



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

CATARINA CAINÉ MONTEIRO PERDIZ

***A influência dos biomarcadores endometriais no insucesso
recorrente de implantação embrionária***

ARTIGO DE REVISÃO NARRATIVA

ÁREA CIENTÍFICA DE GINECOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

PROFESSORA DOUTORA MARIA MARGARIDA OLIVEIRA FIGUEIREDO DIAS
DOUTORA MARIANA DE FREITAS DA CUNHA ROBALO CORDEIRO

JANEIRO 2023

Índice	
Abreviaturas	2
Resumo	4
Abstract.....	5
Introdução	6
Metodologia.....	7
Discussão	7
<i>Pinopodes</i>	8
<i>Perfil imunológico, citocinas e fatores de crescimento</i>	8
Fator inibidor de leucemia (LIF)	8
Interleucinas.....	9
Fator de crescimento epidérmico de ligação à heparina (HB-EGF)	10
Fatores estimulantes de colónias (CSF).....	11
Fatores de crescimento insulina- <i>like</i> (IGF) e fator de necrose tumoral (TNF)	11
Fatores angiogénicos	12
Células <i>Natural Killer</i> uterinas (uNK).....	13
Células T	14
<i>Metaloproteinases</i>	15
<i>Prostaglandinas</i>	15
<i>Moléculas de adesão celular</i>	16
Mucinas	16
Integrinas	18
Caderinas	19
Molécula de adesão celular endotelial 1 (PECAM1).....	20
<i>Progesterona, estrogénios e recetores</i>	20
<i>Fatores genéticos</i>	21
Abordagens “-omics”	21
Fatores de transcrição nuclear	23
KIR, LILRB e seus ligandos.....	24
DNA mitocondrial (mtDNA) e genes relacionados com o <i>stress</i> oxidativo (OSG)	24
Polimorfismos do TNF, p53 e antígeno leucocitário humano (HLA)	25
<i>Fatores epigenéticos</i>	26
<i>Outros marcadores de recetividade endometrial</i>	27
Rho GTPases	27
<i>Interesse clínico dos biomarcadores endometriais</i>	28
Conclusão.....	29
Tabelas e figuras	29
Referências.....	32

Abreviaturas

Aldo-ceto redutase família 1 membro C1 - AKR1C1
Aldo-ceto redutase família 1 membro C3 - AKR1C3
Antigénio leucocitário humano – HLA
Array de Recetividade Endometrial – ERA
Carbonil redutase 1 - CBR1
Células mesenquimatosas estaminais endometriais – eMSC
Células *Natural Killer* periféricas – pNK
Células *Natural Killer* uterinas – uNK
Células T *helper* - Th
Ciclooxigenases - COX
DNA mitocondrial – mtDNA
Enzima de síntese de prostaglandina E – PGES
Fator de crescimento endotelial vascular - VEGF
Fator de crescimento epidérmico de ligação à heparina - HB-EGF
Fator de crescimento placentário – PIGF
Fator de crescimento transformador β 1 - TGF- β 1
Fator de necrose tumoral - TNF
Fator inibidor de leucemia – LIF
Fatores de crescimento epidérmico – EGF
Fatores de crescimento *insulina-like* – IGF
Fatores estimulantes de colónias - CSF
Fertilização *in vitro* – FIV
Gene codificante da fosfoproteína secretada 1 ou osteopontina – gene SPP1
Gene codificante da ubiquilina-1 - UBQLN1
Gene codificante do ER α - ERS1
Gene codificante do transportador de cistina/glutamato - gene SLC7A11
Gene codificante receptor de tirosina-proteína quinase UFO – gene AXL
Genes diferencialmente expressos – DEG
Genes Homeobox A10, -A11, -A9 e -A3 – Hoxa 10, 11, 9 e 3
Genes relacionados com o *stress* oxidativo – OSG
Glutationa peroxidase - GPX3
Gonadotrofina coriónica humana – hCG
Hormona luteinizante – LH
Inibidores teciduais das metaloproteinases – TIMP
Insucesso recorrente de implantação embrionária / “*recurrent implantation failure*” – RIF
Interleucinas – IL
Janela de implantação – JI
Matriz extracelular – MEC

Metaloproteinases – MMP
Microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides – ICSI
microRNA - miRNA
Molécula de adesão celular endotelial 1 - PECAM1
Moléculas de adesão celular – MAC
MT-CO2 – Citocromo c oxidase 2 codificada na mitocôndria
MT-ND1 – NADH desidrogenase 1 codificada na mitocôndria
Mucinas – MUC
Nicotinamida N-metiltransferase - NNMT
Paired box gene 2 – PAX2
Prostaglandinas - PG
Proteína de ligação do IGF-1 - IGFBP-1
Recetividade endometrial - RE
Recetor da interleucina 1 – IL-1R
Recetor do fator inibidor de leucemia – LIF-R
Recetores de estrogénios – ER
Recetores de progesterona – PR
Recetores epiteliais do IGF-1 - IGF-1R
Recetores imunoglobulina-*like* - KIR
Recetores leucocitários imunoglobulina-*like* – LILR
RNA mensageiro – mRNA
Sequenciação de RNA – RNAseq
Stress oxidativo - OS
Subunidade de laminina gama-1 – LAMC1
Técnicas de reprodução assistida – TRA
Transferência embrionária – TE

Resumo

Apesar das técnicas de reprodução assistida, como a fertilização *in vitro* e a microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides, serem uma opção terapêutica para alguns dos casais inférteis, a taxa de incidência de insucesso recorrente de implantação embrionária, do inglês “*recurrent implantation failure*” (RIF), ronda os 8 a 10%.

O RIF é uma condição complexa, cuja patogénese ainda está por esclarecer, resultante de inúmeros mecanismos fisiológicos e moleculares envolvidos na interação endométrio-blastocisto. Apesar de ser uma patologia ainda pouco compreendida reconhece-se a pobre recetividade endometrial como um fator principal de insucesso implantatório.

A associação entre citocinas, fatores de crescimento e fatores imunológicos e a ocorrência de RIF foi sugerida, com principal destaque para o LIF, IL-1 e IL-6, VEGF e células uNK e Th1/Th2. O mesmo acontece em relação às metaloproteinases e moléculas de adesão celular, como a MUC-1 e integrina $\alpha v \beta 3$.

Os fatores genéticos e epigenéticos têm sido, similarmente, estudados no RIF. Diversos polimorfismos e genes diferencialmente expressos na fase recetiva foram relacionados com a sua fisiopatologia. Neste âmbito, as emergentes abordagens “-omics” permitem maior entendimento das alterações dinâmicas envolvidas na implantação. Dentro dos fatores epigenéticos, os RNA não codificantes parecem ser promissores. Nomeadamente, diferentes níveis de microRNA foram encontrados no endométrio de mulheres com RIF, pelo que podem vir a constituir biomarcadores não-invasivos preditores de recetividade. A sua manipulação é, inclusivamente, considerada uma potencial abordagem terapêutica.

A maioria destes biomarcadores sofrem influência hormonal, tendo as alterações do equilíbrio hormonal e dos seus recetores sido igualmente associadas a compromisso da recetividade endometrial e suscetibilidade para o RIF.

Desta forma, entende-se que são inúmeros os biomarcadores endometriais que parecem influenciar a implantação embrionária e a patogénese do RIF. Apesar de muitos serem considerados biomarcadores reconhecidos e promissores, a maioria dos estudos nesta área foi realizada em grupos de reduzida dimensão e os resultados são inconsistentes, pelo que ainda nenhum foi aplicado com sucesso na prática clínica.

O presente artigo revê o conhecimento atual sobre os fatores moleculares endometriais envolvidos na implantação embrionária e na fisiopatologia do RIF, que pela sua influência são considerados biomarcadores promissores. Deste modo, a presente revisão pode auxiliar na compreensão dos mecanismos e de potenciais soluções diagnósticas e terapêuticas para o RIF.

Palavras-chave: Implantação, janela de implantação, recetividade endometrial, biomarcadores.

Abstract

Although assisted reproductive techniques such as *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection constitute a therapeutic approach for some of the infertile couples, the incidence rate of recurrent implantation failure (RIF) is around 8 to 10%.

RIF is a complex condition, the pathogenesis of which has not been clarified yet, that results from numerous physiological and molecular mechanisms involved in the maternal-embryonic interaction. In spite of the fact that this pathology is poorly understood, a low endometrial receptivity is recognized as one of the main factors of implantation failure.

The association between cytokines, growth factors and immunological factors and the occurrence of RIF has been suggested, highlighting LIF, IL-1 and IL-6, VEGF, uNK cells and Th1/Th2 cells. The same applies to metalloproteinases and cell adhesion molecules such as MUC-1 and $\alpha v\beta 3$ integrin.

The genetic and epigenetic factors have similarly been studied in RIF. Various polymorphisms and differentially expressed genes in the receptive phase were associated with RIF's pathophysiology. In this regard, the new "omics" approaches allow a global view of the dynamic changes involved in implantation. Among the epigenetic factors, noncoding RNA appears to be promising. For instance, different levels of microRNA have been detected in RIF women's endometrium, therefore they might constitute non-invasive biomarkers of receptivity. Including, microRNA manipulation is considered a potential therapeutic approach.

Most of these biomarkers are under hormonal influence, in such a way that alterations of the hormonal balance and hormonal receptors were equally associated with endometrial receptivity compromise and susceptibility to RIF.

Consequently, it is understood that there are numerous endometrial biomarkers that appear to influence embryo implantation and RIF pathogenesis. Even though most of them are recognized and promising biomarkers, the majority of studies in the area included small groups and the results are inconsistent, so neither has been successfully applied in clinical practice.

The present article reviews the current knowledge about endometrial molecular factors involved in embryo implantation and in RIF's pathophysiology, which are considered promising due to their influence. Thus, the present review may contribute to understanding the mechanisms and potential diagnostic and therapeutic solutions for RIF.

Keywords: Implantation, window of implantation, endometrial receptivity, biomarkers.

Introdução

A infertilidade afeta entre 8 a 12% dos casais¹ sendo considerada um problema de saúde reprodutiva global pela Organização Mundial de Saúde. Têm sido desenvolvidas e aperfeiçoadas abordagens terapêuticas, nomeadamente a fertilização *in vitro* (FIV) e a microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI),² no entanto é frequente o insucesso destas técnicas de reprodução assistida (TRA), sendo a recetividade uterina alterada uma das principais causas.³ De modo que cerca de 8 a 10% dos casais inférteis experienciam insucesso recorrente de implantação embrionária, comumente designado por “*recurrent implantation failure*” (RIF).²

Esta patologia não tem definição universal. O consórcio de diagnóstico genético pré-implantatório da “*European Society of Human Reproduction and Embryology Genetic Diagnosis Consortium*” definiu o RIF como o insucesso de mais de 3 transferências embrionárias (TE), com embriões de alta qualidade, ou o insucesso da transferência de pelo menos 10 embriões no total. A definição foi universalmente aceite.⁴

A gravidez depende de uma apropriada implantação embrionária,¹ que envolve a aposição, a ligação ao epitélio endometrial e a invasão do estroma.⁵ Este fenómeno complexo depende do perfeito sincronismo entre o blastocisto e as alterações do ambiente endometrial.³ Como tal, adequadas recetividade endometrial (RE),¹ qualidade embrionária³ e comunicação endométrio-embrionária são fundamentais.^{6,7}

A patogénese do RIF permanece por esclarecer, sendo conhecidos diversos fatores etiopatogénicos.^{1,8} As suas causas podem ser divididas em embrionárias e uterinas.¹ Com efeito, uma barreira reconhecida à implantação embrionária, apesar da transferência de embriões de “boa qualidade”, em mulheres com RIF é uma baixa RE,⁵ estimada em 2/3 dos casos.⁹ Sendo um desafio para a medicina reprodutiva, existe interesse clínico em investigar os fatores causadores de insucesso de implantação após FIV/ICSI.¹⁰

O ciclo menstrual “padrão” tem 28 dias de duração e pode ser datado, em termos morfológicos, de acordo com os critérios de Noyes *et al.* (1950). Atualmente, considera-se que a classificação histológica do endométrio não tem a precisão necessária para a abordagem clínica de mulheres com RIF. Como alternativa, a classificação é feita consoante o pico sérico de hormona luteinizante (LH), correspondente à ovulação.⁵ Durante o ciclo, existe um curto e preciso período em que a inter-relação endométrio/embrião é ótima,³ com taxa de implantação máxima.¹ Designa-se janela de implantação (JI), período de RE máxima, que ocorre entre os dias 20 a 24 do ciclo menstrual, na fase médio-secretora^{1,3,5-7,11,12} ou entre os dias 6 a 10 após o pico de LH (LH+6 a LH+10).^{5,12} Julga-se ter duração inferior a 48 horas^{3,5} e manifesta-se pela expressão de fatores de adesão e remoção de fatores inibitórios, promovendo a implantação.¹³

A identificação de biomarcadores de RE tem proeminência na compreensão dos fatores endometriais implicados na fisiopatologia do RIF e, conseqüentemente, no seu diagnóstico e tratamento, por aumento das taxas de implantação.³ Diagnosticar as alterações endometriais de doentes com RIF pode permitir desenvolver intervenções dirigidas, potenciais substitutas das

intervenções de base empírica.² Inúmeros biomarcadores têm sido descritos mas requerem mais estudos para que sejam integrados na clínica.¹⁴ Citocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão celular, fatores imunológicos e genéticos, hormonas e seus recetores, entre outros, têm sido propostos para identificação da JI e avaliação da RE.^{3,5} No entanto, até à data não há consenso sobre qual será o melhor biomarcador.¹³

O presente artigo revê a literatura disponível e o conhecimento atual relativo à temática dos biomarcadores endometriais que parecem influenciar a implantação embrionária e, assim, a patogénese do RIF.

