges e insuficiência luteínica têm sido também associadas a expressão alterada das integrinas.³⁴

Contudo, as evidências atuais são controversas, uma vez que não se tem conseguido provar o seu padrão de expressão diferencial entre mulheres férteis e inférteis.

Além disso, a expressão da integrina $\alpha\beta 3$ no endométrio tem reduzida reprodutibilidade e elevada variabilidade ciclo a ciclo.¹⁹

O gene osteopontina (SPP1), codifica uma glicoproteína estrutural da matriz extracelular regulada pela progesterona sendo um ligando da integrina $\alpha\beta 3$ envolvido na mediação da adesão celular e da migração durante a implantação.

3.2.4. Fator estimulador de colónias-3 (CSF-3)

A família CSF (fatores estimuladores de colónias) inclui o CSF-1 ou macrófago CSF (M-CSF), CSF-2 ou granulócito macrófago CSF (GM-CSF) e CSF-3 ou granulócito CSF (G-CSF). Cada um deles tem uma determinada localização e expressão no sistema reprodutivo (destacando-se o ovário e a interface mãe-feto), assumindo funções específicas nos processos de ovulação, implantação embrionária, desenvolvimento da placenta e desenvolvimento embrionário. São glicoproteínas lábeis de 18 a 70 kDa e atuam através de receptores de membrana específicos, via JAK-STAT com vias de sinalização endócrina, parácrina ou autócrina. Têm propriedades imunomoduladoras, imunotróficas e anti-apoptóticas durante os estádios iniciais da gravidez.³⁶

Estas glicoproteínas são utilizadas na prática clínica atual, nomeadamente na medicina da reprodução, enquanto biomarcadores de qualidade e aptidão do ovócito (G-CSF folicular), suplementos dos meios de cultura de embriões (GM-CSF recombinante humano) e como terapia inovadora nos casos de infertilidade (G-CSF recombinante humano).³⁶

As variações nas concentrações de CSF, em diferentes condições reprodutivas, são descritas no soro e no líquido folicular, mas também no fluido endometrial.

A CSF-3 constitui-se como uma citocina reguladora da produção de neutrófilos, importante na eliminação de bactérias, na modulação da resposta inflamatória, na promoção da sobrevivência das células da linhagem granulocítica bem como na proliferação e migração de neutrófilos e células do trofoblasto. A produção de CSF-3 contribui para modulação da citotoxicidade de células NK uterinas, reduzindo a produção do interferão e de IL-18.

O recetor de CSF-3 (CSF3R) encontra-se expresso na placenta, células endoteliais, células do sistema nervoso central e cardiomiócitos.

Os macrófagos e outras células especializadas produzem endotoxinas e citocinas que estimulam os mecanismos de transcrição e pós-transcrição que implicam alterações na CSF-3 com consequente recrutamento e ativação de neutrófilos.³⁷

Salamonsen *et al*, propuseram o CSF-3 como um potencial biomarcador preditivo de sucesso de transferência do embrião, demonstrando-o com o gráfico que se segue (Fig. 6).¹⁰

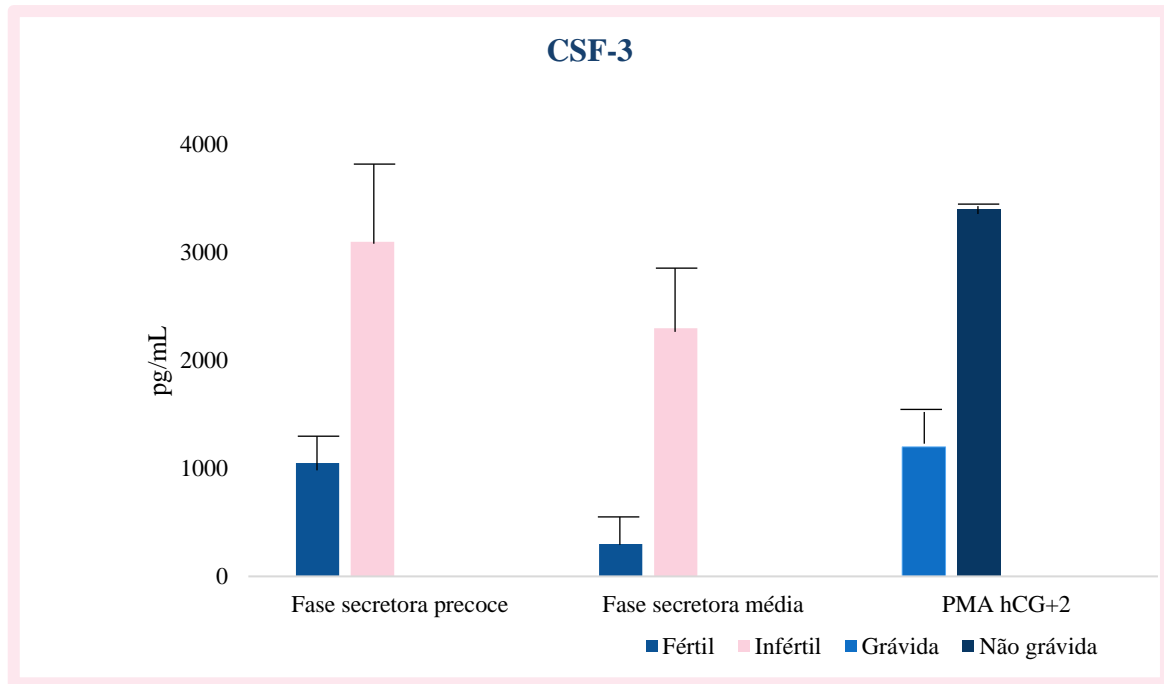


Figura 6. Adaptado de Salamonsen LA, et al: Níveis de CSF-3 em mulheres férteis e inférteis (10)

