

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y  
GINECOLOGÍA

IMPLICACIÓN DE LAS QUIMOQUINAS IL-8, MPC-1,  
RANTES, LOS RECEPTORES CXCR1, CXCR4, CCR2, CCR5  
Y EL FACTOR IGFBP-Rp1 EN LA INTERFASE MATERNO -  
EMBRIONARIA

FRANCISCO DOMÍNGUEZ HERNÁNDEZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2003

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 27 d' Octubre de 2003 davant un tribunal format per:

- D. Fernando Bonilla Musoles
- D. Manuel L. Gil Jalom
- D. José Luis Castrillo Díez
- D. Eleuterio Hernández Miguel
- D. Francisco Sánchez - Madrid

Va ser dirigida per:

D. Carlos Simón Vallés

D. Antonio Pellicer Martínez

©Copyright: Servei de Publicacions  
Francisco Domínguez Hernández

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5808-2

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT  VALÈNCIA

**Facultat de Medicina i Odontologia**  
**Departament de Pediatria, Obstetricia i Ginecologia**



**Implicación de las quimoquinas *IL-8*, *MCP-1*,  
*RANTES*, los receptores *CXCR1*, *CXCR4*, *CCR2*, *CCR5*  
y el factor *IGFBP-rP1* en la interfase materno-  
embrionaria.**

**Tesis Doctoral**

**Francisco Domínguez Hernández**

**Valencia, 2003**

A mis padres

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas que en mayor o menor medida han ayudado a sacar este gran proyecto adelante:

A mi tutor y director, Carlos Simón, por su inestimable ayuda y apoyo constante.

A mi Director de Tesis, Antonio Pellicer, por haberme ofrecido la oportunidad de realizar este proyecto y por su capacidad innata de reconocer el trabajo bien hecho.

A José Remohí por permitirme realizar este trabajo en el Instituto Valenciano de Infertilidad.

A todos los miembros del IVI Valencia por su colaboración en muchas facetas de esta tesis, desde la esterilización del material usado hasta la ayuda administrativa, especialmente a Amparo Mercader, Arancha Galán, Raquel Herrer y Carmela Albert por la recogida de muestras y material.

A Laura y Bea Macías, por las correcciones de esta tesis.

A todos mis compañeros del equipo de investigación de la Fundación IVI, Carmen Escobedo, Julio Martín, Jose Juan Luna, Eva Sánchez, Maria de los Ángeles Asensi, Jose Antonio Horcajadas, Ana Cervero, Raúl Gómez, Maria Jose Escribá, Diana Valbuena, y a mis ex-compañeros, Pedro Caballero-Campo, Jose Luis de Pablo, Marcos Meseguer, Nicolás Garrido por lo mucho o muchísimo que me han ayudado en estos 4 años.

Y como no a mis amigos, que me han apoyado, me apoyan y espero que lo sigan haciendo por muchos años; sois muchos y vosotros sabéis lo mucho que os quiero a todos. Pero me gustaría nombrar en especial a Bernabé Salido, Carmen Escobedo, Marta Faustino, Jose Mas y Miguel Pons, que tanto en los buenos como en los malos momentos habéis estado a mi lado.

Finalmente a mis padres, Maria Teresa y Francisco por su amor incondicional y por dejarme elegir lo que mas me ha gustado hacer en la vida

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en los laboratorios de la fundación IVI, así como en los laboratorios del departamento de pediatría obstetricia y ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, gracias a la beca del Ministerio de Ciencia y Tecnología MIT1999-B24364784 MCYT y al convenio universidad-empresa de la fundación IVI.

## Lista de Abreviaturas

<b>ADNc:</b> ADN complementario	<b>IGFBP:</b> Insulin Growth Factor Binding protein (Proteína de Unión de Factores de Crecimiento tipo Insulina)
<b>AMPc:</b> Adenosin monofosfato cíclico.	<b>IGFBP-rP:</b> Insulin Growth Factor Binding Protein Related Protein (Proteína relacionada con IGFBP)
<b>CE:</b> Células del Estroma	<b>IL:</b> Interleuquina
<b>CEE:</b> Células Epiteliales Endometriales.	<b>IL-8 :</b> Interleuquina 8
<b>CSF:</b> Colony Stimulating Factor (Factor Estimulante de Colonias)	<b>LH:</b> Luteal Hormone (Hormona Lutea)
<b>CSF-alpha :</b> Colony Stimulating Factor alpha (Factor estimulador de colonias alpha)	<b>LIF :</b> Laeukemia Inhibitor Factor (Factor de inhibición de leucemia)
<b>E2:</b> Estradiol	<b>LPS :</b> lipopolisacáridos
<b>EE:</b> Epitelio Endometrial	<b>MCAF:</b> monocyte chemotactic and activating factor (Factor de activación quimotáctico de monocitos)
<b>FAU :</b> Fluorescence Arbitrary Units (Unidades Arbitrarias de Fluorescencia)	<b>MCP-1:</b> Monocyte Chemoattractant Protein (Proteína quimioatrayente de monocitos-1)
<b>FIV:</b> Fecundación <i>In Vitro</i>	<b>MEC :</b> Matriz Extracelular
<b>FSH:</b> Folliele Stimulating Hormone (Hotrmona Estimuladora de Folículos)	<b>MGSA/GRO-alpha:</b> Melanoma growth stimulatory activity (Activador estimulador de crecimiento de melanomas)
<b>GH:</b> Growth Homone (hormona de crecimiento)	<b>MIP:</b> Monocyte Innflamatory Protein (Proteína de Monocitos inflamatoria)
<b>GM-CSF:</b> granulocyte / macrophage colony-stimulating factor ( Factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos)	<b>MMP:</b> Metaloproteinasa
<b>GnRH:</b> Gonadotrophin-Releasing Hormone (Hormona Liberadora de Gonadotropina)	<b>NAP-1:</b> Neutrophil attractant/activating protein-1 (Proteina activadora/atrayente de Neutrófilos)
<b>HB-FGF:</b> Heparan Binding Fibroblast Growth Factor (Unión de Heparan Factor de Crecimiento Básico de Fibroblastos)	<b>NK:</b> Natural Killer Cells (células asesinas)
<b>HCG:</b> Gonadotropina Coriónica Humana	<b>P:</b> Progesterona
<b>HLA/HMC:</b> Human Major Histocompatibility Complex (Complejo Mayor de Histocompatibilidad Humano)	<b>PCAM:</b> Platelet/endothelial Celular Adhesion Molecule (Molecula de Adhesion Celular de plaquetas/endotelial)
<b>IAP:</b> Inhibidor del Activador del Plasminógeno.	<b>PG:</b> Prostaglandina
<b>ICAM:</b> Intra Cellular Adhesion Molecule. (Molecula de Adhesión Intercelular)	<b>PP:</b> Placental Protein (proteína placentaria)
<b>IFN<math>\gamma</math>:</b> Interferón $\gamma$	<b>RANTES :</b> Regulated upon Activation Normal T Expressed and Secreted
<b>IGF:</b> Insulin Growth Factor (Factor de Crecimiento de Insulina)	

**SHO:** Síndrome de estimulación Ovárica

**tAP :** Activador del Plasminogeno de tejido

**TGF- $\beta$ :** Transforming Growth Factor (Factor de Crecimiento Transformante beta)

**TIMP:**Tissue Inhibitor Metalloproteinase (Inhibidor de Metaloproteinas de Tejido)

**TNF- $\alpha$ :** Tumor Necrosis Factor alpha (Factor de Necrosis Tumoral alpha)

**uAP :** Activador del Plasminogeno uroquinasa

**VCAM:** Vascular Cellular Adhesion Molecule (Molécula de Adhesión Celular Vascular)

**VIH:** Virus de Inmunodeficiencia Adquirida

**ZP :** Zona pelúcida

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	11
1.Generalidades en Medicina de la Reproducción.....	11
2. La implantación embrionaria.....	14
2.1. Preimplantación. ....	14
2.1.1 Preparación del endometrio.....	14
2.1.2 Receptividad endometrial.....	15
2.1.3 Desarrollo del embrión a blastocisto. Aposición.....	22
2.2. Periodo implantatorio.....	23
1.2.1. Adhesión.....	23
1.2.2. Invasión.....	24
3. Inmunología de la reproducción.....	29
3.1. Sistema inmune.....	29
3.2. Mediadores de la respuesta inmune. Cascada inmunológica.....	33
3.3. Quimoquinas y receptores.....	35
3.3.1. Definición y clasificación.....	35
3.3.2. Importancia actual de las quimoquinas en inmunología.....	44
3.4. Implicaciones de las quimoquinas en reproducción.....	46
4. Superfamilia IGFbps.....	52
4.1. Generalidades.....	52
4.2. Estructura.....	55
4.3. Fisiología.....	56
<b>OBJETIVOS</b> .....	60

## ARTÍCULOS PRESENTADOS

I. Hormonal and embryonic regulation of chemokines IL-8, MCP-1 and RANTES in the human endometrium during the window of implantation. <i>Molecular Human reproduction</i> Vol 8 n°4 pp 375-384. 2002.....	63
II. Hormonal and Embryonic regulation of chemokine receptors CXCR1, CXCR4, CCR5 and CCR2B in the Human Endometrium and the Human Blastocyst. <i>Molecular Human Reproduction</i> vol 9 n° 4 pp 189-198. 2003.....	74
III. A Combined Approach for Gene Discovery Identifies Insulin-like Growth factor- Protein-Related Protein 1 as a New Gene Implicated in Human Endometrial Receptivity. <i>Journal of Clinical Endocrinology &amp; Metabolism</i> . Vol 88 n° 4 pp 1849-57. 2003....	85
<b>RESUMEN DE LOS RESULTADOS.....</b>	<b>95</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>105</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>114</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>119</b>

# INTRODUCCIÓN

# INTRODUCCIÓN

## 1. Generalidades en Medicina de la Reproducción

A nivel mundial, el 10% de las parejas son infértiles, estimándose entre 60 y 80 millones las parejas que sufren problemas reproductivos. Aunque la infertilidad “per se” no implica enfermedad física, sí produce un detrimento grave de la salud y el bienestar psíquico y social de esas parejas (Diczfalusy *y cols*, 1995). En España, aunque no existen estudios epidemiológicos de infertilidad realizados mediante encuestas directas, el 15% de las parejas que desean tener un hijo no pueden satisfacer su deseo reproductor (Vanrell *y cols*, 1988), lo que implica que en España se calcula una incidencia de 600.000 parejas infértiles, presentándose cada año más de 3000 nuevos casos. De ese 15% de parejas infértiles, a su vez el 15% padece una infertilidad de origen desconocido (Peinado *y cols*, 1996). Muchos de estos casos se relacionan con fallos de la implantación embrionaria.

La implantación embrionaria es la fijación del blastocisto al endometrio materno. El conocimiento de los factores moleculares implicados en su regulación es crucial para comprender los mecanismos que controlan la reproducción humana. Su mecánica es aún un enigma, lo que hace que su conocimiento tenga gran interés para clínicos e investigadores. La mayoría de los datos sobre implantación embrionaria se han obtenido a partir del estudio de modelos animales, mayoritariamente en mamíferos. Sin embargo, pese a las similitudes entre las distintas especies de mamíferos, el modelo animal es sólo parcialmente aplicable a los humanos, debido a que la implantación en los humanos es única (Bischof, *y cols* 1997).

En la especie humana se ha descrito que en condiciones naturales, alrededor del 30% de los embriones consiguen implantarse; es decir, fisiológicamente sólo 1/3 de los ciclos considerados fértiles acaban en embarazo (Miller *y cols*, 1980). Las causas de esta baja tasa de éxito son compartidas entre el embrión (el 30% de los blastocistos *in vivo* es morfológicamente anómalo en el momento de la implantación,

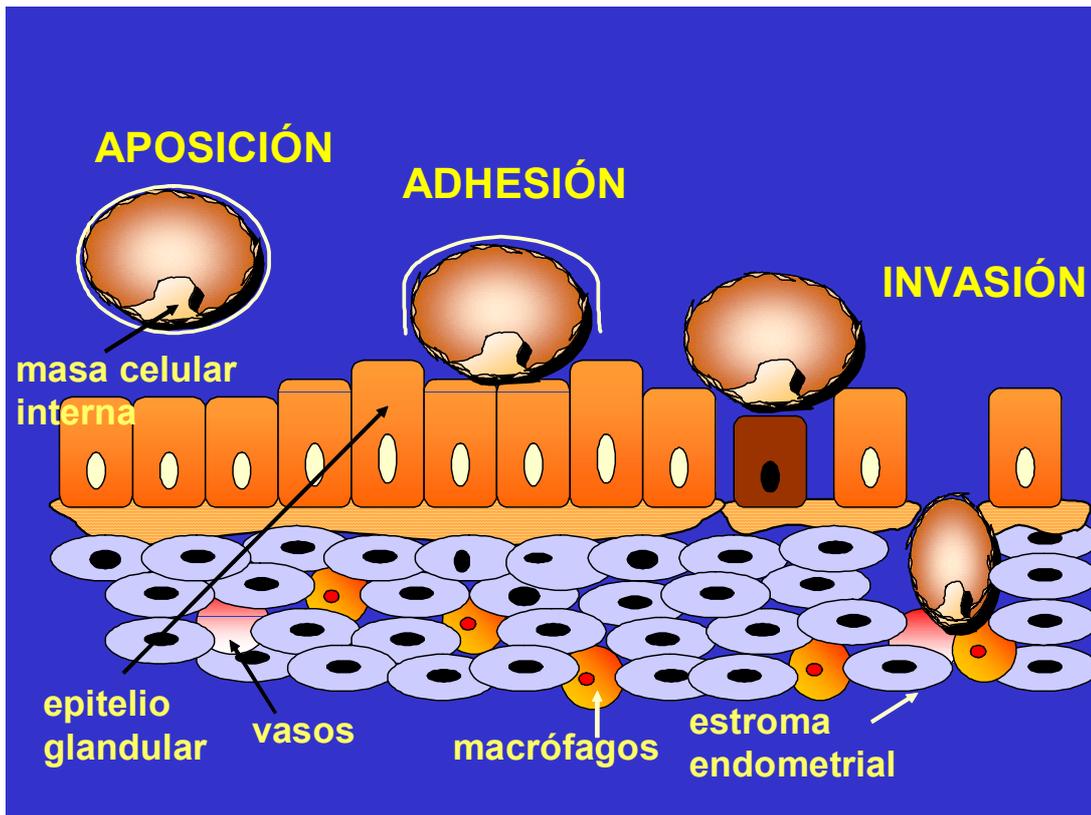
Herting *y cols*, 1952) y un defectuoso diálogo entre embrión y el endometrio materno (el 30% de las pérdidas gestacionales precoces ocurre antes del momento de la menstruación, Wilcox *y cols*, 1988). Este porcentaje de pérdidas es aún mayor en pacientes sometidas a tratamientos de reproducción asistida (Simón *y cols*, 1999). Paradójicamente, en las técnicas de reproducción asistida, con los programas de donación de ovocitos, donde el ciclo menstrual es sustituido hormonalmente, esa barrera natural del 30% de éxito se ha superado, alcanzándose tasas de implantación cercanas al 20 % y de gestación cercanas al 50% (Remohí *y cols*, 1995). En los tratamientos de fecundación *in vitro* (FIV) las tasas de parto a término por ciclo comenzado son de un 29.4 %, mientras que el porcentaje de parto a término por transferencia realizada alcanza el 31.6 % (Society for Assisted Reproductive Technology, 2003).

Tras la fecundación del ovocito, el embrión humano continúa su desarrollo y división en la trompa, llegando al útero en estadio de mórula entre los días 4-5 después de la ovulación. La implantación embrionaria no es un hecho puntual, se trata de un proceso, dividido en dos períodos, y que consta de tres fases consecutivas:

A. **período pre-implantatorio**: fase de aposición u orientación del blastocisto hacia una zona determinada del endometrio, donde, posteriormente, se adherirá. Este período implica una preparación previa del embrión y del endometrio para un contacto posterior.

B. **período implantatorio**: consta de la fase de adhesión, donde el trofoectodermo del blastocisto contacta directamente con el epitelio endometrial, y de la fase de invasión o penetración del trofoblasto embrionario en el endometrio materno.

Este modelo de implantación humana está regulado, a nivel sistémico (endocrino), por la presencia y funcionalidad de las hormonas esteroideas y, a nivel local (autocrino-paracrino), por tres tipos de moléculas: citoquinas, moléculas de adhesión y proteínas de invasión, que actúan principalmente en las fases de adhesión e invasión (ver figura 1).



**Figura 1:** Representación gráfica de las fases de la implantación embrionaria

## **2. La implantación embrionaria**

### **2.1. Período pre-implantatorio. Fase de aposición**

#### **2.1.1 Preparación del endometrio**

Las hormonas esteroideas desempeñan un papel fundamental en la preparación del endometrio para la implantación. Además, moléculas biorreguladas por estas hormonas, principalmente citoquinas, actúan a nivel autocrino-paracrino. Durante la fase folicular, el endometrio, sometido a la acción de los estrógenos, prolifera y crece. Tras la ovulación, la secreción de progesterona va a producir importantes cambios en la morfología y función endometrial. Los cambios morfológicos clásicos en el endometrio secretor que han sido descritos son: disminución progresiva de la mitosis, aparición de vacuolas basales ricas en glucógeno en el epitelio endometrial, edema en el estroma y reacción decidual e infiltración leucocitaria, entre otros.

