

Perubahan morfologi pinopod endometrium *Macaca nemestrina* setelah pemberian hiperstimulasi ovarium terkendali (HOT)

[Morphological changes of the endometrium pinopod *Macaca nemestrina* after administration of a controlled ovarian hyperstimulation (HOT)]

Nurhuda^{1*}, Rachman IA¹, Sajuthi D², Siregar NC¹ dan Yusuf TL²

¹ Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

² Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

*Korespondensi: nurhudasahar@yahoo.com

Abstract. Pinopod is a morphological marker of maturity endometrial implantation phase that can be detected by scanning electron microscope technique. In this study will be evaluated the morphological changes of the endometrium pinopod of *Macaca nemestrina* in middle luteal phase after administration of controlled ovarian hyperstimulation. The purpose of this study was to assess the effect of controlled ovarian hyperstimulation against pinopod morphological changes. *Macaca nemestrina* against ovarian stimulator injected dose of 30-70 IU for 10-12 days. Metode is a combination of GnRH agonist (long protocole) combined with recombinant FSH began the second day after menstruation to obtain the highest peak hormone estradiol in the follicular phase. Uterine tissue sampling conducted in the middle of the luteal phase (days 8-9 after the peak secretion of the hormone estradiol). Pinopod morphological assessment is done through the technique of scanning electron microscope (SEM). The result, as many as 11 samples were analyzed by SEM showed about 18% pinopod development in the early stages, 36% and 46% maximum stage regression phase. Based on the ratio of progesterone / estradiol, pinopod maximum stage of development occurs in the value of the ratio of 0.20 to 0.49 and regression phase is between 0.25 to 7.34. Based on the results obtained it can be concluded that the implantation window open on the ratio of progesterone / estradiol ratio of 0.20 to 0.49 and closed at 0.25 to 7.34.

Key word: *controlled ovarium hyperstimulation, endometrial pinopod, progesterone/estradiol ratio, window implantation*

Pendahuluan

Implantasi merupakan proses kompleks yang melibatkan interaksi antara embrio dengan endometrium. Oleh sebab itu kualitas embrio dan status endometrium adalah faktor yang sangat penting untuk keberhasilan implantasi dan kehamilan. Persiapan endometrium menerima implantasi blastosis dimulai dari perubahan-perubahan yang terjadi selama siklus haid. Rangkaian perubahan tersebut melibatkan unsur molekul dan struktur yang mengarah pada satu tahap atau periode dimana endometrium reseptif menerima implantasi blastosis atau periode jendela implantasi. Pada siklus haid wanita normal 28 hari jendela implantasi terbuka pada fase luteal tengah yaitu hari ke 21 siklus haid. Selama jendela implantasi terbuka membran epitel luminal endometrium kehilangan mikrovili dan pada permukaan membran apikal sel epitel mengalami perkembangan membentuk pinopod (Morphy 2000 dan Lopatta *et al.* 2002). Dengan menggunakan mikroskop elektron terlihat bahwa pinopod muncul dari satu sel dan mencakup sebagian permukaan sel epitel luminal endometrium (Nikas 2000). Biopsi endometrium yang dilakukan 6 hari setelah ovulasi ditemukan

pinopod sebesar 78% (Nikas 1999).

Pinopod muncul dari permukaan membran apikal epitel luminal endometrium selama jendela implantasi. Morfologi pinopod pertama kali diidentifikasi pada mencit, tikus dan manusia sedangkan pada primata belum ada publikasi (Nilson 1958, Johanninson dan Nilson 1972, Martel *et al.* 1987 dan Quinn *et al.* 2007). Durasi tampilan pinopod berlangsung selama periode waktu yang singkat bersamaan dengan terbukanya jendela implantasi. Beberapa peneliti menyebutkan bahwa pinopod merupakan petanda yang akurat dari jendela implantasi. Lamanya periode jendela implantasi terbuka terdapat perbedaan diantara hasil-hasil penelitian. Beberapa laporan menyebutkan jendela implantasi terbuka selama 48 jam yaitu hari ke 20-22 pada siklus haid normal (D'Novo *et al.* 1991, Bergh dan Novoat 1992, Davis dan Rozenwaks 1993, Klentzeis 1997, dan Sarani *et al.* 1999).