3.2.5. Fator inibidor de leucemia (LIF)

O fator inibidor de leucemia (LIF) é uma citocina pleotrópica, altamente glicosilada (Mw 38-67 KDa) expressa no epitélio endometrial humano, que pertence à família da interleucina 6 (IL 6). Atua em diferentes células e tecidos através da sua ligação a um recetor de membrana (LIF-R), um heterodímero constituído por duas subunidades o recetor gp130, uma proteína transmembranar transdutora de sinalização para citocinas da família IL-6 e o LIF-R alfa (LIF-Ra). O recetor LIF-Ra interage seletivamente com o LIF, ao passo que o recetor gp130 interage com outros tipos de citocinas. Dessa ligação resulta a formação de um complexo LIF- LIF- R gp130, cuja sinalização é mediada principalmente pela via JAK/STAT (Janus Quinase/Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição), mas também pela via PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase) e MAPK (Proteino-quinases ativadas por mitógenos), o que potencia as múltiplas ações do LIF.³⁸

Este recetor encontra-se expresso no blastocisto e na placenta assim como no epitélio glandular e luminal. Uma significativa redução na expressão do LIF está associada a uma grande quantidade de patologias do foro reprodutivo.

O LIF regula o processo de implantação, na medida em que contribui para a transformação do endométrio para um estado recetivo e facilita a adesão do blastocisto ao epitélio endometrial, participando na interação embrião-endométrio, promovendo os processos de decidualização estromal e de invasão do trofoblasto, assim como o desenvolvimento e crescimento do blastocisto e, ainda, na infiltração uterina por leucócitos.³⁹ Além da sua ação nos estadios de aposição e adesão na implantação, contribui também para a modulação da invasão pelo trofoblasto controlando a expressão de HLA-G nas suas células³⁸ e regula a síntese de prostaglandinas, um outro mediador importante na implantação e decidualização.

Além do endométrio, o recetor de LIF encontra-se expresso em neurónios, megacariócitos, macrófagos, adipócitos, hepatócitos, osteoblastos, mieloblastos, rim e mama. Participa em processos de proliferação e diferenciação de vários tipos de tecidos.⁴⁰

No endométrio humano, a expressão do LIF permanece reduzida durante a fase proliferativa, aumentando após a ovulação (correspondente ao pico da LH). Mantém-se elevada até ao fim do ciclo, atingindo a sua máxima expressão durante a fase secretora média, correspondente ao período de recetividade para implantação, no qual esta proteína pode ser detetada no fluido uterino.^{35,40} Este padrão sugere que a molécula em causa é independente do embrião e dependente, em certa medida, dos níveis de hormonas sexuais maternos.⁴⁰

Há cerca de uma década, estudos realizados através de biópsia endometrial terão demonstrado que a produção de LIF apresentava uma correlação negativa com a espessura endometrial e o padrão ecográfico, o que sugere que uma elevada expressão de LIF estará associada a um efeito inibitório no endométrio.^{22,41}

Estudos realizados recentemente apontam para uma redução nos níveis de LIF no endométrio e no fluido uterino durante a fase secretora em mulheres inférteis,¹³ embora outros estudos não tenham mostrado diferenças significativas quantos aos valores entre mulheres férteis e inférteis.⁴²

Concentrações de LIF obtidas a partir do líquido endometrial de mulheres inférteis mostraram-se reduzidas quando comparadas com os controlos, indicando que uma desregulação na produção de LIF poderá ser responsável pela diminuição da recetividade uterina e por situações de falência recorrente de implantação e abortamento.⁴³

A expressão do LIF e o recetor gp-130 são regulados positivamente em resposta ao tratamento com hCG e pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 β .

Tawfeek *et al.* mostraram concentrações de LIF no fluido endometrial de mulheres inférteis (0.5 a 35 pg/ml) significativamente inferiores aos de mulheres férteis (18–120 pg/ml). O mesmo

se constatou para a gp130 que em mulheres inférteis apresentou valores de 25–140 pg/ml e em mulheres férteis de 95–370 pg/ml.⁴⁰

As medições do LIF no soro não refletem o estado de fertilidade, contudo, as reduzidas concentrações no fluido uterino são preditoras de uma implantação mal-sucedida.⁴¹ As concentrações no fluido uterino têm sido associadas não só a alterações na receptividade uterina como também a condições como adenomiose.

O recetor de progesterona é o único fator considerado absolutamente essencial para uma implantação bem-sucedida, na mesma medida em que o fator inibidor de leucemia e a mucina 1 são considerados dois dos mais importantes vetores de sinalização.