Tradicionalmente se había considerado el endometrio como la parte pasiva del proceso de implantación. Sin embargo, el endometrio es un tejido regulado hormonalmente que participa activamente en la implantación embrionaria. Está formado por cuatro componentes básicos: epitelio endometrial luminal y glandular, estroma y vasos.

El epitelio endometrial (EE) consiste en una monocapa de células cuboidales polarizadas que tapizan el interior del útero. Esta monocapa, como el resto de las mucosas que actúan como barreras en el tracto reproductor, debe proporcionar protección contra los patógenos que logran acceder hasta la cavidad endometrial, pero también debe permitir y facilitar la implantación embrionaria. El EE está regulado de forma especial por las hormonas esteroideas que inducen cambios morfológicos y bioquímicos cíclicos que ayudan a mantener un microambiente adecuado para el desarrollo del embrión pre-implantatorio. Su función en este proceso es básica, ya que controla el impacto del embrión sobre el estroma y los vasos endometriales, actuando como primer contacto mediador del diálogo entre el embrión implantatorio y su lecho endometrial. El EE transforma en respuestas autocrino-paracrinas los

estímulos hormonales. En esta respuesta están implicadas moléculas como citoquinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión, producidas de forma local.

El endometrio humano también contiene células del sistema inmunológico que pueden ser relevantes para la función reproductora. Su respuesta se ha relacionado con la regulación de la respuesta inmune local en la implantación. La población leucocitaria encontrada en un endometrio normal suele ocupar un 10-15% del estroma, incrementándose hasta un 20-25% en la fase secretora tardía y premenstrual (Bulmer y cols, 1985). La mayor parte de la población la componen los linfocitos T y macrófagos. Los linfocitos T y los macrófagos se distribuyen de forma difusa por el estroma y también formando agregados periglandulares; la población citotóxica se encuentra predominantemente en los nódulos estromales (Kamat y cols, 1986). Las NK, o células asesinas naturales, se hallan principalmente en el estroma y en el interior de los folículos linfoides.

Durante la implantación, la infiltración de leucocitos en la decidua está formada principalmente por macrófagos y linfocitos T (Bulmer y cols, 1988). Sin embargo, en roedores, los leucocitos que intervienen son granulocitos y macrófagos (De y cols, 1991). La regulación del reclutamiento de leucocitos en el útero durante la implantación podría estar dirigida por las células del epitelio endometrial. Éstas producirían una batería de quimoquinas con un patrón temporal definido por los esteroides ováricos E2 y P y también por factores seminales (Robertson y cols, 1996a).

Todos estos descubrimientos sugieren que hay una liberación de quimoquinas como IL-8, RANTES, MCP-1 y GM-CSF en el período pre-implantatorio, quimoquinas producidas por las células del epitelio endometrial en respuesta a las hormonas esteroideas y otros mediadores, que contribuirían al inicio de la implantación.

### **2.1.2 Receptividad endometrial**

La receptividad endometrial delimita un período de tiempo del ciclo menstrual conocido como “ventana de implantación”, en el que, de forma exclusiva, es posible la adhesión del blastocisto al endometrio. Durante este período, en la membrana

plasmática de las células endometriales epiteliales (CEE) se producen cambios morfológicos, bioquímicos y génicos conocidos como “transformación de la membrana plasmática” (Murphy *y cols*, 1995). Estos cambios estructurales incluyen modificaciones de la membrana plasmática (Murphy, 2000) y el citoesqueleto (Thie *y cols*, 1995). La zona apical de la membrana plasmática desarrolla propiedades adhesivas, aparecen microvillis largos que se transforman poco a poco en proyecciones aplanadas. (Murphy, 2000)

La remodelación del tejido epitelial requiere la participación del citoesqueleto y en concreto la familia de la ezrina en la regulación de la polaridad para pasar de un fenotipo no receptivo a uno receptivo. Estos cambios ocurren junto con cambios en el compartimento estromal (Irwin *y cols*, 1989) y la vasculatura endometrial.

En el lugar de implantación, la membrana plasmática del epitelio luminal es la estructura materna que primero contacta con el embrión y define el límite que éste debe atravesar para poder acomodarse en el tejido uterino. La expresión de diferentes componentes moleculares en las CEE determina la identidad y función de la membrana plasmática.

#### *Marcadores morfológicos de receptividad endometrial*

En el período pre-implantatorio se produce un aplanamiento de las CEE y una reducción en la longitud de microvillis en el momento de la implantación. Martel *y cols*, en 1981, observaron la presencia de proyecciones ectoplásmicas, denominadas pinópodos, como marcadores morfológicos del inicio de la ventana de implantación humana. A pesar de desconocerse su función real, parecen ser inducidos por la endocitosis de líquido endometrial por parte de las células epiteliales luminales y se consideran unos marcadores morfológicos del período de receptividad uterino (Nikas *y cols*, 1999).

### *Marcadores bioquímicos de receptividad endometrial*

Se han estudiado ampliamente las integrinas (Lessey y cols, 1992) como marcadores bioquímicos de receptividad endometrial. Las integrinas son una familia de receptores de moléculas de adhesión celular que median la adhesión a la matriz extra celular (MEC) (Hynes, 1992). Los ligandos de la MEC, cuando se unen a las integrinas, inducen la agrupación de otras integrinas adyacentes de forma cooperativa. Esta agrupación de receptores y la unión del ligando son aspectos críticos para que se produzca la activación de las señales intracelulares mediadas por integrinas (Miyamoto y cols, 1995). De este modo, la agrupación conduce a la formación de unos complejos conocidos como adhesiones focales, donde integrinas se unen a proteínas del citoesqueleto intracelular y filamentos de actina, continuando así con la transducción de señales (ver figura 2)

Lessey y Castelbaum, 1995 han investigado la regulación de la expresión de integrinas en CEE. Estos autores consideran la  $\beta_3$ ,  $\alpha_4$ , y  $\alpha_1$  como marcadores potenciales de receptividad uterina, aunque otros autores no han podido replicar estos resultados (Creus y cols, 1998). El uso de estos marcadores de receptividad uterina han sido muy controvertido en los últimos años (Murphy y cols, 2000; Creus y cols, 2003) y se ha ido abandonando como marcador morfológico.

Por otro lado, en experimentos *in vitro*, se ha demostrado una regulación positiva y selectiva embrionaria de la integrina  $\beta_3$  en CEE. El sistema embrionario de la IL-1 parece estar implicado en esta regulación (Simón y cols, 1997a).

Kumar y cols realizaron estudios de cribaje (“screening”) de expresión génica durante el período pre-implantatorio y han descrito la inducción por la progesterona, en el período pre-implantatorio, del gen de la calcitonina. Estos autores postulan que la detección de la calcitonina podría ser un marcador bioquímico idóneo de receptividad uterina (Kumar y cols, 1998).

Otros marcadores propuestos han sido LIF (Leucemia inhibitor factor), COX-2 (Ciclooxigenase 2) y la IL-1 (Interlequina 1). Los ratones con inactivación génica del COX-2 (Davis y cols, 1999) y del LIF (Stewart, 1992) tienen una alteración del

mecanismo de implantación embrionaria. El bloqueo del receptor tipo I de la IL-1 por su antagonista natural (IL-1R tI) previene la implantación en los ratones (Simón y cols, 1994a). Otros genes implicados en la receptividad endometrial son HB-EGF (Heparan binding EGF like growth factor), lactoferrina o el gen *momeobox10* (HOX10). En ratones, la expresión de HB-EGF aparece restringida al sitio de implantación (Das y cols, 1994). HOX10 es esencial para la implantación en el ratón y para la expresión espacial/temporal en el endometrio humano, sugiriendo un papel en la receptividad endometrial (Taylor y cols, 1999).

### *Marcadores génicos de receptividad endometrial y nuevas tecnologías*

Pese a los numerosos avances en el descubrimiento de nuevos marcadores bioquímicos, se precisa una perspectiva global de la regulación génica de la receptividad endometrial para comprender mejor este complicado proceso. Recientes avances en la biología molecular así como en el conocimiento del genoma humano, nos han llevado a reconsiderar este proceso desde este punto de vista.

Mediante la nueva tecnología de hibridación múltiple, más conocida como “array”, es posible realizar comparaciones de hasta 12.000 genes en un solo experimento, lo que permite una visión mucho más global de los genes regulados al alza o a la baja en una determinada situación. Dependiendo del número de genes estudiados en cada caso se denominan “macro” o “micro array”.

Con los “macroarrays” se pueden estudiar simultáneamente hasta unos 500 genes relacionados con algún campo de investigación, como la apoptosis, cáncer, neogénesis, implantación, etc, mientras que con los “microarrays” se puede llegar a analizar de una forma mucho más global alrededor de 10.000 a 40.000 genes simultáneamente. En el último año se han publicado al menos 4 trabajos que exploran el patrón de expresión génica del endometrio receptivo comparado con el estadio pre-receptivo y no receptivo.

La receptividad endometrial, como ya hemos visto, se caracteriza por dos hechos principales: primero, que ocurre en un momento determinado de tiempo, en el

cual el tejido endometrial adquiere una característica funcional transitoria bien definida y, segundo, por la capacidad de adherir un blastocisto.

En este trabajo hemos analizado más de 375 genes utilizando la tecnología de “microarray” para caracterizar la expresión de quimoquinas, citoquinas, factores de crecimiento y sus receptores, tanto en un endometrio receptivo como en uno pre-receptivo, así como en dos líneas celulares derivadas de células epiteliales, como ya veremos más adelante.

Otros autores han investigado la receptividad endometrial utilizando el análisis global mediante “microarrays”, con 12.000 genes estudiados (AFFIMETRRIX). Mediante estos experimentos, Kao y cols han descrito más de 150 genes regulados al alza y 350 regulados a la baja. Entre los genes regulados al alza se encuentran proteínas de transporte de lípidos (apolipoproteína E ; ApoE), proteínas sintetizadoras de prostaglandinas (PLA2), síntesis de proteoglicanos (gluroniltransferasa), proteínas secretadas como la glicodelina o PP14, proteínas de unión a IGF, proteínas relacionadas con la familia TGF-beta, proteínas de transducción de señal, componentes de la matriz extracelular (osteopontina, laminina), numerosos moduladores de inmunidad, genes detoxificadores (metalotioninas) y muchos otros (Kao y cols, 2002).

Entre los genes regulados a la baja en el endometrio receptivo se encuentran, entre otros, factores de transcripción relacionados con la familia de TGF-beta, moduladores de la inmunidad (subunidades del MHC II) y miembros de la familia de receptores acoplados a proteína G (FrpHE).

Otro reciente trabajo basado en la tecnología de “microarray” compara las fases lútea temprana (pre-receptiva) y media lútea (receptiva). En este trabajo se describen al menos 370 genes regulados a la baja en distintas medidas, mientras que aproximadamente 320 se encontraron regulados al alza. Entre los genes más destacables se encuentran algunos de los ya descritos en el anterior trabajo, pero se incluyen algunos nuevos como receptores de superficie celular, proteínas de adhesión a matriz extracelular y factores de crecimiento. (Carson y cols, 2002). Asimismo, Borthwick y cols, usando un “microarray” de más de 60.00 oligonucleótidos,

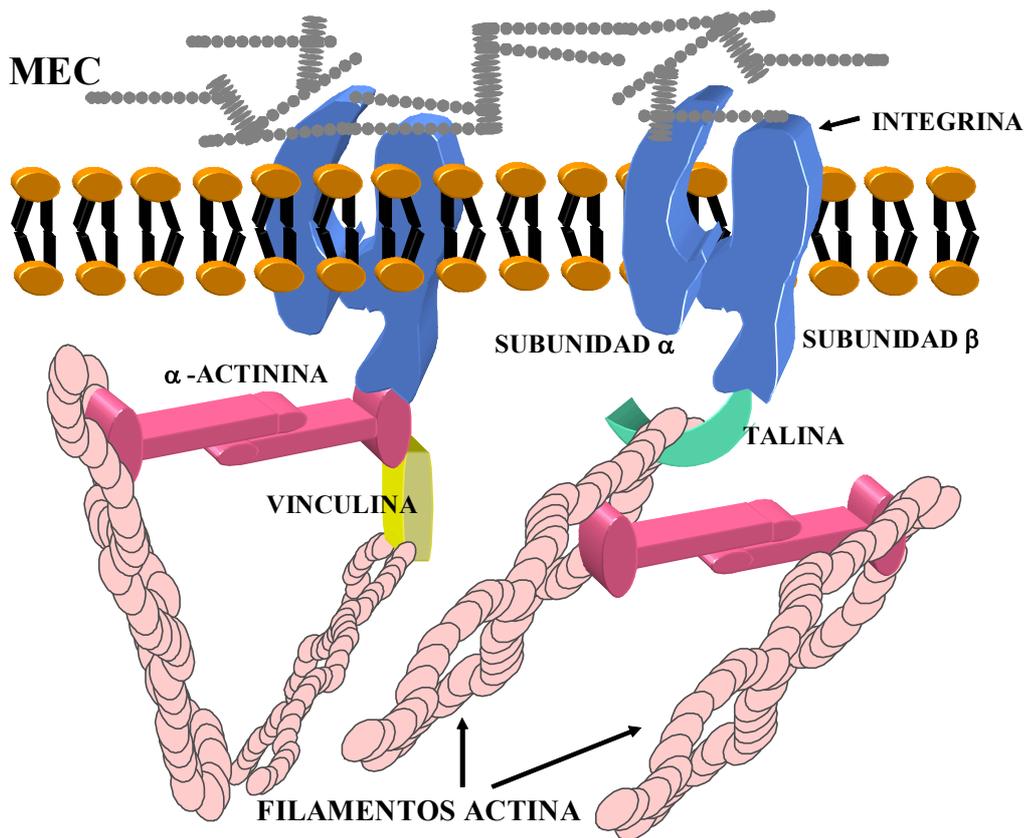
describen 149 transcritos, diferencialmente expresados entre endometrios proliferativos y secretores.

Un último trabajo recién publicado con el mismo diseño ha encontrado en 5 pacientes estudiadas más de 170 genes regulados al alza, pero tan sólo 60 regulados a la baja (Riesewijk *y cols*, 2003). Algunos de esos genes coinciden con el resto de trabajos como la glicodelina, osteopontina, IGFBP-3 o la integrina alpha3, pero algunos genes no habían sido descritos todavía, como la glutathion peroxidasa 3 (GPx-3), claudina 4, o el transportador de alta afinidad de glutamato epitelial (SLC1A1). Se han realizado tablas comparativas de los diferentes trabajos para intentar alcanzar un consenso entre todos los estudios realizados. (Riesewijk *y cols*, 2003)

Se han completado otros estudios en el mismo sentido en otros organismos, como el ratón (Reese *y cols*, 2001; Yoshioka *y cols*, 2000), denotando numerosas diferencias en los patrones de expresión de receptividad endometrial entre los dos organismos. En este tipo de estudios, algunos de los genes utilizados como marcadores bioquímicos clásicos de la implantación ya citados, como LIF y COX-2, no se han detectado en el organismo humano ni en el ratón, por lo que poco a poco se están abandonando estas aproximaciones gen a gen y se está buscando aproximaciones más globales que aporten una cantidad de información mucho mayor a la comunidad científica.

**Figura 2:** Estructura de la interacción matriz extracelular-célula.

Las integrinas de la membrana plasmática unidas a la Matriz extracelular (MEC) se unen en la cara citoplasmática a un complejo de proteínas citoesqueléticas, como son  $\alpha$ -actinina, vinculina, talina que las unen a filamentos de actina. Para la construcción de los complejos de señalización, la quinasa asociada a las adhesiones focales (FAK) debe interactuar con la cola citoplasmática de la subunidad- $\beta$ .



### 2.1.3 Blastocisto y fase de aposición

La salida del embrión de la zona pelúcida (ZP), o “eclosión”, es un requisito necesario para la implantación. Es conocido que el embrión es capaz de salir de la zona pelúcida *in vitro* o fuera del endometrio en lugares ectópicos, indicando que no necesita la interacción con el endometrio para este proceso. Sin embargo, cabe destacar que en condiciones *in vitro* o fuera del endometrio, la salida de la zona pelúcida se retrasa al menos 1 día en comparación con las condiciones intraútero. Esta rotura no implica capacidad de adhesión instantánea, sino que debe ser adquirida en un período que oscila entre minutos y horas.