Tampilan pinopod pada epitel luminal endometrium dipengaruhi oleh hormon steroid terutama progesteron (Starvres-Evers *et al.* 2001). Diperlukan keseimbangan antara kadar hormon estradiol dan progesteron untuk perkembangan maksimal pinopod. Perubahan molekuler dan seluler untuk pematangan

endometrium dipengaruhi oleh estradiol dan progesteron, sedangkan pematangan endometrium fase luteal tengah dipengaruhi progesteron tanpa estradiol. Kegagalan implantasi pada siklus yang dirangsang dengan stimulasi ovarium, akibat ketidakseimbangan hormon steroid. Pemberian estradiol dosis tinggi yang dikombinasikan dengan progesteron pada periode sebelum perkembangan, menghambat pembentukan pinopod, sebaliknya dosis rendah tidak mengganggu perkembangan pinopod (Martel et al. 1991).

Tujuan penelitian ini untuk melihat pengaruh perubahan kadar hormon estradiol dan progesteron akibat pemberian stimulator ovarium terhadap perkembangan pinopod endometrium *Macaca nemestrina* fase luteal tengah.

Metode Penelitian

Nekropsi jaringan endometrium fase luteal tengah diambil dari 11 *Macaca nemestrina*, dari siklus normal dan siklus dirangsang dengan pemberian stimulator ovarium. Semua sampel berasal dari siklus haid normal 28-32 hari.

Hewan coba yang digunakan pada beruk (*Macaca nemestrina*) betina usia reproduktif. Hewan tersebut berasal dari penangkaran di Pusat Studi Satwa Primata (PSSP) IPB Bogor.

Kriteria hewan yang digunakan adalah hewan betina reproduktif (pernah beranak), umur 8-10 tahun dan bobot sekitar 5-8 kg. Semua prosedur dan penggunaan hewan coba telah dapat persetujuan *Institutional Animal Care & Use Committee* (ACUC) Pusat Studi Satwa Primata Institut Pertanian Bogor (IPB) Bogor. Jumlah hewan yang digunakan 16 ekor (masing-masing 4 ekor setiap ulangan), umur 5-8 tahun, bobot badan 8-10 kg dan pernah melahirkan.

Hewan yang telah diseleksi diberi tanda (nomor tato) dan selanjutnya dimasukan ke kandang individual yang terbuat dari *stainless steel* dan ditempatkan dalam suatu ruangan tertutup. Hewan tersebut dikarantinakan atau diadaptasikan di kandang tersebut selama 2-3 periode siklus haid. Selama periode ini kesehatan hewan dijaga dan dilakukan pengobatan jika perlu.

Regimen stimulator ovarium dan prosedur pemberian

Ada tiga jenis regimen obat-obatan yang digunakan pada penelitian ini yaitu rekombinan FSH (Gonal-F), GnRH agonist (suprepart) dan *pregnyl*. Dosis Gonal-F 30-70 IU/kgBB selama 10-12 pemberian. Dosis GnRH yaitu 160 ug/kgBB/hari selama 14 hari dan dosis *pregnyl* adalah 3200 IU/hari/kgBB. Pemberian regimen

stimulator ovarium dilakukan prosedur kombinasi GnRH agonist dosis panjang yang dikombinasikan dengan pemberian Gonal-F selama 10-12 hari (*long protocole*).

Metode pemberian obat-obatan protokol stimulasi ovarium terkendali yaitu kombinasi rFSH dengan GnRH protokol panjang. Pemberian GnRH mulai dilakukan pada pertengahan fase luteal siklus haid sebelumnya. Hari kedua setelah menstruasi periode berikutnya dilakukan pemberian GnRH dikombinasikan dengan gonadotropin (Gonal-F) sesuai dosis. Pemberian Gonal berlangsung selama 10-12 hari sampai diperoleh puncak tertinggi sekresi estradiol. Setelah diperoleh puncak tertinggi sekresi estradiol dilanjutkan dengan pemberian hCG (*pregnyl*) dosis 10 000 unit atau setara 3200 IU unit pada *Macaca nemestrina*. Penentuan fase luteal mulai dilakukan melalui pengukuran kadar progesteron serial mulai hari kedua setelah ovulasi.