O LIF recombinante humano tem sido proposto para tratamento de doentes com falência recorrente de implantação de forma a melhorar a receptividade endometrial, contudo, um estudo multicêntrico não demonstrou melhoria das condições de receptividade e aumento das taxas de gravidez após rhLIF quando comparado com um placebo.¹⁹

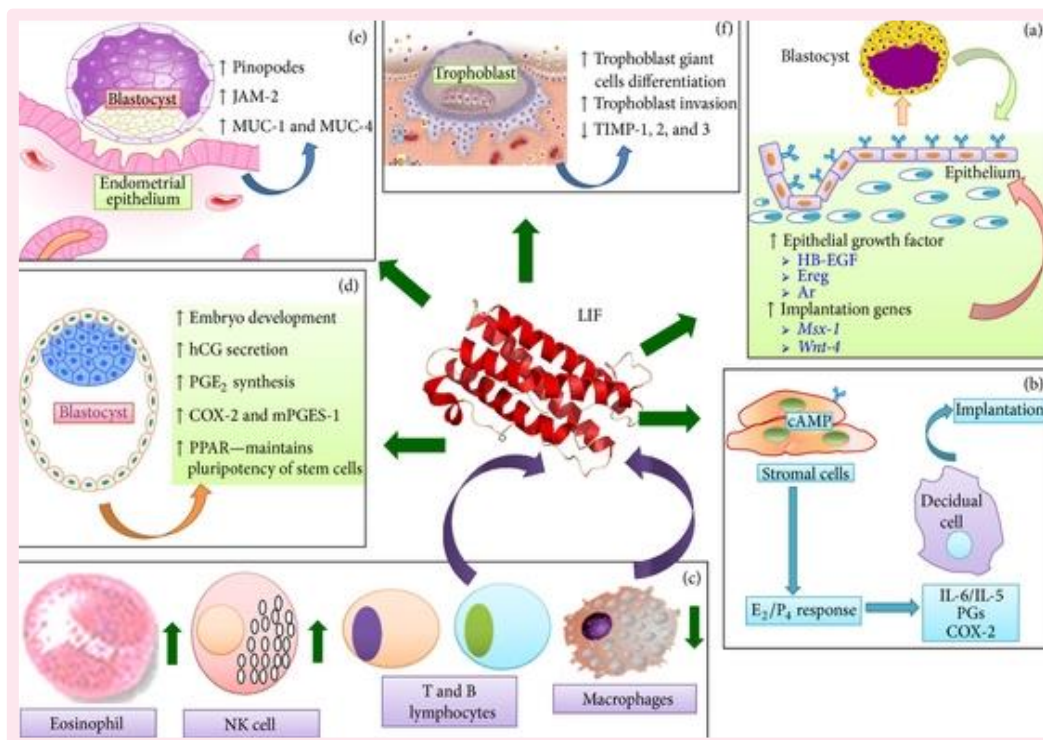


Figura 7. Adaptado de Salleh N et al: Funções do LIF na implantação embrionária (39)

3.2.6. Glicodelina

A glicodelina foi inicialmente isolada a partir da placenta humana e denominada proteína placentar 14 ou proteína endometrial associada a progesterona.

É produzida na sua maioria pelo epitélio glandular endometrial (durante a fase lútea do ciclo menstrual) e em pequena escala por tecidos não uterinos, estando presente nas tubas uterinas, ovário, células hematopoiéticas e glândulas mamárias.⁴⁴ Considera-se que poderá estar envolvida na supressão da resposta imune materna, tal como o LIF referido anteriormente, através da supressão de células NK (*natural killer cells*), assumindo um papel imunoprotetor durante a implantação e desenvolvimento da placenta.²²

A glicodelina plasmática aumenta cinco dias após o pico de LH e retorna ao valor basal durante a fase folicular seguinte. Nos ciclos de concepção as suas concentrações aumentam rapidamente após a implantação, atingindo o máximo às 8-10 semanas de gestação e diminuindo de seguida. Assume assim, um papel fulcral no processo de implantação embrionária e participa na regulação da resposta imune exercendo um efeito imunossupressor, o que promove a existência da janela de implantação, pela diminuição da resposta imunitária materna ao embrião. A sua função neste contexto prende-se com o fato de inibir diretamente a proliferação de linfócitos T e a secreção de citocinas, estimulada pela fitohemaglutinina (PHA) ou anticorpo monoclonal anti-CD3 imobilizado.⁴⁵

É detetável no fluido uterino a partir do 6º dia pós-pico de LH e aumenta rapidamente. Na fase lútea tardia excede as concentrações de glicodelina plasmática em cerca de 100 vezes.⁴⁴

Existe uma clara correlação entre os níveis de glicodelina no fluido endometrial e o estado de maturação endometrial.^{13,22,44}

Estudos mais antigos mostraram que as concentrações de glicodelina A no fluido uterino durante a fase secretora são inferiores em mulheres com perda de gravidez subsequente do que naquelas com gravidezes bem-sucedidas.^{13,22,24,33,44} Tendo sido detetadas concentrações

reduzidas dez a doze dias após o pico de LH em mulheres com infertilidade inexplicada comparando com o grupo de controlo fértil e ausência de diferenças nos dias LH+7.⁴⁴