#### *Fase de aposición*

La fase de aposición u orientación es la menos estudiada y tiene lugar entre los días 5 ó 6 postovulatorios cuando el blastocisto tiene un tamaño aproximado de 300-400  $\mu\text{m}$  de diámetro. El blastocisto humano permanece libre en el lumen uterino, que se ha estrechado, haciéndose prácticamente virtual. El blastocisto se posiciona habitualmente en una zona determinada del útero que depende de la especie; en humanos es el fundus uterino tercio superior, en su cara posterior. Esto es importante, porque va a determinar la localización de la placenta. El disco embrionario (masa celular interna), que dará origen al embrión propiamente dicho, se sitúa en un lugar específico también según la especie. En el caso del hombre se halla en la zona donde se va a desarrollar el trofoblasto invasor, al contrario que en el ratón.

## 2.2. Período implantatorio

### 2.2.1. La fase de adhesión

En el proceso de la implantación, la fase de adhesión es el resultado de los cambios moleculares en la superficie del trofoblasto y del endometrio. Es particularmente interesante porque están implicadas la adhesión de células de dos orígenes distintos y, específicamente, las superficies apicales de éstas (Enders *y cols*, 1994). Esta adhesión podría estar mediada por la inducción esteroidea (Aplin, 1997) y/o embrionaria (Simón *y cols*, 1998b) de una o más moléculas de adhesión en la superficie celular del epitelio luminal durante la ventana de implantación.

El estudio de la relación entre el sistema inmune y el sistema reproductor ha permitido demostrar la función de determinadas citoquinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión en los órganos del tracto reproductor, como es el caso de la IL-1, presente en ovario (Simón *y cols*, 1994b) y endometrio (Hall *y cols*, 1998). En concreto, el endometrio y otros órganos del sistema reproductor contienen células del sistema inmune que pueden desempeñar papeles específicos en la función reproductora.

En cuanto a las moléculas y mediadores que participan en la implantación embrionaria, existe una serie de moléculas de acción local (autocrino-paracrino) como las citoquinas, LIF, CSF- $\alpha$  y en especial el sistema de la IL-1, las integrinas y las proteasas (revisado por Simón *y cols*, 1996). Este modelo está centrado en las interacciones a nivel molecular entre el embrión y el endometrio materno (Simón *y cols*, 1998b). Es un modelo dinámico que va evolucionando a medida que se hacen nuevos descubrimientos y se va teniendo más información sobre la funcionalidad de los factores implicados

Por otro lado, las moléculas de adhesión implicadas en la adhesión célula-célula y en la adhesión célula-MEC son cruciales para la adhesión del blastocisto al endometrio materno. Así pues, estas primeras interacciones que comentábamos anteriormente podrían venir seguidas de eventos de adhesión mediados por integrinas y caderinas. La presencia de integrinas ha sido descrita tanto en las células epiteliales

endometriales (Lessey *y cols*, 1994), como en el embrión (Campbell *y cols*, 1995). Estas moléculas son proteínas esenciales para la correcta morfogénesis y el mantenimiento de la integridad en organismos multicelulares.

En conjunto, toda esta información parece indicar que entre las moléculas de adhesión más relevantes en el proceso de implantación se encuentran las integrinas implicadas en la fase de adhesión, como, por ejemplo, la integrina  $\beta 3$ , cuya expresión se ve reducida en mujeres infértiles (Lessey *y cols*, 1994; González *y cols*, 1999). Además, como posteriormente profundizaremos, el blastocisto es capaz de aumentar selectivamente la expresión de esta molécula a través del sistema de la IL-1 (Simón *y cols*, 1994c). No sólo las integrinas intervienen en el proceso, sino que la expresión de las cadherinas también ha sido descrita en el epitelio endometrial y en el trofoblasto (MacMalman *y cols*, 1996; Genbachev *y cols*, 2003).

### **2.2.2. Fase de invasión**

El siguiente paso en el proceso de implantación es la penetración del blastocisto a través del epitelio endometrial y la invasión del estroma por parte del trofoblasto. Es la llamada fase de invasión, que tiene lugar ocho días después de la fecundación. El blastocisto se embebe en el estroma y el sitio de entrada en el epitelio es rápidamente cubierto por fibrina, sobre la cual las células epiteliales crecen de nuevo. Para las especies con implantación invasiva, la membrana basal es la primera barrera que debe ser atravesada por el blastocisto. Después el trofoblasto invadirá el compartimento estromático, llegando hasta los capilares maternos para su alimentación. Es necesario un control exhaustivo de este proceso para prevenir posibles invasiones patológicas, como ocurre en los casos de placenta ácreta o en la preeclampsia (Zhou *y cols*, 1993).

El control de este proceso invasivo es mediado por diversas proteasas que degradan MEC, entre ellas las serinproteasas, metaloproteasas y colagenasas (Alexander *y cols*, 1991). Otras moléculas de vital importancia en este proceso son las moléculas de adhesión como las integrinas, selectinas, etc.

Entre las serinproteasas más relevantes en este proceso nos encontramos con los Activadores del Plasminógeno Uroquinasa (uAP) y de tejido (tAP), que catalizan la conversión del plasminógeno a plasmina, con una amplia actividad proteolítica capaz de degradar directamente la matriz celular.

Durante la invasión, las células trofoblásticas poseen propiedades migratorias e invasivas que han sido relacionadas con su actividad AP. El citotrofoblasto humano produce uAP y su secreción se ve aumentada por el AMPc. La expresión de estos receptores en el trofoblasto puede representar un posible mecanismo que facilite la remodelación de la vasculatura uterina y el desarrollo de la placenta (Zini *y cols*, 1991).

Por lo que sabemos, la invasión del trofoblasto es un mecanismo autocontrolado. Hasta hoy se han propuesto dos posibles mecanismos. El primer mecanismo se basa en el hecho de que la gonadotropina coriónica humana (HCG) disminuye la actividad proteasa *in vitro* de una manera dosis-dependiente por competición directa con la actividad uroquinasa, reduciendo también la invasividad del trofoblasto, sin afectar la adhesividad del mismo a la membrana basal. Es interesante destacar que aún a elevadas concentraciones de HCG, la invasión del trofoblasto no se inhibe completamente, indicando que existen otros tipos de regulación en este proceso.

Un segundo mecanismo, propuesto por Graham y Lala en 1991, está basado en que la invasividad del trofoblasto está inhibida al añadir medio condicionado de células deciduales *in vitro*. La extrapolación de estos datos a los sucesos ocurridos en el período pre-implantatorio sugiere que, bajo un control con progesterona, el IAP-1 derivado de células deciduales puede restringir la invasión del blastocisto en el estroma por la inhibición de la actividad uAP asociada al trofoblasto (Shatz *y cols*, 1995).

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son una familia de endopeptidasas dependientes de Zinc que poseen actividad proteolítica contra muchos de los componentes de la MEC. Son secretadas como proenzimas inactivas y se activan tras cortar una región de su zona amino terminal. De acuerdo a su especificidad de

sustrato, se distinguen tres grupos: colagenasas, gelatinasas y estromalisinas. El papel de la colagenasa tipo IV es crucial en el proceso de implantación e invasión del trofoblasto. El blastocisto que se implanta penetra en el epitelio hasta llegar a la membrana basal. El colágeno tipo IV es el componente principal de esta membrana y debe ser disgregado para proseguir con la invasión. *In vitro*, la secreción de colagenasa tipo IV se halla relacionada con el proceso de implantación, sugiriendo que sus propiedades invasivas son responsables de la habilidad del embrión para atravesar la membrana basal uterina. El colágeno tipo IV es, además, una de las estructuras principales de la matriz extracelular uterina en la interfase materno-fetal (Emonard y cols, 1990).

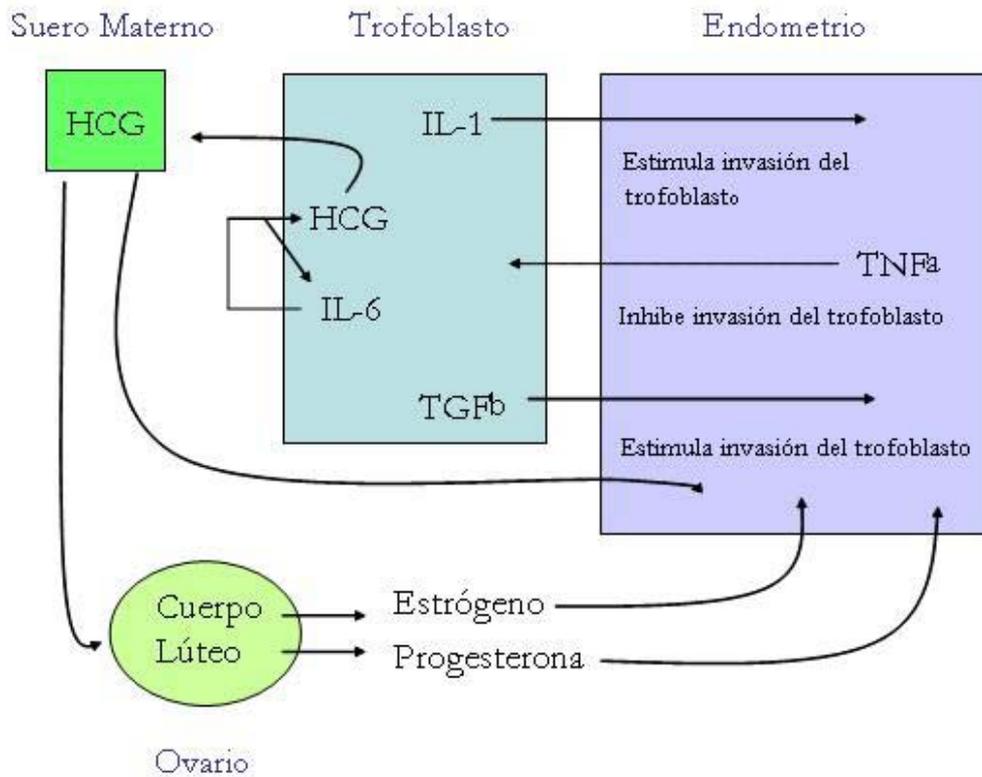
El proceso de invasión se caracteriza por el cambio a fenotipo invasivo mediante la expresión de integrinas del trofoblasto y posiblemente de la decidua. El trofoblasto extraveloso despolariza la integrina  $\alpha_6 \beta_4$  (receptor de laminina) y comienza a migrar y secretar proteasas para digerir la MEC (Bischof y cols, 1997). Una vez el blastocisto ha atravesado la membrana basal, la migración del trofoblasto invasivo de primer trimestre necesita, al menos *in vitro*, una expresión de integrinas  $\alpha_5$  y  $\beta_1$ . Esta migración se encuentra estimulada por el Factor de Crecimiento similar a Insulina II (IGF-II) y por la Proteína de unión al Factor de Crecimiento similar a Insulina I (IGFBP-I) y puede ser inhibida por el Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Irving y cols, 1995).

Bischof y cols. en 1995 demostraron que el citotrofoblasto extraveloso con capacidad invasiva (secreción elevada de gelatinasas y secreción reducida de fibronectina) expresa mayoritariamente la subunidad  $\alpha_6$  y que, cuando se activa la expresión de la subunidad  $\alpha_5$ , el comportamiento invasivo cesa, acompañado de una reducción en la secreción de gelatinasas y una elevada secreción de fibronectina.

Otro tipo de moléculas importantes en el proceso de invasión, y, en general en toda la implantación, son las citoquinas. Estas proteínas están en relación directa con las proteínas invasivas citadas en este apartado, que, a su vez, se encuentran reguladas por hormonas.

La progesterona parece ser una de las hormonas que mayor control ejerce sobre las moléculas de adhesión en el endometrio humano, especialmente sobre las integrinas. Citoquinas y factores de crecimiento también presentan una regulación sobre estas moléculas de adhesión (ver figura 3); por ejemplo, IL-1 $\beta$  parece modular la expresión de la subunidad  $\beta_1$  y sus subunidades  $\alpha$  asociadas en células MG-63 de osteosarcoma humano. IL-1 $\beta$  también aumenta los niveles de ARNm de  $\alpha_2$ ,  $\alpha_5$  y  $\alpha_v$ , mientras que disminuye los de  $\alpha_4$ . IL-1 $\beta$  junto con TNF- $\alpha$  controlan la expresión del heterodímero  $\alpha_1\beta_1$ . En células endoteliales humanas, IL-1 $\beta$  modula la expresión del complejo  $\alpha_6\beta_1$  e IL-1 $\beta$  junto con TNF- $\alpha$ , mientras que el IFN $\gamma$  (Interferón  $\gamma$ ) induce la expresión de ICAM-1, Selectina-E y VCAM proteína y ARNm.

El TGF $\beta$ -1 es el principal candidato para regular la invasividad del trofoblasto. Se expresa en la decidua humana, es capaz de estimular la expresión de TIMP-1 en fibroblastos y se ha demostrado su capacidad para inhibir la estromalisina. Sin embargo, animales transgénicos deficientes para el gen TGF $\beta$ -1 son capaces de implantarse sin ningún problema.



**Figura 3:** Representación esquemática de la interacción citoquinas-control endocrino durante la implantación

### **3. Inmunología de la reproducción**

Los primeros descubrimientos de la interrelación entre el sistema reproductor y el sistema inmunológico comenzaron en 1898, cuando Calzoralli observó que el timo de los conejos castrados antes de la madurez sexual era más grande que el de los controles no castrados. La interacción entre ambos sistemas está apoyada en una serie de descubrimientos clave realizados durante los últimos 25 años. Entre ellos cabe destacar: en los humanos, la gonadectomía y reemplazamiento con hormonas esteroideas produce alteraciones en la liberación de citoquinas (Grossman, 1985). Los linfocitos humanos producen hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) y gonadotropina coriónica humana (hCG), tanto bioactiva como inmunorreactiva. En los linfocitos de cerdo están presentes los receptores para la hormona liberadora de LH (GnRH), lo que pudiera sugerir su implicación en la liberación de gonadotropinas (Grossman, 1985; Standaert *y cols*, 1992).

El endometrio tiene una población importante de células del sistema inmune que son necesarias para la función reproductora. En concreto, su presencia se ha relacionado con la regulación de la respuesta inmune local y con la implantación. Para situar este trabajo dentro del contexto inmunológico, puesto que las quimoquinas actúan como mediadores de la respuesta inmune, a continuación se mencionarán brevemente unos conceptos generales de inmunología.

#### **3.1 Sistema Inmune. Conceptos generales**

El sistema inmune constituye en los mamíferos un mecanismo adaptado de defensa, capaz de protegerlo de la invasión de organismos infecciosos, de sus productos tóxicos y de células anómalas. Para ello se han desarrollado una serie de mecanismos de localización de células extrañas, virus y macromoléculas, para neutralizarlos y poder eliminarlos del organismo. Dentro de este sistema de vigilancia hay dos categorías: la inmunidad natural, mediada por células que responden inespecíficamente, y la inmunidad adquirida, mediada por linfocitos capaces de sintetizar receptores de superficie o de secretar proteínas específicas (anticuerpos) que

se unen a las moléculas extrañas, respetando al mismo tiempo las moléculas del propio organismo (tolerancia). La respuesta adquirida se puede dividir en dos clases: la humoral, que resulta de la generación de anticuerpos, y la celular, que supone la generación de células citotóxicas encargadas de provocar la lisis celular de las células extrañas o propias infectadas por agentes externos.

Todas las células del sistema inmunitario proceden de células primordiales pluripotenciales a través de dos líneas principales de diferenciación:

- a) La línea linfoide, que da lugar a la formación de los linfocitos.
- b) La línea mieloide, que conduce a la formación de fagocitos (monocitos y granulocitos polimorfonucleares) y de otras células.

Los linfocitos constituyen aproximadamente el 20% del total de los leucocitos. Cada uno de estos linfocitos es capaz de reconocer un único antígeno, debido a que todos los receptores antigénicos de un mismo linfocito son idénticos. Existen dos tipos principales de linfocitos: B y T.

### *Linfocitos B*

Se desarrollan en la médula ósea o en el hígado fetal, y pueden diferenciarse en células plasmáticas productoras de anticuerpos. Reconocen el antígeno mediante las inmunoglobulinas de la superficie. Para dar lugar a una respuesta de producción de anticuerpos precisan del antígeno y, generalmente, de la ayuda de las células T colaboradoras, aunque existen antígenos que generan respuesta inmune independiente de linfocitos T. Las células B activadas por el antígeno proliferan y maduran bajo la influencia de las células T y se diferencian finalmente en las células plasmáticas productoras de anticuerpos.

### *Linfocitos T*

Se desarrollan en el timo y llevan a cabo diferentes funciones: ayudan a los linfocitos B a fabricar anticuerpos, matan células infectadas por virus, y estimulan la actividad microbicida y citotóxica de otras células efectoras (macrófagos) (Van Ewick,1991). Para poder llevar a cabo todas estas funciones es necesaria la

transmisión de señales entre las diversas células, y ésta se realiza mediante contacto directo o a través de factores solubles, como son las citoquinas (Mossman y Coffman, 1989, Powrie y Coffman 1993). Funcionalmente, los linfocitos T pueden dividirse en colaboradores (*helper*) y citotóxicos.