Pengambilan darah

Pengambilan darah setiap individu dilakukan bersamaan dengan pemberian stimulator ovarium, kecuali kelompok kontrol. Pengambilan dilakukan sebanyak 14-15 kali per individu, 10-12 kali pada fase folikuler dan 4-5 kali pada fase sekresi. Pengambilan dimulai hari kedua setelah menstruasi sampai fase sekresi tengah (hari ke 21 siklus haid.) dengan interval sehari dua kali. Pengambilan darah dilakukan pagi hari sekitar jam 09.00 (setelah selesai penyuntikan obat obat stimulator ovarium). Hewan dalam keadaan puasa, kemudian disedasi dengan ketamin HCl 10 mg/kgBB. Darah diambil sebanyak 5 ml dari vena femoralis di daerah lipatan paha. Prosedurnya sebagai berikut, hewan diletakan dengan posisi dorso-lateral dengan kedua kaki belakang dijulurkan. Daerah segitiga femoralis dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian diraba vena femoralis dengan ibu jari. Jarum venoject dimasukkan sampai mencapai vena femoralis dengan sudut jarum 45-60° dan sisi lain jarum dimasukkan dalam tabung *vacutaner*. Darah yang masuk dalam tabung *vacutaner* selanjutnya disentrifugasi 2500 rpm selama 15 menit. Serum dipisahkan ketabung polipropilen dan disimpan -20°C sebelum dilakukan pengukuran.

Pengukuran kadar hormon steroid serum

Hormon estradiol dan progesteron diukur dengan metode *Chemiluminescent Competitive Immunoassay* (*Siemen Diagnostic*). Antibodi poliklonal steroid yang terikat pada *bead* diinkubasi bersama dengan antibodi kedua yang telah dilapisi dengan enzim alkalin ptofatase

dan serum sampel selama 60 menit suhu 37°C. Selama periode inkubasi terjadi kompetisi steroid sampel dengan steroid berlabel enzim untuk berikatan dengan antibodi yang terikat *bead*. Konjugate yang tidak berikatan dibuang saat pencucian. Selanjutnya ditambahkan substrat *chemiluminescent* dan inkubasi selama 10 menit. Warna yang timbul akibat hidrolisis dari enzim alkaline fosfatase terhadap substrat diukur dengan luminometer. Uji sensitifitas untuk estradiol 15 pg/ml dan koefisien antara *assay* 6,3%. Uji sensitivitas untuk progesteron 0,2 ng/ml dan koefisien antar *assay* 6,3%. Sebelum pemeriksaan semua sampel serum dan reagen disimpan pada suhu -20°C sampai dilakukan pengukuran.

Pengambilan jaringan uterus

Pengambilan uterus (nekropsis) dilakukan pada fase sekresi tengah yaitu antara hari ke 8-9 setelah puncak sekresi estradiol folikuler akhir. Sebelum dilakukan operasi, hewan disedasi dengan ketamine 0.1 mL/kgBB. dan selanjutnya dilakukan nekropsis uterus. Organ uterus dipotong secara sagital dari fundus kearah servik (A), setelah uterus terbagi dua dilanjutkan pemotongan secara transversal sebanyak 3 bagian (B) dengan ketebalan lebih kurang 5 cm setiap potongan. Potongan pertama disimpan dalam larutan penyangga formalin sebagai sampel pemeriksaan penanda kematangan endometrium secara imunohistokimia dan porsi kedua disimpan dalam penyangga gulutaraldehyde untuk menilai morfologi endometrium secara *scanning electron microscope* (SEM) dan porsi ke tiga disimpan pada suhu -84°C untuk analisis biomolekuler.