A sua concentração no soro e fluido endometrial aumenta nos ciclos ovulatórios, verificando-se uma diminuição no fluido uterino de mulheres inférteis, sem se verificar contudo, no soro dessas pacientes.^{41,44}

Bentin-Ley *et al.* demonstraram concentrações de glicodelina no fluido uterino mais elevadas em mulheres inférteis (por fator tubar e hidrosalpinges) comparativamente às mulheres férteis; as mulheres com infertilidade de causa inexplicada apresentaram valores comparáveis com os do grupo de controlo fértil. Os níveis de glicodelina plasmática em mulheres férteis e com infertilidade inexplicada não mostraram diferenças nos dias LH+7, LH+10 e LH+12.⁴⁴

MH van der Gaast *et al.* mostraram que apenas a glicodelina apresentava correlação positiva entre a sua concentração no fluido endometrial e a maturação endometrial, o que não se observou com o LIF, o qual não reflete a maturidade endometrial convenientemente.²²

4. DISCUSSÃO

Ao longo dos anos o interesse pelo estudo das proteínas no fluido endometrial tem vindo a aumentar. No entanto, ao contrário da importância da espessura endometrial que é inquestionável e está documentada, o significado do valor do fluido endometrial permanece controverso.

Existem algumas questões que se colocam no decorrer da investigação de biomarcadores de avaliação da receptividade uterina: qual a variabilidade do momento de início do período receptivo de ciclo para ciclo na mesma mulher? Qual a variação de mulher para mulher? Será que uma mulher fértil atinge a receptividade endometrial em todos os ciclos? Serão os biomarcadores diferentes em mulheres com diferentes etiologias para a infertilidade? Qual dos marcadores utilizados para definir a receptividade normal está alterado em mulheres cuja infertilidade é devida à incapacidade de alcançar a receptividade? Quão dependente é a receptividade endometrial da qualidade do produto de concepção?¹¹ Questões às quais a ciência tem tentado dar resposta e embora se verifique um crescimento exponencial de potenciais biomarcadores de receptividade, poucos são os estudos com validade para definir quais deles têm maior valor e consistência.

Apesar dos avanços da genómica e proteómica no estudo de todo o tecido endometrial, subtipos celulares e fluido endometrial e da obtenção de resultados promissores relativamente a potenciais biomarcadores de receptividade endometrial, existe pouca concordância entre os diversos estudos, principalmente nos de análise de tecido endometrial.

Uma das principais limitações do fluido endometrial, é que as concentrações dos seus componentes variam conforme o tipo de procedimento. Ainda que a análise do fluido endometrial permita obter informação momentânea do ambiente uterino durante a janela de implantação, a compreensão da contribuição glandular específica para a composição total do fluido uterino humano permanece limitada.

Outra das limitações da utilização do fluido uterino, enquanto método de avaliação da receptividade uterina, assenta no facto de este estar presente na cavidade uterina em pequenas quantidades, o que se deve à marcada proximidade das superfícies luminais uterinas, sendo difícil obter mais de 10 µl por aspiração.

Além destas, o carácter dinâmico do endométrio constitui uma dificuldade no estudo do mesmo, dado que ocorrem alterações da composição molecular e celular diariamente.

Apesar de alguns autores defenderem que a biópsia endometrial, no momento de transferência do embrião, não põe em causa a viabilidade de uma possível gravidez, há quem defenda que a análise do padrão proteico no fluido endometrial oferece mais segurança, permitindo o acesso ao estado de receptividade uterina durante os ciclos de tratamentos de uma forma não invasiva.

É importante considerar que os aspirados das secreções endometriais poderão conter contaminantes celulares como leucócitos, células do estroma ou células epiteliais.⁴⁶

Alguns estudos realizados, em que foi efetuada uma aspiração direta do fluido uterino, mostraram que há uma correlação entre os resultados obtidos relativamente à glicodelina, histologia e marcadores de células mitóticas, o mesmo não se verificando quanto ao fator inibidor da leucemia, embora este seja proposto como um dos mais promissores marcadores da janela de implantação.⁸ Os últimos dados relativos à glicodelina são, contudo, contraditórios.

De acordo com os resultados obtidos, a PC6 parece ser um biomarcador promissor. Contrariamente ao VEGF e CSF-3 cujos resultados supramencionados são controversos e pouco conclusivos.

A análise das concentrações no LIF no fluido uterino a partir de mulheres inférteis e férteis não mostrou consistência e o seu valor como biomarcador permanece pouco claro.⁷

Sob o meu ponto de vista, a contradição patente nos resultados obtidos deve-se à reduzida homogeneização dos grupos de mulheres inférteis selecionados. É fundamental caracterizar

detalhadamente esses grupos, definir metodicamente os critérios de inclusão dos estudos e interpretar os dados à luz da etiologia subjacente.

5. CONCLUSÃO

A compreensão do microambiente uterino e da sua contribuição para a comunicação entre o blastocisto e o útero materno, poderão vir a modificar os atuais tratamentos de infertilidade e aumentar as taxas de sucesso.

Por sua vez, perante as evidências já existentes, um conhecimento biológico mais aprofundado do líquido endometrial representa uma mais-valia para a prática clínica atual, contribuindo para uma melhor e mais específica abordagem clínica das mulheres inférteis.