Metodologia

Neste artigo de revisão, as publicações disponíveis na base de dados PubMed foram consultadas.

Na Pubmed, foi utilizada a equação de pesquisa (*"Endometrium"[MeSH] AND "Biomarkers"[MeSH] AND "Embryo Implantation"[MeSH]*, com aplicação dos filtros "English", "Humans" e data de publicação entre 2000 e 2022. Para reforçar a pesquisa, fez-se o cruzamento com a equação: (*biomarkers[Title/Abstract] AND (endometrium[Title/Abstract] OR endometrial[Title/Abstract]) AND (implantation failure[Title/Abstract])*), aplicando os filtros "English" e data de publicação entre 2000 e 2022. No total, obtiveram-se 234 resultados.

Pesquisas adicionais incluíram referências das publicações consideradas mais relevantes para o tema.

Após leitura cuidada e seleção manual, foram utilizadas 59 referências para a elaboração do presente artigo de revisão.

Discussão

As mulheres submetidas a FIV/ICSI podem experienciar RIF, por múltiplos fatores (Tabela 1).^{1,5}

A progressiva compreensão do papel do endométrio na implantação e o desenvolvimento de métodos de avaliação das suas alterações moleculares e estruturais sugerem a possível elaboração de uma "ferramenta diagnóstica endometrial", que pode guiar terapêuticas dirigidas para o RIF.² Os biomarcadores que influenciam o RIF podem auxiliar na sua prevenção e desenvolvimento de estratégias de controlo de TE,¹⁵ pelo que constituem instrumentos promissores na prática clínica.¹⁴

Os principais pontos de vista sobre biomarcadores endometriais disponíveis na literatura publicada até à data encontram-se descritos na presente revisão.

Pinopodes

Na JI, uma das mudanças estruturais *major* do endométrio é a formação de pinopodes, essenciais na RE,^{1,12} correspondendo a protusões na superfície apical celular do epitélio endometrial.^{3,11,12,16,17} A sua expressão ocorre num período com máximo de dois dias, tornando-se visíveis a partir dos dias 20 a 21 do ciclo menstrual, embora haja variação inter-individual.^{3,16} Os seus mecanismos não estão completamente elucidados, mas pensa-se facilitarem a adesão do blastocisto, por expressão de moléculas de adesão,³ apesar de a sua co-localização ter sido questionada.¹² Assim, os seus desenvolvimento e morfologia anormais interferem no contacto do blastocisto com o endométrio.¹⁸

Estudos descreveram modificações morfológicas dependentes do ciclo sublinhando que, além da presença dos pinopodes, a sua morfologia é extremamente relevante na implantação.¹⁶ Exemplificando, um estudo sobre o *ormeloxifeno*, um contraceptivo que impede a implantação por afetar a RE, revelou atraso da maturação endometrial nas mulheres sob ação do fármaco, acompanhado por diminuição da cobertura e densidade de pinopodes e microvilosidades curtas.¹¹

Os pinopodes dependem da progesterona. Foi descrita a associação entre o aumento do nível de progesterona e o aparecimento dos pinopodes.¹⁶ A sua formação e regressão parecem associar-se à regulação do recetor da progesterona B (PR-B).³ O seu desenvolvimento associa-se, igualmente, ao fator inibidor de leucemia (LIF), ao seu recetor, à integrina $\alpha v \beta 3$,¹⁶ à mucina 1 e ao gene *homeobox A10*.¹⁹ Zhao *et al.* (2021) avaliaram por microscopia eletrónica o desenvolvimento de pinopodes, em amostras de biópsia obtidas na JI em mulheres com e sem RIF. A presença de pinopodes desenvolvidos revelou-se reduzida nas mulheres com RIF em LH+7.¹⁹

Consequentemente, a deteção de pinopodes endometriais na fase médio-secretora pode ser relevante para aferir a RE e o momento ideal para uma TE bem-sucedida. O *score* de pinopodes pode, inclusivamente, ser usado para prever o resultado da TE. Assim, os pinopodes podem ser considerados potenciais biomarcadores promotores de implantação com interesse clínico, inclusivamente no tratamento do RIF,^{1,3,16,17} embora alguns estudos não confirmem o seu valor prognóstico a respeito do sucesso implantatário.¹⁸

Perfil imunológico, citocinas e fatores de crescimento

Fator inibidor de leucemia (LIF)

O LIF é um relevante fator de modulação da RE. Constitui uma glicoproteína pleiotrópica, pertencente à superfamília da interleucina-6 (IL-6), envolvida em inúmeros processos fisiológicos. É expressa predominantemente no endométrio, na fase secretora,^{1,3} promovendo o desenvolvimento dos pinopodes, na JI.¹ A proteína e respetivo RNA mensageiro (mRNA), com baixos níveis durante a fase proliferativa, têm expressão significativamente aumentada na fase secretora,³ com pico na JI.¹¹ Investigadores detetaram-no no fluido uterino, com concentração significativamente inferior em mulheres com infertilidade inexplicada.^{3,20}

A evidência sugere expressão anormal de LIF no endométrio de mulheres inférteis.³ Inclusivamente, salienta-se nível diminuído de LIF em mulheres com RIF.¹

A influência de uma reduzida produção de prostaglandinas no insucesso de implantação, relacionada com alterações no LIF foi descrita¹ e a sua expressão é modificada pelas hormonas ováricas.^{1,11}

O LIF regula a função celular por ligação ao seu recetor membranar (LIF-R) e ativação da via de sinalização JAK-STAT, requerida na implantação.^{1,12} Demonstrou-se expressão diminuída de STAT-3 e de genes associados a esta via em doentes com RIF.³ Zhao *et al.* (2021) detetaram níveis de LIF e p-STAT3 inferiores no grupo RIF, relativamente ao controlo ($p = 0.0002$). Também os níveis de mRNA do LIF foram inferiores no grupo RIF ($p < 0.0001$).¹⁹ Adicionalmente, detetou-se elevada quantidade de estrogénios em resposta ao défice do gene da STAT-3.¹

A expressão do LIF-R interessa na formação de pinopodes.³ Ainda, o gene do LIF é alvo da ação da p53, que altera a sua expressão no tecido endometrial.¹ As mutações no gene LIF também foram investigadas no RIF.¹⁶

A inativação do LIF leva a insucesso implantatório e tal é revertido após a sua administração, reforçando o seu valor na JI.¹¹ Ensaio pré-clínicos e clínicos para investigar a melhoria da RE em doentes com RIF administrando LIF recombinante humana foram inclusivamente desenvolvidos.¹⁶

Todavia, um estudo não demonstrou diferença significativa na expressão de LIF entre mulheres férteis e com RIF, referindo não ser um marcador de RE sensível para o RIF.¹³ De forma semelhante, Zhang *et al.* (2012) detetaram o pico do LIF na fase secretora tardia, após a JI, descrevendo-o como um marcador não relevante.²¹ Outros estudos também não confirmaram a reduzida produção de LIF em mulheres inférteis, previamente sugerida.¹¹

O papel do LIF permanece desconhecido¹¹ mas, apesar das divergências, um artigo de revisão de 2021 descreve o LIF como um marcador molecular de RE aceite, com interesse na abordagem do RIF.¹

Interleucinas

Numerosas citocinas, como as interleucinas, são importantes fatores nas interações ótimas entre o embrião e o endométrio.⁷

À família das interleucinas-1 (IL-1) pertencem a IL-1a, a IL-1b e o antagonista do recetor IL-1ra, que atuam no recetor da IL-1 (IL-1R).¹ Foram identificados e caracterizados dois recetores, IL-1R do tipo I e II.¹⁶ A evidência destaca o sistema da IL-1 na interação cruzada endométrio/embrião. A sua relevância foi estabelecida em estudos experimentais com ratos.^{3,16} Surpreendentemente, apesar de ratos com o gene IL-1 silenciado serem férteis, uma injeção intraperitoneal de IL-1ra no momento apropriado impediu a implantação por ter efeito nas integrinas. O mesmo parece acontecer nos humanos, já que suplementação com IL-1 de uma cultura celular epitelial endometrial aumenta a expressão de integrina $\beta 3$, sustentando a implantação.¹⁶

As células epiteliais endometriais humanas produzem maioritariamente IL-1b e IL-1ra e a expressão do mRNA do IL-1R do tipo I é máxima na fase lútea.^{3,16} A expressão do IL-1ra revela-se reduzida na JI.¹⁶ Sendo o sistema regulador das interações celulares entre embrião e endométrio, uma razão IL-1b/IL-1ra adequada facilita a implantação.³

A IL-1 foi descrita como a primeira citocina ativa nesta interação, seguindo-se uma cascata de citocinas e glicoproteínas. Assim, um defeito ou ausência do IL-1R no endométrio pode ter repercussões nesse sistema cascata, conduzindo a insucesso na implantação.³ A IL-1b modula a expressão de ciclooxigenase-2 (COX2) e metaloproteinase-3 (MMP-3), importantes no equilíbrio dos eventos de decidualização, invasão trofoblástica e transformação da matriz extracelular (MEC).¹

No entanto, uma revisão de 2003 descreve um estudo do mesmo ano onde se observou elevação estatisticamente significativa de IL-1b em doentes com RIF, comparativamente ao grupo controlo.³

Similarmente, a IL-6 tem papel crucial durante a JI, sendo sintetizada por diversos tipos celulares, nomeadamente macrófagos, fibroblastos, células epiteliais e trofoblastos placentares. O seu nível aumenta particularmente na JI.¹ A expressão do mRNA da IL-6 endometrial aumenta progressivamente na fase médio-secretora e diminui na fase secretora tardia, havendo elevada imunorreatividade na JI.¹⁶ O recetor é expresso no endométrio e também no blastocisto e trofoblasto. Tal, juntamente com a expressão máxima da IL-6 na JI, sublinha as suas funções autócrina e parácrina no período peri-implantatório. Porém, alguns estudos experimentais em ratos com disrupção do gene da IL-6 demonstraram implantação do blastocisto não afetada.¹⁶ A estimulação e supressão da IL-6 pelas hormonas esteroides foi descrita, mas permanece controversa. Contudo, é indiscutível que a IL-6 tem expressão máxima na fase secretora, momento em que o endométrio está exposto a maiores concentrações de progesterona. Desta forma, mesmo que não se relacionem diretamente, as hormonas esteroides e a IL-6 podem associar-se por meio de outros mediadores.¹⁶

As IL-1 e IL-6 correlacionam-se: a IL-1b estimula a IL-6 endometrial de forma dose-dependente, bem como a IL-6 medeia determinadas ações da IL-1b.¹⁶

No estudo de Edgell *et al.* (2018) verificou-se diferença estatisticamente significativa entre os níveis de IL-8 de mulheres férteis e inférteis, na fase médio-secretora, estando consideravelmente aumentados nas mulheres inférteis ($p = 0,004$).²²

Fator de crescimento epidérmico de ligação à heparina (HB-EGF)