Pemeriksaan pinopod endometrium

Pemeriksaan pinopod endometrium dilakukan dengan teknik *scanning electron microscope* (SEM). Jaringan uterus dipotong dengan ukuran sampel 1 mm³ dicuci dengan NaCl dan selanjutnya direndam dalam penyangga *coccolidate* selama lebih kurang 2 jam, selanjutnya diagitasi dengan *ultrasonic cleaner* selama 15-20 menit. Tahap selanjutnya sampel direndam dalam penyangga *glutaraldehyde* 2,5% selama beberapa jam sampai 2 hari. Pada tahap fiksasi sampel direndam lagi dalam larutan *tanic acid* 2% selama 6 jam sampai beberapa hari, kemudian dicuci dalam penyangga *coccolidate* selama 5 menit dengan empat kali pergantian penyangga. Tahap dehidrasi, sampel direndam dalam etanol bertingkat (50%) selama 5 menit, empat kali pergantian, (70%) selama 20 menit, (85%) selama 20 menit, (95%) selama 20 menit dan

terakhir etanol absolut selama 10 menit, dua kali pergantian. Selanjutnya sampel direndam dalam *tertier butanol* selama 10 menit, dua kali pergantian, dibekukan dalam *freezer* dan selanjutnya dikeringkan dengan *Freezed drier*. Sampel di *mounting* dan di *coated* dengan *system ion coater IB2* dan diamati dibawah mikroskop elektron pembesaran 2000 x.

Penilaian tahapan perkembangan pinopod

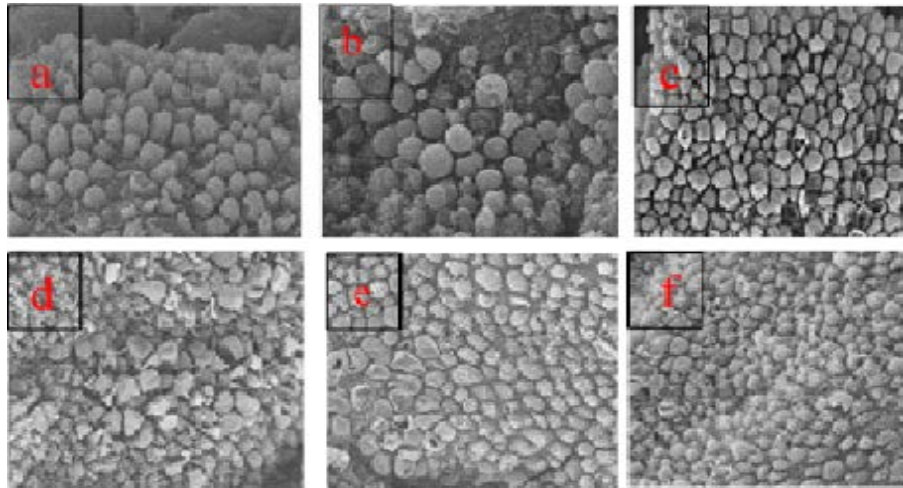
Tahapan perkembangan morfologi pinopod diklasifikasikan menurut metode Bentin-Ley *et al.* 1999. Ada tiga klasifikasi perkembangan pinopod yaitu perkembangan awal, maksimal dan kemunduran. Perkembangan awal ditandai ukuran pinopod kecil, halus seperti jamur kadang masih ditutupi mikrovili pendek. Perkembangan maksimal ditandai dengan ukuran lebih besar, tonjolan agak licin. Perkembangan mundur, pinopod mulai keriput seperti bola kempes.