A identificação de biomarcadores suficientemente confiáveis e com elevada especificidade, permitirá a tomada de decisões sustentadas no decorrer dos tratamentos de fertilidade.

De facto, a avaliação de apenas uma fase do ciclo ou a utilização de um único biomarcador não serão suficientes para apurar a recetividade endometrial. Assim sendo, uma abordagem ideal integrará várias modalidades de diagnóstico como: métodos histológicos tradicionais, radiológicos e ecográficos, marcadores hormonais, genómica e proteómica no tecido e fluido endometrial e biomarcadores específicos no fluido endometrial.

Esta conjugação, nomeadamente de marcadores no fluido uterino e de monitorização ecográfica dinâmica do fluido uterino, permitirá a otimização do *timing* de transferência dos embriões e o desenvolvimento de tratamentos específicos desenhados e adaptados para cada paciente.

Assim, um teste preciso com obtenção rápida de resultados possibilitará uma adequação da terapêutica individualizada para cada paciente e a gestão eficaz de recursos, permitindo que se delibere entre realizar uma transferência embrionária a fresco ou criopreservar os embriões, diferindo a sua transferência para um ciclo em que a recetividade endometrial seja maior.

A determinação da utilização na prática clínica de biomarcadores de recetividade uterina presentes no fluido endometrial requer uma validação global, o que exige uma simplificação do processo de colheita de amostras, tornando-as amplamente aplicáveis, assim como uma

definição clara de como poderão ser utilizados os marcadores. É mandatório provar o impacto da avaliação da receptividade uterina na prática clínica, na avaliação da infertilidade e nos resultados dos ciclos de FIV, cuja decisão seja tomada com base neste teste.

O valor preditivo de um teste de receptividade aplicável variará conforme a prevalência de alterações na receptividade uterina na população em estudo podendo não ser adequado para a abordagem inicial de todas as situações de infertilidade.

Ao recorrer a estes biomarcadores pretende-se avaliar a receptividade uterina na fase secretora média num ciclo natural durante o estudo de situações de infertilidade bem como prever o estado de receptividade uterina durante os ciclos naturais, tendo em vista a transferência de embriões a fresco ou criopreservados.

A correlação estabelecida entre os biomarcadores e os resultados clínicos é uma etapa fulcral no processo de descoberta de novos biomarcadores. Além disso, há critérios adicionais que deverão ser cumpridos: o biomarcador deverá ser reproduzível e bem fundamentado, validado quanto à segurança, eficácia e utilidade prática através de ensaios clínicos bem desenhados, preferencialmente prospetivos, randomizados e controlados e deverá também ser quantificado com recurso a uma tecnologia confiável e compatível.⁴⁷

O estudo por biópsia endometrial é incompatível com a sua aplicação clínica durante o ciclo ativo, não permitindo, portanto, uma correlação direta de marcadores com as taxas de implantação e resultados obtidos.

Assim, o fluido endometrial constitui um biomarcador adequado e pertinente uma vez que não diminui a probabilidade de implantação e que poderá ser analisado durante o período de receptividade endometrial, praticamente em simultâneo com o momento de transferência do embrião.

O conhecimento da disfunção no diálogo embrião-útero materno e a implementação de testes de diagnóstico de forma padronizada durante a janela de implantação trará vários benefícios

particularmente em situações de RIF, de inúmeras tentativas de FIV falhadas e também perante a decisão difícil de continuar ou interromper um ciclo terapêutico.

A identificação de biomarcadores fidedignos da receptividade endometrial poderá representar um aumento da eficácia dos tratamentos de FIV, através da otimização da rentabilidade do tratamento e de um aumento das taxas de gravidez, permitindo ainda reduzir o stress emocional das pacientes.

Assim, e de forma a dar resposta à questão-problema deste trabalho, a pequena percentagem de nidação dever-se-á à expressão diferencial das substâncias no endométrio e no respetivo fluido endometrial. A previsão do insucesso das técnicas poderá ser possível após implementação de métodos de análise do fluido endometrial, nomeadamente pelo aumento ou diminuição da concentração de determinadas moléculas envolvidas.