#### *Células asesinas naturales (NK)*

Se encuentran en el endometrio en elevado número (20% de las células inmunes endometriales), están localizadas principalmente en el estroma y en el interior de los folículos linfoides e intervienen en la mayor parte de los procesos reproductores. Son células que derivan de los linfocitos granulares grandes (LGL), pero, a diferencia de éstos no expresan receptores antigénicos o inmunoglobulinas en su superficie. La población celular es muy heterogénea, teniendo en cuenta su morfología y marcadores superficiales. Las NK tienen como células diana ciertas células malignas, así como células infectadas por virus tanto *in vivo* como *in vitro* (Kissling *et al*, 1975; Trinchieri, 1989).

Cuando el sistema inmune encuentra por primera vez un antígeno, hay relativamente pocos linfocitos con el correspondiente receptor capaces de llevar a cabo una respuesta inmune. Pero, durante la primera respuesta, la población respondedora sufre una expansión y desarrollo que permite, en un segundo reconocimiento antigénico, la presencia de una población celular mayor capaz de reconocerlo y que, además, está más diferenciada, lo que explica que la respuesta secundaria sea mucho más rápida y efectiva. A su vez, los linfocitos estimulados por el antígeno podrán diferenciarse completamente en células efectoras o bien podrán pasar a formar parte de un grupo celular expandido (células memoria) que intervendrá en la respuesta secundaria sobre el mismo antígeno.

Como las células B, los linfocitos T también reconocen el antígeno utilizando un receptor que se genera por un proceso de recombinación a partir de un juego de genes de la línea germinal, produciendo así una gran diversidad de receptores. A diferencia de los linfocitos B, los T no reconocen los antígenos aislados, sino asociados a las moléculas codificadas por el complejo principal de histocompatibilidad.

El complejo principal de histocompatibilidad se divide en dos clases: clase I, presente en todas las células nucleadas del organismo, y las moléculas de clase II, presentes sólo en la superficie de determinadas células presentadoras de antígeno. En el hombre se denomina HLA-DP, DG y DR (Banchereau y Rousset, 1992). La mayoría de las células T colaboradoras reconocen un fragmento del antígeno asociado a moléculas de la clase II, mientras que las células T citotóxicas reconocen una combinación de las moléculas de clase I más fragmento del antígeno.

Las células capaces de presentar el antígeno a los linfocitos en forma inmunogénica se denominan colectivamente células presentadoras de antígeno e incluyen una gran variedad de células, como las células de Langerhans, los macrófagos y los monocitos.

#### *Monocitos-Macrófagos*

Los macrófagos son por excelencia las células presentadoras de antígenos a los linfocitos T helper. Se originan en la médula ósea, gracias a la intervención del factor estimulador de colonias (CSF) (Sief, 1987). Los monocitos, al salir de la médula ósea, circulan por el torrente sanguíneo, donde permanecen 24 horas, tras las cuales abandonan los vasos y pasan a los tejidos, donde se convierten en macrófagos. Al penetrar en los tejidos, donde permanecen 60 ó más días, algunos de los monocitos se convierten en células fagocitarias. De acuerdo con su morfología y el sitio en el que se localizan, reciben nombres diferentes, tienen funciones distintas, así como procesos metabólicos especializados. En los tejidos los macrófagos se inmovilizan adhiriéndose a la red intercelular formada por membranas, fibras de colágeno, proteoglicanos, etc (Jonhson 1988).

Las funciones de los macrófagos son muchas y muy variadas: participan de forma activa en el proceso de inflamación, tienen un papel activo en la respuesta inmune y, además, intervienen en la remodelación de los tejidos, cicatrización de heridas, destrucción y remodelación de tejidos envejecidos, regulación de mecanismos de trombosis y regulación del metabolismo de los lípidos.

Presentan, además, una amplia función secretora. Se han descrito más de 100 sustancias diferentes secretadas por los macrófagos, entre ellas: enzimas proteolíticas (colagenasa, elastasa, lisozima), hidrolasas ácidas (ribonucleasas, fosfatasas, lipasas), lípidos bioactivos (tromboxano, leucotrienos, PGE2) inhibidores de enzimas (inhibidores de plasmina  $\beta$ 2 microglobulina) componentes del complemento, proteínas de ligación (fibronectina), citoquinas y quimoquinas. Muchas de estas moléculas desempeñan un papel fundamental en la implantación embrionaria, en concreto en la invasión del embrión en el endometrio materno.

### **3.2 Mediadores de la respuesta inmune. Cascada inmunológica**

Las citoquinas son un grupo de polipéptidos producidos, sobre todo, por las células del sistema monocito-macrófago y linfocitos-T que, además de actuar en la respuesta inmune, están implicadas en un amplio espectro de funciones biológicas. Las citoquinas, o glicoproteínas reguladoras, pueden ser virtualmente producidas por cualquier tipo celular nucleado del organismo. Tienen efectos reguladores sobre las células hematopoyéticas y otros tipos celulares. Las citoquinas funcionan como importantes reguladores de la comunicación celular, con una misión prioritaria en el crecimiento, desarrollo y reparación histológica (desarrollo embrionario), en las reacciones inmunológicas y en los procesos inflamatorios. Su producción está controlada por un complejo sistema de inducción, donde intervienen e interaccionan con otros reguladores celulares como hormonas y neuropéptidos (Nicocola, 1994). Están presentes tanto en situaciones fisiológicas, como en gran variedad de patologías de distinta etiología (por ejemplo, síndromes autoinmunes tipo artritis reumatoide o colitis ulcerosa). Por ello, son la base de estudios de nuevas formas terapéuticas.

La activación de los macrófagos implica un incremento en la capacidad de destruir los patógenos internalizados, así como de incrementar la secreción de diferentes citoquinas, entre ellas la interleuquina-1, (IL-1), interleuquina-6, (IL-6), factor de necrosis tumoral, (TNF), interferón- $\gamma$  (INF-1), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias granulocito-macrófago

(GM-CSF), en respuesta del  $\text{INF-}\gamma$  liberado por los linfocitos T helper activados (Reed y cols, 1987). El material procesado por los macrófagos es presentado a los linfocitos en combinación con el complejo principal de histocompatibilidad clase II (Jonhson, 1988).

Los monocitos y los macrófagos tisulares constituyen la fuente principal de IL-1. El incremento de la síntesis de la IL-1 contribuye al aumento de la respuesta inmune. La activación de las células T y B es, probablemente, la función biológica más característica de la IL-1, ya que, tanto los linfocitos T, como los B, poseen receptores para la IL-1. La ocupación de éstos receptores cuando se activan los receptores propios del antígeno inducirá la proliferación de ambos tipos de células, aumentando la respuesta inmunitaria.

La activación de los linfocitos T en respuesta a un antígeno o a un mitógeno desencadena tanto la secreción de la IL-2, como la inducción de la expresión de receptores para la IL-2 (Smith, 1984), observándose, además, que esta respuesta, es decir, la adquisición de receptores para la IL-2, se ve incrementada por la estimulación sinérgica de la IL-1 y la IL-2 (Männel y cols, 1985).

Otra de las acciones más importantes de la IL-1 consiste en la inducción de la producción de otras citoquinas, como el TNF, por los macrófagos y el endotelio, IL-6 por los fibroblastos y GM-CSF por los linfocitos T.

En el inicio de la proliferación de los linfocitos T interviene, no sólo el reconocimiento del antígeno y de los determinantes del complejo principal de histocompatibilidad, sino también las señales entre las células presentadoras de antígenos y los linfocitos T por vía de diferentes citoquinas como la IL-1 y el  $\text{INF-}\gamma$ .

Las citoquinas no sólo son importantes en la respuesta inmune, sino también en otros procesos fisiológicos incluyendo la reproducción (Tabibzadeh, 1991). Entre ellas existe una subfamilia de características definidas denominada quimoquinas o quimiocinas (del inglés “chemokines”), descubiertas hace relativamente poco tiempo. Son factores con capacidad quimiotáctica para determinadas poblaciones de leucocitos.

### 3.3 Quimoquinas y sus receptores

#### 3.3.1 Definición y clasificación

Las quimoquinas pertenecen a la familia de las citoquinas y el descubrimiento de la primera quimoquina con todas sus características, data de hace apenas 15 años (Rollins *y cols*, 1997). Se caracterizan porque además de su actividad autocrina/paracrina, poseen la interesante capacidad de ejercer quimiotaxis sobre distintos tipos celulares. Son capaces de estimular el reclutamiento de leucocitos (Oppenheim *y cols*, 1991), actuando como mediadores secundarios pre-inflamatorios en el proceso de la inflamación, inducidos por mediadores pro-inflamatorios primarios como la IL-1 o el TNF y son reguladas tanto hormonalmente, progesterona (P) (Kelly *y cols*, 1994), como por las propias citoquinas (Chia *y cols*, 1995).

Estas moléculas son polipéptidos de bajo peso molecular (entre 8-10 KDa) con secuencias de entre 70 y 80 aminoácidos (Nicocola, 1994). Genómicamente comparten una estructura similar consistente en 3 exones y 2 intrones. Son factores solubles que actúan tanto a concentraciones elevadas como a concentraciones medias y su liberación es fácilmente inducible en diversos tejidos. Su peculiaridad más importante es su funcionalidad. Atraen a diferentes tipos de células que intervienen en el proceso inflamatorio, fundamentalmente células blancas, las sacan del torrente circulatorio y las llevan hacia las zonas afectadas (Del Pozo *y cols*, 1996). Por ello tienen una gran relevancia en los procesos de inflamación, actuando como mediadores secundarios. En los últimos años se están descubriendo nuevas funciones de estas moléculas en muchos campos, entre ellos, la reproducción.

La importancia de esta familia de citoquinas radica en parte, en su relativa especificidad en el reclutamiento de determinados tipos de leucocitos dependiendo del estatus fisiológico-patológico (Nicocola *y cols*, 1994). Esto se ha observado en situaciones fisiológicas, como la menstruación (Kelly *y cols*, 1994), o en distintas patologías ginecológicas como el parto pretérmino, donde intervienen sobre el tejido endometrial (Dudley *y cols*, 1995) o en la endometriosis (Khorram *y cols*, 1993).

Hasta la fecha se han descrito alrededor de 45 quimoquinas diferentes. Su número crece constantemente debido a un mayor interés de la comunidad científica por el estudio de las citoquinas, así como al desarrollo de los ensayos de quimiotaxis. En un corto período de tiempo se han descrito y caracterizado un gran número de quimoquinas diferentes. Algunas de ellas ya habían sido caracterizadas de forma bioquímica, aunque no se había determinado su actividad quimiotáctica (Ver Figura 4).

Tradicionalmente, las quimoquinas se han clasificado en dos subfamilias en función de la posición de dos de sus residuos de cisteína. Las quimoquinas pertenecientes a **la subfamilia  $\alpha$  o C-X-C** tienen un aminoácido (aa) situado entre el 2° y el 4° aa, que son los dos residuos de cisteína antes mencionados. Los genes que las codifican están mayoritariamente agrupados en el cromosoma 4 (Luster y cols, 1987, Mukeida y cols, 1989). Generalmente, se considera que los miembros de la subfamilia C-X-C son quimioatrayentes para neutrófilos (Huber y cols, 1991). Estas quimoquinas contienen una secuencia en el extremo amino-terminal Glu-Leu-Arg (ELR), que es esencial para la unión a su receptor (Clark-Lewis y cols, 1991, Hébert y cols, 1991).

Los miembros de **la subfamilia  $\beta$  ó C-C** (Huber y cols, 1991) tienen adyacentes los dos residuos de cisteína sin aminoácido intercalado. Los genes que codifican estas quimoquinas se encuentran localizados en el cromosoma 17. Los miembros de la subfamilia C-C son atrayentes para monocitos, eosinófilos, linfocitos-T, células NK (Natural Killers) y un pequeño número de linfocitos (Carr y cols, 1994).

Existen quimoquinas que difieren de la estructura general de las dos categorías anteriormente descritas. Una excepción es la linfotactina, un potente atrayente de linfocitos T, pero no de monocitos. Aunque su tamaño coincide con la mayoría de quimoquinas y comparte algunas características con las CC, sólo contiene dos cisteínas (posición 2 y 4), se ha colocado esta quimoquina en una tercera clase denominada C, debido a la cisteína solitaria en el extremo amino-terminal (Kennedy y cols, 1995).

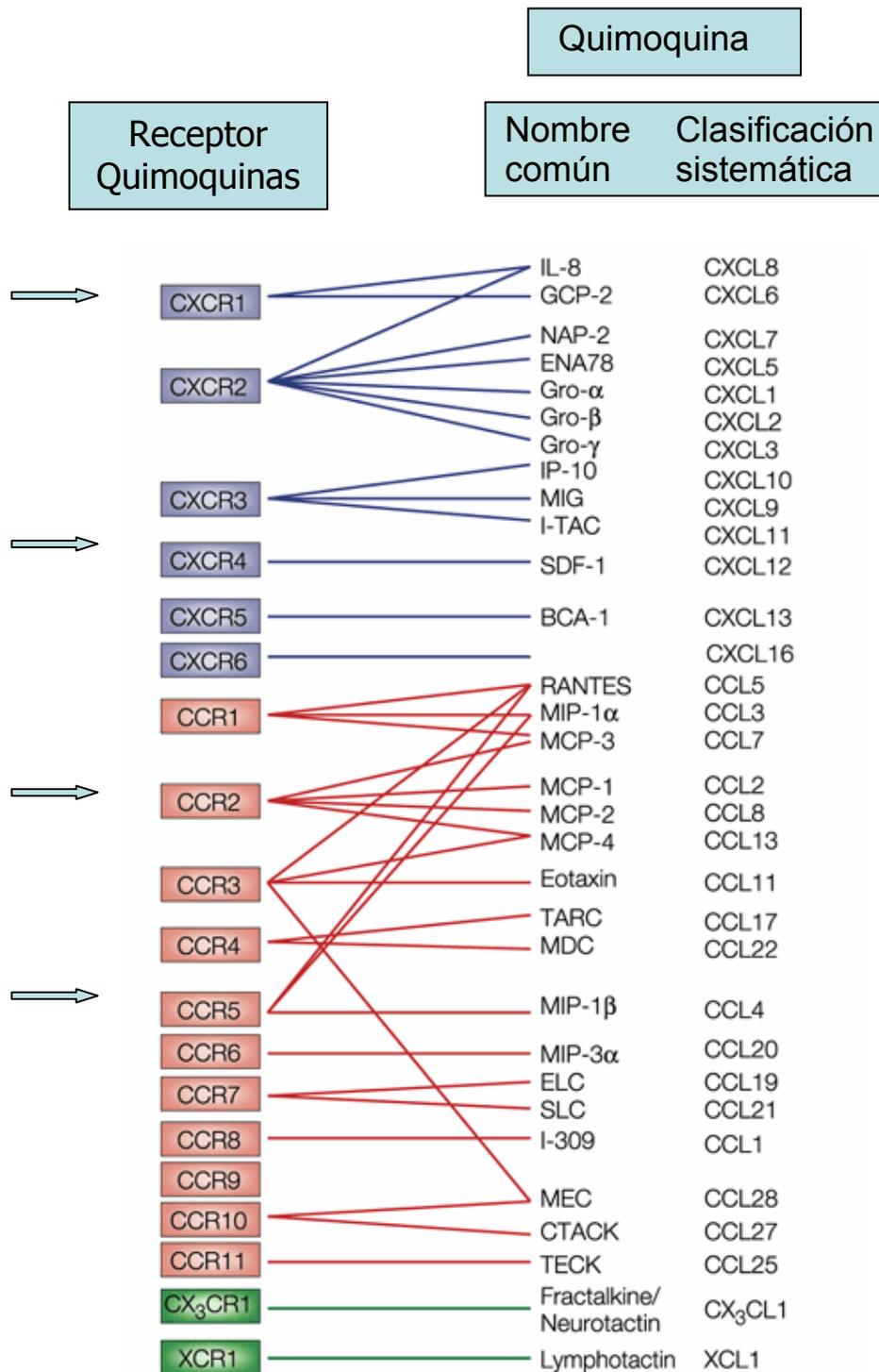
Otra excepción es la familia CX<sub>3</sub>C, denominada fractalquina o neurotactina, proteína integral de membrana con un dominio de quimoquina como extremo N terminal (Bazan *y cols*, 1997). Este dominio se diferencia del resto de quimoquinas por la presencia de tres aminoácidos entre las dos cisteínas. Como la linfotactina, el gen se halla situado en un cromosoma distinto.

En los últimos años se ha desarrollado una clasificación sistemática que ha renombrado todas las quimoquinas descubiertas hasta el momento. Esta nueva clasificación denomina a todas las quimoquinas CCL o CXCL dependiendo de a qué familia pertenezca. Así la nomenclatura sistemática para IL-8 sería CXCL8, mientras que RANTES sería CCL5, MCP-1 ahora se llamaría CCL2 y SDF-1 se denominaría CXCL12 (ver figura 4)

Estas moléculas realizan su acción mediante la unión a receptores específicos. Los receptores de estas quimoquinas pertenecen a la superfamilia de las proteínas de membrana. Como ya se ha mencionado, su unión, y con ello, su actividad biológica, está relacionada con una secuencia tripeptídica ELR (glutamato-leucina-arginina) (del Pozo *y cols*, 1995). Los receptores tienen 7 dominios transmembrana que se unen a proteínas G por un dominio extracelular y un dominio citoplasmático (Murphy, 1994) (ver figura 5).