Hasil dan pembahasan

Ekspresi pinopod pada epitel luminal endometrium

Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan pinopod *Macaca nemestrina* pada endometrium yang diambil pada hari ke 8-9 setelah puncak sekresi estradiol fase folikuler akhir. Tidak diperoleh gambaran morfologi pinopod yang sama pada semua sampel yang diperiksa. Hasil foto mikroskop elektron menunjukkan dari 11 sampel yang diperiksa secara umum terdapat tiga tahap perkembangan endometrium. Tahap pertama, morfologi pinopod ditandai dengan ukuran sel lebih kecil, hampir semua sel ditutupi mikrovili, jarak antara sel masih rapat. Tahap ini disebut sebagai periode awal dan ditemukan sebesar 18%. Tahap kedua yaitu perkembangan maksimal, tahap ini ditandai dengan ukuran sel lebih besar, permukaan sel licin, tidak ditemukan mikrovili dan terjadi pengelembungan pada bagian apikal sel ke arah lumen endometrium. Tahap perkembangan maksimal ini ditemukan sebanyak empat sampel (36%). Tahap ketiga disebut fase regresi, bagian ujung terbentuk lobang-lobang kecil, jarak antar sel renggang dan di beberapa bagian ditemukan silia. Pada tahap regresi diperoleh lima sampel atau sebesar 46%. Pada Gambar 1 ditampilkan tahapan perkembangan pinopod epitel luminal endometrium *Macaca nemestrina*. Gambar 1a menunjukkan perkembangan awal, 1b dan 1c perkembangan penuh, 1d, 1e dan 1f adalah tahap regresi/kemunduran.

Pada awalnya perkembangan endometrium menunjukkan pola yang sama yaitu ditandai dengan bentuk dan ukuran



Gambar 1 Tahapan perkembangan pinopod epitel uminal endometrium *Macaca nemestrina* (Scanning electron microscope) perbesaran asli 2000 x)

- Pinopod belum berkembang secara maksimal, mikrovili masih terlihat agak panjang dan tegak.
- Pinopod berkembang sepenuhnya, terjadi penggelembungan sel kearah lumen, mikrovili tidak terlihat.
- Pinopod masih berkembang dan sebagian sudah mulai menurun, mikrovili belum terlihat.
- Pinopod masih terlihat dan pada banyak sel mikrovili sudah tampak.
- Hampir semua sel sudah megalami kemunduran perkembangan, dan hampir semua sel ditutupi mikrovili.
- Semua sel mengalami kemunduran perkembangan, semua sel ditutupi mikrovili.

sel serta mikrovili yang bervariasi. Pada fase folikuler terlihat semua sel ditutupi mikrovili panjang dan tegak. Selanjutnya pada fase sekresi terutama sekresi tengah terjadi perubahan morfologi yaitu mikrovili mulai hilang dan ukuran besar menjadi lebih besar dengan permukaan licin dan terjadi penggelembungan maksimal pada membra apical sel kearah lumen endometrium. Perkembangan maksimal membran apikal ini merupakan petanda struktur untuk menyatakan bahwa endometrium berada pada fase reseptif untuk menerima implantasi embrio. Periode ini berlangsung dalam jangka waktu singkat yaitu antara 24-48 jam. Pada manusia penerimaan endometrium bertepatan dengan perkembangan maksimal pinopod

(Nikas *et al.* 1995, Kolb *et al.* 1997 dan Garcia Velasco *et al.* 2001). Setelah periode tersebut mulai terjadi penurunan perkembangan pinopod, mikrovili muncul kembali dan sel mulai agak keriput dan sebagian mengalami regresi.

Pada penelitian ini perkembangan maksimal endometrium yang diambil pada fase luteal tengah ditemukan 36% berada pada tahap maksimal, 46% tahap regresi dan 18% tahap perkembangan awal. Dari 11 sampel yang diperiksa tidak semua endometrium yang diambil pada fase sekresi tengah berada dalam tahap reseptif untuk menerima implantasi blastosis. Berdasarkan hasil yang diperoleh 36% kondisi endometrium reseptif menerima implantasi blastosis.