Quanto à reversão de condições endometriais adversas, esse será o principal desafio, de que forma se conseguirão alterar as concentrações de determinados componentes do fluido endometrial. Embora terapêuticas como a administração de rhLIF tenham vindo a ganhar alguma expressão na prática clínica, o passo seguinte será o desenvolvimento de terapêuticas-alvo que otimizem o processo de implantação, no combate a alterações de implantação e condições como a pré-eclampsia, abortamento e restrição de crescimento fetal intrauterino.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, a Professora Doutora Margarida Figueiredo Dias e à minha coorientadora, a Professora Doutora Margarida Silvestre, por todo o apoio, disponibilidade, alento e dedicação prestadas ao longo da realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Binder NK, Evans J, Salamonsen LA, Gardner DK, Kaitu'u-Lino TJ, Hannan NJ. Placental Growth Factor Is Secreted by the Human Endometrium and Has Potential Important Functions during Embryo Development and Implantation. *PLoS One*. 2016;11(10):e0163096.
2. Paule S, Aljofan M, Simon C, Rombauts LJ, Nie G. Cleavage of endometrial alpha-integrins into their functional forms is mediated by proprotein convertase 5/6. *Hum Reprod*. 2012;27(9):2766-2774.
3. Fatemi HM, Popovic-Todorovic B. Implantation in assisted reproduction: a look at endometrial receptivity. *Reprod Biomed Online*. 2013;27(5):530-538.
4. Hanson B, Johnstone E, Dorais J, Silver B, Peterson CM, Hotaling J. Female infertility, infertility-associated diagnoses, and comorbidities: a review. *J Assist Reprod Genet*. 2017;34(2):167-177.
5. Calhaz-Jorge C, De Geyter C, Kupka MS, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2013: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*. 2017;32(10):1957-1973.
6. Nowak I, Wilczynska K, Wilczynski JR, et al. KIR, LILRB and their Ligands' Genes as Potential Biomarkers in Recurrent Implantation Failure. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017;65(5):391-399.
7. Salamonsen LA, Edgell T, Rombauts LJ, et al. Proteomics of the human endometrium and uterine fluid: a pathway to biomarker discovery. *Fertil Steril*. 2013;99(4):1086-1092.
8. Cheong Y, Boomsma C, Heijnen C, Macklon N. Uterine secretomics: a window on the maternal-embryo interface. *Fertil Steril*. 2013;99(4):1093-1099.
9. Casado-Vela J, Rodriguez-Suarez E, Iloro I, et al. Comprehensive proteomic analysis of human endometrial fluid aspirate. *J Proteome Res*. 2009;8(10):4622-4632.
10. Salamonsen LA, Evans J, Nguyen HP, Edgell TA. The Microenvironment of Human Implantation: Determinant of Reproductive Success. *Am J Reprod Immunol*. 2016;75(3):218-225.
11. Edgell TA, Rombauts LJ, Salamonsen LA. Assessing receptivity in the endometrium: the need for a rapid, non-invasive test. *Reprod Biomed Online*. 2013;27(5):486-496.
12. Zhang Y, Wang Q, Wang H, Duan E. Uterine Fluid in Pregnancy: A Biological and Clinical Outlook. *Trends Mol Med*. 2017.
13. Bhusane K, Bhutada S, Chaudhari U, Savardekar L, Katkam R, Sachdeva G. Secrets of Endometrial Receptivity: Some Are Hidden in Uterine Secretome. *Am J Reprod Immunol*. 2016;75(3):226-236.
14. Lu S, Peng H, Zhang H, et al. Excessive Intrauterine Fluid Cause Aberrant Implantation and Pregnancy Outcome in Mice. In: Ye X. *PLoS One*. Vol 8. San Francisco, USA2013.
15. Liu S, Shi L, Shi J. Impact of endometrial cavity fluid on assisted reproductive technology outcomes. *Int J Gynaecol Obstet*. 2016;132(3):278-283.
16. Dong Y, Cai Y, Zhang Y, Xing Y, Sun Y. The effect of fertility stress on endometrial and subendometrial blood flow among infertile women. *Reprod Biol Endocrinol*. 2017;15(1):15.
17. Wolff EF, Vahidi N, Alford C, Richter K, Widra E. Influences on endometrial development during intrauterine insemination: clinical experience of 2,929 patients with unexplained infertility. *Fertility and sterility*. 2013;100(1):194-199.e191.
18. Kamath MS, Chittawar PB, Kirubakaran R, Mascarenhas M. Use of granulocyte-colony stimulating factor in assisted reproductive technology: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2017;214:16-24.

