ARTÍCULO ORIGINAL

EXPRESIÓN DE INTEGRINAS αV-β3 Y PINÓPODOS EN CÉLULAS ENDOMETRIALES HUMANAS DURANTE CICLOS OVULATORIOS FÉRTILES TERMINADOS CON Y SIN EMBARAZOS; PATRONES HORMONALES QUE LOS REGULAN

Orta Garcia A.[1.] Ceballos Reyes G.M.[2.,] Flores Urbina A.R. [2.]
Figueroa Morales S.[2.] , Aguilar Pérez G.[2].

RESUMEN

ANTECEDENTES

Dentro del marco general de la infertilidad humana y muy particularmente de la implantación embrionaria existe información escasa y una buena parte de ella contradictoria respecto a una probable relación temporal en la expresión de los primeros indicadores o marcadores de receptividad endometrial sospechados y descritos: los pinópodos y el complejo integrina αV-β3. Es prácticamente inexistente cualquier investigación realizada durante ciclos reproductivos fértiles naturales con exposición a embarazos que compare dicha expresión entre ciclos que terminaron con o sin gestaciones y que además nos revele los patrones hormonales que los regularon. No encontramos igualmente datos definitivos respecto a una relación entre éstos dos marcadores que aclaren o ayuden a definir lo que significa la llamada ventana de implantación embrionaria" asi como a ubicarla cronológicamente en forma más acertada dentro de un ciclo reproductivo sin depender exclusivamente de la determinación de la madurez cronológica endometrial mediante el estudio histológico convencional. Por último, no existe o no se ha profundizado en la idea de que mas allá de la función ya conocida como "marcadores de receptividad endometrial", tanto el complejo integrina αV- β3 como los pinópodos desempeñen un papel fisiológico relevante dentro del proceso de implantación embrionaria, tal vez el principal.
MATERIAL Y MÉTODOS.- Se investigó la relación temporal de la expresión de integrinas αV-β3 y la formación de pinópodos en 314 biopsias endometriales mediante inmunohistoquímica y microscopía electrónica de barrido respectivamente, ubicando cronológicamente también el grado de madurez endometrial mediante estudio histológico convencional, comparándose los resultados entre ciclos reproductivos terminados en embarazo y ciclos fallidos en un total de 63 pacientes y 157 ciclos reproductivos. Se tomaron dos biopsias endometriales los días ovulatorios +6 y +8 (aproximadamente los días 20° y 22° del ciclo) durante ciclos menstruales fértiles naturales, con exposición al embarazo. Los mismos días de la toma de las biopsias endometriales se cuantificaron niveles sanguíneos de estradiol y progesterona.
RESULTADOS.- Al compararse la expresión de integrinas, formación de pinópodos y concentraciones de estradiol y progesterona entre ciclos de embarazo y ciclos fallidos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas. La expresión de integrinas y la formación de pinópodos fue intensa (HSCORE de 3-4 y Score 3 respectivamente) en temporalidad coordinada (coexpresión) el día ovulatorio +8 (aproximadamente 22° dia del ciclo) en el 95% de los ciclos de embarazo, no ocurriendo así en el 95% de los ciclos fallidos. Las concentraciones de estrógenos y progesterona se elevaron progresivamente entre el día ovulatorio +6 y +8 (20° y 22° dia de los ciclos), siendo altas en el dia ovulatorio +8 (22° del ciclo) en ciclos de embarazo, lo que no ocurrió en ciclos fallidos. Finalmente, hubo concordancia entre la asociación temporal de expresión y el grado de madurez endometrial cronológico obtenido mediante fechado histológico.

CONCLUSIONES

Se observó una marcada coexpresión temporal de los marcadores de receptividad endometrial estudiados que se citan como constructores de la ventana de implantación embrionaria en ciclos fértiles que concluyeron en embarazos; las concentraciones de estradiol y progesterona fueron más elevadas también en éste tipo de ciclos. Debemos diseñar estudios que ayuden a esclarecer las acciones que sobre la implantación embrionaria con mucha seguridad desempeñan las integrinas y los pinópodos, más allá del concepto de "marcadores de receptividad endometrial". Los patrones hormonales que configuran los ciclos de embarazo y los ciclos fallidos pueden ser tomados como indicadores pronósticos de embarazo o no embarazo en la actividad clínica.

PALABRAS CLAVE.- Histología endometrial, implantación, infertilidad, integrinas, pinópodos.

[1] Centro Poblano de Fertilidad, Biología de la Reproducción Humana, División de Ginecología y Obstetricia, Hospital Ángeles , Puebla, Pue., México.

ABSTRACT

BACKGROUND.– Studies on endometrial co-expression of the receptivity markers αV-ß3 integrin and pinopods, as well as the hormonal dynamics that generates such expression during the embryonic implantation window, are scarce and contradictory. No study to date has compared the co-expression of these molecules and cellular sacculations during reproductive cycles ending with or without gestational success in order to establish the hormonal regulation involved.
MATERIALS AND METHODS.– We explored the co-expression of αV-ß3 integrins and pinopods, as well as endometrial maturity, in 314 biopsies from 63 patients by immunohistochemistry, electron scanning microscopy and histochemistry. We compared the results obtained for finished cycles with and without pregnancy. We obtained 2 endometrial biopsies per cycle for 157 cycles during ovulatory days +6 and +8 with exposure to pregnancy, and we simultaneously quantified serum estradiol and progesterone levels.

RESULTS

The co-expression of integrins and pinopods was high on ovulatory day +8 in 95% of the cycles with pregnancy, but was not present in 95% of the unsuccessful cycles. Hormone levels were elevated between ovulatory days +6 and +8 in gestational cycles. There was a correlation between co-expression and endometrial maturity.

CONCLUSIONS

In completed pregnancy cycles, there was an intense and progressive endometrial co-expression of αV-ß3 integrins and pinopods associated with elevated concentrations of estradiol and progesterone during the embryonic implantation window. The most important limitation of the study, due to its design, was the availability of patients.
KEY WORDS.– implantation, infertility, integrins, pinopods, estradiol, progesterone.

INTRODUCCIÓN

La concepción humana es lograda a través de la fertilización de un óvulo por un espermatozoide, si el producto de lo concebido resulta de calidad satisfactoria y su estancia intrauterina coincide cronológicamente con un completo estado de receptividad endometrial se habrán cubierto las condiciones necesarias para una eventual implantación embrionaria, la cual al evolucionar, define a un embarazo o gravidez en la mujer y consecuentemente su fertilidad (Psychoyos, 1986).

Un ambiente endometrial muy especial es imprescindible para lograr una implantación embrionaria, que es el evento decisivo en la reproducción, por lo cual tiene una enorme relevancia el exámen de su receptividad y no solamente el tradicional estudio de morfología y madurez por fechas del ciclo menstrual (Noyes et al., 1950; Casper, 2011; Lessey, 2011; Revel, 2012). La evaluación de la función endometrial humana bajo condiciones fisiológicas que remeda a la de un órgano secretor, es un área de alta especialidad y complejidad en medicina reproductiva sobre todo en ciclos fértiles naturales en el modelo humano (Wentz et al., 1988).
Hasta el momento han proliferado los informes respecto a metodologías y a abordajes para el estudio de la receptividad endometrial, unos muy complejos, otros muy confusos, algunos de costos muy elevados, todos ellos aún muy controvertidos respecto a su eficacia y eficiencia diagnóstica y con muy pocas expectativas de aplicación práctica en la clínica y muchas dificultades respecto a validaciones (Vilella et al., 2012; Diaz-Gimeno et al., 2013; Chan et al., 2013; Norman, 2013; Ruiz Alonso et al., 2013).