Os membros da família de fatores de crescimento epidérmico (EGF) regulam a RE.¹²

Identificou-se HB-EGF no endométrio, no período peri-implantatório. A expressão do respetivo mRNA é menor na fase proliferativa do que secretora, atingindo o pico imediatamente antes da JI, sugerindo que medeia a implantação embrionária. Estudos precedentes demonstraram expressão máxima de HB-EGF nas células epiteliais luminiais e glandulares na JI, postulando que promove a implantação através de sinais autócrinos e parácrinos à medida que as células invadem o estroma.³

Técnicas de microscopia e imunohistoquímica demonstraram que a expressão máxima de HB-EGF parece coincidir com o intervalo em que os pinopodes estão presentes.³ Ou seja, a sua presença no epitélio luminal ocorre quando os pinopodes estão completamente formados.¹²

Ainda, a expressão de HB-EGF relaciona-se inicialmente com o aumento dos níveis de progesterona.¹²

Estes pontos reforçam a plausível relevância do HB-EGF na regulação da RE, pelo que alterações da sua expressão podem influenciar a implantação e, conseqüentemente, o RIF.³

Fatores estimulantes de colónias (CSF)

O CSF-1 exibiu, em estudos realizados em roedores, aumento considerável na gravidez. Investigações denotaram que animais com mutações no gene CSF apresentavam reduzidas taxas de implantação. Adicionalmente, descreveu-se que a concentração de CSF-1 é regulada, sinergicamente, pelos estrogénios e progesterona.³ O CSF-1 tem relevância melhor estabelecida no primeiro semestre de gravidez, ao passo que na implantação o seu papel carece de esclarecimento,³ embora tenha já sido proposto.¹²

Um estudo confirmou a potencial utilidade de 5 biomarcadores da fase médio-secretora, destacando-se o CSF-3 por aumentar na fase secretora precoce. Através da colheita de fluido uterino nas fases secretora precoce e médio-secretora, as concentrações de cada biomarcador foram calculadas em ambas as fases. Detetou-se concentração significativamente elevada de CSF-3 ($p = 0,029$) no fluido uterino de mulheres inférteis na fase médio-secretora. Na fase secretora precoce, o CSF-3 foi o único biomarcador que mostrou diferença significativa de expressão ($p = 0,006$) entre mulheres férteis e inférteis.²²

Edgell *et al.* (2018) também estudaram a função endometrial epitelial em resposta à exposição aguda (fase secretora) e crónica (fases secretora e proliferativa) de CSF-3 glicosilado (CSF-3G) e não-glicosilado (CSF-3NG), em duas concentrações equivalentes às observadas no fluido de mulheres férteis e inférteis. O CSF-3NG aumentou significativamente a proliferação nos tratamentos agudo e crónico. O CSF-3G aumentou a proliferação e adesão apenas na exposição aguda em ambas as concentrações, o que parecem ser efeitos desejáveis. Ainda, ambas as formas aumentaram a invasão trofoblástica de forma dose-dependente.²²

Fatores de crescimento insulina-like (IGF) e fator de necrose tumoral (TNF)

Os fatores de crescimento insulina-like e proteínas de ligação participam no crescimento, diferenciação, angiogénese e apoptose a nível endometrial.³ O IGF-1 é secretado pelo estroma e liga-se aos seus recetores epiteliais, IGF-1R, levando à proliferação.¹²

Na diferenciação dos fibroblastos estromais em células da decídua, em resposta a estímulos embrionários, expressa-se a proteína de ligação IGF-1R. Investigações mostraram início da sua

produção 10 dias após o pico de LH, coincidindo com a JI. Pensa-se que a IGFBP-1 afeta a implantação por regular a ação do IGF nas células endometriais.³

O TNF, identificado no estroma, glândulas endometriais e na interface materno-embriônica, relaciona-se com aumento da taxa de aborto espontâneo. Por outro lado, a lesão local de indução já associada a sucesso na implantação, sugere que a resposta inflamatória e a libertação de citocinas como o TNF podem facilitar a preparação do endométrio para o processo.²³

Participando em diferentes etapas da implantação, através de propriedades pró-inflamatórias, a produção desta citocina atinge nível máximo nas células epiteliais na fase secretora tardia. O TNF induz a mucina 1 (MUC-1) e a metaloproteinase 9 (MMP-9), associadas à implantação, e ainda aumenta a expressão de LIF e IL-6, associados a maiores taxas de implantação.²³

Os níveis detetados no fluido uterino foram significativamente superiores em mulheres férteis relativamente a mulheres inférteis, com diminuída RE ($p < 0,05$).²⁰

Dados disponíveis sobre o uso inibidores do TNF- α e o RIF são escassos. Apenas um estudo mostrou resultados promissores em mulheres com um ratio TNF- α /IL-10 aumentado em doentes tratadas com *adalimumab* antes da TE.²⁴

Fatores angiogénicos

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) está implicado em diversos mecanismos fisiopatológicos.¹ No endométrio, aumenta a permeabilidade vascular e é essencial na invasão trofoblástica.¹⁵

Várias proteínas pertencem a este grupo, desde o VEGF-A ao VEGF-F e ao fator de crescimento placentário (PIGF). O VEGF-A parece aumentar a RE e fomenta as interações entre embrião/endométrio. A apropriada expressão de VEGF e PIGF é essencial na implantação embrionária, invasão trofoblástica, angiogénese e desenvolvimento placentário. Estes modulam a imunotolerância materna ao embrião, sendo que o PIGF promove proliferação e diferenciação das células *Natural Killer* uterinas, células dendríticas, entre outras.¹

Estudos demonstram que mulheres férteis tinham níveis de VEGF no fluido endometrial significativamente superiores a mulheres com infertilidade idiopática e diminuída RE ($p < 0,05$).²⁰ Outro estudo mostrou a mesma tendência, embora não de forma significativa.²²

Dados que associam o VEGF ao RIF são limitados.¹⁵ Em doentes com RIF, observa-se aumento do VEGF em circulação periférica, com redução da expressão de VEGF endometrial.¹ Benkhalifa *et al.* (2021) incluíram entre os biomarcadores estudados o VEGF, cujos níveis periféricos foram significativamente inferiores no grupo com RIF.¹⁵

Outros autores enunciaram associação entre polimorfismos dos genes de expressão do VEGF e o RIF.¹⁵ Numerosos polimorfismos do VEGF alteram a sua produção em doentes com esta patologia.

Designadamente, o alelo -1154 do VEGF associa-se fortemente ao RIF. Estudos adicionais mostraram que mulheres portadoras de diversas variantes do VEGF tinham risco significativo de RIF.^{1,15}

Estudos subsequentes são necessários para investigar os níveis de VEGF sérico em mulheres em tratamentos de FIV ou ICSI e a sua associação com o RIF.¹⁵

Quanto ao PIGF, foi encontrada maior concentração associada a infertilidade, provavelmente indicativa de um estado que previne a RE e ligação embrionária, reforçando-o como biomarcador de recetividade.²²

Células *Natural Killer* uterinas (uNK)

O equilíbrio imunológico é essencial para a adequada RE. A estabilidade das complexas interações materno-fetais envolve processos imunológicos elaborados.¹ Dados recentes mostram proporção de células imunitárias endometriais alterada no período pré-concepcional em até 82% de casos de aborto e RIF.^{24,25} Designadamente, o *scratch* endometrial pode ser favorecedor da implantação, por mecanismos não totalmente compreendidos, sugerindo-se que o procedimento estimula o recrutamento de células dendríticas, uNK e macrófagos, induzindo resposta imune favorável.²⁶

Estudos salientam a desregulação das células uNK no desenvolvimento do endométrio recetivo,¹ pelo que diversos investigadores se têm focado nestas células.⁶ As células uNK, dominantes no endométrio, correspondem a 70% dos leucócitos uterinos, no início da decidualização e implantação.^{10,27,28} Distinguem-se das células NK periféricas (pNK) pela menor citotoxicidade e maior expressão de CD56.^{7,10} mais de 90 % das células uNK caracterizam-se pelo fenótipo imaturo (CD56^{bright}CD16⁻).²⁵ Constituem componentes altamente especializados do endométrio decidualizado, que produzem citocinas pró e anti-inflamatórias na JI.^{6,27}

A sua influência na infertilidade é alvo de debate. Apesar de alguns estudos demonstrarem aumento de subgrupos de células uNK e da sua citotoxicidade em mulheres com RIF, outros não o evidenciaram.^{6,10} Associando-se, inclusivamente, níveis superiores de células uNK a sucesso implantatório.¹⁰

Apesar das divergências, acredita-se que a ativação excessiva de células uNK, consistente com um perfil endometrial inflamatório citotóxico, afeta a interação materno-embrionária, podendo causar RIF.²⁵

Um estudo de coorte com um grupo de mulheres a iniciar primeiro tratamento de FIV e outro grupo com mulheres que experienciaram RIF após FIV/ICSI, analisou amostras endometriais a nível histológico, imunohistoquímico e genético (*Array* de Recetividade Endometrial – ERA). As mulheres com bom prognóstico, a iniciar tratamento, apresentavam contagens de células CD56⁺ superiores na fase recetiva do ERA do que na pré-recetiva, refletindo observações anteriores: mulheres férteis têm maior número de células CD56⁺ na implantação. Um pequeno número de mulheres com RIF, teve contagens de células uNK CD56⁺ superiores na fase pós-recetiva, sugerindo que no RIF há menor

contagem de células uNK, provavelmente por recrutamento comprometido. Mas, num pequeno grupo de mulheres com RIF, as contagens foram extraordinariamente elevadas.¹⁰

Maior contagem de uNK em amostras endometriais de mulheres inférteis foi demonstrada. Paradoxalmente, noutros estudos, mulheres inférteis submetidas a FIV tinham percentagem diminuída de células CD56⁺.¹⁰ Adicionalmente, reportaram-se concentrações similares de células CD56^{bright} entre mulheres inférteis e férteis.⁷

Freitag *et al.* (2020), embora foquem outros temas, relatam que do grupo estudado, 74 doentes tinham RIF e, dessas, 16 apresentavam elevada contagem de uNK. Contudo, o cálculo do *odds ratio* não indicou a elevada contagem como fator de risco para RIF.²⁸

Um estudo de coorte multicêntrico, que analisou ciclos de TE em mulheres com RIF inexplicada, evidenciou aumento das células pNK. Os mesmos autores descreveram um perfil endometrial inflamatório que afeta a implantação.²⁴

Kolanska *et al.* (2019) mostraram que a percentagem das células pNK não diferiu entre os grupos com RIF e controlo. Todavia, a meta-análise complementar mostrou maior proporção de células pNK nas mulheres com RIF ($p < 0,001$), mas a heterogeneidade entre estudos foi elevada.²⁵

Os dados sobre a alteração do número de células pNK é pouco consensual no RIF, por diferentes definições de células pNK e de RIF.²⁵

O papel, produção e fenótipo dos linfócitos endometriais e periféricos é distinto. Concluiu-se que a proporção de células pNK não reflete o risco de insucesso implantatório, não sendo recomendada a sua avaliação na abordagem do RIF.²⁵

Estudos adicionais são necessários para avaliar a influência das células uNK na RE e, consequentemente, no RIF.