Debido a esta estructura característica estos receptores se engloban dentro de las proteínas de unión a proteína G (GPCRs). La principal función de dichos receptores es la de transmitir información del exterior celular al interior de la célula.

Estos receptores comparten múltiples características, teniendo entre ellos al menos un 20 % de homología. Muchas de sus estructuras se han determinado a partir de la clonación de sus ADNc, como el receptor para la IL-8 tipo A (IL-8RA ó CXCR1), IL-8RB (CXCR2), el receptor MIP-1 $\alpha$ /RANTES y el receptor MCP-1 (Van Damme *y cols*, 1992, Sozzani *y cols*, 1994, Wang *y cols*, 1993). Algunos de los agonistas se unen a sus respectivos ligandos con afinidad elevada, como el receptor IL-8RA o CXCR1 (Lee *y cols*, 1992), pero existen otros receptores que no tienen una especificidad tan elevada, como IL-8RB o CXCR2 al que se unirán la mayor parte de las quimoquinas de



**Figura 4.** Tabla de representación de las principales quimoquinas y sus correspondientes receptores, así como su nomenclatura sistemática.

la subfamilia CXC (ver figura 4).

Muchos de estos receptores se han relacionado con diversas afecciones y enfermedades (Ver figura 6) como es el caso del receptor CCR5, que ha sido relacionado con asma, nefritis, VIH, (Mulherin *y cols*, 2003) o el receptor CCR2, relacionado con arterioesclerosis o trasplantes (Seegerer *y cols*, 2001). Algunos de estos receptores se expresan de forma constitutiva en las células blancas, mientras que otros tan solo se expresan en situaciones inflamatorias (ver figura 6).

Las quimoquinas se activan mediante las interacciones célula-célula entre leucocitos y también entre endotelio vascular y leucocitos (del Pozo *y cols*, 1996). Estas interacciones regulan las propiedades de adhesión de las integrinas leucocitarias. Se cree que las quimoquinas son responsables de la formación de urópodos (modificaciones del citoesqueleto  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes que favorecen la migración celular), así como de la regulación de la expresión y redistribución de las moléculas de adhesión como las integrinas (del Pozo *y cols*, 1997).

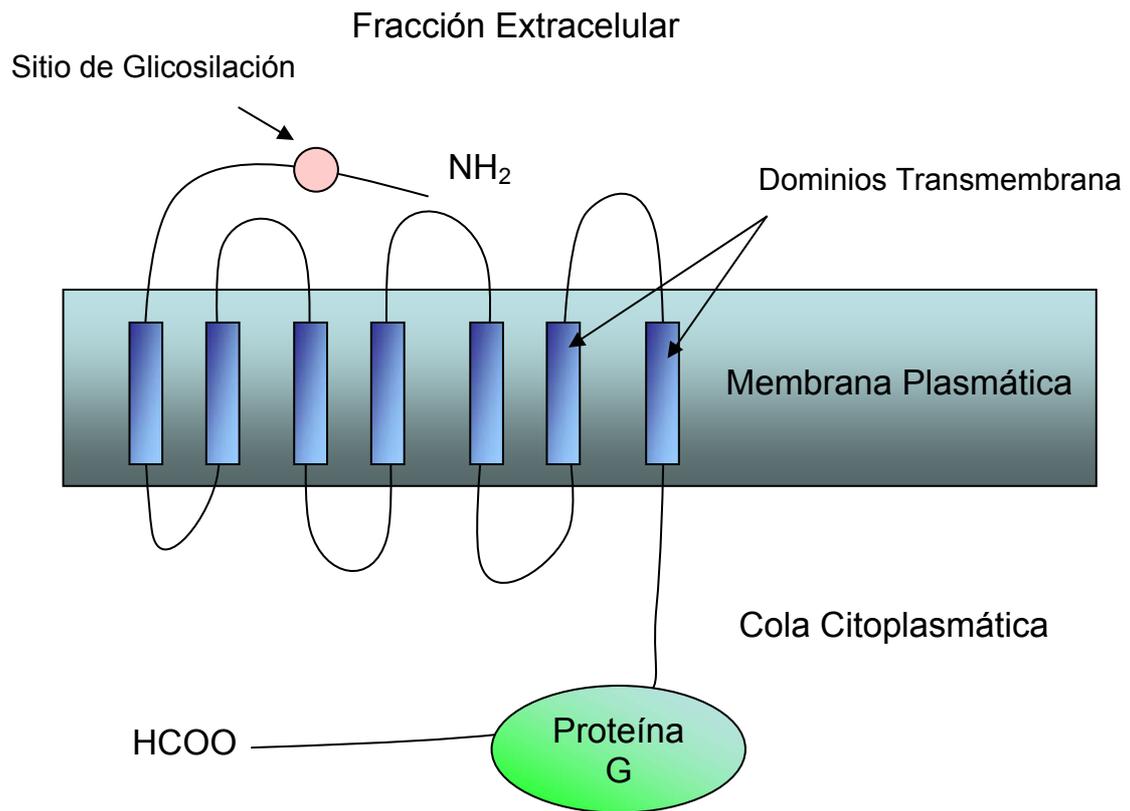
En cuanto a su mecanismo de acción, las quimoquinas actúan a través de sus receptores que pertenecen a la familia de las proteínas de membrana ligadas a las proteínas G. Las quimoquinas, al unirse a su receptor, inducen cambios en su estructura que lo activarán; con ello movilizarán el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, activando la vía del 2º mensajero mediado por enzimas como la adenilato ciclasa. Varios agonistas del AMPc como la forskolina (forskolin), la prostaglandina E2 o su análogo de permeabilidad de membrana, 8-bromoadenosina-cAMP, son capaces de inducir la formación de urópodos y la redistribución de ICAM-3 (Intra celular adhesion molecule-3) por ellos mismos (Sozzani *y cols*, 1994), lo que apoya la hipótesis del mecanismo de interacción ligando-receptor.

Nuestro estudio se va centrar en cuatro de estas quimoquinas y sus receptores. La quimoquina IL-8, antes conocida como NAP-1 (“neutrophil attractant/activating protein-1”), y más recientemente renombrada CXCL8, es un potente factor quimioatrayente y activador para neutrófilos. Pertenece a la subfamilia  $\alpha$  o

quimoquinas CXC. En respuesta a estímulos proinflamatorios como IL-1, TNF, LPS (lipopolisacáridos) y virus, es producida por una gran variedad de células, como monocitos, macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliales, linfocitos T etc, (Taub y Oppenheim, 1994).

La secuencia del ADNc de IL-8 codifica para una proteína precursora de 99 aminoácidos que genera una proteína no-glicosilada madura de aproximadamente 8 kDa, variable en tamaño en función de la fuente celular de producción de IL-8 (Matsushima *y cols*, 1992). Además de ser un potente agente quimioatrayente para neutrófilos y angiogénico, IL-8 también tiene la capacidad de inducir moléculas de adhesión (CD11/CD18) y activar la adhesión de neutrófilos a células endoteliales y proteínas de la MEC (Oppenheim, 1991). IL-8 produce su efecto biológico mediante la unión a dos receptores, denominados tipo I o IL-8RA ó CXCR1 y tipo II o IL-8 RB ó CXCR2 (ver figura 4). Mientras que el tipo I es específico de IL-8, el tipo II puede unir tanto IL-8 como GRO/MGSA (Murphy *y cols*, 1994). Debido a su gran variedad de acciones se piensa que IL-8 desempeña un papel muy relevante en la mediación de la respuesta inmune.

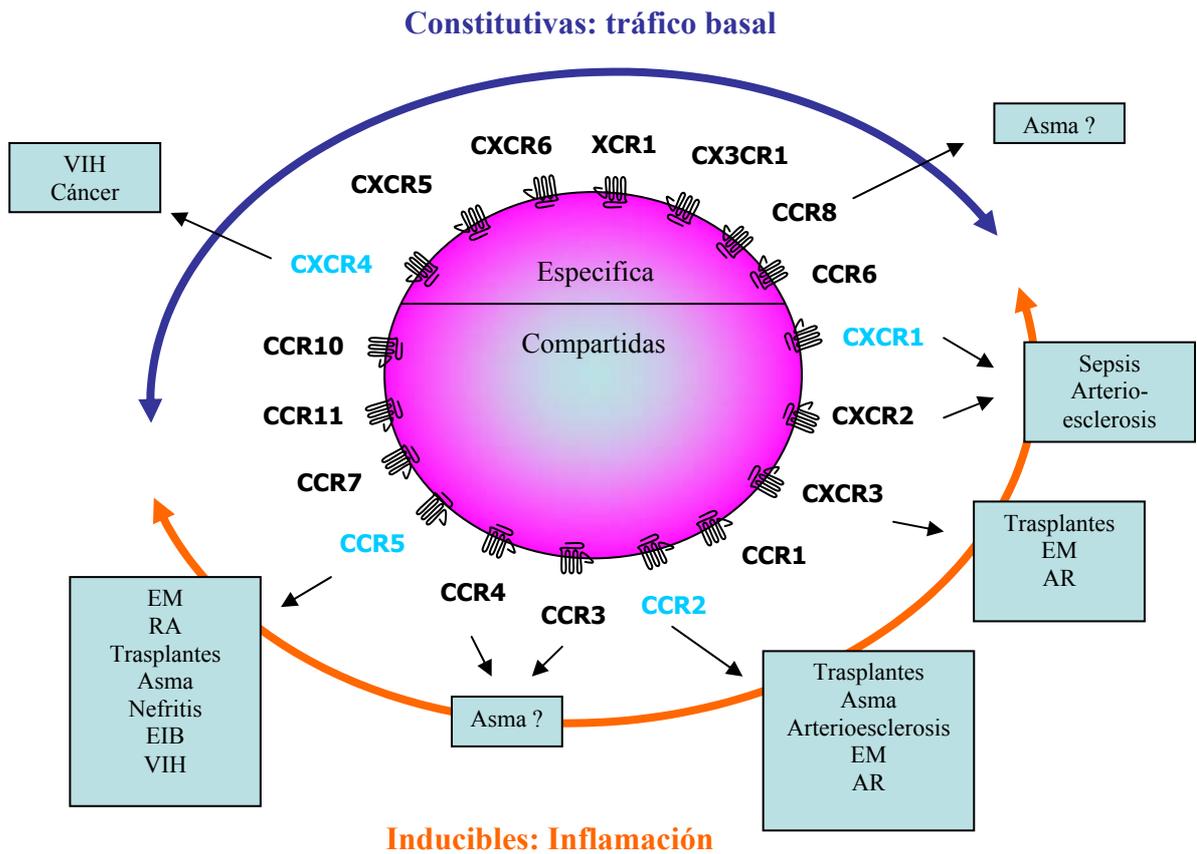
IL-8 es producida por cultivos de células del epitelio y estroma endometrial y ha sido inmunolocalizada tanto en glándulas como en el lumen a lo largo del ciclo menstrual. Esto sugeriría la posible implicación de esta molécula en el reclutamiento hacia el endometrio de neutrófilos y linfocitos (Arici *y cols*, 1998). La producción e inducción de IL-8 puede ser inhibida por dexametasona y progesterona; los explantes en cultivo producen IL-8, que es inhibida por P (Kelly *y cols*, 1994). El E2 (estradiol) también ha sido relacionado con el control de la migración de leucocitos mediado por la producción del factor de estimulación de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) en las células del epitelio endometrial (Robertson *y cols*, 1996b). En resumen, P y E2 podrían iniciar la cascada de eventos que regularían la producción de IL-8, MCP-1 y GM-CSF por el epitelio endometrial, que a su vez inducirían el influjo de leucocitos.



**Figura 5.** Estructura general de un receptor de quimoquina perteneciente a la familia de las proteínas asociadas a proteína G, con 7 dominios transmembrana, una cola citoplasmática y un dominio extracelular en el que se encuentran uno o varios sitios de glicosilación.

La quimoquina MCP-1, también conocida como MCAF (“monocyte chemotactic and activating factor”) o CCL2 es el miembro mejor estudiado de la subfamilia  $\beta$  o quimoquinas CC. Tras su clonación y secuenciación (Furutani *y cols*, 1989) se apreció una gran homología con el gen JE del ratón que resultó ser el homólogo del MCP-1 humano. Existe un solo gen que codifica para una proteína monomérica de 76 aa (Yoshimura *y cols*, 1989), secretada en dos formas de 9 y 13 kDa, ambas con idéntica actividad *in vitro* (Jiang *y cols*, 1992). MCP-1 actúa de forma selectiva sobre poblaciones de monocitos, macrófagos, linfocitos T y basófilos, mediante unión a receptores específicos (ver figura 4). Se piensa que la capacidad de MCP-1 de activar la quimiotaxis sobre estos tipos celulares está relacionada con la inflamación crónica.

La quimoquina RANTES (“Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted”, denominada por algunos autores: “Regulated upon activation, normal T cell expressed and *presumably* secreted”) ahora denominada CCL5, pertenece a la subfamilia  $\beta$  o quimoquinas CC. El ADNc de RANTES codifica para una proteína madura de 68 aa que actúa, principalmente, sobre monocitos mediante la unión a receptores (Schall *y cols*, 1994). Los receptores de RANTES no son específicos (Gao *y cols*, 1993), ya que comparten aproximadamente el 30% de la secuencia de aminoácidos de los receptores de IL-8 tipo I y tipo II (Neote *y cols*, 1993). Resulta interesante, que en la región próxima al extremo amino-terminal, en el dominio transmembrana del receptor para RANTES, comparte una secuencia homóloga con el gen US28 de citomegalovirus humano, esto implicaría al receptor de RANTES en el proceso de infección por el virus (Gao *y cols*, 1994). RANTES, al igual que IL-8 y MCP-1 parecen desempeñar papeles importantes en la mediación de procesos inmunológicos e inflamatorios en distintas localizaciones.



**Figura 6.** Representación de un linfocito con los distintos receptores de quimoquinas, funciones relacionadas y clasificación en inducibles y constitutivas.

AR: Artritis Reumatoide, EIB: Enfermedad Inflamatoria de Bowel, EM: Esclerosis Múltiple, VIH Virus Inmunodeficiencia Humana.

“Stromal cell-derived factor-1” (SDF-1) o CXCL12 es una quimoquina miembro de la familia CXC (Bleul *y cols*, 1996) y atrae tanto a linfocitos B como T. Su papel en la infección linfocitaria por el virus del SIDA ha sido exhaustivamente caracterizado (Littman, 1998). Estudios realizados en ratones deficientes en SDF-1 y su receptor CXCR4 confieren un papel significativo en la linfopoyesis, así como en el desarrollo neural y cardíaco (Nagasawa *y cols*, 1996; Tachibana *y cols*, 1998; Zou *y cols*, 1998).

### **3.3.2. Importancia actual de las quimoquinas en inmunología**

Las quimoquinas son producidas por una gran diversidad de células en respuesta a estímulos externos o mediadores celulares. Se asocian con varias enfermedades en las que intervienen procesos inflamatorios, incluyendo la artritis reumatoide (IL-8) (Koch *y cols*, 1995), alteraciones respiratorias como el asma (IL-8, MIP-1 $\alpha$ , RANTES) (Neote *y cols*, 1993, Sim *y cols*, 1995), alergias (IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1-3, RANTES) (Baggiolini *y cols*, 1994) o incluso en la arteriosclerosis (MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, 2, 3) (Charo *y cols*, 1994) (ver figura 6). De hecho, se pensó que el desarrollo de fármacos inhibidores específicos de quimoquinas podría ser útil para bloquear procesos patológicos en inflamaciones destructivas como los que acabamos de exponer, incluso en algunas enfermedades cardíacas (Seiko *y cols*, 1995).

La idea de “selectividad” en la atracción de determinadas células blancas resultaba muy interesante para los investigadores. Parecía que si se conseguía bloquear una quimoquina, se inhibiría la acción específica sobre un tipo de células. Es decir, si bloqueáramos la MCP-1, podríamos inhibir la reacción inflamatoria específica de los neutrófilos sobre el tejido articular, esto es, la artritis reumatoide. Sin embargo, dicha selectividad entre quimoquinas y células blancas sobre las que ejercen quimiotaxis es menor de lo que se pensó inicialmente (Gura, 1996). Su especificidad depende del tipo de receptor que se encuentre en la superficie de dicha célula blanca. Por ejemplo, el receptor de MCP-1 es específico para MCP-1, así como el receptor CC de quimoquinas 1 (CC-CKR receptor) lo es para MIP-1 $\alpha$  y RANTES. La mayoría de los receptores que se están clonando en la actualidad no son específicos para una sola quimoquina sino que pueden unirse a varios ligandos (ver figura 4). Por ejemplo, el

MIP-1 $\alpha$  puede reclutar al menos 6 tipos diferentes de leucocitos, y dos tipos distintos de células no inflamatorias además de los macrófagos (Gura, 1996, Matsushima *y cols*, 1988, Larsen *y cols*, 1989, Schall *y cols*, 1990, Baggiolini *y cols*, 1989).