19. Teh WT, McBain J, Rogers P. What is the contribution of embryo-endometrial asynchrony to implantation failure? *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(11):1419-1430.
20. Chan C, Virtanen C, Winegarden NA, Colgan TJ, Brown TJ, Greenblatt EM. Discovery of biomarkers of endometrial receptivity through a minimally invasive approach: a validation study with implications for assisted reproduction. *Fertil Steril.* 2013;100(3):810-817.
21. Pundir J, El Toukhy T. Uterine cavity assessment prior to IVF. *Womens Health (Lond).* 2010;6(6):841-847; quiz 847-848.
22. van der Gaast MH, Macklon NS, Beier-Hellwig K, et al. The feasibility of a less invasive method to assess endometrial maturation--comparison of simultaneously obtained uterine secretion and tissue biopsy. *Bjog.* 2009;116(2):304-312.
23. Hannan NJ, Nie G, Rainczuk A, Rombauts LJ, Salamonsen LA. Uterine lavage or aspirate: which view of the intrauterine environment? *Reprod Sci.* 2012;19(10):1125-1132.
24. Hannan NJ, Stephens AN, Rainczuk A, Hincks C, Rombauts LJ, Salamonsen LA. 2D-DiGE analysis of the human endometrial secretome reveals differences between receptive and nonreceptive states in fertile and infertile women. *J Proteome Res.* 2010;9(12):6256-6264.
25. Boomsma CM, Kavelaars A, Eijkemans MJ, et al. Cytokine profiling in endometrial secretions: a non-invasive window on endometrial receptivity. *Reprod Biomed Online.* 2009;18(1):85-94.
26. Scotchie JG, Fritz MA, Mocanu M, Lessey BA, Young SL. Proteomic Analysis of the Luteal Endometrial Secretome. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.).* 2009;16(9):883-893.
27. Paule S, Nebl T, Webb AI, Vollenhoven B, Rombauts LJ, Nie G. Proprotein convertase 5/6 cleaves platelet-derived growth factor A in the human endometrium in preparation for embryo implantation. *Mol Hum Reprod.* 2015;21(3):262-270.
28. Heng S, Hannan NJ, Rombauts LJ, Salamonsen LA, Nie G. PC6 levels in uterine lavage are closely associated with uterine receptivity and significantly lower in a subgroup of women with unexplained infertility. *Hum Reprod.* 2011;26(4):840-846.
29. Heng S, Cervero A, Simon C, et al. Proprotein convertase 5/6 is critical for embryo implantation in women: regulating receptivity by cleaving EBP50, modulating ezrin binding, and membrane-cytoskeletal interactions. *Endocrinology.* 2011;152(12):5041-5052.
30. Heng S, G Paule S, Li Y, et al. Posttranslational removal of -dystroglycan N terminus by PC5/6 cleavage is important for uterine preparation for embryo implantation in women. *Vol 292015.*
31. Heng S, Paule S, Hardman B, et al. Posttranslational activation of bone morphogenetic protein 2 is mediated by proprotein convertase 6 during decidualization for pregnancy establishment. *Endocrinology.* 2010;151(8):3909-3917.
32. Chen X, Man GCW, Liu Y, et al. Physiological and pathological angiogenesis in endometrium at the time of embryo implantation. *Am J Reprod Immunol.* 2017;78(2).
33. Hannan NJ, Paiva P, Meehan KL, Rombauts LJ, Gardner DK, Salamonsen LA. Analysis of fertility-related soluble mediators in human uterine fluid identifies VEGF as a key regulator of embryo implantation. *Endocrinology.* 2011;152(12):4948-4956.
34. Coughlan C, Sinagra M, Ledger W, Li TC, Laird S. Endometrial integrin expression in women with recurrent implantation failure after in vitro fertilization and its relationship to pregnancy outcome. *Fertil Steril.* 2013;100(3):825-830.
35. Franasiak JM, Holoch KJ, Yuan L, Schammel DP, Young SL, Lessey BA. Prospective assessment of midsecretory endometrial leukemia inhibitor factor expression versus

- $\alpha\text{v}\beta 3$ testing in women with unexplained infertility. *Fertility and sterility*. 2014;101(6):1724-1731.
36. Rahmati M, Petitbarat M, Dubanchet S, Bensussan A, Chaouat G, Ledee N. Colony Stimulating Factors 1, 2, 3 and early pregnancy steps: from bench to bedside. *J Reprod Immunol*. 2015;109:1-6.
 37. Yeganegi M, Leung CG, Martins A, et al. Lactobacillus rhamnosus GR-1 Stimulates Colony-Stimulating Factor 3 (Granulocyte) (CSF3) Output in Placental Trophoblast Cells in a Fetal Sex-Dependent Manner. *Biology of Reproduction*. 2011;84(1):18-25.
 38. Margioulas-Siarkou C, Prapas Y, Petousis S, et al. LIF endometrial expression is impaired in women with unexplained infertility while LIF-R expression in all infertility sub-groups. *Cytokine*. 2017;96:166-172.
 39. Salleh N, Giribabu N. Leukemia inhibitory factor: roles in embryo implantation and in nonhormonal contraception. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:201514.
 40. Tawfeek MA, Eid MA, Hasan AM, Mostafa M, El-Serogy HA. Assessment of leukemia inhibitory factor and glycoprotein 130 expression in endometrium and uterine flushing: a possible diagnostic tool for impaired fertility. *BMC Women's Health*. 2012;12:10-10.
 41. Aghajanova L, Hamilton AE, Giudice LC. Uterine Receptivity to Human Embryonic Implantation: Histology, Biomarkers, and Transcriptomics. *Seminars in cell & developmental biology*. 2008;19(2):204-211.
 42. Wu M, Yin Y, Zhao M, Hu L, Chen Q. The low expression of leukemia inhibitory factor in endometrium: possible relevant to unexplained infertility with multiple implantation failures. *Cytokine*. 2013;62(2):334-339.
 43. Cheng X, Liu J, Shan H, et al. Activating transcription factor 3 promotes embryo attachment via up-regulation of leukemia inhibitory factor in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*. 2017;15:42.
 44. Bentin-Ley U, Lindhard A, Ravn V, Islin H, Sorensen S. Glycodelin in endometrial flushing fluid and endometrial biopsies from infertile and fertile women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011;156(1):60-66.
 45. Dong M, Ding G, Zhou J, Wang H, Zhao Y, Huang H. The effect of trophoblasts on T lymphocytes: possible regulatory effector molecules--a proteomic analysis. *Cell Physiol Biochem*. 2008;21(5-6):463-472.
 46. Diedrich K, Fauser BC, Devroey P, Griesinger G. The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update*. 2007;13(4):365-377.
 47. Chen AA, Tan L, Suraj V, Pera RR, Shen S. Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application. *Fertility and sterility*. 2013;99(4):1035-1043.