Tabel 1 Rasio progesteron/estradiol dan tahap perkembangan pinopod

Progesteron (ng/mL)	Estradiol(pg/mL)	Rasio P4/E2	Tahap Perkembangan	Skor
0,30	610	0,49	penuh (p)	3
0,25	1319	0,20	penuh (p)	3
0,25	1139	0,22	penuh (p)	3
0,25	635	0,39	awal (a)	2
5,30	772	7,34	regresi ®	1
0,25	509	0,49	regresi ®	1
0,25	426	0,58	regresi ®	1
0,49	552	0,88	regresi ®	1
0,45	1756	0,26	regresi ®	1
10,32	917	1,25	regresi ®	1

Menurut Nikas *et al.* 1999 terdapat perbedaan pola perkembangan pinopod antara siklus diranjang stimulasi ovarium dengan siklus alamiah. Periode pematangan pinopod pada siklus diranjang mengalami kemajuan 1-2 hari. Dampak penyimpangan periode perkembangan ekspresi pinopod yaitu terjadi pergeseran jendela implantasi, sehingga terjadi hubungan yang tidak sinkron antara blastosis dengan epitel endometrium saat implantasi.

Pengaruh hormon estradiol dan progesteron terhadap ekspresi pinopod

Hormon estrogen dan progesteron mempunyai peranan penting dalam mendukung pembentukan endometrium yang reseptif untuk menerima implantasi embrio. Estradiol yang disekresi fase sebelum ovulasi merangsang proliferasi dan diferensiasi sel-sel endometrium. Setelah ovulasi, progesteron dilepaskan dari korpus luteum yang baru terbentuk dan mengubah endometrium menjadi struktur yang sekretorik dan reseptif.

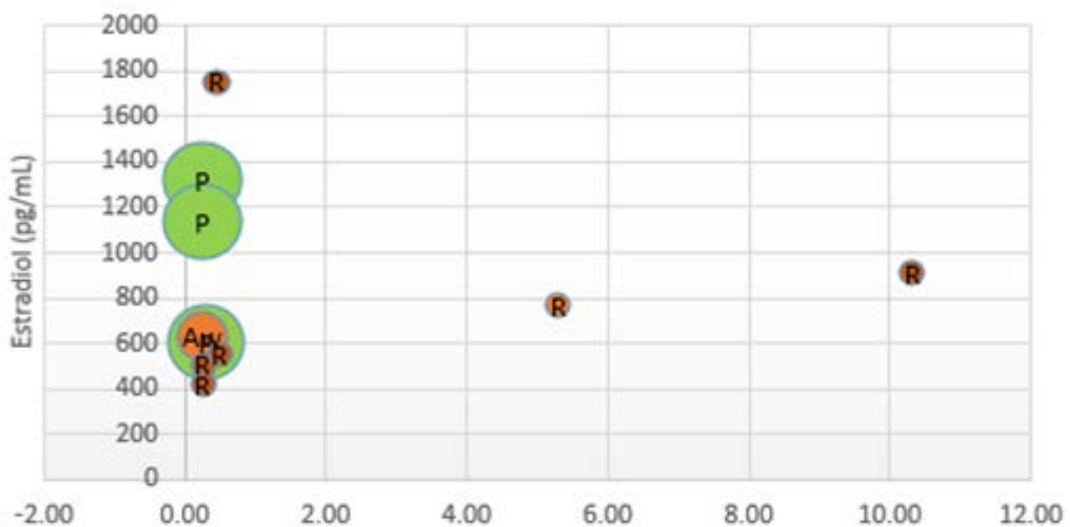
Beberapa peneliti melaporkan bahwa perkembangan maksimal morfologi pinopod dipengaruhi hormon steroid terutama progesteron. Pada kadar progesteron <1 ng/mL, perkembangan pinopod di fase luteal tengah belum mencapai tahap maksimal. Sebaliknya bila kadar progesterone >4 ng/mL perkembangan pinopod mengalami kemunduran atau regresi. Kadar progesteron antara 2-4 ng/mL menunjukkan perkembangan maksimal pinopod. Berdasarkan hasil ini dapat dilihat

perkembangan pinopod, pada pengambilan sampel hari yang sama dipengaruhi oleh hormon. Penelitian Singh *et al.* 1996 pada tikus membuktikan bahwa tampilan pinopod maksimal terjadi pada tikus yang diberi progesteron selama 3 hari dan tidak terjadi pada pemberian estradiol (Singh *et al.* 1996). Selain itu kadar estradiol dan progsteron tinggi akibat hiperstimulasi ovarium berdampak buruk terhadap perkembangan pinopod. Dampak buruk pergeseran periode implantasi yang maju beberapa hari dan keterlambatan proses pematangan epitel dan stroma endometrium.