El punto máximo de receptividad endometrial para la implantación embrionaria es la culminación de un intrincado y complejo mecanismo orquestado por el eje Hipotálamico-Hipofisiario-Ovárico-Endometrial a través de fluctuaciones sincrónicas equilibradas en un fino balance de estrógenos y progesterona (Elgindy, 2011; Diao et al., 2011; Xu et al., 2012; Li et al., 2013; Madaschi et al., 2013). La implantación ocurre al final de una cascada de eventos moleculares que involucra tanto al endometrio como al embrión, si ésta se interrumpe en cualquier punto, se ocasiona un fallo implantatorio que clínicamente se interpreta como infertilidad (Evans et al., 2012; Haouzi et al., 2012; Salamonsen et al., 2013; Cheong et al., 2013; Garrido-Gómez et al., 2013; Vilella et al., 2013; Diaz-Gimeno et al., 2014; Nejat et al., 2014; Mahajan, 2015; Gómez et al., 2015).

La existencia de la llamada ventana de implantación embrionaria, definida por el momento como el periodo de máxima receptividad endometrial a la implantación fue sugerida por Finn en 1977 y su presencia ha sido demostrada en modelos animales (Hodgen, 1983; Psychoyos, 1986), en humanos solamente ha sido inferida con fuertes argumentos, pero in vivo no ha podido ser evidenciada. A pesar de éste hecho, en Biología de la Reproducción Humana se utiliza ésta definición en forma habitual y cronológicamente se le ubica entre los días 20° a 24° de un ciclo menstrual, es decir, entre los días 6° y 10° post-ovulatorio. Característicamente durante éste período el endometrio asume fenotipos de permisividad desarrollando una morfología especial debida a la formación de saculaciones en la porción apical de las células epiteliales superficiales conocidas como pinópodos (marcador morfológico) o bien, puede asumir fenotipos de hostilidad a la recepción (Nikas, 1999 ab, 2003; Psychoyos et al., 1973). Por otro lado, se enfatiza la importancia de la expresión de ciertas moléculas de adhesión celular donde los receptores para componentes de la matriz extracelular pertenecientes a la familia de las integrinas (marcador molecular) parecen tener un papel central (Lessey et al., 1992; Sueoka et al., 1997; Daftary y Taylor, 2001). Estos factores presentan un patrón de expresión ciclo dependiente correspondiente al periodo máximo de receptividad endometrial (Hertig et al., 1956; Tabibzadeh, 1992) y son ambos probablemente los más citados en la literatura como interventores en la conformación de la ventana de implantación embrionaria (Xu et al., 2012; Coughlan et al., 2012; Scmitz et al., 2014).

Llama la atención la escasa presencia de estudios que demuestren la aparición de los dos marcadores simultáneamente en tiempo y menos en espacio durante

la ventana de implantación embrionaria en ciclos naturales fértiles, con mucha discrepancia en los resultados y ausencia de informes analizando resultados gestacionales con los patrones hormonales que deben caracterizarlos. Por todo lo anterior nos preguntamos: ¿existe una relación cronológica entre la expresión del complejo integrina αV-β3 y el desarrollo de pinópodos en las células epiteliales del endometrio humano durante la ventana de implantación en ciclos reproductivos fértiles naturales que concluyen en embarazos?, ¿y qué patrones hormonales regulan éstos eventos?

Hipotetizamos que durante la ventana de implantación embrionaria en ciclos reproductivos fértiles naturales terminados con embarazos, la expresión del complejo integrina αV-β3 ocurre intensa, simultánea y coordinadamente (coexpresión) con el desarrollo de los pinópodos en las células del epitelio endometrial, existiendo una dinámica hormonal característica que los regula.

Así, el objetivo del presente estudio es el de comparar en muestras endometriales humanas la intensidad de expresión del complejo integrina αV-β3 y el grado de desarrollo de los pinópodos durante la ventana de implantación embrionaria entre ciclos de embarazo y ciclos fallidos, estableciendo las características hormonales desarrolladas.

MATERIAL Y MÉTODOS

PACIENTES Y CICLOS DE ESTUDIO.- Investigamos la intensidad de la expresión de integrinas αV-β3 y el desarrollo progresivo de pinópodos asi como su probable relación temporal en términos de coexpresión en 314 muestras endometriales de 63 pacientes fértiles, 41 con un hijo y 22 con dos hijos voluntarias con deseos de un nuevo embarazo provenientes de la clínica privada, con promedio de edad de 30 ± 4.5 años por 157 ciclos reproductivos en total y un lapso de 22 meses (junio 2015-abril 2017). Los estudios del tejido humano estuvieron apoyados por consentimientos informados firmados y aprobados por el Comité de Ética de nuestra clínica y fueron realizados por dos patólogos especialistas en endometrio en forma ciega. Todas las mujeres presentaban patrones menstruales regulares cada 27 a 32 dias así como parejas con excelentes parámetros de densidad espermática y características específicas de fertilidad. Ninguna paciente tomaba medicación, básicamente hormonal. En todas las mujeres se practicaron revisiones secuenciales con ultrasonido endovaginal para determinar crecimiento folicular; de igual modo se determinaron concentraciones de estradiol y progesterona en fase lútea y se tomaron biopsias endometriales en el mismo ciclo los días ovulatorios +6 y +8 (20° y 22° del ciclo).

PROCEDIMIENTO

Una vez cubiertos los criterios de selección de pacientes y obtenido la firma de consentimiento informado, se procedió a tomarles muestras sanguíneas para cuantificar niveles basales de hormona foliculoestimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) y estradiol (E2) mediante radioinmunoanálisis (RIA) el 1°, 2° ó 3er día del ciclo. Estos indicadores de función ovárica se midieron en miliunidades por mililitro los dos primeros con rangos de normalidad de > 5 mu/ml y < 40 mu/ml y el tercero en pg/ml con rangos de normalidad de > 13 pg/ml y < 75 pg/ml (Speroff et al., 1999).

Mediante un transductor endovaginal de 5 Mhz con un aparato Aloka (modelo SSD-620; Aloka Co. Ltd, Tokio, Japón) se exploraron ultrasonográficamente (USG) el endometrio y los ovarios, estableciéndose las características basales de grosor y ecogenicidad endometriales así como de dimensiones, volumen y apariencia ovárica. Esta metodología de función ovulatoria evaluó el grosor endometrial en milímetros, en rangos de normalidad basal de 4 mm ± 2 milimetros, hipo o hiperecogénico. Todo esto fue realizado siempre por el mismo observador.

Se les citó al dia 10° del ciclo para valorar cambios a nivel endometrial y de desarrollo folicular ovárico, realizándose esto diariamente hasta observar la presencia de un folículo ovárico preovulatorio de 17mm a 25mm de diámetro y un grosor endometrial mayor de 10mm con apariencia trilaminar hiperecóica que sucedió entre los días 13° al 15° de los ciclos, se iniciaron entonces cuantificaciones de los niveles de LH dos veces al día en sangre hasta detectar su pico preovulatorio (RIA > 60 mu/ml). En ése tiempo se constató que hubiera una ruptura folicular y consecuentemente ovulación, manifestada ultrasonográficamente por colapso folicular, disminución del diámetro y distorsión en su forma asi como la presencia de líquido en la cavidad peritoneal (Puerto et al., 2003). Las mujeres siguieron un ritmo coital de exposición al embarazo satisfactorio de 3 a 4 coitos semanalmente.