Células T

Outras células imunitárias estão envolvidas na maturação endometrial e implantação embrionária. Entre elas, os linfócitos T representam cerca de 40 a 50 %.²⁵

A homeostase local de células T *helper* (Th) foi observada na JI. A transição de um ambiente pró-inflamatório (Th1) para anti-inflamatório (Th2) permite desenvolver mecanismos locais promotores de imunotrofismo, de regulação negativa da inflamação e das vias citotóxicas.²⁷ A ativação excessiva das células Th1 endometriais pode originar um perfil inflamatório citotóxico deletério para a interação cruzada embrião/endométrio e causar RIF.²⁵ O mesmo se descreve num artigo de revisão publicado em 2021.¹

Um fenótipo de células Th17, que perpetuam a inflamação, também está implicado no RIF.¹

Assim, reconhece-se que a resposta anti-inflamatória Th2 suporta a implantação e o mesmo se aplica ao perfil de células T reguladoras.¹

Metaloproteinases

As moléculas de adesão celular (MAC) e as metaloproteinases (MMP) da matriz extracelular (MEC) iniciam uma cascata interativa na implantação.³ Logo, entre os fatores participantes na interação cruzada blastocisto/endométrio identificam-se as MMP,¹⁵ que degradam componentes específicos da MEC. Tal é essencialmente controlado pelos seus inibidores teciduais (TIMP), essenciais no equilíbrio entre acumulação e degradação da MEC inclusivamente na implantação embrionária.^{12,15}

Benkhalifa *et al.* (2021) compararam os níveis de diversos fatores, no sangue periférico e no fluido folicular, entre mulheres com RIF e que engravidaram após a primeira tentativa de ICSI. Destacam-se as MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2. Resultados demonstraram diminuição significativa dos níveis periféricos de MMP-7 no grupo RIF comparativamente com o controlo.¹⁵

A MMP-7, localizada nos epitélios glandular e luminal, pode quebrar a integridade epitelial luminal, a primeira barreira encontrada pelo trofoblasto. Diminui em expressão na fase secretora, quando domina a progesterona, reguladora da expressão das MMP. Sugeriu-se insuficiência de MMP-7 ou hipersensibilidade contra a inibição da progesterona no RIF, no sangue periférico e no endométrio. Foi assim considerado um novo biomarcador para o RIF.¹⁵

A MMP-9 é uma das enzimas chave na invasão trofoblástica, assim como a MMP-2.²³ A sua expressão endometrial foi avaliada em mulheres inférteis na JI do ciclo menstrual anterior ao tratamento FIV. Expressavam-se ambas no endométrio recetivo, mas não houve correlação com o resultado da FIV.²⁹

A MMP-26, das células epiteliais, tem pico na fase secretora precoce. O seu gene é sensível aos estrogénios, tendo expressão significativamente superior na JI de ciclos de terapêutica hormonal de substituição comparando com ciclos naturais, pelo que expressão aumentada de MMP-26 sugere sobre-estimulação pelos estrogénios. Um estudo indica expressão superior em doentes com RIF.³⁰

Sumarizando, as MMP estão envolvidas na RE e no diálogo materno-embrionário, mas o seu papel no RIF e a sua utilidade carecem de estudos adicionais.

Prostaglandinas

A biossíntese intracelular de prostaglandinas (PG) engloba a oxidação do ácido araquidónico pelas ciclooxigenases, COX-1 e COX-2, para gerar PGH₂, um precursor inativo e instável de todas as PG, através de enzimas de síntese.³¹

A via de sinalização das PG está envolvida na implantação embrionária. As células epiteliais endometriais respondem à gonadotrofina coriónica produzida pelo blastocisto com expressão de COX-2 e enzima de síntese de prostaglandina E (PGES). Ainda, a PGE₂ derivada de COX aumenta a permeabilidade vascular endometrial característica da reação inflamatória típica da implantação.¹²

A síntese endometrial defeituosa de PG associa-se a insucesso implantatório em doentes submetidas a FIV,³¹ tendo sido detetados tais defeitos de síntese entre os dias 20 e 24 do ciclo menstrual em doentes com RIF, a nível do mRNA e proteico.⁷

Vilella *et al.* (2013) investigaram se as PGE₂ e PGF_{2α} do fluido endometrial podem ser usadas como biomarcadores de recetividade e implantação.³¹

As concentrações de PGE₂ e PGF_{2α} revelaram-se significativamente aumentadas na JI, em relação a outras fases de ciclos naturais (p < 0,01). Ainda, após a inserção de dispositivo intrauterino no ciclo de terapia de substituição hormonal, para abolir a JI, a secreção de ambas as PG diminuiu significativamente.³¹

As enzimas de síntese de PGE₂ e PGF_{2α} demonstraram regulação hormonal na JI.^{12,31} A transcrição de COX-2 aumentou na fase recetiva e os níveis de mRNA detetados foram superiores no compartimento epitelial, corroborando que seja o local de produção de PG.³¹ Este aspeto concorda com o descrito num artigo de revisão: níveis muito baixos de COX-2 foram mensurados em 85% de doentes com RIF.⁷

Similarmente, as enzimas de síntese COX-2, CBR1 e AKR1C3 mostraram maior marcação na JI, com localização restrita aos epitélios luminal e glandular. Além disso, a enzima AKR1C1 ainda converte PGE₂ em PGF_{2α} e vice-versa, logo níveis elevados de PGF_{2α} e AKR1C1 resultam conjuntamente em maior produção de PGE₂, o que pode refletir o aumento acentuado das PG na JI.³¹

Num modelo de adesão embrionária *in vitro*, a inibição de PGE₂ e PGF_{2α} ou dos seus recetores preveniu-a, enquanto a adição dessas moléculas ou seus agonistas restaurou ou aumentou a taxa de adesão.³¹

Finalmente, colocou-se a hipótese de a concentração das PG no fluido endometrial, 24h antes da TE, poder prever a ocorrência de gravidez³¹ e que a suplementação com PG antes da TE pode beneficiar um grupo selecionado de doentes com RIF.⁷

Perante estes resultados, a potencial utilização das PGE₂ e PGF_{2α} como biomarcadores não-invasivos em TRA é colocada, oferecendo uma ferramenta diagnóstica de avaliação da RE.³¹

Moléculas de adesão celular

Mucinas

Estudos recentes mostram redução significativa da secreção de MAC em mulheres com RIF, influenciadora do insucesso implantatório nas mesmas.⁴ A esta família pertencem as mucinas (MUC).¹⁶

A MUC-1 é a mais estudada no endométrio, mas há resultados controversos na literatura quanto ao seu papel inibidor na implantação.¹⁷ Expressa-se no epitélio luminal e quando altamente expressa, na JI, interfere com a adesão celular,^{3,12,16,18} atuando possivelmente como barreira à implantação embrionária.^{3,18} Inclusivamente, níveis elevados de progesterona reduzem a expressão da MUC-1 facilitando as interações endométrio-blastocisto.¹⁶

Considera-se a possibilidade de a MUC-1 não permitir a adesão do blastocisto até surgirem o momento e o local ideais para a implantação. A favor destas propriedades anti-adesivas existem estudos em que a MUC-1 está reduzida no endométrio recetivo, em diversos animais.¹⁶ Consequentemente, a diminuição da expressão de MUC-1 auxiliaria a atingir RE adequada. Paradoxalmente, estudos experimentais evidenciaram aumento da proteína e mRNA nas fases proliferativa e secretora, incluindo na implantação.^{3,16} Tal sugere um mecanismo local que remova a barreira constituída pela MUC-1, permitindo a implantação.^{12,16}

Um artigo recente descreve que a MUC-1 se localiza nas células ciliadas, estando ausente nas células não-ciliadas e pinopodes endometriais.¹⁶ Um estudo de coorte prospetivo corrobora estes resultados: localizou a MUC-1 por microscopia eletrónica de varredura e imunomarcção na base dos cílios das células ciliadas e não nas células secretoras e pinopodes desenvolvidos. Uma pequena percentagem localizava-se em células não-ciliadas.¹⁸

Sugere-se que os pinopodes promovem uma área livre de MUC-1, possibilitando a interação blastocisto/endométrio.¹⁶ Um estudo *in vitro* demonstrou-o, mas o mecanismo é desconhecido.¹⁸ Outros estudos sugerem que o próprio blastocisto pode desencadear perda local de MUC-1.¹⁶

Apesar de a MUC-1 aparentar ser um fator negativo para a implantação localmente, estudos revelam, então, aumento da sua expressão na implantação.^{16,18} Um estudo em mulheres férteis evidencia aumento da MUC-1, no fluido uterino, a partir do dia LH+7.³ Outros autores mostram diminuição de MUC-1 associada a inadequada RE.¹³

Wu *et al.* (2018) compararam a expressão de biomarcadores endometriais, dos quais a MUC-1, entre mulheres férteis, com aborto recorrente idiopático e com RIF. Registou-se expressão significativamente menor de MUC-1 no grupo RIF. Mostrou-se que a MUC-1 era independente das características demográficas e clínicas das participantes, sugerindo que a expressão diminuída é um biomarcador independente no RIF durante a JI.¹³

Um estudo revela percentagem de MUC-1 nas células ciliadas significativamente superior no grupo controlo do que em mulheres com RIF, reiterando que a MUC-1 e as células ciliadas regulam a implantação.¹⁸ Bastu *et al.* (2015) também observaram quantidade significativamente menor de MUC-1 endometrial em doentes RIF.³²

Apesar de proposta como biomarcador de recetividade,¹⁸ a influência da MUC-1 é incerta no RIF e estudos posteriores são imprescindíveis.¹³

A MUC-16 expressa-se nos epitélios luminal e glandular. Dados indicam ser um inibidor mais específico, tendo perda completa de expressão na JI, enquanto a MUC-1 tem perda incompleta. As suas propriedades anti-adesivas parecem mais fortes e a sua remoção dos pinopodes facilita a adesão trofoblástica.¹⁷

Um estudo de coorte observacional retrospectivo investigou o papel inibidor da implantação da MUC-16. Apesar de não ter incluído mulheres com RIF, retiraram-se conclusões interessantes: a expressão de MUC-16 no epitélio luminal de mulheres que engravidaram, após FIV-TE, foi inferior ($p <$

0,001) à daquelas que não engravidaram; estava aumentada em mulheres com níveis de progesterona elevados no dia de administração de gonadotrofina coriônica humana (hCG), associados a menores taxas de implantação; não houve correlação entre os níveis de MUC-16 e a contagem de pinopodes. Tal favorece a hipótese de a MUC-16 ser um inibidor da implantação.¹⁷ No entanto, o papel no RIF carece de esclarecimento.

Integrinas

As integrinas são glicoproteínas transmembranares, formadas pela associação de subunidades *alfa* e *beta*, pertencentes à família das MAC.^{3,16} Estão envolvidas na preparação endometrial para a implantação embrionária, sendo amplamente utilizadas como marcadores de monitorização das condições uterinas.³³

Foram identificadas integrinas nas células endometriais epiteliais ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$) e estromais ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$). Estas revelam-se ausentes em determinadas situações associadas a infertilidade. Tal levantou a suspeita de estarem implicadas na implantação,³ o que foi comprovado.³⁴

Algumas integrinas são constantes ao longo do ciclo, outras exibem um padrão de expressão. Histologicamente definidas com periodicidade, entre os dias 20 e 24 do ciclo, estão as $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$,^{16,34} coexistindo a expressão da isoforma $\beta 3$ com a JI.^{11,13}

A integrina $\alpha v\beta 3$ e o seu ligando, osteopontina, foram detetados por imunohistoquímica na superfície epitelial luminal do endométrio^{12,16} e a sua expressão eleva-se na JI,³ pelo que podem mediar a adesão trofoblástica.¹² Estudos evidenciaram diminuição significativa de $\alpha v\beta 3$ em mulheres com infertilidade inexplicada.^{3,11} Makker *et al.* (2009) referem redução significativa da subunidade $\beta 3$ no epitélio glandular em mulheres inférteis comparando com controlos férteis. Paralelamente, a imunomarcagem de $\beta 3$ é menos intensa nos epitélios glandular e luminal, em mulheres com assincronia de maturação dos dois componentes.¹¹ De forma concordante, Wang *et al.* (2020) detetaram maiores níveis de $\alpha v\beta 3$ no fluido uterino de mulheres férteis, correspondendo ao biomarcador com maior valor preditivo de recetividade no estudo.²⁰

A diminuída expressão endometrial de integrina $\beta 3$ acompanhada de RE reduzida verificou-se em diversas condições patológicas.³⁴

Contudo, os inúmeros estudos são discordantes. A título de exemplo, outro estudo revelou expressão de integrina $\beta 3$, nos epitélios glandular e luminal de doentes com RIF, ligeiramente superior à de mulheres férteis, embora não de forma estatisticamente significativa.³³

Resultados semelhantes foram obtidos num estudo realizado com células mesenquimatosas estaminais endometriais, do inglês “*endometrial mesenchymal stem cells*” (eMSC). Postula-se que as multipotentes eMSC têm papel regenerativo e de preparação do útero para a gravidez, expressando marcadores de RE. A integrina $\beta 3$ revelou expressão significativamente superior nas eMSC isoladas de sangue menstrual no grupo com RIF ($p < 0,05$).³³

O padrão de expressão específico da $\alpha v\beta 3$ sugere influência de outros fatores. A $\alpha v\beta 3$ é regulada positivamente pelo HB-EGF e negativamente pelo 17β -estradiol. Na fase proliferativa, os elevados níveis de estradiol atuam no receptor $ER\alpha$, inibindo a expressão de integrinas. Com a diminuição destes receptores na fase lútea, ocorre o aumento das integrinas. A progesterona parece aumentar a expressão de integrina $\beta 3$. A influência hormonal nas integrinas será posteriormente detalhada neste manuscrito. Igualmente, o gene *homeobox A10* parece aumentar a expressão de $\beta 3$.¹⁶