Anexos

MOLECULAR ASSESSMENT OF ENDOMETRIAL FLUID CAN IMPROVE THE SUCCESS OF EMBRYO IMPLANTATION AFTER ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNIQUES

Inês Ramalho¹, Ana Alves¹, Margarida Figueiredo-Dias¹, Margarida Silvestre²
¹Gynecology Department, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal
²Ethics Department, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal

PROBLEM STATEMENT

Recurrent implantation failure (RIF) is a major challenge in assisted reproductive techniques that still remains poorly characterized. Although controversial, it can be defined as the failure to achieve a pregnancy after 3 completed fresh IVF-ET cycles and endometrial receptivity plays a crucial role in the success of this process. Actually implantation is considered the limiting step in the success of assisted reproductive techniques and there are no reliable biochemical methods that can determine whether the uterus is receptive. Therefore, endometrial fluid has been recently studied for its role as it undergoes profound molecular changes during the transient window of implantation.

METHODS

A review literature search of the PubMed and Cochrane database was conducted before August 25, 2017 to identify studies published between 2007 and 2017.

The following terms were used and adjusted for each database as necessary: endometrial fluid; endometrial fluid collection; endometrial fluid biomarkers; fluid accumulation of the uterine cavity; uterine fluid; endometrial cavity fluid AND assisted reproductive techniques; endometrial fluid AND recurrent implantation failure. Studies were included if they compared the outcomes of analysis of endometrial fluid, and only 4 studies were selected on the basis of their methodological quality.

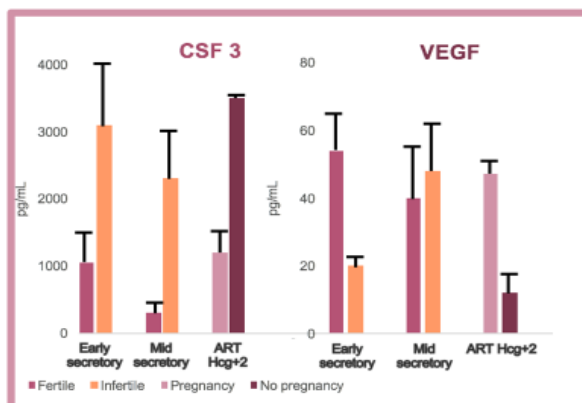


Fig. 1 – Adapted from Salmonsens LA, et al. (2)

RESULTS

There are few studies that contribute to determine which molecular biomarkers are relevant and consistent.

Transvaginal ultrasound assessment of the endometrium still remains the standard investigation to examine thickness, features and blood flow. However, it is a poor positive predictor of implantation, and the usefulness of some potential mid-secretory biomarkers for early secretory diagnostic was found to be limited.

Besides, several different proteins presented in endometrial cavity fluid have been recently described, namely CSF3 and VEGF that are critical predictive markers of successful embryo transfer. Furthermore, proprotein convertase 5/6 (PC6) is up-regulated in the human endometrium specifically at the time of epithelial receptivity and is strongly associated with endometrial receptivity and embryo implantation.

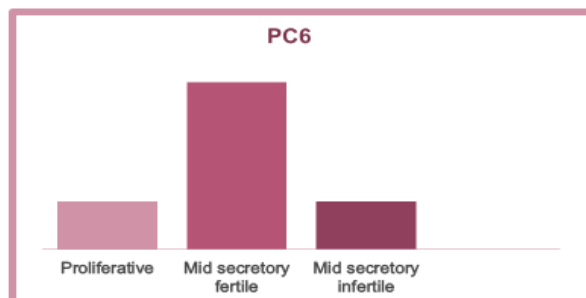


Fig. 2 - Adapted from Heng S, et al. (3)

CONCLUSIONS

There are strong indicators supporting that endometrial fluid collection and assessment could be used as rapid non-invasive biomarker for the assessment of endometrial receptivity. Therefore, it could predict and improve assisted reproductive techniques outcomes. The establishment of reliable biomarkers of endometrial receptivity will require a large-scale validation. The uterine fluid has advantages when compared with other tests, as it has a simpler proteome than endometrial tissue and is less invasive than tissue biopsies. Furthermore, it can be evaluated at the exactly time of embryo transfer. The later use of appropriate biomarkers will contribute to find the suitable timing for embryo transfer.

1. Hannan NJ, Nie G, Rainzucuk A, Rombauts LJ, Salmonsens LA. Uterine lavage or aspirate: which view of the intrauterine environment? *Reprod Sci.* 2012;19(10):1125-1132. 2. Salmonsens LA, Evans J, Nguyen HP, Edgell TA. The Microenvironment of Human Implantation: Determinant of Reproductive Success. *Am J Reprod Immunol.* 2016;75(3):218-225. 3. Heng S, Hannan NJ, Rombauts LJ, Salmonsens LA, Nie G. PC6 levels in uterine lavage are closely associated with uterine receptivity and significantly lower in a subgroup of women with unexplained infertility. *Hum Reprod.* 2011;26(4):840-846. 4. Chan C, Virtanen C, Winegardner NA, Colgan TJ, Brown TJ, Greenblatt EM. Discovery of biomarkers of endometrial receptivity through a minimally invasive approach: a validation study with implications for assisted reproduction. *Fertil Steril.* 2013;100(3):810-817.