En los días ovulatorios + 6 y + 8 (20° y 22° de los ciclos) se citó a las voluntarias para obtener nuevamente muestras sanguíneas y cuantificar niveles de E2 y progesterona (P4) mediante RIA y quimioluminiscencia (sensibilidad de 0.2 ng/ml), en éstos mismos días del ciclo se tomaron las biopsias endometriales por aspiración (2 por ciclo, días 20° y 22°) de la cara anterior de la cavidad endometrial utilizando cánulas plásticas flexibles de Pipelle (Laboratoire CCD, París, Francia) sin ocasionar dolor ni sangrado.

MUESTRAS DE TEJIDO ENDOMETRIAL

El especimen endometrial se dividió en 3 porciones, una para establecer el grado de madurez endometrial por fecha del ciclo (fechado) usando microscopía de luz, otra para la preparación del estudio inmunohistoquímico (integrinas) y la tercera para la preparación de microscopia electrónica de barrido (pinópodos).

MICROSCOPIA DE LUZ

En el caso de la microscopía de luz para el diagnóstico de madurez endometrial, el fragmento de tejido, se fijó en solución de formaldehído neutro al 4%, se hicieron las preparaciones de cortes en parafina, se tiñeron con hematoxilina-eosina y hematoxilina ácida periódica de Schiff (PAS), las preparaciones fueron analizadas por 2 observadores (patólogos especialistas) en forma ciega y se calificaron de acuerdo a los criterios de Noyes (Noyes et al., 1950) utilizando un microscopio Nikon (Nikon, Inc.Garden City, NY, USA).

INMUNOHISTOQUÍMICA

Para la observación de la intensidad de expresión de las integrinas (inmunohistoquímica), el proceso de preparación fué distinto, los fragmentos de tejido endometrial fueron congelados a 80° C, posteriormente se efectuaron cortes de 5 milimicras de espesor tratados con inmunoperoxidasa, se colocaron en laminillas cubiertas con poli-L-lisina y se fijaron 10 minutos con acetona a -20° C, después se tiñeron con vectastain élite ABC Kits (Vector Lab., Burlingame CA, USA). Se utilizó diaminobenzidina (DAB Sigma, Chemical Co. St. Louis MO, USA) como cromógeno y anticuerpos monoclonales de ratón contra el complejo integrina αV-β3 (LM-609, Chemicon, Temecula, CA, USA) en dilución 1:200 que reconocen específicamente al heterodímero αV-β3 y que ya hemos usado nosotros (Orta et al., 2005) y otros grupos (Acosta et al., 2000). Las preparaciones fueron revisadas con un microscopio Nikon (Nikon, Inc. Garden City, NY, USA), se tomaron microfotografías usando película Kodak Asa 100 (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA). Se consideró que hubo expresión de integrinas en las células endometriales cuando fueron detectadas tanto en las glándulas como en el epitelio superficial luminal y la intensidad de ésta fué valorada por un sistema de puntaje semicuantitativo (0-4) multiplicando el porcentaje de células que expresan las integrinas por la intensidad de la misma calificada: ausente (0), débil o focal (1), moderada (2), fuerte (3) sumándole una unidad (+ 1)(Lessey et al., 1995; Creus et al., 2002). Se contó con controles negativos, no manejados con LM-609. Igualmente las preparaciones fueron observadas y calificadas por 2 personas distintas (patólogos especialistas) en forma ciega.
MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (S E M)

La preparación del tejido a observar con microscopía electrónica fue la siguiente: los fragmentos fueron fijados una hora en glutaraldehído al 3%, posteriormente se conservaron en solución buffer de cacodilatos (0.1 M, pH 7.4), fueron post fijados por 2 horas en tetraóxido de osmio al 1%, deshidratados en gradientes de acetona (30%, 50%, 70% y 100%). Las muestras fueron secadas con CO2 como fluido de transición en un aparato secador Balzers CDP 030 (Balzers Union Ltd, Balzers, Liechtenstein), posteriormente fueron cubiertas con oro-paladio en un Balzers Union SCD 040 y observadas en un microscopio electrónico de barrido y de transmisión Zeiss DSM940A (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), por lo menos fueron revisados 5 fragmentos de 2 milimetros de cada biopsia, se requirieron un mínimo de 4 milímetros cuadrados de superficie epitelial endometrial bien preservados para hacer correcta la observación. Se tomaron microfotografías digitales con el programa computacional Quartz PCI (Quartz Imaging Co., Vancouver,BC, Canadá). Las observaciones fueron realizadas en forma ciega por 2 personas distintas (patólogos especialistas). Se investigó la presencia de pinópodos, definidos como formaciones esféricas sin microvellosidades (Nikas, 1999a; Acosta et al., 2000) y se calificó el grado de desarrollo de éstos semicuantitativamente en la siguiente escala: ausentes (0), pinópodos aislados (1), pequeños grupos de pinópodos (2) y pinópodos confluentes (3)(Creus et al., 2002; Usadi et al., 2003), se contó con controles negativos.

Se realizaron cuantificaciones sanguíneas de la fracción beta de hormona gonadotropina coriónica como prueba diagnóstica de embarazo (método inmunoenzimático de micropartículas) a las mujeres que no menstruaron diez días después de haberles tomado la segunda biopsia endometrial, la obtención de resultados positivos, determinó un embarazo, terminando su estudio, las no embarazadas con resultados negativos continuaron su proceso de investigación, el o los siguientes ciclos, hasta un total de seis, no siempre en forma consecutiva.

ESTADÍSTICAS

El tamaño de la muestra fue calculado en 63 pacientes, lo cual confiere a nuestro estudio una potencia estadística de 80% de evitar un error tipo II y con probabilidades del 5% de cometer un error tipo I. Los datos finales fueron procesados utilizando un paquete estadístico SPSS (Inc.,Chicago, Ill, USA) y las pruebas de hipótesis utilizadas fueron procedimientos no paramétricos , U de Mann-Whitney y la Prueba exacta de Fisher. El Coeficiente Kappa ponderado se usó para análisis de concordancia interobservadores. Los resultados son informados como promedios y desviacion estándar. El nivel de significancia fue considerado como $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

Se estudiaron inicialmente un total de 163 ciclos reproductivos en 63 pacientes. Acorde a los criterios biofísicos y bioquímicos, todos los ciclos reproductivos del estudio fueron ovulatorios: los USG mostraron folículos maduros y posteriormente colapsos foliculares con liquido libre en cavidad pélvica, endometrios trilaminares con un espesor $\bar{X}$ de 12 mm $\pm$2mm, LH sanguínea preovulatoria con picos $\bar{X}$ de 76 mu/ml $\pm$ 8 y P4 sanguínea en fase lútea media de 13 ng/ml $\bar{X} \pm$ 2 ng/ml . Se tomaron un total de 326 biopsias endometriales, la mitad en dia 20° de los ciclos y la mitad en dia 22° (día ovulatorio +6 y +8). Doce biopsias no pudieron ser analizadas porque fueron extraviadas de tal forma que sólo 314 de ellas (157 ciclos) fueron estudiadas e identificadas concluyentemente en todos los casos como muestras endometriales fúndicas en fase progestacional. Ningún producto de la concepción fue reportado en las biopsias analizadas, tampoco fuimos informados acerca de cambios inflamatorios o infecciosos consecutivos a la toma de la primera biopsia detectados en el análisis de la segunda.