Pada penelitian ini dibandingkan perkembangan pinopod periode awal, perkembangan maksimal dan perkembangan akhir (regresi) dengan rasio kadar hormon progesteron fase luteal tengah dengan estradiol folikuler akhir.

Pada Gambar 2 ditampilkan perkembangan morfologi pinopod dalam tiga kategori yaitu fase perkembangan awal (aw), fase perkembangan penuh (p) dan fase regresi (r). Ketiga fase perkembangan tersebut dihubungkan dengan rasio progesteron/estradiol (P4/E2). Tahap perkembangan awal ditemukan pada rasio P4/E2 0,39 tahap perkembangan maksimal ditemu kan pada rasio antara 0,20-0,49 dan tahap regresi ditemukan sebesar 80% terdapat pada rasio antara 0,26-7,34.

Pada penelitian ini ditemukan tiga tahap perkembangan pinopod epitel luminal endometrium yang diambil pada fase luteal tengah. Tahap perkembangan tersebut yaitu tahap awal, maksimal dan tahap regresi.



Gambar 2 Grafik Rasio Progesteron/estradiol terhadap tahapan perkembangan pinopod.

- Aw%, Tahapan perkembangan awal pinopod terjadi pada rasio 0.39
- P,% Tahapan perkembangan penuh pinopod, terjadi pada rasio 0.20-0,49
- R%, Tahapan perkembangan akhir/regresi, terjadi pada rasio 0.26-7,34

Dari 11 sampel yang berhasil diperiksa 4 sampel (36%) menunjukkan tahap perkembangan maksimal. Morfologi pinopod tahap maksimal ditandai dengan munculnya proyeksi seperti bola kecil tanpa sel-sel mikrovili pada permukaan sel apikal endometrium. Kehadiran pinopod berlangsung dalam jangka waktu terbatas yaitu pada periode implantasi. Beberapa peneliti melaporkan keberadaannya hanya berlangsung selama 2 hari, yaitu hari ke 21-22 (Nikas *et al.* 1995).

Kehadiran pinopod pada membran apikal endometrium diduga tergantung pada keseimbangan progesteron dan estradiol. Pada penelitian ini diperoleh hasil nilai rasio progesteron/estradiol terhadap perkembangan maksimal pinopod berkisar antara 0,20-0,49 dan tahap regesi terjadi pada rasio 0,25-7,34.

Kadar progesteron tinggi akibat stimulasi ovarium berpengaruh terhadap struktur endometrium. Dampak yang terjadi antara yaitu pergeseran periode pematangan endometrium. Jika biopsi endometrium dilakukan pada periode implantasi, maka akan diperoleh struktur endometrium yang tidak sesuai dengan fase haid normal (Salehnia 2003).

Simpulan

Dari 11 sampel pinopod yang diperiksa dapat disimpulkan bahwa pemberian stimulator ovarium tidak mengubah durasi dan pola perkembangan pinopod. Penyimpangan tahap perkembangan morfologi pinopod dari endometrium yang diambil pada fase implantasi kemungkinan terjadi karena pergeseran jendela implantasi yang mengalami kemajuan selama beberapa hari. Perkembangan maksimal pinopod, terjadi pada rasio progesteron/estradiol 0.20-0,49.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof drh Dondin Sajuthi, Ph.D, Prof Tuty L. Yusuf, drh Permana atas bantuannya selama penelitian. Ucapan terima kasih juga disampaikan pada institusi PSSP atas bantuan penyediaan hewan coba (*Macaca nemestrina*). Selain PSSP, penelitian ini mendapat bantuan dari program RUUI unggulan UI tahun 2009.