### *Quimoquinas, receptores y VIH*

El descubrimiento de la función de los receptores de quimoquinas como cofactores o co-receptores necesarios en los humanos para la fusión e infección de los CD-4 (linfocitos-T) por el virus VIH, ha abierto nuevas direcciones en la investigación del SIDA (D'Souza y Harden, 1996).

El conocimiento adquirido entre los campos de las quimoquinas y el VIH ha abierto nuevas perspectivas para el entendimiento de los mecanismos patogénicos del SIDA, así como el desarrollo de terapias y vacunas más o menos efectivas. Estos conocimientos refuerzan el papel de algunos receptores de quimoquinas como CCR5, CCR2, CXCR4 y, más recientemente, CX3CR1 como vía de entrada del virus en los linfocitos humanos. Múltiples evidencias demuestran que algunos ligandos de estos receptores como RANTES, MIP-1 $\alpha$  y  $\beta$ , MCP-2, y HCC-1, en el caso de CCR5, y SDF-1 en el caso de CXCR4, pueden ofrecer cierta protección contra la infección vírica (Ver figura 7).

Las quimoquinas representan un nuevo tipo de vacunas “inteligentes”, capaces de controlar las respuestas tanto humorales como celulares reclutando células específicas al lugar de inmunización. Las quimoquinas que se unen a CCR5 y CXCR4, son potentes inhibidores del VIH, aunque una potencial limitación a su uso terapéutico sería el riesgo de producir efectos inflamatorios colaterales. Aunque es cierto que algunos estudios clínicos recientes demuestran que se puede bloquear la entrada del virus sin producir esta inflamación. Más aún, los determinantes estructurales del reconocimiento del virus del receptor CCR5 ya han sido elucidados, con lo que se podría llegar al diseño de co-receptores de VIH que inhibieran la entrada del VIH en los linfocitos.

También se ha visto que polimorfismos de estos genes influyen en la evolución de la enfermedad, ya que presentan un efecto protector o deletéreo. Uno de ellos, una mutación natural de la población denominada Delta 32, es frecuente en la población de

origen europeo y codifica para una proteína truncada no funcional que no se transporta a la superficie celular del linfocito. Homocigotos para esta mutación presentan una resistencia (aunque no completa) frente al SIDA (Mulherin *y cols*, 2003). También se empiezan a estudiar algunos de estos polimorfismos para valorar el desarrollo de la enfermedad.

CCR5 es el principal co-receptor usado por las cadenas M del virus VIH-1 y VIH-2, responsable de la transmisión viral, y es considerado como objetivo para el uso y creación de nuevas drogas y tratamientos, en los cuales se incluyen nuevos anticuerpos monoclonales que bloqueen la entrada del virus, creación de quimoquinas modificadas, y pequeños antagonistas sintéticos, como una nueva sustancia denominada TAK-779, la cual presenta una potente pero variable actividad anti VIH (De Clercq, 2002).

### **3.4 Implicaciones de las quimoquinas en la reproducción**

Tanto en el proceso de la ovulación, de la menstruación, del parto, como en el de la implantación embrionaria, encontramos migración de células blancas en los tejidos afectados (Kelly *y cols*, 1994). Si tenemos en cuenta las semejanzas entre estos procesos con la inflamación (Simón *y cols*, 1998a), esto hace que estas moléculas tengan un destacable interés en dichos procesos reproductivos.

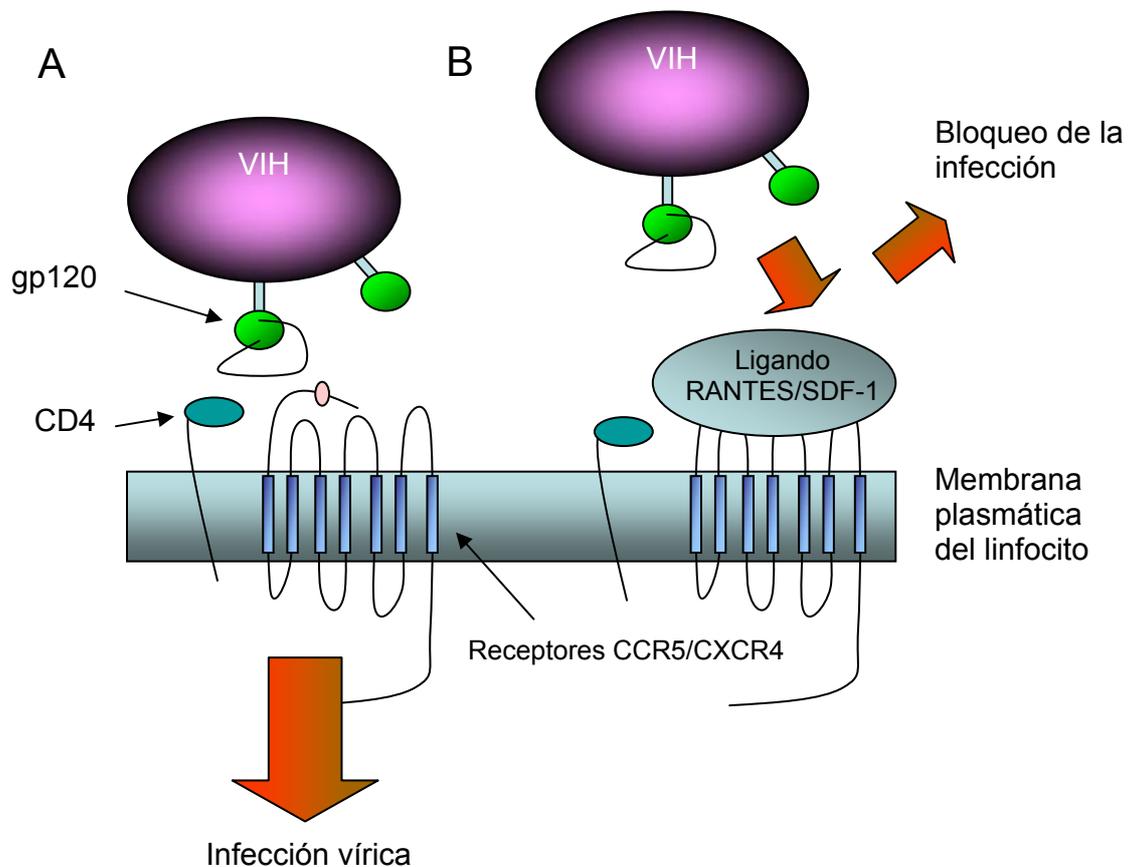
#### *Ovulación*

La completa explicación fisiológica del proceso de la ruptura folicular suscita un gran interés entre la comunidad científica. La hipótesis de un aumento de la presión intrafolicular como causa de la ruptura y expulsión del complejo ovocito-cúmulo no parece ser totalmente satisfactoria. Se han realizado medidas directas de la presión intrafolicular aproximándose el momento de la ovulación en distintas especies: rata (Blandau *y cols*, 1963), conejo (Espey *y cols*, 1963) y cerdo (Bronson *y cols*, 1979), y no se encontraron aumentos significativos. Los cambios estructurales que sufre la matriz del tejido conectivo que protege el folículo preovulatorio maduro en el

momento de la ovulación parecen tener más consistencia como explicación de la ruptura folicular. A medida que se aproxima la ovulación hay una disolución de la matriz extracelular y una disociación del colágeno tecal (Espey *y cols*, 1967a, 1967b). Estos cambios en el tejido conectivo van acompañados de un aumento de la permeabilidad de los capilares sanguíneos. Esto lleva a una extravasación de eritrocitos y un edema folicular (Abisogun *y cols*, 1988, Bjersing *y cols*, 1974, Janson, 1975, Parr, 1974, Zachariae, 1958). En estos cambios que acontecen en el tejido conectivo del ovario, intervienen en forma de cascada proteolítica, el activador del plasminógeno (Beers *y cols*, 1975 y 1978) y la colagenasa (Fukumoto *y cols*, 1981, Morales *y cols*, 1978 y 1983). También intervienen los eicosanoides incrementando la síntesis de prostaglandinas tras estimulación con gonadotropinas (Ainsworth *y cols*, 1975, Le Marie *y cols*, 1973) y la ampliamente estudiada influencia de los esteroides, fundamentalmente la progesterona. Existe una relación entre estos mediadores (prostaglandinas y progesterona) y las quimoquinas.

La ovulación, en muchos aspectos, es un proceso parecido a la reacción de inflamación, incluyendo la participación de leucocitos y los mediadores clásicos del proceso inflamatorio como eicosanoides, histamina y bradiquinina (Espey, 1980). El número y tipo de leucocitos en el ovario humano varía a lo largo del ciclo ovárico. Se ha observado que, tras el pico de la LH, existe un marcado aumento en la densidad de neutrófilos en la teca concomitante (Hellberg *y cols*, 1991). Se ha demostrado actividad quimiotáctica principalmente para neutrófilos en el líquido folicular humano (Herriot *y cols*, 1986, Harkin *y cols*, 1994) básicamente debido a la IL-8. Se podría pensar que el aumento de actividad de la IL-8 como quimioatrayente y activador de neutrófilos, a la par que como potente agente angiogénico, es un importante modulador de la quimiotaxis de leucocitos en la función ovárica. Se han estudiado la expresión y modulación de la IL-8 en el líquido folicular de pacientes de FIV y en modelos *in vitro*. La actuación de la IL-8 en estos cultivos sugiere que puede desempeñar una función relevante en la fisiología de la ovulación, en la ruptura folicular y en la neovascularización del cuerpo lúteo (Arici *y cols*, 1996a). Runesson *y colaboradores* (Runesson *y cols*, 1996) también estudiaron la presencia de IL-8 en el folículo preovulatorio de 12 pacientes de FIV y determinaron que la presencia de esta quimoquina en el líquido folicular era 30 veces mayor que en plasma. También es destacable que cultivos de células de la granulosa producen grandes cantidades de IL-8

**Figura 7.** Esquema de la invasión del virus del SIDA en los linfocitos humanos. A. El VIH utiliza como co-receptores para la infección CD4 y los receptores de quimoquinas CCR5 y CXCR4. B. En el caso de que los ligandos naturales de los receptores CXCR4 y CCR5, SDF-1 y RANTES se hallen unidos a su receptor, el VIH es incapaz de proceder con la infección



siendo esta producción modulada de forma positiva por IL-1 $\alpha$ . (Runesson *y cols*, 1996).

### *Menstruación*

Las poblaciones de leucocitos varían a lo largo del ciclo menstrual. Estudios clásicos se referían a poblaciones de linfocitos-T del tipo CD2+, CD3+ en la fase lútea precoz y a un posterior aumento de poblaciones menos usuales de linfocitos del tipo CD56+, CD2+, CD3- al llegar a la fase lútea tardía (Coditz, 1990; Bulmer *y cols*, 1988 y 1991; King *y cols*, 1989). En estudios más recientes donde se realizaron biopsias de endometrio los días 4, 7, 10 y 13 tras el pico de LH en una población de mujeres fértiles normales, se determinó mediante métodos inmunohistoquímicos que la población total de leucocitos aumentó desde el día LH + 4 hasta el día LH + 13. Igualmente mostraron que los linfocitos-T y los macrófagos aumentan en ciertos estadios de la fase lútea, y que en mujeres fértiles el aumento de la población de células NK era muy escaso (Klentzeris *y cols*, 1992). Si el sinergismo, que se mencionó anteriormente, entre prostaglandina-E (PGE) y quimoquinas fuera importante, la distribución de IL-8 en el tejido endometrial sería crítico como modulador de la función endometrial.

En relación con la modulación de la función endometrial, existen evidencias de que explantes de células endometriales producen IL-8, producción que es inhibida por la progesterona (Kelly *y cols*, 1994). La IL-8 a nivel de ARNm se ha encontrado en células del estroma endometrial (Arici *y cols*, 1992 y 1993). En cuanto a su funcionalidad, la IL-8 y la PGE tienen efectos sinérgicos en relación con el reclutamiento y la activación de leucocitos, fundamentalmente neutrófilos (Jones *y cols*, 1997).

No se ha querido olvidar la relación de estas moléculas con otros procesos patológicos muy estudiados en ginecología y medicina de la reproducción pero no por ello mejor comprendidos, que son la endometriosis, el parto pretérmino y el síndrome de hiperestimulación ovárica.

## *Endometriosis*

Una de las teorías etiopatogénicas más comúnmente aceptadas sobre esta enigmática enfermedad es la implantación de células endometriales que refluyen retrógradamente a través de las trompas durante la menstruación hacia los órganos abdominopélvicos. El hecho de que, pese a ser la menstruación retrógrada un fenómeno universal, tan sólo de 2 a 5% de las mujeres sanas y hasta un 25% de aquellas con historia de esterilidad desarrollan dicha enfermedad (Valbuena *y cols*, 1995), nos hace pensar sobre los factores que van a modular la posible atracción de las células endometriales hacia la cavidad peritoneal y su capacidad de implantar y crecer en ella.

Existen evidencias indirectas que relacionan el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis con concentraciones más altas y mayor número de macrófagos activados (Halme *y cols*, 1982), así como una mayor concentración de los factores secretados por éstos (Fakih *y cols*, 1987, Halme *y cols*, 1988 y 1989). También es conocida la capacidad quimioatrayente para neutrófilos que posee el líquido peritoneal, aunque no está claro de dónde proviene esta capacidad (Leiva *y cols*, 1993). La IL-8, una quimoquina con capacidad de atraer y activar a los neutrófilos (Baggioline *y cols*, 1989), es producida en las células mesoteliales (Goodman *y cols*, 1992, Arici *y cols*, 1996), y en las células del estroma endometrial (Arici *y cols*, 1993). Es, además, un potente agente inductor de la angiogénesis (Koch *y cols*, 1992), lo que lo involucra aún más en la patogénesis de la endometriosis. De hecho, las concentraciones de IL-8 en el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis son superiores a los de mujeres sanas, y tanto la IL-1 $\alpha$  como el TNF- $\alpha$  son capaces de potenciar la expresión del ARNm de la IL-8 de forma, dosis y tiempo-dependiente (Goodman *y cols*, 1992) (figura I.4).

Otra de las quimoquinas implicadas en la endometriosis es RANTES. Se trata de una proteína cuya liberación puede ser fácilmente inducible en diferentes tejidos por estímulos específicos. Se expresa en células de tejido endometrial normal y con endometriosis tanto *in vivo* como *in vitro*. En la endometriosis, esta citoquina inflamatoria aumenta su producción tanto a nivel de proteína (líquido peritoneal) como de ARNm (explantes endometrióticos). Interviene en la fisiopatología de la

endometriosis mediante el reclutamiento de macrófagos en la cavidad peritoneal (Khorram *y cols*, 1993).

También se ha sugerido que MCP-1, al aumentar la quimiotaxis de leucocitos en el líquido peritoneal, podría participar activamente en la reacción inflamatoria del peritoneo asociada a esta enfermedad (Akoum *y cols*, 1996a).

### *Parto pretérmino*

Desde hace años se sabe que en la fisiopatología del parto pretérmino interviene decisivamente la infección subclínica/clínica, cuya consecuencia inmediata es la liberación de prostaglandinas, que al desencadenar contracciones ponen en marcha el proceso (Romero *y cols*, 1988, García-Velasco *y cols*, 1995). Lo que no se sabe es si la infección subclínica pone en marcha el proceso, o si en el parto pretérmino, en su inicio, al desencadenarse las contracciones, se favorece la migración o el ascenso de las bacterias desde el canal del parto (MacGregor *y cols*, 1996).

Como la infección/colonización bacteriana activa los macrófagos, éstos liberan IL-1 (pirógeno endógeno), IL-6, TNF y otras sustancias, comprobándose como los niveles de estas citoquinas en el líquido amniótico y en las secreciones cervicovaginales se correlacionan con la existencia de corioamnionitis histológicamente comprobada (Romero *y cols*, 1988). Además, los niveles en líquido amniótico de IL-1, IL-6 (Romero *y cols*, 1993) e IL-8 (Cherouny *y cols*, 1993) se ven significativamente elevados en aquellas mujeres con amenaza de parto pretérmino que acaban en parto prematuro. Cuando actúan como mediadores de la inflamación, se libera al aparecer la corioamnionitis, haciendo que se acumulen granulocitos en el cuello uterino, por debajo de la membrana basal. Más tarde penetran entre las células epiteliales del endocérvix llegando al canal endocervical, donde liberan su contenido enzimático rico en proteasas que, al degradar la matriz extracelular, madurarían el cuello del cérvix favoreciendo el parto pretérmino (Junqueira *y cols*, 1980).