De 157 ciclos reproductivos estudiados finalmente, 57 terminaron con embarazo (36.5%) y 100 concluyeron sin el (63.5%). Se embarazaron 57 de 63 pacientes (90.5%) en un lapso de 22 meses y en el 91.5 % de los casos (52 embarazos) los estudios endometriales revelaron sincronía en coexpresión de los marcadores con HSCORE de 1 y 2 para integrinas y SCORE de 1 y 2 para los pinópodos en el dia ovulatorio +6, pero en el 95% de los 57 embarazos (54 casos) se demostró en los análisis endometriales practicados el dia ovulatorio + 8 coexpresión intensa de integrinas αV-β3 calificada con 3 y 4 en el HSCORE aunado a un desarrollo de pinópodos en forma confluente calificado con SCORE de 2 y 3. Por el contrario, en el 95% de los 100 ciclos fallidos, se demostró una asincronía total, tanto temporal como de

intensidad de la expresión de los marcadores de receptividad endometrial en el dia ovulatorio +8, en éstos mismos ciclos en el dia ovulatorio +6 hubo coexpresión con HSCORE de 1 y 2 para integrinas y Score de 0 y 1 para pinópodos en el 49% (49 casos) y no hubo coexpresión en el 51% restante (51 casos). Hubo concordancia total entre la coexpresión temporal de los marcadores y el grado de madurez endometrial obtenido en estudio histológico de todas las muestras.

La tabla 1 resume los datos relacionados a biopsias endometriales, expresión de integrinas αV-β3 formación de pinópodos en los días de muestreo endometrial (dia ovulatorio +6 y +8), así como de los embarazos sucedidos.

ESTUDIO	TÓPICO	DIA OV.+ 6			DIA OV.+ 8		
VARIABLE	DETALLE	EMBARAZO			EMBARAZO		
		Pos.	Neg.	P	Pos.	Neg.	P
TEJIDO ENDOMETRIAL	Fechado Crono.	6±2	6±2	NS	8±1	8±1	NS
	Fechado Histol.	6±0.5	5.5±0.5	NS	8.5±0.5	8.7±0.3	NS
	En fase (%)	52(51.5)	49(48.5)	NS	54(91.5)	5(8.5)	<0.01
EXPRESIÓN DE INTEGRINAS	Muestras pos.(%)	56(56.5)	43(43.5)	NS	54(91.5)	5(8.5)	<0.01
	Intensidad (Score)	0.88±0.4	1±0.2	NS	3.5±0.5	1.5±1	<0.01
DESARROLLO PINÓPODOS	Muestras pos.(%)	52(51.5)	49(48.5)	NS	54.5(91.5)	5(8.5)	<0.01
	Desarrollo (Score)	0.7±0.2	1±0.5	NS	2.5±0.5	1±0.8	<0.01

Tabla I.- Biopsias endometriales tomadas en 6° y 8° día post ovulatorio, fechado histológico, expresión celular epitelial de integrinas αV-β3, formación y desarrollo de pinópodos en ciclos de embarazo y ciclos fallidos, búsqueda de diferencias (P≤0.05). Valores expresados en promedios, desviaciones estándar y porcentajes.

Las diferencias estadísticas son muy significativas en cuanto a la coexpresión de los parámetros estudiados durante el ciclo en el que se embarazaron las pacientes comparadas con las que no terminaron así en el mismo (Tabla II).

CICLOS	COEXPRESIÓN					
N= 157	Dia Ovulatorio + 6			Dia Ovulatorio +8		
	Positiva	Negativa	Valor de P	Positiva	Negativa	Valor de P
Embarazo (57 ciclos)*	52 91.5%	5 8.5%	0.003	54 95%	3 5%	0.001
No embarazo (100 ciclos)**	49 49%	51 51%	NS	5 5%	95 95%	0.001

*coexpresión intensa y proporcionada de los dos marcadores
**coexpresión débil y desproporcionada de los dos marcadores

Tabla II.- Biopsias endometriales tomadas en 6° y 8° dia post ovulatorio, coexpresión epitelial de integrinas αV-β3 y pinópodos, en ciclos terminados con y sin embarazo.

En las que se embarazaron se encontraron coexpresiones constantes mayores de integrinas y de desarrollo de pinópodos en las biopsias lúteas tomadas el dia 8° post ovulatorio (Tabla III).

Variables	ciclos de embarazo n= 57	ciclos fallidos n= 100	todos los ciclos n= 157
Int. αV-β3 +/pin+	54 (95%)	5 (5%)	59 (37.5%)
Int. αV-β3 +/pin-	2 (3.5%)	38 (38%)	40 (25.5%)
Int. αV-β3 -/pin+	1 (1.5%)	27 (27%)	28 (18%)
Int. αV-β3 -/pin-	0 (0%)	30 (30%)	30 (19%)

+ y – significan expresión positiva o negativa

Valor de P < 0.001 en todas las variables.

Tabla III.- Correlación de la expresión de integrinas y formación de pinópodos en el epitelio endometrial del dia 8° post ovulatorio durante ciclos terminados con y sin embarazo.

La intensidad de la expresión de las integrinas (Figura 1).

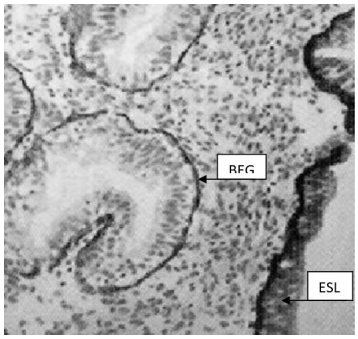


Figura 1.- Inmunohistoquimica, expresión de integrinas αV-β3 en muestras endometriales del día 8° post ovulatorio (Hscore 4) magnificación 200x. *BEG= base epitelio glandular *ESL= epitelio superficial luminal.

Y la formación de pinópodos (Figura 2)

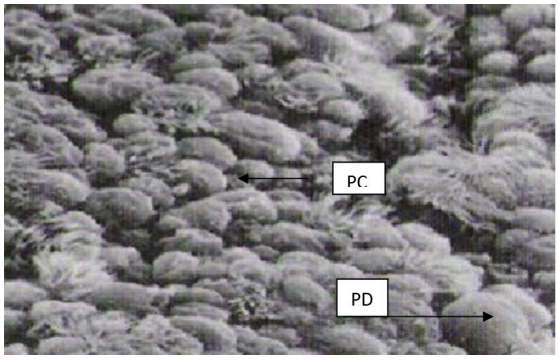


Figura 2.- Pinópodos confluentes (Score +++) endometrio del dia 8° post ovulatorio), microscopia electrónica de barrido, *PD= pinópodo desarrollado *PC= pinópodos confluentes>50%

Estuvieron estrechamente relacionadas con la maduración histológica del endometrio (Figura 3).