Sugeriu-se que o nível de mRNA de integrina, doseado no dia 21 do ciclo menstrual, poderá prever o sucesso da FIV, pois doentes com níveis normais apresentavam o dobro da taxa de gravidez relativamente a doentes com níveis inferiores.^{13,16} No entanto, estudos distintos demonstraram que o RIF não se associa a expressão de integrina anormal e que a expressão das integrinas $\alpha 1$, $\alpha 4$ e $\alpha v\beta 3$ não teria valor prognóstico em tratamentos de FIV. Efetivamente, Wu *et al.* (2018) não encontraram diferença significativa na expressão de integrinas entre mulheres com e sem RIF.¹³

A integrina $\beta 1$, constitutivamente expressa no ciclo menstrual, revela menor expressão no próprio blastocisto de modelos animais, causando insucesso implantatório.³⁴ Em eMSC, a sua expressão revelou-se inferior em doentes com RIF, embora de forma não significativa.³³

Apesar das discrepâncias na literatura, o nível de expressão e a distribuição das integrinas na membrana celular devem ser considerados biomarcadores de RE com pertinência no RIF.³⁴

Caderinas

No que respeita a implantação, a E-caderina é, destas moléculas, a mais estudada.¹⁶

A presença de E-caderina, tanto no trofoblasto como no epitélio endometrial, indica que tem funções fundamentais na implantação.^{12,35}

Esta promove a adesão entre células epiteliais endometriais^{16,29} e a sua deficiência pode conduzir a insucesso implantatório por estrutura celular anormal.³⁶ Contudo, é descrito que apesar de requerida para a adesão celular, pode ser regulada negativamente para permitir dissociação celular epitelial e invasão do blastocisto.¹⁶

Os níveis de mRNA são superiores na fase lútea, embora tal não tenha sido detetado a nível proteico em alguns estudos.¹⁶

A região promotora do gene da E-caderina parece ser regulada pelo fator *homeobox A10*, relação abordada adiante, o que melhora a receptividade e aumenta a taxa de implantação.³⁷

Meios de imunohistoquímica e imunofluorescência detetaram E-caderina no citoplasma do epitélio glandular. A sua marcação foi menos intensa no grupo com RIF inexplicada do que no controlo, durante o período peri-implantatório, embora sem diferença estatisticamente significativa ($p = 0,08$).³⁵

Molécula de adesão celular endotelial 1 (PECAM1)

MAC distintas foram associadas à implantação, mas carecem de estudo no RIF destacando-se a PECAM1 que tinha níveis consistentemente diminuídos de forma significativa no RIF, a nível de mRNA e proteico, e uma imunomarcagem menos intensa. A PECAM1 nas células endometriais tem expressão máxima na fase médio-secretora e já tinha sido detetada por análise transcriptómica, estando restrita ao endométrio recetivo.³⁶

O seu alvo, fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) também estava regulado negativamente na fase médio-secretora de doentes RIF submetidas a FIV-TE, demonstrando associação entre alterações da sua expressão na interface materno-fetal e insucesso implantatório.³⁶

Apesar da função da PECAM1 na implantação ser pouco percebida, perante os resultados coloca-se a hipótese de a sua reduzida expressão ter influência no RIF.³⁶

Progesterona, estrogénios e recetores

A função uterina é primariamente regulada pelos estrogénios e progesterona, que modulam a expressão genética das células epiteliais e estromais.¹² Portanto, a RE máxima depende do equilíbrio hormonal,³⁴ cuja alteração afeta a sincronia entre a maturação do estroma e do epitélio, comprometendo a RE.¹¹ Após a ovulação, os estrogénios diminuem e a progesterona aumenta. Com a JI coincidem níveis elevados de estrogénios e o correto equilíbrio hormonal promove proliferação endometrial adequada.¹

No RIF, níveis suprafisiológicos de estrogénios durante a estimulação ovárica, podem conduzir a prematuridade na elevação da progesterona e consequente recetividade alterada, afetando a implantação.^{1,7} A deficiência de progesterona foi, igualmente, proposta como etiologia do RIF.³⁸

Um largo número de biomarcadores envolvidos na recetividade sofrem influência hormonal.¹¹

Chen *et al.* (2016) estudaram a ação das integrinas $\beta 1$ e $\beta 3$ na constituição da RE, explanada anteriormente, fomentada pelo equilíbrio hormonal. Observou-se diferença significativa na expressão relativa destas integrinas entre o grupo controlo e o grupo com níveis elevados de estrogénios, provavelmente por efeito inibitório na transcrição de integrinas.³⁴

Quando a concentração de estrogénios ultrapassava a fisiológica, verificava-se declínio importante na expressão e distribuição de $\beta 3$. Em células tratadas com estrogénios e progesterona, a última eliminava o efeito negativo dos estrogénios sobre a integrina $\beta 3$, por aumentar a expressão de $\beta 1$. Assim, concentrações mais elevadas de estrogénios inibem em maior grau a integrina $\beta 3$.³⁴

Níveis elevados de estrogénios encerram rapidamente a JI e pensa-se que o uso de progesterona para atenuar este efeito pode ser um método para melhoria dos resultados de FIV-TE.³⁴

A importância dos recetores hormonais foi demonstrada.¹ Polimorfismos dos genes codificantes dos recetores de progesterona (PR) foram considerados no RIF.³⁸ Um estudo avaliou a expressão de recetores de estrogénio (ER), PR-A e PR-B, comparando a expressão endometrial em mulheres integradas num programa de doação de oócitos, nos dias 0 e 5 da recuperação de oócitos.

Houve aumento significativo da expressão de PR-B e diminuição de ER, confirmando as alterações fisiológicas na preparação para a implantação.¹

Estudos experimentais revelam menor taxa de implantação em ratos com o gene PR-B *knockout* do que com PR-A *knockout*.¹ Todavia, descreveu-se que o PR-A é crítico na implantação, porque noutros estudos em ratos com o gene PR-B *knockout*, os efeitos mediados pelo PR-A foram suficientes para manter a função.¹²

O artigo de Mrozikiewicz *et al.* (2021) descreve resultados que indicam diminuição dos ER em doentes com RIF. Variantes do recetor de estrogénio 1 (ER-1) associam-se à implantação. Num estudo, o genótipo ER-1/AA foi mais comum em mulheres com RIF do que em mulheres que engravidaram espontaneamente ou após o primeiro ciclo de FIV/ICSI.¹

Um estudo comparou a expressão de ER e PR, em mulheres férteis e inférteis sob *ormeloxifeno*, um contraceptivo modulador dos ER não-esteróide, por interferir na implantação por inibição da recetividade, na JI. Foi observada maturação endometrial retardada, pelo menos 3 dias, em todas as mulheres sob o fármaco. A anormal abundância de PR no epitélio endometrial médio-secretor indica RE alterada. Os achados também associaram a maturidade endometrial ao aparecimento de PR estromais e regulação negativa de PR epiteliais.¹¹

A prevalência de três variantes do PR referidas na literatura como o complexo *Progins* - genótipo H770H (C/T), polimorfismo V660L e inserção 360bpAlu - foi estudada por Coulam *et al.* (2008) em mulheres com RIF. Não houve diferença significativa na frequência alélica das variantes entre doentes com RIF, após FIV-TE, e controlos férteis. Nenhuma das participantes apresentava a inserção 360bpAlu. Estes resultados discordam de relatórios anteriores que reportaram, nomeadamente, aumento da prevalência da inserção 306bpAlu e polimorfismo H770H em mulheres com infertilidade inexplicada.³⁸

Pode-se argumentar que mulheres com RIF constituem um grupo heterogéneo de doentes, pelo que a comparação da taxa de mutações dos PR com mulheres férteis pode não ser uma fonte de informação válida.³⁸

Fatores genéticos

Abordagens “-omics”

A necessidade de biomarcadores que reflitam a RE para assegurar TE no período ótimo é clara.²¹ As tecnologias de estudo do genoma, transcriptoma e secretoma - abordagens “-omics” - auxiliam a identificar vias moleculares, biomarcadores específicos e perfis de recetividade.⁶

As hormonas regulam a expressão genética a nível endometrial para a sua proliferação pelo que se os genes essenciais não são expressos na JI, a implantação é afetada.³⁹ Com os métodos “-omics”, incontáveis genes diferencialmente expressos (DEG) foram reportados na fase médio-secretora (Tabela 2). No entanto, a consistência dos genes representativos de recetividade entre estudos é pobre pelo que a investigação continua a decorrer.^{5,6,40-42} Adicionalmente, os marcadores

variam entre indivíduos, podendo retirar-se conclusões enganadoras quanto ao estado de implantação.⁴

A maioria dos DEG tem regulação positiva e codifica proteínas de superfície, componentes extracelulares e citocinas/fatores de crescimento.^{5,40,41} Comum à maioria dos estudos é o gene SPP1, codificante da fosfoproteína secretada 1 ou osteopontina,^{5,40-42} cuja desregulação no endométrio médio-secretor de mulheres com patologia reprodutiva foi demonstrada.⁴² No estudo de Zhang *et al.* (2012) a osteopontina também aumentou significativamente na fase secretora, mas considerou-se a possibilidade de não ser um bom marcador da JI por ter apresentado pico na fase secretora tardia.²¹

Altmäe *et al.* (2017) identificaram uma meta-assinatura de biomarcadores de recetividade altamente putativos. Alguns dos genes regulados na fase recetiva integram a Tabela 2.⁴²

Os estudos definiram uma assinatura genética de RE.³⁹ Contudo a expressão diferencial dos genes não implica que as respetivas proteínas constituam biomarcadores.⁴⁰ Com os dados foi desenvolvido o *Array* de Recetividade Endometrial (ERA),¹² amplamente utilizado, embora múltiplos relatórios não corroborem os seus benefícios.^{9,39,40} Os 238 genes constituintes são excessivos para uma interpretação clínica ideal, realçando a necessidade de biomarcadores preditivos de RE.⁴³ Quando usado na avaliação de mulheres com RIF após TRA, as submetidas a TE após o diagnóstico “recetivo” demonstraram 38% de taxa de implantação.⁶

He *et al.* (2021) construíram um novo teste baseado na sequenciação de RNA (RNAseq) para prever a JI ótima e melhorar a taxa de gravidez em doentes com RIF, com melhores resultados no grupo com JI deslocada, indicando-a como principal causa de insucesso implantatório e que os resultados melhorariam com TE personalizada.⁴⁴

Assinaturas genéticas de aspirados uterinos reconheceram a fase recetiva, em ciclos naturais, pelo que a aspiração uterina poderá avaliar o endométrio em ciclos ativos, sem provocar lesão, e permitir relacionar a expressão genética e o resultado de TRA. Adicionalmente, a abordagem poderá permitir uma avaliação diagnóstica de infertilidade inexplicada.^{43,45,46} Contudo, inúmeras questões merecem esclarecimento antes do procedimento ser introduzido na clínica.⁴⁵

A expressão genética tem sido estudada inclusivamente em mulheres com RIF, na fase recetiva,^{40,47} para encontrar biomarcadores robustos que influenciem o RIF, importantes para predição, diagnóstico e tratamento da condição.³⁰

Dos genes *pivot* condicionantes de RIF identificados, destacam-se: LAMC1 (diminuído significativamente em doentes RIF), ESR1 (cuja expressão e polimorfismo foram relacionados com o RIF), GPX3 (com pico na JI), NNMT (cuja proteína está significativamente diminuída no RIF) e PAX2 (cuja expressão elevada impede a implantação, verificando-se em doentes RIF).³⁰

Também, foi identificada expressão superior dos genes da metaloendopeptidase membranária e *WW and C2 domain containing 1* e expressão significativamente reduzida do gene da tenascina C, em amostras endometriais de doentes RIF.⁴⁷

O estudo do proteoma e metaboloma permite maior entendimento das alterações dinâmicas envolvidas na receptividade e implantação.⁴⁰

Um artigo de revisão refere uma “impressão digital” distinta que diferenciou mulheres férteis de doentes com RIF.⁷ Wang *et al.* (2021) detetaram proteínas diferencialmente expressas em amostras colhidas no dia LH+7 de doentes RIF, a maioria das quais realça a influência do microambiente imune endometrial no RIF.⁴⁸ Os resultados suportaram que a elevação de fetuína-A conduz a insucesso implantatório, apontando-a juntamente com a globulina de ligação a corticosteroides, aumentada em doentes com RIF, como proteínas específicas da patologia.⁴⁸