### *Síndrome de hiperestimulación ovárica*

El síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) es una complicación iatrogénica derivada del uso de gonadotropinas en los tratamientos de estimulación ovárica. Sin embargo los mecanismos que desencadenan este síndrome son todavía desconocidos, aunque parece que la administración de la hCG desencadena este proceso en el que se produce un aumento de la permeabilidad capilar mediada por el aumento de sustancias vasoactivas secretadas a nivel sistémico y/u ovárico. Induce una pérdida elevada de fluido intravascular y consecuentemente una depleción de volumen.

IL-8, junto con otras citoquinas y quimoquinas, ha sido encontrada aumentada en el líquido peritoneal de mujeres con SHO, sugiriendo la implicación de estas moléculas en dicha entidad patológica (Abramov *y cols*, 1996; Revel *y cols*, 1996). Es bien sabido que IL-8 *in vitro* es capaz de aumentar la liberación de enzimas lisosomales, así como aumentar la expresión de su receptor, e, *in vivo*, puede inducir quimiotaxis sobre neutrófilos y aumento de la permeabilidad vascular (Larsen *y cols*, 1989). No sólo IL-8, sino un gran número de diferentes citoquinas y quimoquinas están potencialmente implicadas en este particular síndrome, aunque hasta la fecha no se conoce mucho sobre su mecanismo de acción.

## **4. SUPERFAMILIA IGFBPs**

### **4.1. Generalidades**

El eje de los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGFs) desempeña un papel central en la fisiología del organismo al regular, entre otras, las siguientes funciones biológicas: proliferación, diferenciación, supervivencia y metabolismo celular; diferenciación y estructura tisular; carcinogénesis; función y maduración de órganos; crecimiento y desarrollo del organismo.

En los últimos años, la familia de IGFBPs se ha ampliado con la descripción de nuevas proteínas con similitud estructural con las IGFBPs y afinidad (en rango menor que las IGFBP-1 a -6) por los IGFs. Estas proteínas han sido denominadas IGFBP-rPs (proteínas relacionadas con las IGFBPs) y constituyen un grupo heterogéneo con al

menos diez miembros. Los conocimientos que se tienen hasta la fecha indican que las IGFBP-rPs regulan funciones biológicas diversas: proliferación, adhesión y migración celular, síntesis de sustancia extracelular; reproducción y desarrollo fetal; angiogénesis y reparación tisular; inflamación y crecimiento tumoral, entre otras.

En resumen, la superfamilia de IGFBPs reúne a los transportadores de alta afinidad (las IGFBP-1 a -6 kd ~ 10<sup>-10</sup> M) y a transportadores de baja afinidad (las IGFBP-rP1 a -10), encargados de regular las acciones biológicas de los factores de crecimiento pero que se caracterizan también por presentar funciones biológicas propias.

En la actualidad se conocen al menos seis proteínas transportadoras de los IGFs: las IGFBP-1 a -6, que no sólo transportan a los factores de crecimiento en líquidos biológicos sino que regulan también la biodisponibilidad de los mismos en células y tejidos. Además, se han descrito recientemente acciones propias (independientes de su interacción con los IGFs) de estas proteínas en la modulación del crecimiento celular.

El eje de los factores de crecimiento similares a insulina está constituido por dos ligandos: el IGF-I e IGF-II, dos receptores, los de tipo I y tipo II, seis proteínas transportadoras, las IGFBPs y una serie de proteínas de reciente descripción con características parecidas, las IGFBP-rPs (ver Tabla 1).

Los IGFs son proteínas de bajo peso molecular ampliamente distribuidas por todo el organismo, tanto el IGF-I como el II desarrollan funciones fundamentales en la fisiología celular sistémica, pero IGF-I se ha estudiado con un gran interés por el hecho de que representa una clara regulación por la hormona GH (Hormona de crecimiento) y por el estado nutricional del individuo.

Después de su unión al receptor tipo I, las IGFs ejercen acciones biológicas diversas, entre ellas la regulación del crecimiento, diferenciación, metabolismo, y supervivencia celular implicada en el proceso de carcinogénesis, control de la estructura y diferenciación de tejidos, regulación de la función de maduración de órganos y el control del desarrollo embriológico y del crecimiento longitudinal del organismo (Jones y cols, 1995; López-Bermejo, 2000).

	Afinitat per IGF-I/IGF-II	Unió a heparina	Expressió tissular (líquids biològics)	Funcions biològiques	Valors en sèrum
<i>IGFBPs (transportadors d'alta afinitat)</i>					
IGFBP-1	□	-	Fetge, ronyó, decidua (líquid amniòtic, plasma)	Hiperglucemiant (regula els IGFs lliures) Creixement fetal	10-500 ng/ml
IGFBP-2	> IGF-II	-	Teixits fetals, cervell, pròstata (plasma, LCR)	Fisiologia cerebral i prostàtica. Glucòhomeostasi	50-270 ng/ml
IGFBP-3	□	+	Fetge i altres (plasma, altres)	Principal transportador sèric d'IGFs	2200-4600 ng/ml
IGFBP-4	□	-	Fetge, cervell, os (plasma)	Inhibició tumoral	300-700 ng/ml
IGFBP-5	> IGF-II	+	Ronyó, os (plasma, LCR)	Fisiologia òssia i ovàrica	200-700 ng/ml
IGFBP-6	>> IGF-II	+	Diversos teixits (LCR, plasma)	Fisiologia òssia i ovàrica	65-425 ng/ml
<i>IGFBP-rPs (transportadors de baixa afinitat)</i>					
IGFBP-rP1	□	+	Diversos teixits (líquid amniòtic, LCR, plasma)	Secretagoc de prostaciclina. Inhibició tumoral	d
IGFBP-rP2	□	+	Diversos teixits (plasma, altres)	Fibrosi, angiogènesi, reparació tissular	d
IGFBP-rP3	□	d	Diversos teixits	Nefrogènesi Proto-oncogen	d
IGFBP-rP4	d	+	Diversos teixits	Chemotaxina, adhesió cel·lular, angiogènesi	d
IGFBP-rP5	d	+	Diversos teixits	Proteasa de serina	d
IGFBP-rP6	d	d	Pulmó, ronyó	d	d
IGFBP-rP7	> IGF-II	d	Diversos teixits	Carcinogènesi Remodelat ossi	d
IGFBP-rP8	d	d	Diversos teixits	Carcinogènesi	d
IGFBP-rP9	d	d	Diversos teixits	Carcinogènesi	d
IGFBP-rP10	d	d	Membrana cel·lular	Neuroembriogènesi	-

**Tabla 1.** Clasificación de IGFBPs y IGFBP-rPs, expresión tisular y funciones biológicas.

Las IGFBP son actualmente 6. Estas proteínas de peso molecular mas elevado que IGF, no sólo trasportan y estabilizan los factores de crecimiento en líquidos biológicos (especialmente IGFBP-3 e IGFBP-5 cuando forman complejos), sino que también regulan su disponibilidad en células y tejidos (Jones *y cols*, 1995; López-Bermejo, 2000).

Estos descubrimientos indican que tanto trasportadores de alta afinidad (IGFBPs) como de baja afinidad (IGFBP-rPs) pueden modular las acciones biológicas de IGF. Además, tanto las IGFBPs como las IGFBP-rPs pueden presentar funciones específicas de cada molécula.

#### **4.2 Estructura**

Ambas clases de proteínas (IGFBPs e IGFBP-rPs) son proteínas modulares y que pueden reconocer distintos dominios de su estructura primaria (ver figura 8). Estas proteínas se caracterizan también por su riqueza en residuos de cisteína (16 a 20 residuos en las proteínas maduras) reunidas en los dominios amino y carboxiterminal conservados, necesarios para conferir a la propia molécula su estructura terciaria.

Las IGFBPs se dividen arbitrariamente en tres regiones, el extremo amino y carboxi terminal y la región intermedia. Hoy se sabe que la alta afinidad por IGF de las IGFBPs se debe a los extremos de la proteína, razón por la cual no es sorprendente que exista un alto grado de conservación entre ellas en distintas especies. La zona intermedia es bastante divergente en cada especie y molécula.

Las IGFBP-rPs conservan tan sólo el extremo aminoterminal, lo que hace que posean una menor afinidad por IGF (Oh *y cols*, 1996; Kim *y cols*, 1997). Mas allá de este dominio, las IGFBP-rPs presentan módulos bien definidos que son los mismos que comparten multitud de proteínas no relacionadas con esta superfamilia. Las características estructurales y sus módulos se describen en la tabla y figura 2.

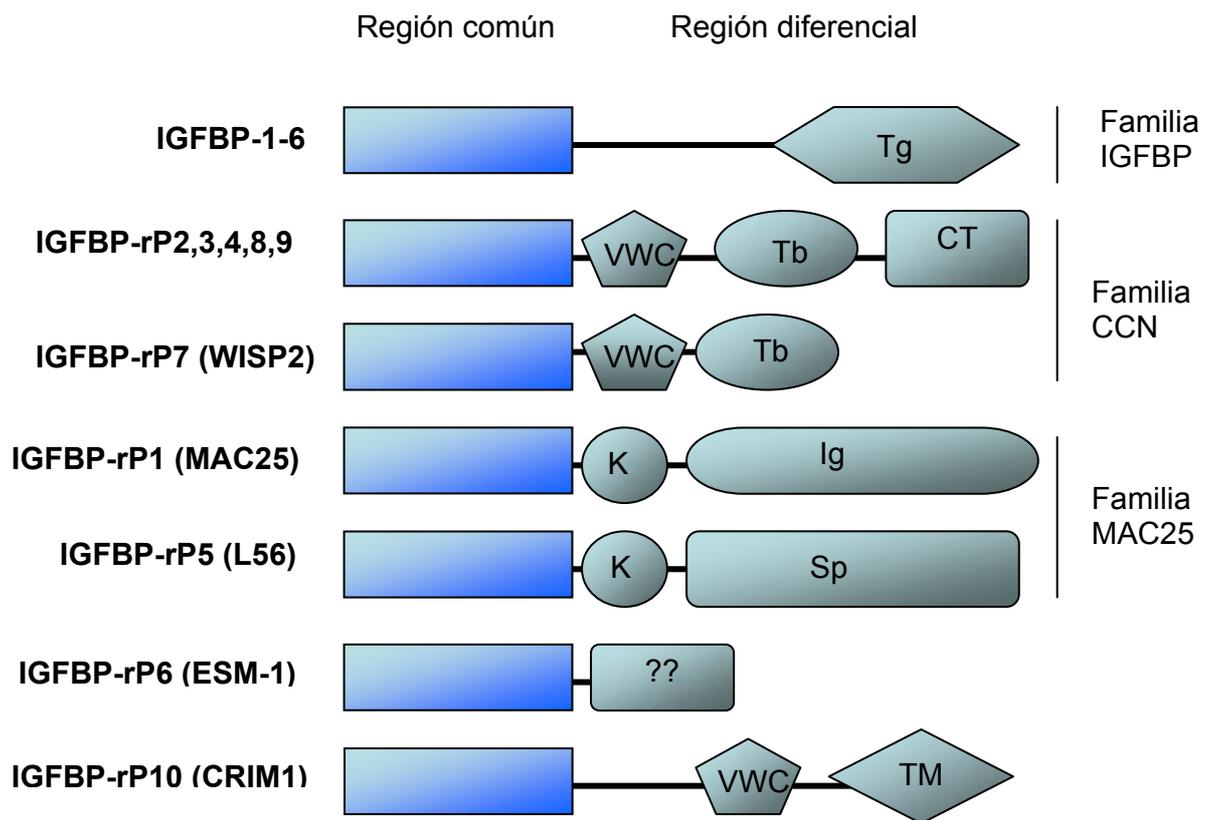
### 4.3 Fisiología

Los estudios originales referentes a las IGFbps han demostrado que su alta afinidad por IGF y la capacidad de estabilizar a los factores de crecimiento en circulación sanguínea, por lo que, durante mucho tiempo, se les ha considerado como simples transportadores séricos de IGF (Rajaram *y cols*, 1997). Estudios posteriores han revelado que las IGFbps son capaces de modular las acciones biológicas de los factores de crecimiento en el medio extracelular.

Estos descubrimientos han hecho que ahora se les considere capaces de ejercer por sí mismos funciones de factores de crecimiento, estimuladores o inhibidores. Muchas de las funciones de estas proteínas se detallan en la tabla 2.

La estructura similar de IGFbps y IGFbp-rPs se debe a su extremo N terminal. (Burren *y cols*, 1999). En el grupo de IGFbp-rPs se incluyen IGFbp-rP1 (también llamada mac25), el grupo de proteínas CCN (IGFbp-rP2 a 4), L56 (IGFbp-rP5) y ESM-1 (IGFbp-rP6). Mac25 es una proteína de 31kd, originalmente clonada de leptomeninges, y más recientemente clonada de células tumorales de mama (Kim *y cols*, 1997). La misma proteína ha sido purificada y nombrada independientemente de una línea de carcinoma humano (Kolle *y cols* 2000) (TAF-tumor adhesion factor), de fibroblastos diploides humanos (Brigstock *y cols* 1999) (PSF-protacyclin-stimulating factor). El extremo N terminal contiene 12 de 12 cisteínas conservadas desde IGFbp1 a 5, y comparte aproximadamente el 53% de similaridad con el extremo N terminal de las IGFbps.

Entre alguna de las funciones de IGFbp-rP1 se halla su habilidad para unir insulina al menos con la misma afinidad que IGF. Buscar la unión a insulina parece mediada a través del extremo N terminal, ya que la generación *in vitro* del extremo N terminal de IGFbp-3 (Clemmons *y cols*, 2000), así como los fragmentos proteolizados de esta región de orina humana han demostrado su unión a la insulina, además de su reducida afinidad con IGF.



**Figura 8.** Estructura general de las proteínas IGFBPs y IGFBP-rPs  
 Ig: Inmunoglobulina, vWC: factor Von Willebrand tipo C,  
 Tb:Trombospondina tipo I, Sp: Serin Proteasa, TM Tg:Tiroglobulina tipo I, CT:extremo Carboxi Terminal, KI: Inhibidor de serina proteasa tipo Kazal.

El extremo N terminal sintético, así como la propia IGFBP-rP1, pueden inhibir efectivamente la autofosforilación de la subunidad b del receptor de insulina en determinados tipos celulares, indicando un efecto biológico del extremo N terminal en la inhibición de esta acción. Se postula que el extremo N terminal de IGFBP-3 y de las IGFBP-rPs pueden tener importancia biológica en la modulación de IGF y de insulina.

# **OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

Diversas quimoquinas funcionan atrayendo distintos subtipos de células blancas hacia focos de inflamación, heridas o, simplemente, para trasvasar dichas células desde el torrente sanguíneo hacia los tejidos internos. Sabemos que determinados grupos de células inmunes son atraídos hacia la zona de implantación en el momento en que el blastocisto humano se dispone a implantar en el útero materno. Pero la intervención de estas quimoquinas y sus receptores sobre el proceso implantatario permanece sin revelar todavía.

Por tanto nuestros objetivos son:

- Investigar la expresión y localización de la quimoquinas IL-8, MCP-1, RANTES y SDF-1 en el endometrio humano.
- Estudiar la expresión y localización de los receptores de las quimoquinas antes citadas CXCR1, CCR2b, CCR5 y CXCR4 en el endometrio humano.
- Determinar la presencia de dichos receptores en el blastocisto humano.
- Determinar la expresión de qué genes están regulados en el endometrio durante la ventana de implantación y establecer su implicación en la receptividad endometrial humana.
- Evaluar la expresión y localización de IGFBP-rP1 en el endometrio humano.

# **TRABAJOS PRESENTADOS**

**I**

## Hormonal and embryonic regulation of chemokines IL-8, MCP-1 and RANTES in the human endometrium during the window of implantation

Pedro Caballero-Campo<sup>1,2</sup>, Francisco Domínguez<sup>1,2</sup>, Julio Coloma<sup>3</sup>, Marcos Meseguer<sup>1,2</sup>,  
José Remohí<sup>1,2</sup>, Antonio Pellicer<sup>1,2</sup> and Carlos Simón<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Fundación Instituto Valenciano de Infertilidad para el Estudio de la Reproducción Humana (FIVIER), <sup>2</sup>Dpto. de Pediatría, Obstetricia y Ginecología, Facultad de Medicina and <sup>3</sup>Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, España

<sup>4</sup>To whom correspondence should be addressed at: C/ Guardia Civil 23, 46020 Valencia, Spain. E-mail: csimon@interbook.net

Chemokines are a family of small polypeptides which specialize in the attraction of leukocytes. The presence of specific leukocyte subsets at the implantation site is an important element of the complex, and not completely understood, process of embryonic implantation. This report includes the investigation of the in-vivo immunolocalization and hormonal regulation of interleukin (IL)-8, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 and RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted) in the human endometrium during hormone replacement therapy cycles for oocyte recipients in an IVF programme. In addition, we have analysed the embryonic regulation of these endometrial epithelial chemokines (IL-8 and MCP-1) using an in-vitro model for the apposition phase of human implantation by co-culturing single human embryos until the blastocyst stage with human endometrial epithelial cells (EEC). IL-8 and MCP-1 were immunolocalized in the human endometrium to the glandular and luminal epithelium as well as to the endothelial cells. RANTES was mainly localized to the stromal compartment and endothelial cells. The immunoreactive levels of endometrial IL-8 and MCP-1 were up-regulated by the administration of progesterone during the receptive phase of the cycle. Furthermore, it was demonstrated that, *in vitro*, the human blastocyst does not produce measurable amounts of IL-8, MCP-1 or RANTES; however, it does up-regulate EEC IL-8 mRNA expression ( $P < 0.05$ ) and protein production ( $P < 0.05$ ), but not IL-8 secretion. The human embryo did not regulate EEC MCP-1 expression. These results provide evidence of hormonal and embryonic regulation of specific endometrial chemokines, suggesting two different but related mechanisms to induce the production of chemokines by the EEC, thus contributing to the attraction of specific leukocyte populations during the peri-implantation phase.