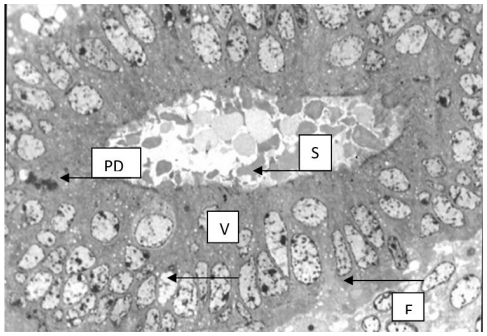
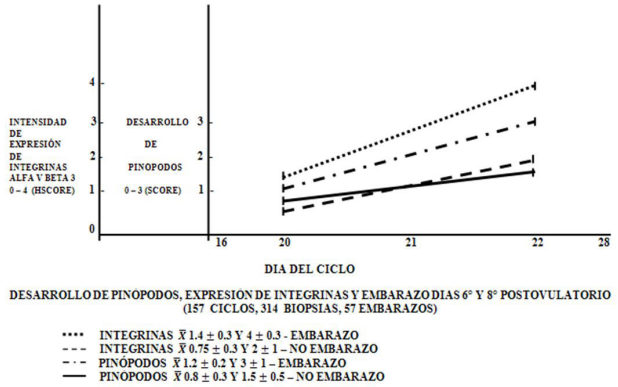
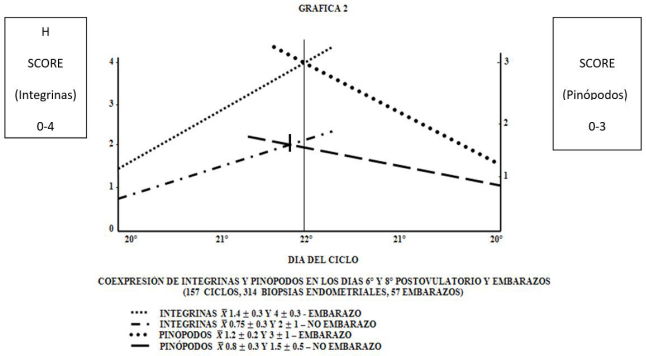


Figura 3.- Fechado de madurez endometrial (8° dia post ovulatorio) *S= secreción *PD= predecidualización *E= edema *V= vacuola

Manifestándose principalmente entre los días post ovulatorios 6° y 8° en incremento progresivo, (Gráfica 1 y Grafica 2).



Gráfica 1.- Expresión sincrónica de marcadores en ciclos de embarazo (8° día postovulatorio).

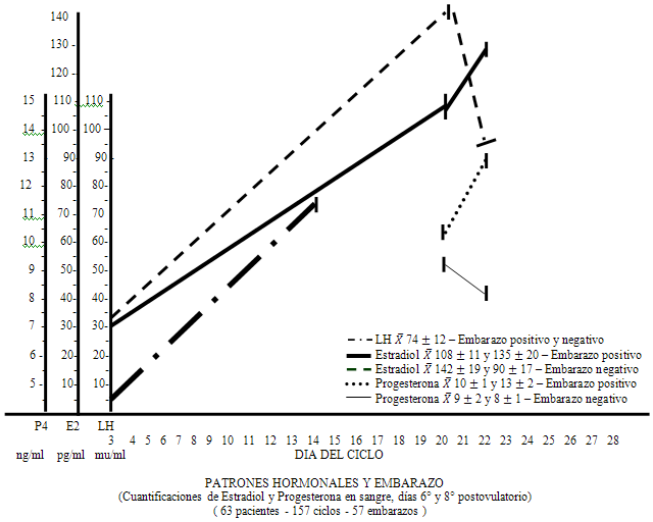


Gráfica 2.- Coexpresión de marcadores en el dia 8° post ovulatorio en ciclos de estudio que finalizaron con y sin embarazo.

La concentración sanguínea de E2 fue significativamente más baja en promedio (108 ± 11 pg/ml) en el día ovulatorio +6 (20° del ciclo) y más alta en el día ovulatorio +8 en ciclos de embarazo (135 ± 20 pg/ml), comparada con los niveles promedio obtenidos en ciclos fallidos (142 ± 19 pg/ml y 90 ± 17 pg/ml respectivamente, P< 0.05). La P4 elevó progresivamente su nivel promedio de 10 ± 3 ng/ml a 13 ± 2 ng/ml entre los días ovulatorios +6 y +8 (20° al 22° día) en los ciclos de embarazo, dinámica hormonal exactamente inversa en ciclos fallidos (9±2 ng/ml y 8±3 ng/ml respectivamente (P< 0.05)(Tabla IV y Gráfica 3).

ESTUDIO	TÓPICO	DÍA OVULATORIO + 6			DÍA OVULATORIO + 8		
		EMBARAZO			EMBARAZO		
	PATRONES	Pos.	Neg.	P	Pos.	Neg.	P
HORMONAS	Estradiol (pg/ml)	108±11	142±19	<0.05	135±20	90±17	<0.05
	Progesterona (ng/ml)	10±3	9±2	NS	13±2	8±3	<0.05

Tabla IV.- Niveles hormonales sanguíneos en ciclos de embarazo y ciclos fallidos en los días 6° y 8° postovulatorios, las diferencias son significativas.



Gráfica 3.- Niveles hormonales que rigen ciclos reproductivos terminados con y sin embarazos (P 0.05).

Las biopsias fechadas como fuera de fase mostraron expresiones aberrantes de integrinas y desarrollo de pinópodos. El coeficiente Kappa ponderado mostro una concordancia casi perfecta interobservadores (.88). La asociación entre la intensidad de expresión de integrinas y el desarrollo de pinópodos al 8° día postovulatorio y embarazos, fue muy significativa (P < 0.003) (Tabla V).

Ciclos	Intensidad de expresión de integrinas				Grado de desarrollo de pinópodos			
n=157	0-2	3-4	total	valor de P	0-1	2-3	total	valor de P
Embarazo	3	54	57	<0.01	3	54	57	<0.01
Fallido	95	5	100	<0.01	88	12	100	<0.03

Tabla V.- Comparación de frecuencias para asociación de variables: expresión de integrinas, pinópodos y embarazo, 157 biopsias endometriales del día 8° postovulatorio.

No hubo diferencias en los patrones espermáticos obtenidos de las parejas de las pacientes entre las que se embarazaron y las que no, en concentración espermática, motilidad y morfología.

DISCUSIÓN

La justificación de nuestro trabajo de investigación se debe a la escasa presencia en nuestra literatura médica de estudios que evalúen elementos cruciales para los inicios de la vida humana que nos hagan pensar con curiosidad científica como son: 1.- La expresión y su intensidad, la de los 2 primeros marcadores mejor caracterizados de receptividad endometrial: los pinópodos y el complejo integrina aV-b3 (Lessey, 2000a,b; Nikas, 1995, 1999a,b.) simultáneamente en tiempo y espacio durante la ventana de implantación embrionaria, 2.- La importancia de la relación o intervención que pudiera existir entre éstos y el evento implantatorio, valorando resultados gestacionales después de exposición al embarazo en ciclos naturales, y 3.- El estudio de patrones hormonales que regulen los sistemas de ovulación, de expresión de marcadores y eventualmente de gestación.