A maioria dos estudos “-omics” não foram replicados ou traduzidos para a prática clínica.⁴⁰ Estudos adicionais com abordagem “-omics” e análise de dados são necessários para identificar marcadores válidos. Ainda, estudos que incluam o endométrio e embrião são relevantes para esclarecer como os seus transcriptomas se interinfluenciam.^{5,40}

Fatores de transcrição nuclear

Os genes dos fatores de transcrição *homeobox* importam na regulação e desenvolvimento endometrial, com aumento de regulação na JI.³ As proteínas, *homeobox* A10 e A11 (*Hoxa10* e *Hoxa11*), expressam-se a nível glandular e estromal.¹²

A expressão de *Hoxa10* ótima é crítica para estabelecer a receptividade, implantação, decidualização e interface materno-fetal.⁴⁹ Na implantação, é vital na proliferação das células estromais e na imunossupressão local.³⁵

A sua expressão aumenta na fase proliferativa tardia, mantendo-se na fase secretora. Alterações dessa expressão prejudicam a receptividade, associando-se a condições relacionadas com insucesso implantatório.^{35,36} Num estudo, a expressão de *Hoxa10* foi significativamente inferior no grupo com RIF a nível de mRNA e proteico, comparativamente ao controlo.³⁶

Num estudo com doentes com síndrome do ovário poliquístico, os investigadores analisaram se a *metformina* melhorava a RE nestas doentes, por aumento da expressão de *Hoxa10* e integrina $\beta 3$. O aumento de *Hoxa10* no grupo tratado, com melhoria de RE, reforçou o seu papel.⁴⁹

Um estudo adicional constatou localização predominante de *Hoxa10* no núcleo de células estromais e no citoplasma do epitélio glandular com intensidade de marcação significativamente inferior no grupo RIF, no epitélio glandular ($p < 0,01$) e estroma ($p < 0,05$). O *Hoxa10* correlaciona-se positivamente com a E-caderina, podendo regular a sua expressão.³⁵ Bi *et al.* (2022) reiteram estes resultados. *In vitro*, o *Hoxa10* e a E-caderina correlacionavam-se positivamente e a adesão das células epiteliais e trofoblásticas era inibida com o silenciamento do *Hoxa10*, havendo reversão após restauração da expressão da E-caderina.³⁷

Concluindo, a redução de expressão de *Hoxa10* provavelmente influencia o insucesso implantatório no RIF.³⁵

O gene Hoxa11, expresso por eMSC do endométrio recetivo e na implantação, revelou expressão significativamente superior no grupo com RIF ($p < 0,05$).³³

A expressão do gene Hoxa9 aumenta na fase secretora e a sua diminuição resulta em menor RE. Revelou-se que o eixo de interação hsa_circ_0038383/miR-196b-5p/Hoxa9 pode constituir uma via determinante de RIF. Contudo estudos de biologia molecular mais aprofundados são necessários para o verificar. O papel do Hoxa3 na RE e como alvo do miR-424-5p não foram confirmadas.⁵⁰

KIR, LILRB e seus ligandos

As células NK expressam recetores imunoglobulina-*like* (KIR) que, após reconhecimento das moléculas HLA-C e HLA-G, estimulam ou inibem a produção de fatores solúveis e exibem baixa citotoxicidade para manutenção do embrião. Alguns recetores leucocitários imunoglobulina-*like* (LILR), como LILRB1 e LILRB2, encontram-se nas células estromais, vasos e músculo liso.⁵¹

Uma revisão de literatura recente focou-se no papel dos polimorfismos dos KIR, LILRB e seus ligandos (HLA-C e HLA-G) na suscetibilidade para RIF. Os KIR pertencem a uma superfamília de imunoglobulinas e os seus polimorfismos genéticos diferem em número e tipo inter-individualmente. Os genes KIR dividem-se em dois grandes haplotipos e cada KIR tem como ligando um subgrupo de alotipos HLA-classe I.⁵¹

Os polimorfismos dos genes KIR e HLA afetam a reatividade das células NK e a suscetibilidade para várias patologias, incluindo provavelmente o RIF. De facto, mulheres com haplotipo KIR-AA tinham maior taxa de aborto após TE, comparativamente ao haplotipo KIR-BB. Outros estudos observaram uma percentagem mais baixa de doentes RIF com a combinação de genes inibitórios KIR2DL1–HLA-C2.⁵¹

O KIR2DL4 é expresso pelas células CD56⁺ da decídua e liga-se à proteína HLA-G. Os seus polimorfismos podem influenciar a interação entre as células NK deciduais e o HLA-G das células trofoblásticas. Também foi encontrada correlação entre a HLA-G uterina solúvel e a fração de células uNK KIR2DL4⁺. Logo, o fenótipo das uNK pode ser regulado pelo HLA-G das células trofoblásticas e do útero.⁵¹

Nowak *et al.* (2017) acreditam que a investigação das bases genéticas destes recetores e seus ligandos pode clarificar a patogénese do RIF e ajudar no seu diagnóstico.⁵¹

DNA mitocondrial (mtDNA) e genes relacionados com o stress oxidativo (OSG)

A relação entre o RIF e o número de cópias de mtDNA endometrial foi recentemente estudada. Um grupo de 25 mulheres com RIF e 25 mulheres saudáveis, entre os 25 e 42 anos, foram submetidas a biópsia endometrial, entre os dias 20 a 24 do ciclo menstrual. Os genes mitocondriais MT-ND1 e MT-CO2 foram alvo de amplificação, para comparação entre grupos. Concluiu-se que os níveis de mtDNA distinguem os doentes com RIF dos controlos. O número de cópias de mtDNA em amostras endometriais foi superior no grupo com RIF.⁵²

Sugeriu-se que níveis aumentados de mtDNA resultam em *stress* oxidativo que influencia negativamente a receptividade e causa insucesso implantatário. Tais resultados podem contribuir para desenvolver *kits* de diagnóstico e aumentar o sucesso de FIV, apesar das limitações e de serem necessários estudos complementares.⁵²

Os OSG, associados a fator imunológico aberrante, podem representar novos biomarcadores de RIF. A regulação mediada pelo *stress* oxidativo (OS) importa na implantação embrionária, podendo a desregulação da atividade imune e exacerbação do OS reduzir os locais de implantação. Dados indicam regulação da resposta imunitária e do OS diferencialmente ativada no endométrio entre doentes RIF e controlos férteis.²⁷

Lin *et al.* (2022) construíram um modelo de predição de RIF baseado em 3 OSG potencialmente subjacentes à fisiopatologia. O gene SLC7A11 regula a via da ferroptose, alterada no RIF. O gene AXL codifica um fator protetor para o RIF. O UBQLN1 codifica uma proteína ubiquitina-*like*, reguladora de vias envolvidas na decidualização. Estes 3 genes são co-expressos numa variedade de células imunitárias, sendo propostos como novos biomarcadores do RIF.²⁷

Polimorfismos do TNF, p53 e antígeno leucocitário humano (HLA)

As citocinas inflamatórias associadas às células Th, como o TNF, podem ser favoráveis nos períodos pré e peri-implantatário. Por exemplo, o TNF favorece a perda de MUC-1.²³

Polimorfismos do gene TNF associam-se a modificações da sua produção. Investigadores avaliaram a taxa de implantação em mulheres com e sem os polimorfismos TNF -308 e -238, submetidas a FIV, por fator masculino exclusivo. A associação entre o alelo -308A e a suscetibilidade a diversas patologias sugere que o polimorfismo é relevante *in vivo*. Num grupo selecionado de doentes, o polimorfismo -308 foi discriminativo na taxa de implantação, já que a aumentou em doentes com o alelo TNF-308A ($p = 0,0003$). No total de mulheres, também houve aumento da taxa de implantação. Quanto ao polimorfismo TNF-238, as taxas de implantação foram semelhantes para os alelos -238A e G. Estas observações reforçam o papel positivo do TNF na implantação e que o polimorfismo -308 pode ser um marcador genético dessa ação.²³

Polimorfismos genéticos da p53 foram relacionados com o RIF. Mulheres com o polimorfismo que leva à substituição de arginina por prolina mostraram expressão diminuída de LIF. Esta variante em mulheres com menos de 35 anos aparenta ser fator de risco para insucesso implantatário. Estudos posteriores confirmaram estas observações.¹

O HLA-G é imunomodulador do processo de fertilização e gravidez inicial, logo a sua expressão é alvo de análise em mulheres com RIF. Numa meta-análise, os autores concluíram que o polimorfismo HLA-G 14 bp se correlaciona significativamente com o RIF.¹ Contudo, poucos estudos investigaram os polimorfismos de HLA-G e suas funções no RIF, havendo resultados contraditórios.⁵¹

Fatores epigenéticos

A contribuição das alterações epigenéticas para a decidualização e RE foi igualmente estudada.⁴⁰

Estudos *in vitro* sugerem que o estímulo de decidualização ativa vários genes por modificação das histonas e da metilação do DNA na transição da fase pré-recetiva para recetiva.⁴⁰ A alteração dinâmica da metilação do DNA, sob exposição hormonal exógena, pode levar a função celular endometrial anormal: o biomarcador *Hoxa10* é regulado por metilação do DNA, que quando aberrante leva a expressão genética anormal e patologia endometrial.⁵³

A modificação epigenética altera a recetividade em mulheres com elevados níveis de progesterona no dia de administração de hCG, associados ao insucesso de FIV. A metilação de DNA (5-mC) e metilação (H3K4me2/3, H3K9me2, H3K27me3) e acetilação (H3K4ac, H3K9ac) das histonas foram estudadas. No epitélio glandular, a expressão de 5-mc foi significativamente superior no grupo com níveis elevados de progesterona, assim como a expressão de H3K9me2, nos epitélios glandular e luminal, e a expressão no estroma de H3K27me3. H3K9ac teve maior expressão no epitélio glandular no grupo com níveis elevados de progesterona. Estas alterações contribuirão para baixas taxas de implantação reportadas na literatura.⁵³

Nos fatores epigenéticos integram-se os RNA não codificantes.^{39,53} O papel dos microRNA (miRNA) na implantação e o seu potencial diagnóstico de RE comprometida e insucesso implantatório têm sido revistos.³⁹ Estes regulam a expressão genética na implantação^{4,54} e enquanto alguns a promovem, outros causam insucesso implantatório.⁵⁵ Logo, a regulação aberrante de miRNA associa-se a patologias, incluindo o RIF.^{4,54}

Poderão constituir biomarcadores não-invasivos a utilizar em TRA, refletindo o estado endometrial e determinando o momento ótimo de implantação. Diferentes níveis de expressão de miRNA foram encontrados no endométrio e sangue periférico de mulheres com RIF.⁵⁵ Contudo, poucos estudos avaliaram a associação entre o resultado de TRA e os miRNA endometriais de doentes com RIF.⁵⁵

Os miRNA têm sido isolados na fase médio-secretora. A expressão de miR29B, miR29C, miR30B, miR30D, miR31, miR193A-3P, miR203, miR204, miR200C, miR210, miR582-5P e miR345 aumenta na fase médio-secretora.^{39,55} Assim como, Cretoi *et al.* (2016) referem que os miR210, miR-29B, miR-30B, miR-30D, miR193A-3P, miR200C e miR-31 aumentam na fase médio-secretora, descrevendo os hsa-miR-30b, -30d, -494 e -923 como novos biomarcadores de recetividade.⁵⁶

Altmäe *et al.* (2017) identificaram miRNA regulados negativamente, na fase médio-secretora, destacando os miR-130b-3p, miR-548n, miR-548ah-3p, miR-30c-1-3p, miR-449c-5p e genes alvo.⁴²

Diferentes perfis de miRNA, nas fases pré-recetiva e recetiva, são aparentes entre mulheres com e sem RIF.⁵⁵ Por exemplo, os polimorfismos miR-449bA>G, miR-27a rs895819 e miR-449b rs10061133 foram descritos na predisposição para o RIF¹ e o miR-145 triplica em doentes RIF, tendo como alvo outros marcadores como o IGF-1R, ER α , MUC-1, *Hoxa10* e *Hoxa11*.⁵⁵

Alguns dos miRNA alterados no RIF, incluindo alguns dos já referidos, encontram-se sistematizados posteriormente neste manuscrito (Tabela 3).