Daftar Pustaka

Bentin-Ley U, Sjogrena, Nilsson L, Hamberger L, Larsen JF, Horn T. 1999. Present of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation. *Hum Reprod.* 14: 515-520
Bergh PA and Novaot D. 1992. The impact

of embrionic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil Steril.* 58: 537-542

Davis MC and Rozenwaks Z. 1993. Preparation of endometrium for egg donation. *J. Assisted Reprod Genet.* 10: 457-459

D. Novot RT, Scott K, Droesch et al. 1991. The window of embryo transfer and efficiency of human conception in vitro. *Fertil Steril.* 55: 114-118

Garcia-Velasco JA, Nikas G, Remohi J, Pellicer A, Simon C. 2001. Endometrial receptivity in terms of pinopode expression is not impaired in women with endometriosis in artificially prepared cycles. *Fertil Steril.*: 1231-33

Johannisson E and Nilsson L. 1972. Scanning electron microscopic study of the human endometrium. *Fertil Steril.* 23:613-625

Klentzeis LD. 1997. The role of endometrium in implantation. *Hum Reprod.* 1997; 12: 170-175

Kolb AB, Najmabadi S, Paulson RJ. 1997. Ultrastructural characteristics of the luteal phase endometrium in donors undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil. Steril.* 67: 625-630

Lopata A, Bentin-Ley U, Enbders A. 2002. Pinopod and implantation. Review in *Endocrine and Metabolic Disorder.* 3: 77-86

Martel D, Frydman R, Glissant M, Maggioni C, Roche D, Psychoyos A. 1987. Scanning electron microscopy of postovulatory human endometrium in spontaneous cycles and cycles stimulated by hormone treatment. *J Endocrinol.* 114:319-328

Martel D, Monier MN, Roche D, Psychoyos A. 1991. Hormonal dependence of pinopod formation at the uterine luminal surface. *Hum Reprod.* 6: 597-603

Murphy CR. 2000. Understanding the apical surface markers of uterine receptivity: Pinopods or uterodomes. *Hum Reprod.* 15: 2451-2454

Nilsson O. 1958. Ultrastructure of mouse uterine surface epithelium under different estrogenic influences. 3. Late effect of estrogen administered to spayed animals. *J Ultrastruct Res.* 2:185-199

Nikas G, Drakakis P, Loutradis D, Maraskoufari C, Koumantakis E, Michalas S, Psychoyos A. 1995. Uterine pinopodes as markers of the 'nidation window' in cycling women receiving exogenous oestradiol and progesterone. *Hum Reprod.* 10:1208-1213

Nikas G. 1999. Cell-surface morphological events relevant to human implantation. *Hum Reprod.* 14 Suppl 2: 37-44

- Nikas G.** 2000. Endometrial receptivity: changes in cell-surface morphology. *Semin Reprod Med.* 18: 229-235
- Quinn C, Ryan E, Claessens EA, Greenblatt E, Hawrylyshn P, Cruickshank B, Hannam T, Dunk C, Casper RF.** 2007. The presence of pinopodes in the human endometrium does not delineate the implantation window. *Fertil Steril.* 87: 1015-1021
- Salehnia M.** 2003. Progesterone shifts the pinopodes expression of mouse endometrium to pre-implantation time after ovarian hyperstimulation. *Iran J ReproductiveMed.* 1:20–23
- Sarani SA, Ghaffari-Novin M, Warren MA, Dockery P, Cooke ID.** 1999. Morphological evidence for the “implantation window” in human luminal endometrium. *Hum. Reprod.*, 14: 3101–3106
- Singh MM, Chauhan SC, Trivedi RN, Maitra SC, Kamboj VP.** 1996. Correlation of pinopod development on uterine luminal epithelial surface with hormonal events and endometrial sensitivity in rat. *Eur J. Endocrinol.* 135:767-770
- Stavreus-Evers A, Nikas G, Sahlin L, Ericksson H, Landgren BM.** 2001. Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentration of progesterone and progesterone receptors. *Fertil Steril.* 76:782 791