Nuestro estudio fue realizado en modelos humanos fértiles, en una cantidad de pacientes calculada como suficiente para evitar errores estadísticos, sobre todo tipo II (Creus et al., 2002). Fue diseñado para ser llevado a cabo durante ciclos reproductivos naturales sin inhibiciones para embarazarse durante el desarrollo del trabajo, en plenos ciclos de concepción, como no ha sido diseñado antes o informado en la literatura médica de acuerdo a revisiones exhaustivas de la misma que realizamos. Las fechas ovulatorias fueron bien definidas y establecidas, no sobrediagnosticadas, bien documentadas mediante evidencias ultrasonográficas ($\bar{X}$ de 5 revisiones/paciente/ciclo) y hormonales ($\bar{X}$ de 5 cuantificaciones de LH/paciente/ciclo) para trabajar con niveles de eficacia diagnóstica elevados y así evitar al máximo errores de apreciación en diagnóstico y sesgos. Todos los ciclos fueron ovulatorios probablemente por la edad del grupo de pacientes y los criterios de selección aplicados en el estudio.

Nuestra hipótesis de trabajo fue confirmada al alcanzar nuestro objetivo, demostrando por un lado que efectivamente en el 91.5% de 57 ciclos fértiles que terminaron en embarazo, la intensidad de expresión de integrinas αV-β3 (HSCORE 1 y 2) fué concordante temporalmente con el desarrollo de los pinópodos (SCORE 1 y 2) en las células del epitelio endometrial (52 ciclos) durante la apertura de la ventana de implantación embrionaria (día ovulatorio +6) y sólo el 8.5% de los 57 ciclos fértiles (5 ciclos) no mostró esa coexpresión. En el día ovulatorio +8 de los mismos ciclos la coexpresión de los 2 marcadores fue muy intensa (HSCORE 3 y 4 en integrinas y SCORE 2 y 3 para pinópodos) en el 95% de los 57 ciclos fértiles (54 ciclos) mientras que en sólo el 5% de los ciclos restantes de embarazo no ocurrió asi (3 ciclos), la explicación a ésto muy probablemente se encuentre en la contraparte del evento implantatorio, el embrión, su calidad, su comportamiento, sus expresiones proteicas, moleculares, enzimáticas y hormonales (Simon et al.,2001).

Inversamente a lo obtenido en ciclos de embarazo, en los fallidos (100 ciclos) el 51% de los casos (51 ciclos) mostró ausencia de coexpresión de los marcadores de receptividad endometrial y el 49% (49 ciclos) reveló coexpresión en día ovulatorio +6 (HSCORE 1 y 2 para integrinas y SCORE 0 y 1 para pinópodos), sin embargo, en el día ovulatorio +8, el 95% de ciclos fallidos mostró ausencia total de coexpresión, solo hubo presencia de coexpresión en 5 casos (5 ciclos con HSCORE 3 y 4 para integrinas y SCORE 2 y 3 para pinópodos) donde a pesar de ésto no ocurrió el embarazo; la variable embrionaria y sus características pueden explicar lo anterior o bien es probable que en ésos ciclos las pacientes no se hayan expuesto al embarazo.

La evidencia es fuerte en éste caso, que la coexpresión intensa de los marcadores de receptividad endometrial (complejo integrina αV-β3 y pinópodos) es necesaria para que se lleve a cabo una implantación, ésto sugiere poderosamente que mas allá del papel de marcadores tales integrinas y los pinópodos juegan un papel central en implantación embrionaria (Bentin-Ley et al., 1999; Gindlesperger et al., 2003).

El comportamiento hormonal fue muy característico tanto en los ciclos de embarazo como en los fallidos en nuestra casuística, en los primeros el E2 elevó sus niveles promedio del 6° al 8° día postovulatorio de 108±11 pg/ml a 135±20 pg/ml mientras que en los segundos disminuyó sus niveles en los mismos días de 142±19 pg/ml a 90±17 pg/ml, diferencias significativas. La P4 por su parte en ciclos de embarazo elevó niveles entre los días 6° a 8° postovulatorios, de 10±3 ng/ml a 13±2 ng/ml, disminuyéndolos en los mismos días en ciclos fallidos de 9±2 ng/ml a 8±3 ng/ml. Los patrones hormonales obtenidos son característicos de una población ovuladora sin patología endócrino ovárica, al ser fisiológicos, producen y modulan la expresión tanto de los marcadores moleculares (integrinas) como morfológicos (pinópodos) (Baird et al.,1991; Speroff et al.,1999; Stavreus-Evers et al.,2001; Cao et al.,2007). Proponemos la utilización de los valores promedio con sus desviaciones estándar como indicadores pronósticos para obtener un embarazo, traspolando los valores hormonales hipotéticamente a la intensidad de expresión endometrial de los marcadores.

En discordancia con resultados de informes previos (Creus et al., 1998, 2002; Acosta.,2000), en nuestro estudio sí identificamos plenamente una coexpresión de las integrinas αV-β3 y de los pinópodos durante la fase lútea, mostrando claramente un incremento en su expresión y desarrollo entre el 6/o y el 8/o día postovulatorio en franca sincronía temporal en el 91.5% en el dia ovulatorio +6 y 95% en el ovulatorio +8 de 57 ciclos terminados en embarazo; éstos resultados coinciden con otros ya publicados (Nardo et al .,2003 ; Nikas,1999 a y b; 2003; Lessey, 2000a,b.), paralelamente entre éstas fechas se detectó un incremento de estrógenos y progesterona en éstas mismas pacientes como mecanismos regulatorios de la expresión y desarrollo de los marcadores tal como aparece en publicaciones (Cao et al.,2007).

En la mayoría de los casos tanto la expresión acentuada de los dos marcadores, como las elevaciones en los niveles hormonales mostraron concordancia con el fechado

histológico del endometrio, así que coincidimos con ciertas publicaciones (Lessey et al., 2000a,b; Creus et al.,2002) en el sentido que la detección de los marcadores puede tener una función endometrial, relacionada con receptividad y añadiríamos nosotros en implantación embrionaria, pero esto no reemplaza por lo menos en éste momento a la forma tradicional de evaluar el desarrollo y madurez endometrial para fechado cronológico (Noyes et al., 1950).

Coincidimos con los resultados de algunos trabajos publicados (Castelbaum et al.,1994; Acosta et al.,2000; Creus et al.,2002; Nardo et al.,2003) durante los cuales también fueron tomadas dos biopsias endometriales por ciclo sin demostrar cambios deletéreos en la segunda toma, nosotros también no detectamos en nuestro grupo de estudio al microscopio efectos inflamatorios o modificatorios de la segunda muestra consecutivos al trauma de la toma de la primera biopsia, adicionalmente, en nuestro trabajo no se modificó la evolución de embarazos incipientes. No se apreciaron alteraciones morfológicas en el desarrollo de pinópodos de acuerdo a cronología y biopsias secuenciales, conocimiento ya establecido (Nikas,1999 a y b).