As hormonas esteroides regulam a expressão de miRNA e vice-versa.⁵⁵ Postula-se que o miR-21 ajusta as funções uterinas dos estrogénios e progesterona na implantação⁵⁷ e que os miR-194-3p e miR-196a reduzem significativamente os PR-A e PR-B. Os PR e ER são alvo de múltiplos miRNA. Informação sobre a regulação dos miRNA sobre os ER é escassa.⁵⁵

Alguns miRNA presentes em vesículas extracelulares do fluido uterino foram associados à implantação, sugerindo-se que o insucesso implantatário após FIV se associa a desregulação dos pequenos RNA não codificantes presentes nas vesículas.⁵⁸

A função reguladora das cascatas de miRNA torna-os potentes biomarcadores.⁵⁵ Embora os estudos não tenham resultados concordantes,³⁹ os miRNA específicos do endométrio poderão ser preditores de RIF. A manipulação das suas vias de sinalização é considerada uma potencial abordagem terapêutica.⁵⁵ Estudos suplementares são cruciais.^{39,55}

Outros marcadores de recetividade endometrial

Rho GTPases

As Rho GTPases constituem proteínas reguladoras de processos celulares dinâmicos, como a modulação da adesão celular.⁵⁹

Destas, as Rac1 e RhoA regulam a migração e motilidade celulares, regulando-se reciprocamente. Encontram-se nas células estromais endometriais, onde aparentam ter papéis opostos na regulação da motilidade e atuar na implantação embrionária.⁵⁹

Um estudo *in vitro*, num modelo de células estromais endometriais humanas, demonstrou por imunohistoquímica a presença de Rac1 e RhoA no estroma e epitélio luminal na JI. As células estromais isoladas também tinham imunomarcagem positiva. Além disso, o silenciamento da Rac1 inibiu significativamente a invasão embrionária, enquanto o silenciamento da RhoA a aumentou significativamente. Igualmente, em células estromais com inibição da via de sinalização de RhoA, a invasão embrionária foi marcadamente superior.⁵⁹

Quanto à migração das células estromais, a inibição da sinalização de Rac1 diminuiu significativamente a motilidade e a inibição de RhoA aumentou-a. Sugeriu-se aumento localizado dos níveis de Rac1 nas células estromais adjacentes ao embrião em processo de implantação, com conseqüente aumento da motilidade celular. Este aumento é acompanhado pela inibição de RacGAP1, regulador da função de Rac1.⁵⁹

Assim, a implantação requer motilidade celular dependente de Rac1 e é inibida pela RhoA.⁵⁹

A Rac1 tem, similarmente, função na migração das eMSC, especialmente nos locais de implantação.³³ Inconsistentemente, em eMSC derivadas de sangue menstrual os níveis de Rac1 foram

superiores em mulheres com RIF, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa ($p > 0,05$).³³

Sumarizando, alterações da motilidade das células estromais por inibição da Rac1 ou de vias alternativas pode ser importante na inibição da implantação no RIF. Perante estas discrepâncias, mais estudos são necessários.⁵⁹

Interesse clínico dos biomarcadores endometriais

Ainda é importante sublinhar que a identificação dos fatores de risco para o RIF podem ser úteis na prática clínica,¹ considerando que a gestão terapêutica destas doentes é ainda desafiante e nenhuma terapia é consensual,²⁴ não existindo atualmente técnicas fiáveis que determinem a sincronia entre endométrio e embrião no momento da TE.⁴³

A compreensão da função dos biomarcadores endometriais e o seu papel na determinação da JI ajudará no diagnóstico e tratamento dos casais inférteis, de um modo mais eficiente,³ nomeadamente durante os processos de FIV e TE, permitindo reconhecer a JI e manter a RE.¹ Assim, a identificação de marcadores biológicos pode ter significância clínica promissora, pela melhoria das taxas de implantação em ciclos naturais e em TRA.³

Indubitavelmente, a identificação dos fatores predisponentes para a ocorrência de RIF tornará possível individualizar planos terapêuticos. Assim como o diagnóstico de recetividade do endométrio em doentes com RIF permitirá intervenções dirigidas em vez das atuais abordagens empíricas.¹

A título de exemplo, como destacado anteriormente nos tópicos respetivos, a deteção da expressão de pinopodes é útil na avaliação do momento ótimo para uma TE bem-sucedida.^{1,3} Similarmente, é evidente o interesse particular na testagem de número aumentado de células uNK entre as mulheres com RIF e no tratamento imunomodulador dirigido, que foi inclusivamente reportado por aumentar a taxa de nascimentos vivos entre estas mulheres.²

Ainda, a análise de expressão genética tendo em vista a determinação da JI individual e a promoção de uma TE personalizada,² assim como a manipulação da sinalização relacionada com os miRNA de modo a favorecer a implantação, são promissoras abordagens terapêuticas.⁵⁵ Assim, os fatores genéticos e epigenéticos podem ser benéficos na predição da taxa de sucesso de implantação na prática clínica.⁵⁵

A deteção dos biomarcadores no fluido uterino também é uma potencial abordagem não-invasiva.²⁰

Consequentemente, elucidar as interações entre fatores endócrinos, imunológicos, genéticos e histológicos que se correlacionam com alguns aspetos da função endometrial poderá ser a fundação para a descoberta de mecanismos e vias com importância clínica na avaliação da RE em TRA e na melhoria dos procedimentos diagnósticos relacionados com a infertilidade.¹⁰ Além disso, o conhecimento dos mesmos mecanismos pode ajudar a predizer o prognóstico no RIF.⁴

Conclusão

O RIF é um desafio em medicina de reprodução. Afeta a saúde física e mental das doentes e sendo causa frequente de desapontamento, tanto para os casais como para os profissionais de saúde.¹

Um dos seus fatores causadores major é uma RE comprometida.¹⁹

A precisão, reprodutibilidade e relevância funcional dos critérios de datação endometrial tradicionais, como a histologia, têm sido questionadas quanto à sua precisão, reprodutibilidade e relevância funcional, sendo de momento consideradas obsoletas.⁴² Assim surge a indubitável necessidade em identificar biomarcadores que influenciam o RIF, incluindo os das células endometriais. Tal pode, ainda, possibilitar o tratamento individualizado por aumento das taxas de implantação.¹

Até à data, os estudos associaram múltiplos potenciais biomarcadores e a ocorrência de RIF. Incluem-se biomarcadores clássicos há muito propostos pela maioria dos autores como os pinopodes, o LIF, a MUC-1 e a integrina $\beta 3$. Inúmeros outros fatores como hormonas e seus recetores, fatores angiogénicos, imunomoduladores e de crescimento explanados na presente revisão têm sido estudados e descritos como associados ao RIF.¹

A aplicação de novas tecnologias “-omics” para diagnóstico objetivo da RE têm emergido na tentativa de colmatar a falta de marcadores diagnósticos.⁴² Por exemplo, a identificação de miRNA, genes, seus polimorfismos e fatores de transcrição envolvidos na implantação embrionária, resposta imunitária e RE é benéfica para compreender a fisiopatologia do RIF e prever o sucesso de implantação na prática clínica.

Apesar dos sucessivos desenvolvimentos, os dados disponíveis relativamente à maioria dos biomarcadores endometriais propostos na literatura, até à data, são contraditórios, pelo que nenhum biomarcador foi, até à data, considerado ideal. Assim, são prementes estudos adicionais para validação de biomarcadores previamente propostos ou para identificação de novos marcadores com influência no RIF, tendo em vista a necessidade de métodos que permitam avaliar o risco, diagnosticar e auxiliar no tratamento da patologia.

Tabelas e figuras

Tabela 1 – Fatores de risco frequentemente descritos no RIF

	Fatores de risco de RIF	Referências	
Fatores maternos	Fatores anatómicos	Útero bicórneo, útero septado, miomas, pólipos endometriais, adesões intrauterinas, endometriose, hidossalpinge, etc.	1, 7, 24
	Fatores imunológicos	Células NK e Th	1, 7, 24
	Fatores biomoleculares	LIF, IL, outras citocinas e fatores de crescimento, moléculas de adesão, etc.	1, 7

	Fatores genéticos	Fatores de transcrição nuclear, miRNA, HLA-G, p53, VEGF, etc.	1, 24
	Fatores hematológicos	Trombofilia hereditária ou adquirida, Síndrome antifosfolipídico	1, 7
	Outros	Hormonais, metabólicos, infecciosos, autoimunes, GdA, etc.	1, 7, 24
	Estilo de vida	Tabagismo e IMC	7, 8
Fatores masculinos	Alterações do esperma	Oligoatenozoospermia e severa fragmentação do DNA	7, 24
Fatores embrionários	Genéticos	Aneuploidia	1, 7

Tabela 2 – Genes que variam em expressão na fase médio-secretora, durante a janela de implantação

Genes	Regulação	Referências
SPP1	+	5, 6, 21, 40-42
ApoD	+	5, 40, 41
ApoL	+	41
Laminina	+	40, 41
IL-15	+	5, 40, 41
CD55/DAF	+	5
DKK1	+	5, 21, 40
DPP4	+	41,42,43
Anexina A4	+	21, 40
Claudina 4	+	40
Glutathiona peroxidase	+	40-42
GADD45	+	5, 42
MAOA	+	5, 21, 42
MAP3K5	+	5
MFAP5 / MAGP2	+	41
ANGPTL1	+	41
EG-VEGF	+	41
GPX3	+	41
NLF2	+	21, 41
NLF1	+	21
PAEP	+	30, 42
S100P	+	21
CXCL14	+	30
CCND3	+	30
OLFM	-	5, 40, 42
MSX1	-	30
MSX2	-	41

SFRP4	-	42
EDN3	-	42
CRABP2	-	42
MMP-7	-	42

Legenda: + - Regulação positiva; - - Regulação negativa; SPP1 - Fosfoproteína secretada 1 ou osteopontina; ApoD e ApoL - Apolipoproteínas D e L; IL-15 - Interleucina 15 ou Glicodelina; CD55/DAF - Fator acelerador de decaimento; DKK1 - Dickkopf 1; DPP4 - Dipeptidil peptidase 4; GADD45 - Grupo de genes indutores de stress; MAOA - Monoaminoxidase A; MAP3K5 - proteína quinase 5 ativada por mitogénio; MFAP5 ou MAGP2 - Proteína 5 associada à microfibrilha; ANGPTL1 - Angiopoeitina-like 1; EG-VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular derivado de glândulas endócrinas; GPX3 - Glutathione peroxidase 3; NLF 1 e 2 - Fatores nucleares localizados 1 e 2; PAEP - Proteína endometrial associada ao progestagénio ou Glicodelina; S100P - Proteína ligante de cálcio S100; CXCL14 - Ligando 14 da quimiocina; CCND3 - Ciclina D3; OLFM - Olfactomedina; MSX1 e 2 - Msh homeobox homolog 1 e 2; SFRP4 - Proteína secretada relacionada com o *frizzle* 4; EDN3 - Endotelina 3; CRABP2 - Proteína de ligação do ácido retinóico celular 2; MMP-7 - Metaloproteinase 7.

Tabela 3 – Micro-RNA de regulação alterada no RIF.

miRNA	Alteração no RIF	Referências
miR-22	↑	55
miR-23b	↑	39
miR-30d	↓	19, 39, 55, 56
miR-31	↓	39, 55, 56
hsa-miR-32	↓	39
miR-34c-5p	↓	55
miR-99a	↑	39
miR-135b-5p	↑	55
miR-145	↑	39, 55
miR-148a-3p	↑	55
miR-155-5p	↑	55
miR-181	↓	55
hsa-miR-199a-5p	↑	4
hsa-miR-628-5p	↓	39
hsa-mi-R874	↓	39
miR-1290	↑	55
hsa-mi-R4306	↓	4

Legenda: ↑ - regulação aumentada; ↓ - regulação diminuída.

Referências

1. Mrozikiewicz AE, Ożarowski M, Jędrzejczak P. Biomolecular Markers of Recurrent Implantation Failure-A Review. *Int J Mol Sci* 2021;22(18).
2. Saxtorph MH, Hallager T, Persson G, Petersen KB, Eriksen JO, Larsen LG, et al. Assessing endometrial receptivity after recurrent implantation failure: a prospective controlled cohort study. *Reprod Biomed Online* 2020;41(6):998-1006.
3. Cavagna M, Mantese JC. Biomarkers of endometrial receptivity--a review. *Placenta* 2003;24 Suppl B:S39-47.
4. Shang J, Cheng YF, Li M, Wang H, Zhang JN, Guo XM, et al. Identification of Key Endometrial MicroRNAs and Their Target Genes Associated With Pathogenesis of Recurrent Implantation Failure by Integrated Bioinformatics Analysis. *Front Genet* 2022;13:919301.
5. Aghajanova L, Hamilton AE, Giudice LC. Uterine receptivity to human embryonic implantation: histology, biomarkers, and transcriptomics. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19(2):204-11.
6. Koot YE, Macklon NS. Embryo implantation: biology, evaluation, and enhancement. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2013;25(4):274-9.
7. Timeva T, Shterev A, Kyurkchiev S. Recurrent implantation failure: the role of the endometrium. *J Reprod Infertil* 2014;15(4):173-83.
8. Bashiri A, Halper KI, Orvieto R. Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. *Reprod Biol Endocrinol* 2018;16(1):121.
9. Craciunas L, Gallos I, Chu J, Bourne T, Quenby S, Brosens JJ, et al. Conventional and modern markers of endometrial receptivity: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2019;25(2):202-223.
10. Hviid Saxtorph M, Persson G, Hallager T, Birch Petersen K, Eriksen JO, Larsen LG, et al. Are different markers of endometrial receptivity telling us different things about endometrial function? *Am J Reprod Immunol* 2020;84(6):e13323.
11. Makker A, Tandon I, Goel MM, Singh M, Singh MM. Effect of ormeloxifene, a selective estrogen receptor modulator, on biomarkers of endometrial receptivity and pinopode development and its relation to fertility and infertility in Indian subjects. *Fertil Steril* 2009;91(6):2298-307.
12. Massimiani M, Lacconi V, La Civita F, Ticconi C, Rago R, Campagnolo L. Molecular Signaling Regulating Endometrium-Blastocyst Crosstalk. *Int J Mol Sci* 2019;21(1).
13. Wu F, Chen X, Liu Y, Liang B, Xu H, Li TC, et al. Decreased MUC1 in endometrium is an independent receptivity marker in recurrent implantation failure during implantation window. *Reprod Biol Endocrinol* 2018;16(1):60.
14. Campbell KL, Rockett JC. Biomarkers of ovulation, endometrial receptivity, fertilisation, implantation and early pregnancy progression. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2006;20 Suppl 1:13-25.

15. Benkhalifa M, Zidi W, Bahri H, Mahjoub S, Boudhraa K, Sanhaji H, et al. Circulating MMP-7 and VEGF as potential predictive biomarkers for recurrent implantation failures. *Zygote* 2021;29(5):365-371.
16. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update* 2006;12(6):731-46.
17. Liu L, Wang Y, Chen X, Tian Y, Li TC, Zhao L, et al. Evidence from three cohort studies on the expression of MUC16 around the time of implantation suggests it is an inhibitor of implantation. *J Assist Reprod Genet* 2020;37(5):1105-1115.
18. Wu F, Mao D, Liu Y, Chen X, Xu H, Li TC, et al. Localization of Mucin 1 in endometrial luminal epithelium and its expression in women with reproductive failure during implantation window. *J Mol Histol* 2019;50(6):563-572.
19. Zhao Y, He D, Zeng H, Luo J, Yang S, Chen J, et al. Expression and significance of miR-30d-5p and SOCS1 in patients with recurrent implantation failure during implantation window. *Reprod Biol Endocrinol* 2021;19(1):138.
20. Wang L, Lv S, Mao W, Pei M, Yang X. Assessment of endometrial receptivity during implantation window in women with unexplained infertility. *Gynecol Endocrinol* 2020;36(10):917-921.
21. Zhang D, Sun C, Ma C, Dai H, Zhang W. Data mining of spatial-temporal expression of genes in the human endometrium during the window of implantation. *Reprod Sci* 2012;19(10):1085-98.
22. Edgell TA, Evans J, Lazzaro L, Boyes K, Sridhar M, Catt S, et al. Assessment of potential biomarkers of pre-receptive and receptive endometrium in uterine fluid and a functional evaluation of the potential role of CSF3 in fertility. *Cytokine* 2018;111:222-229.
23. Vialard F, El Sirkasi M, Tronchon V, Boudjenah R, Molina-Gomes D, Bergere M, et al. Tumor necrosis factor-308 polymorphism increases the embryo implantation rate in women undergoing in vitro fertilization. *Hum Reprod* 2013;28(10):2774-83.
24. Kolanska K, Bendifallah S, Cohen J, Placais L, Selleret L, Johanet C, et al. Unexplained recurrent implantation failures: Predictive factors of pregnancy and therapeutic management from a French multicentre study. *J Reprod Immunol* 2021;145:103313.
25. Kolanska K, Suner L, Cohen J, Ben Kraiem Y, Placais L, Fain O, et al. Proportion of Cytotoxic Peripheral Blood Natural Killer Cells and T-Cell Large Granular Lymphocytes in Recurrent Miscarriage and Repeated Implantation Failure: Case-Control Study and Meta-analysis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2019;67(4):225-236.
26. Cavalcante MB, Barini R, Kwak-Kim J. Endometrial scratching for embryo implantation failure-uterine immune biomarkers as a selection criterion. In: *Hum Reprod. England*; 2021. p. 1446-1447.
27. Lin JZ, Lin N. Three Oxidative Stress-Related Genes That Associate Endometrial Immune Cells Are Considered as Potential Biomarkers for the Prediction of Unexplained Recurrent Implantation Failure. *Front Immunol* 2022;13:902268.

28. Freitag N, Pour SJ, Fehm TN, Toth B, Markert UR, Weber M, et al. Are uterine natural killer and plasma cells in infertility patients associated with endometriosis, repeated implantation failure, or recurrent pregnancy loss? *Arch Gynecol Obstet* 2020;302(6):1487-1494.
29. Maia-Filho VO, Rocha AM, Ferreira FP, Bonetti TC, Serafini P, Motta EL. Matrix metalloproteinases 2 and 9 and e-cadherin expression in the endometrium during the implantation window of infertile women before in vitro fertilization treatment. *Reprod Sci* 2015;22(4):416-22.
30. Zeng H, Fu Y, Shen L, Quan S. Integrated Analysis of Multiple Microarrays Based on Raw Data Identified Novel Gene Signatures in Recurrent Implantation Failure. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;13:785462.
31. Vilella F, Ramirez L, Berlanga O, Martínez S, Alamá P, Meseguer M, et al. PGE2 and PGF2 α concentrations in human endometrial fluid as biomarkers for embryonic implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(10):4123-32.
32. Bastu E, Mutlu MF, Yasa C, Dural O, Nehir Aytan A, Celik C, et al. Role of Mucin 1 and Glycodelin A in recurrent implantation failure. *Fertil Steril* 2015;103(4):1059-1064.e2.
33. Esmailzadeh S, Mohammadi A, Mahdinejad N, Ghofrani F, Ghasemzadeh-Hasankolaei M. Receptivity markers in endometrial mesenchymal stem cells of recurrent implantation failure and non-recurrent implantation failure women: A pilot study. *J Obstet Gynaecol Res* 2020;46(8):1393-1402.
34. Chen G, Xin A, Liu Y, Shi C, Chen J, Tang X, et al. Integrins β 1 and β 3 are biomarkers of uterine condition for embryo transfer. *J Transl Med* 2016;14(1):303.
35. Yang Y, Chen X, Saravelos SH, Liu Y, Huang J, Zhang J, et al. HOXA-10 and E-cadherin expression in the endometrium of women with recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2017;107(1):136-143.e2.
36. Guo F, Si C, Zhou M, Wang J, Zhang D, Leung PCK, et al. Decreased PECAM1-mediated TGF- β 1 expression in the mid-secretory endometrium in women with recurrent implantation failure. *Hum Reprod* 2018;33(5):832-843.
37. Bi Y, Huang W, Yuan L, Chen S, Liao S, Fu X, et al. HOXA10 improves endometrial receptivity by upregulating E-cadherin \uparrow . *Biol Reprod* 2022;106(5):992-999.
38. Coulam CB, Jeyendran RS, Roussev R. Association of progesterone receptor polymorphisms with recurrent implantation failure after in vitro fertilization and embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 2008;25(4):119-22.
39. Galliano D, Pellicer A. MicroRNA and implantation. *Fertil Steril* 2014;101(6):1531-44.
40. Hernández-Vargas P, Muñoz M, Domínguez F. Identifying biomarkers for predicting successful embryo implantation: applying single to multi-OMICs to improve reproductive outcomes. *Hum Reprod Update* 2020;26(2):264-301.
41. Haouzi D, Mahmoud K, Fourar M, Bendhaou K, Dechaud H, De Vos J, et al. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum Reprod* 2009;24(1):198-205.

42. Altmäe S, Koel M, Võsa U, Adler P, Suhorutšenko M, Laisk-Podar T, et al. Meta-signature of human endometrial receptivity: a meta-analysis and validation study of transcriptomic biomarkers. *Sci Rep* 2017;7(1):10077.
43. 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):810-7.
44. He A, Zou Y, Wan C, Zhao J, Zhang Q, Yao Z, et al. The role of transcriptomic biomarkers of endometrial receptivity in personalized embryo transfer for patients with repeated implantation failure. *J Transl Med* 2021;19(1):176.
45. Norman RJ. Biomarkers of endometrial receptivity through a minimally invasive approach. *Fertil Steril* 2013;100(3):654-5.
46. Chan C, Brown TJ, Greenblatt EM. Response to editorial entitled "Biomarkers of endometrial receptivity through a minimally invasive approach". *Fertil Steril* 2013;100(3):e11.
47. Albayrak İ G, Azhari F, Çolak EN, Balcı BK, Ülgen E, Sezerman U, et al. Endometrial gene expression profiling of recurrent implantation failure after in vitro fertilization. *Mol Biol Rep* 2021;48(6):5075-5082.
48. Wang C, Feng Y, Zhou WJ, Cheng ZJ, Jiang MY, Zhou Y, et al. Screening and identification of endometrial proteins as novel potential biomarkers for repeated implantation failure. *PeerJ* 2021;9:e11009.
49. Zhai J, Yao GD, Wang JY, Yang QL, Wu L, Chang ZY, et al. Metformin Regulates Key MicroRNAs to Improve Endometrial Receptivity Through Increasing Implantation Marker Gene Expression in Patients with PCOS Undergoing IVF/ICSI. *Reprod Sci* 2019;26(11):1439-1448.
50. Zhao H, Chen L, Shan Y, Chen G, Chu Y, Dai H, et al. Hsa_circ_0038383-mediated competitive endogenous RNA network in recurrent implantation failure. *Aging (Albany NY)* 2021;13(4):6076-6090.
51. Nowak I, Wilczyńska K, Wilczyński JR, Malinowski A, Radwan P, Radwan M, 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.
52. Eker C, Basdas R, Balci BK, Bastu E, Gunel T. The genomic analysis of endometrial mitochondrial DNA copy number variation on recurrent implantation failure. *J Gynecol Obstet Hum Reprod* 2021;50(2):101945.
53. Xiong Y, Wang J, Liu L, Chen X, Xu H, Li TC, et al. Effects of high progesterone level on the day of human chorionic gonadotrophin administration in in vitro fertilization cycles on epigenetic modification of endometrium in the peri-implantation period. *Fertil Steril* 2017;108(2):269-276.e1.
54. Zeng H, Fu Y, Shen L, Quan S. MicroRNA signatures in plasma and plasma exosome during window of implantation for implantation failure following in-vitro fertilization and embryo transfer. *Reprod Biol Endocrinol* 2021;19(1):180.

55. Goharitaban S, Abedelahi A, Hamdi K, Khazaei M, Esmailivand M, Niknafs B. Role of endometrial microRNAs in repeated implantation failure (mini-review). *Front Cell Dev Biol* 2022;10:936173.
56. Cretoiu D, Xu J, Xiao J, Suci N, Cretoiu SM. Circulating MicroRNAs as Potential Molecular Biomarkers in Pathophysiological Evolution of Pregnancy. *Dis Markers* 2016;2016:3851054.
57. Teague EM, Print CG, Hull ML. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Hum Reprod Update* 2010;16(2):142-65.
58. Li T, Greenblatt EM, Shin ME, Brown TJ, Chan C. Cargo small non-coding RNAs of extracellular vesicles isolated from uterine fluid associate with endometrial receptivity and implantation success. *Fertil Steril* 2021;115(5):1327-1336.
59. Grewal S, Carver JG, Ridley AJ, Mardon HJ. Implantation of the human embryo requires Rac1-dependent endometrial stromal cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(42):16189-94.