Se acepta que existen dificultades para establecer o definir los conceptos de marcadores o biomarcadores de la ventana de implantación embrionaria tanto de las integrinas como de los pinópodos (Acosta et al., 2000), ya que las fases iniciales de la implantación humana descritas no pueden ser visualizadas (aposición, adhesión, unión y penetración a través de la superficie epitelial y membrana basal), entonces, la cronología y secuencia real de éste período de receptividad endometrial, resulta ser teórico, de tal manera que toda la información al respecto es descriptiva y correlacionada. Por otro lado, mientras algunos de los biomarcadores propuestos en la literatura relacionados con aposición, adhesión y unión, presentes en el epitelio endometrial luminal podrían desempeñar funciones preliminares o iniciales, otros marcadores podrían no jugar ningún papel en fases tempranas de la implantación y estar presentes y/o tener una función en estadios mas avanzados de la nidación. Ciertos componentes de la matriz extracelular tales como las integrinas, una familia de globulinas ampliamente expresada en el endometrio en épocas implantatorias como moléculas, son receptores superficiales de adhesión celular y podrían promover la unión embrionaria al endometrio (Sueoka et al., 1997; Giudice, 1999; Lessey et al., 2000a,b.); mientras que los pinópodos que son estructuras celulares superficiales especializadas en endocitosis y pinocitosis, podrían estar involucrados en adhesión trofoblástica y/o facilitación en los procesos de penetración del estroma (Nikas, 1999 a y b). Hay que aceptar que el microambiente intrauterino podría cambiar con la presencia de un embrión, cambios que jamás se apreciarían cuando los estudios son hechos en ciclos no concepcionales (Creus et al.,2002), lo cual en ése sentido aumenta el valor de nuestro trabajo que fue realizado en ciclos de concepción y nos permitió comparar completamente las características endometriales de receptividad con y sin embarazo. Demostramos que en el 91.5% de 57 embarazos hubo coexpresión temporal de integrinas αV-β3 y pinópodos en el día ovulatorio +6 y en el 95% de éstos ciclos de embarazo ocurrió intensamente en el día ovulatorio +8, por tanto proponemos se amplíen líneas de investigación sobre acciones de las integrinas y pinópodos en implantación embrionaria y no solamente como marcadores de receptividad endometrial. Quedaron claros también los patrones hormonales característicos de ciclos gestacionales y ciclos fallidos así como nuestra propuesta de utilizarlos como indicadores pronósticos para la obtención o no de embarazos.

CONCLUSIONES

En conclusión, el presente estudio, diseñado en forma distinta a la mayoría de los publicados en la literatura, en desacuerdo con algunos y de acuerdo con otros, revela que:

- Durante la ventana de implantación embrionaria entre los días 6° y 8° postovulatorios se presentó una clara e intensa coexpresión endometrial de pinópodos e integrinas αV-β3 de manera muy significativa en las pacientes cuyo ciclo reproductivo terminó en embarazo (91.5% y 95% respectivamente al 6° y 8° días postovulatorios), contrario a lo sucedido en ciclos que finalizaron sin él (95% de ausencia de coexpresión en 100 ciclos fallidos).

- Los resultados anteriores sugieren fuertemente que más allá de servir como predictores, los marcadores estudiados pudieran estar implicados directamente en el proceso de implantación embrionaria.

- El nivel de estradiol sérico obtenido en el dia 6/o postovulatorio fue significativamente más bajo, asi como más alto en el día 8/ postovulatorio en mujeres que terminaron un ciclo reproductivo con embarazo comparado con el nivel sanguíneo de la hormona en mujeres que no se embarazaron, siguiendo patrones característicos, consistentemente regulares.

- La progesterona en suero mostró ser significativamente alta tanto en el dia 6/o como en el día 8/o postovulatorios progresivamente en un patrón constante en mujeres que se embarazaron comparada con las cuantificaciones en las mismas fechas en mujeres que no lograron embarazos

BIBLIOGRAFIA

1. Acosta A, Elberger L, Borghi M, Calamera JC, Chemes H, Doncel GF, Kliman H, Lema B, Lustig L, Papier S. (2000) Endometrial dating and determination of the window of implantation in healthy fertile women. Fertil Steril 73:4, 788-798.
2. Baird DD, Weinberg CR, Wilcox AJ. (1991) Hormonal profiles of natural conception cycles ending in early, unrecognized pregnancy loss. J Clin Endocrinol Metab 72:793.
3. Bentin-Ley U, Sjogren A, Nilsson L. (1999) Presence of uterine pinopodes at the embryo endometrial interface during human implantation in vitro. Hum Reprod 14:515-520.
4. Castelbaum AJ, Wheeler J, Coutifaris C, Mastroianni L, Lessey BA. (1994) Timing of the endometrial biopsy may be

critical for the accurate diagnosis of luteal phase deficiency. Fertil Steril 61: 443-447.
5. Cao W, Mah K, Carroll RS, Slayden OD, Brenner RM. (2007) Progesterone withdrawal up-regulates fibronectin and integrins during menstruation and repair in the rhesus macaque endometrium. Hum Reprod 22(12):3223-3231.
6. Casper RF. (2011) It's time to pay attention to the endometrium. Fertil Steril. 96: 519-521.
7. Coughlan C, Sinagra M, Ledger W, Laird S. (2013) Fertil Steril. 100: 825-830.
8. Creuss M, Ordi J, Fábregues F, Casamitjana R, Ferrer B, Coll E, Vanrell JA, Balasch J. (2002) Alfa v beta 3 integrin expression and pinopod formation in normal and out-of-phase endometria of fertile and infertile women. Hum Reprod. 17:2279-2286.
9. Creuss M, Ordi J, Fábregues F, Casamitjana R, Carmona F, Cardesa A, Vanrell JA, Balasch J. (2003) The effect of different hormona therapies on integrin expresión and pinopode formation in the human endometrium: a controlled study. Hum Reprod. 18: 683-693.
10. Chan C, Virtanen C, Weingarden N, Colgan T, Greenblatt E. (2013) Discovery of biomarkers of endometrial receptivity through a minimally invasive approach: a validation study with implication for assisted reproduction. Fertil Steril. 100: 810-817.
11. Cheong Y, Boomsma C, Heijnen C, Macklon N. (2013) Uterine secretomics: a window on the maternal-embryo interface. Fertil Steril. 99: 1093-1099.
12. Daftary GS, Taylor HS. (2001) Molecular markers of implantation: clinical implications. Curr Opin Obstet Gynecol. 13: 269-274.
13. Diao H, Paria B, Xiao S, Ye X. (2011) Temporal expression of progesterone receptor in te utrine luminal epithelium suggests its requirement during early events of implantation. Fertil Steril. 95: 2087-2093.
14. Diaz-Gimeno P, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Bosch N, Martínez-Conejero JA, Alamá P, Garrido N, Pellicer A, Simón C. (2013) The accuracy and reproducibility of the endometrial receptivity array is superior to histology as a diagnostic method for endometrial receptivity. Fertil Steril. 93: 508-517.
15. Diaz-Gimeno P, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Simón C. (2014) Transcriptomics of the human endometrium. Int J Dev Biol. 58: 2-4: 127-137.
16. Elgindy E. (2011) Progesterone level and progesterone/stradiol ratio on the day of HCG administration: detrimental cutoff levels and new treatment strategy. Fertil Steril. 95: 1639-1644.
17. Evans G, Martínez Conejero JA, Phillipson G, Simón C, McNoe L, Sykes P,Horcajadas JA, Lam E, Print C, Sin I, Evans J. (2012) Gene and protein expression signature of endometrial glandular and stromal compartments during the window of implantation. Fertil Steril. 97: 1365-1372.
18. Finn CA. (1977) The implantation reaction,in Wynn RM (ed). Biology of the uterus.New York, Plenum Press, pp 245.
19. Garrido-Gómez T, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Diaz-Gimeno P, Vilella F, Simón C. (2013) Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. Fertil Steril. 99: 1078-1085.
20. Gindlesperger V, Arredondo F, LIU J, Loret de Mola JR. (2003) Treatment of αV-β3 integrin abnormalities increases pregnancy success rates after failed IVF cycles. Fertil Steril;vol 80, supl 3.
21. Giudice LC. (1999) Potential biochemical markers of uterine receptivity. Hum Reprod 14:3-6.
22. Gómez E, Ruiz-Alonso M, Miravet J, Simón C. (2015) Human endometrial transcriptomics: implications for embryonic implantation. Cold Spring Harb Perspect Med. Mar 27.
23. Haouzi D, Dechaud H, Tiers L, Lehmann S, Hamamah S. (2012) Transcriptomic and proteomic analyses of human endometrial receptivity under natural cycle. Fertil Steril. 98: supp pg S226.
24. Hodgen GD.(1983) Surrogate embryo transfer combined with estrogen-progesterone therapy in monkeys: implantation, gestation and delivery without ovaries. JAMA 250:2167.
25. Lessey BA. (2011) Assesment of endometrial receptivity. Fertil Steril. 96: 522-529.
26. Lessey BA, Castelbaum AJ, Wolf L, Paulson M. (2000-a) Use of integrins to date the endometrium. Fertil Steril. 73:779-87.
27. Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C. (1992) Integrin adhesion molecules in the human endometrium: correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. J Clin Invest. 90:188-195.
28. Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SJ. (1995) Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. Fertil Steril. 63:535-42.
29. Lessey BA. (2000-b) Endometrial receptivity and the window of implantation. Baillieres Clin Obstet Gynecol. 14:775-788.
30. Li M, Xie Y, Park H, Kumar A, Hubert G, Buyalos R. (2013) The effects of elevated serum progesterone level at the day of HCG injection on clinical outcome in IVF-ET patients. Fertil Steril. 100: supp pg S7.
31. Madaschi C, Guilheme P, Tatiana BCS, Georges S, Carlos IR. (2013) Progesterone levels higher than 1.0 ng/ml affects endometrial receptivity. Fertil Steril. 100: supp pg S294, S295.
32. Mahajan N. (2015) Endometrial receptivity array: clinical application. J Hum Reprod Sci. Jul-Sep; 8(3):121-9.
33. Nardo LG, Nikas G, Makrigiannakis A, Sinatra F, Nardo F. (2003) Synchronous expression of pinópodos and alfa v beta 3 y alfa 4 beta 1 integrins in the endometrial surface epithelium of normally menstruating women during the implantation window. J Reprod Med. 5:355-361.
34. Nejat EJ, Ruiz-Alonso M, Simón C, Meier C. (2014) Timing the window of implantation by nucleolar cannel system prevalence matches the accuracy of the endometrial receptivity analysis. Fertil Steril. Sep 17.
35. Nikas G. (1999a) Pinopodes as markers of endometrial receptivity in clinical practice. Hum Reprod 14:99-106.
36. Nikas G. (1999b) Cell-surface morphological events relevant to human implantation. Hum Reprod 14(2)37-44.
37. Nikas G, Makrigiannakis A. (2003) Endometrial pinópodos and uterine receptivity. Ann NY Acad Sci 997:120-123.
38. Nikas G, Drakakis P, Loutradis D. (1995) Uterine pinópodos as markers of the "Nidation Window" in cycling women receiving exogenous oestradiol and progesterone.

Hum Reprod 10:1208-1213.
39. Norman RJ. (2013) Biomarkers of endometrial receptivity through a minimally invasive approach. Fertil Steril. 100: 654-655.
40. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. (1950) Dating endometrial biopsy. Fertil Steril 1:3.
41. Orta A, Flores A, Vazquez E. (2003) Expresión endometrial del complejo alfa v beta 3 integrina y embarazo en mujeres anovuladoras tratadas con citrato de clomifeno. Tesis de Maestría en Ciencias Médicas e Investigación. BUAP, Pue. Méx.
42. Psychoyos A. (1986) Uterine receptivity for nidation. Ann NY Acad Sci 476:36-42.
43. Puerto B, Creuss M, Carmona F. (2003) Ultrasonography as a predictor of embryo implantation after in vitro fertilization: a controlled study. Fertil Steril 79:4.
44. Revel A. (2012) Defective endometrial receptivity. Fertil Steril. 97: 1028-1032.
45. Ruiz-Alonso M, Blesa D, Diaz-Gimeno P, Gómez E, Fwernández-Sánchez M, Carranza F, Carrera J, Vilella F, Pellicer A, Simón C. (2013) The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. Fertil Steril. 100: 818-824.
46. Salamonsen L, Edgell T, Rombauts L, Stephens A, Robertson D, Rainczuk A, Nie G, Hannan N. (2013) Proteomics of the human endometrium and uterine fluid: a pathway to biomarker discovery. Fertil Steril. 99: 1086-1092.
47. Schmitz C, Yu L, Bocca S, Anderson S, Cunha-Filho J, Rhavi B, Oehninger S. (2014) Role for the endometrial epithelial protein MFG-E8 and its receptor integrin avb3 in human implantation: results of an in vitro trophoblast attachment study using established human cell lines. Fertil Steril. 101: issue 3.
48. Simon C, Dominguez J, Remohí J, Pellicer A. (2001) Embryo effects in human implantation: Embryonic regulation of endometrial molecules in human implantation. Ann NY Acad Sci;943:1-16.
49. Speroff L. (1999) en: Speroff L, Glass RH, Kase NG.(eds). Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. Lippincot-Williams & Wilkins, Baltimore MA USA.
50. Stavreus-Evers A, Nikas G, Sahlin L, Eriksson H, Landgren BM. (2001) Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentrations of progesterone and progesterone receptors. Fertil Steril 76:782-91.
51. Sueoka K, Shiokawa S, Miyazaki T, Kuji N, Tanaka M, Yoshimura Y. (1997) Integrins and reproductive physiology: expression and modulation in fertilization, embryogenesis and implantation. Fertil Steril 67:799-811.
52. Tabibzadeh S. (1992) Patterns of expression of integrina molecules in the human endometrium: correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. Hum Reprod 7:876-882.
53. Usadi RS, Murray MJ, Bagnell RC. (2003) Temporal and morphologic characteristics of pinopod expression across the secretory phase of the endometrial cycle in normally cycling women with proven fertility. Fertil Steril 79:4.
54. Vilella F. (2013) Lipidomics as an emerging tool to predict endometrial receptivity. Fertil Steril. 99: 1100-1106.
55. Vilella F, Bradshaw H, Ramírez LB, Stuart JM, Martínez S, Simón C. (2012) A non-invasive diagnostic method for human endometrial receptivity based on a specific lipidomic profile in endometrial fluid. Fertil Steril. 98: supp pg S35.
56. Xu B, Sun X, Li L, Wu L, Zhang A, Feng Y. (2012) Pinopodes, leukemia inhibitory factor, integrin b3, and mucin-1 expression in thye peri-implantation endometrium of women with unexplained recurrent pregnancy loss. Fertil Steril. 98: 389-395.
57. Xu B, Li Z, Zhang H, Jin L, Li Y, Ai J, Zhu G. (2012) Serum progesterone level effects on the outcome of in vitro fertilization in patients with different ovarian response: an analysis of more than 10,000 cycles. Fertil Steril. 97: 1321-1327.