**Key words:** chemokines/embryonic implantation/endometrium/human blastocyst

### Introduction

Chemokines (short for chemoattractant cytokines) are a newly identified family of small polypeptides (70–80 amino acids) specialized in the attraction of specific leukocyte subsets. In reproductive biology, these molecules and related cells have been implicated in ovulation, menstruation, parturition and embryo implantation as well as in pathological processes such as preterm delivery, endometriosis, ovarian hyperstimulation syndrome and HIV infection (Simón *et al.*, 1998).

Traditionally, chemokines are classified into two groups, the  $\alpha$  or CXC chemokines and the  $\beta$  or CC chemokines, according to the position of the first two of the four consecutive cysteine residues. Interleukin (IL)-8, an  $\alpha$ -chemokine, is a potent chemoattractant and activator of neutrophils (Mukaida *et al.*,

1989) and T-lymphocytes (Larsen *et al.*, 1989). IL-8 is produced by a variety of cell types, including monocytes, fibroblasts, lymphocytes and epithelial and endothelial cells (Baggiolini and Dahinden, 1994). In the human reproductive tract, IL-8 has been detected in the cervix (Barclay *et al.*, 1993), placenta (Saito *et al.*, 1994), chorio-decidua (Dudley *et al.*, 1993) and endometrium (Arici *et al.*, 1993). Although monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 belongs to the  $\beta$ -chemokine subfamily, it is a closely related protein and a potent chemoattractant and activator of monocytes, macrophages, T-cells, basophils, mast cells and natural killer cells. MCP-1 is secreted by a number of cell types such as endothelial cells (Sica *et al.*, 1990), fibroblasts (Yoshimura and Leonard, 1990), monocytes and lymphocytes (Yoshimura and Leonard, 1990). It has been

detected in normal endometrium (Arici *et al.*, 1995) and endometriotic cells (Akoum *et al.*, 1996). The  $\beta$ -chemokine, RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted), is a chemoattractant for monocytes, eosinophils and basophils, and has been localized to eutopic endometrium and ectopic endometriotic implants (Homung *et al.*, 1997).

During the peri-implantation period in the absence of embryo, there is an accumulation of specific leukocyte subsets in the endometrial stroma due to migration from blood vessels and neighbouring tissues (Bulmer and Johnson, 1991). During implantation, when the human blastocyst is present, this specific leukocyte infiltration pattern into the endometrium continues (Bulmer *et al.*, 1985). The existence of a cyclical pattern of specific leukocytes during the implantation window is suggestive of steroid control, but the fact that they do not possess either estrogen or progesterone receptors (King *et al.*, 1996) suggests that this regulation may be exerted indirectly (Del Pozo *et al.*, 1997). Therefore, the molecular mechanisms implicated in the attraction of specific leukocyte subsets during the peri-implantation period remain unknown.

A specific molecular cross-talk between the embryo and endometrium has been reported during the human implantation process (Glasser *et al.*, 1991; De los Santos *et al.*, 1996). The endometrial epithelium is an important element where the molecular interactions between the embryo and the endometrium seem to be initiated (Simón *et al.*, 1997, 1999; Galán *et al.*, 2000; Meseguer *et al.*, 2001), and where chemokines are produced and received.

In this investigation, we have studied the immunolocalization of endometrial chemokines (IL-8, MCP-1 and RANTES) in an *in-vivo* model for uterine receptivity. Furthermore, the embryonic regulation of chemokines (IL-8 and MCP-1) produced by endometrial epithelial cells (EEC) was assessed using an *in-vitro* model for the apposition phase of human implantation.

## Materials and methods

### *Institutional approval and informed consent*

This study was approved by the institutional review board on the use of human subjects in research at the Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) and complies with the Spanish Law of Assisted Reproductive Technologies (35/88). All patients participating in this study signed a written statement of consent and received information about the study.

### *Experimental design*

To study the immunolocalization of endometrial chemokines (IL-8, MCP-1 and RANTES), endometrial samples from hormone replacement therapy (HRT) cycles of oocyte recipients were obtained during non-receptive, pre-receptive and receptive phases.

The embryonic regulation of EEC IL-8 and MCP-1, in an *in-vitro* model for apposition, was investigated at the mRNA level (by Northern blot analysis) and at the levels of protein production (by flow cytometry and immunohistochemistry) and protein secretion (by ELISA).

### *Serum and endometrial samples obtained in from HRT cycles*

Patients undergoing oocyte donation as embryo recipients (aged 23–39 years) received HRT in a mock cycle prior to the cycle of treatment

(Remohí *et al.*, 1995). Briefly, patients were desensitized for ovarian function with leuprolide acetate (1 mg/day) starting at the secretory phase of the previous menstrual cycle. In addition, estradiol ( $E_2$ ) valerate (Progynova; Schering, Madrid, Spain) 2 mg/day was started on day 1 of the next cycle and continued until day 8, and then increased to 4 mg/day from days 9–11, and to 6 mg/day from days 12–22. Natural micronized progesterone (Progefix; Effik Lab., Madrid, Spain) at 800 mg/day was administered vaginally from days 16–22.

According to the period of clinical receptivity, endometrial biopsies (B) and serum samples (S) were obtained in three different phases: non-receptive (S1, B1; day 13), pre-receptive (S2, B2; day 18) and receptive (S3, B3; day 21).

$E_2$  was measured in the serum samples using an immunoenzymatic assay (MEIA, Imx; Abbot Scientific, Madrid, Spain). The inter- and intra-assay coefficient of variations (CVs) for  $E_2$  at 0.827 nmol/l were 6.7 and 6.3% respectively. Progesterone was measured by radioimmunoassay (Biometriex, Charbonnières Les Bains, France). The CVs for progesterone at 0.699 nmol/l were 9 and 10% respectively.

Endometrial biopsies were fractionated and a portion was weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at  $-70^\circ\text{C}$  until used for molecular biology. Other portions of the endometrial biopsies were dated by histology according to the criteria of Noyes *et al.* (Noyes *et al.*, 1950).

### *Immunohistochemistry*

Formalin-fixed and paraffin-embedded endometrial biopsies were sectioned and mounted on glass slides coated with Vectabond TM (Vector Lab, Burlingame, CA, USA). Twelve serial sections (5  $\mu\text{m}$ ) from each sample were prepared and the first and last sections were stained with haematoxylin–eosin. After deparaffinization and rehydration, sections were rinsed three times with phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min. Non-specific binding was blocked with normal milk (50 mg/ml in PBS). Then, sections were rinsed three times with PBS/0.05% Tween 20 (PBS-T), pH 7.4 and incubated for 1.5 h at  $37^\circ\text{C}$  with the following specific antibodies: mouse anti-human IL-8 (Genzyme Diagnostics, Cambridge, MA, USA), mouse anti-human MCP-1 and mouse anti-human RANTES (Pharmingen, San Diego, CA, USA), each at 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . After rinsing four times with PBS-T, sections were incubated for 1.5 h at  $37^\circ\text{C}$  with the secondary antibody, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG whole molecule (Sigma, St Louis, MO, USA). Sections were then washed four times with PBS-T and gently rinsed with distilled water. Sections were mounted in aqueous mounting medium (Dako, Barcelona, Spain) and immunolocalization of chemokines was visualized and photographed using an Olympus 35 mm camera attached to a fluorescence microscope (Nikon, Japan). Immunostaining intensity was evaluated in at least three different specimens obtained from four different patients and interpreted as absent (0), weak (+), moderate (++) or intense (+++) by two independent observers in a blinded fashion.

### *Endometrial separation, culture and embryo co-culture*

Endometrial biopsies were minced into small pieces (<1 mm) and digested with a mild collagenase solution (0.1%) at  $37^\circ\text{C}$  for 1 h. Endometrial epithelium was isolated and purified as previously described (Simón *et al.*, 1993). EEC were cultured to confluence in a steroid-depleted medium (Simón *et al.*, 1994) containing a 3:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium, MCDB-105 and 5  $\mu\text{g}$  insulin (all Sigma), supplemented with 10% charcoal-dextran-treated fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT, USA). The homogeneity of EEC cultures was assessed by morphological characteristics (scanning electron microscopy) (Simón *et al.*, 1999) and using specific antibodies for the immunocytochemical staining of cytokeratin (an epithelial cell marker) (Simón *et al.*, 1994). EEC cultures showed

<1% contamination with endometrial stromal cells (vimentin-positive) and macrophages (CD68 antigen-positive) (Simón *et al.*, 1994). After confluence, the culture media was replaced by a 1:1 mixture of IVF:S2 medium (Scandinavian IVF Science AB, Gothenburg, Sweden). Forty-eight hours after insemination of oocytes, each 2- to 4-cell human embryo was transferred to an EEC monolayer. When embryos reached the 8-cell stage, the medium was replaced by a S2 medium (Scandinavian IVF) up to the blastocyst stage. Embryonic development was checked daily and media was changed every 24 h. On day 6 of co-culture, blastocysts were transferred to the recipient using a Frydman catheter. EEC that had been cultured alone under the same conditions were used as controls. Conditioned media from cultures of EEC without embryos, EEC with blastocysts and EEC with arrested embryos were collected each day from days 3–6 (transfer day) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until chemokine determinations were performed.

#### RNA isolation, oligonucleotide probe synthesis and Northern blot analysis

Total RNA was isolated from endometrial tissue samples and from EEC cultures by a modification of the guanidinium isothiocyanate method (Chomczynski *et al.*, 1987) using RNAzol according to the manufacturer's instructions (Tel-Test Inc., Friendswood, Texas, USA). RNA concentrations were determined by optical density (Shimadzu 1201 Spectrophotometer, Japan). The A260/A280 ratio for each RNA sample was always between 1.6 and 1.8.

For Northern blot analysis, specific oligonucleotide probes for IL-8, MCP-1 and RANTES were synthesized. The sequence of IL-8 oligonucleotide probe (TGTTGGCGGCGCAGTGTGGTCCACTC-TCAATCA) corresponds to a portion of exon 2 of the IL-8 gene (Matsushima *et al.*, 1988). The sequence of MCP-1 oligonucleotide probe (TTGGGTTTGGCTGTCCAGGTGGTCCATGGA) was complementary to nucleotides 256–285 of the coding region of human MCP-1 cDNA (Yoshimura *et al.*, 1989). The RANTES probe was an oligonucleotide (GCTCATCTCGAAAGAGTTGATGACTCCCG-AACITTTCTTCTCTCTGGGTT) synthesized based on the reported sequence of the coding region for human RANTES (Oppenheim *et al.*, 1991). Probes were end-labelled with [ $^{32}\text{P}$ ] ATP (Arici *et al.*, 1993, 1995; Manri *et al.*, 1996).

To normalize the amount of total RNA transferred to the blot, we used a cDNA probe for 28S rRNA, kindly provided by Dr L.L. González, Hahnemann University, PA, USA. Plasmid was amplified and isolated, and the 1.6 kb insert in vector pGEMz (2.7 kb) (Promega Corporation, Madison, WI, USA) was removed using *EcoRV/Bam*III double digestion and radiolabelled with [ $^{32}\text{P}$ ] ATP with a random primer DNA labelling kit (Roche, Barcelona, Spain).

For Northern blot analysis, total RNA samples (10–15  $\mu\text{g}$ ) were electrophoresed on a 1% agarose/formaldehyde denaturing gel for 2 h at 76 V in 3N-morpholino-propanesulfonic acid buffer (Sambrook *et al.*, 1989). The integrity of the RNA was analysed by ethidium bromide staining. Samples with evidence of RNA degradation were excluded from subsequent analysis. RNA was transferred onto positively charged nylon membrane (Roche) by capillary action in a  $10\times$  concentrated standard saline citrate (SSC) buffer. Finally, RNA was cross-linked to the membrane by UV treatment.

For IL-8 and MCP-1 oligonucleotides and 28S RNA probes, the blots were pre-hybridized overnight at  $65^{\circ}\text{C}$  in a buffer containing  $6\times$ SSC,  $5\times$ Denhardt's solution, 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS) and 200 ml of salmon sperm DNA (Sigma) according to Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989). Hybridization was performed overnight at  $65^{\circ}\text{C}$  in the same buffer with  $5\times 10^6$  cpm of radiolabelled probes. For RANTES pre-hybridization and hybridization, a solution containing 50% formamide,  $5\times$ Denhardt's solution, 0.2% (w/v) SDS, 50 nmol/l sodium phosphate buffer, pH 7.4, 5 mg/ml dextran

sulphate and 200 mg/ml salmon sperm DNA was used. Blots were pre-hybridized overnight at  $42^{\circ}\text{C}$  and hybridized in the same conditions with the radiolabelled RANTES oligonucleotide probe. After hybridization all blots were washed twice with  $6\times$ SSC/0.1% SDS for 15 mins at room temperature and with  $2\times$ SSC/0.1% SDS for 15 min at  $65^{\circ}\text{C}$ . Autoradiography was performed at  $-80^{\circ}\text{C}$  using Kodak X-Omat AR films. Blots were then stripped for 10 min at  $95^{\circ}\text{C}$  in 0.1% SDS prior to being reprobed. Bands from at least four blots for each chemokine were analysed by laser densitometry (Tecnología para Diagnóstico e Investigación, Madrid, Spain) and normalized using the 28S rRNA band for each sample analysed.

#### Flow cytometry

Intracellular detection of chemokines in EEC cultures was performed by flow cytometry based on previously developed procedures (Jung *et al.*, 1993; Prussin and Metcalfe, 1995; Simón *et al.*, 1997). Cultured EEC were detached with a cell scraper, retrieved, centrifuged and blocked with 1% bovine serum albumin in PBS for 2 h at  $4^{\circ}\text{C}$ . The cell pellet was resuspended in 70% ethanol at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 20 min and centrifuged. After washing with PBS-T, cells were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with IL-8 (Genzyme) and MCP-1 (Pharmingen) mouse anti-human antibodies (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). EEC suspensions were washed with PBS-T and mixed with FITC-conjugated anti-mouse IgG whole molecule (Sigma) diluted 1:64 for 150 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Cell suspensions were fixed with 1% paraformaldehyde for 1 h at  $4^{\circ}\text{C}$ . Negative controls were performed in each experiment by omitting the primary antibody. Cells were suspended in PBS and analysed in an Epics Elite flow cytometer (Coulter Cytometry, Hialeah, FL, USA) using an argon ion laser tuned at 488 nm and 15 mW. Debris was excluded by analysis of scatter properties. At least 10 000 events per sample were stored in list-mode files. Data were expressed as the percentage of fluorescent cells (%FC) and as intensity of luminosity in fluorescence arbitrary units (FAU). Variability in the intensity of the fluorescent signal was obtained with full peak of CV.

#### Determination of chemokine secretion

IL-8 and MCP-1 concentrations were measured on days 3 and 6 of embryo development in the 24 h conditioned media from EEC cultures and co-cultures with blastocysts and arrested embryos ( $n = 14$  per group for IL-8 and  $n = 12$  per group for MCP-1) by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). According to the manufacturer's information, the sensitivity of IL-8 and MCP-1 ELISAs were 10 and 5 pg/ml respectively. Intra- and inter-assay CVs were respectively 6.5 and 6% for IL-8, and 5.9 and 4.9% for MCP-1.

The stage of human embryo development during the culture period was also determined (day 3: 8–10 cells; day 4: morula stage; day 5: blastocyst;  $n = 10$  each). In addition, we investigated the secretion of chemokines to the culture medium by blastocysts or arrested embryos alone (without EEC).

We also studied the influence of  $\text{E}_2$  and progesterone on chemokine secretion by EEC cultures. The experimental design for  $\text{E}_2$  and progesterone effects was set by comparing two culture media: S2 medium (Scandinavian IVF) supplemented with  $\text{E}_2$  (0.2 nmol/l) and progesterone (10 nmol/l) and M3 medium (Medicult, Copenhagen, Denmark) without hormones.

#### Statistical analysis

Data of chemokine concentrations (from ELISA), %FC, intensity of luminosity (FAU; from flow cytometry) and densitometric units (from Northern blot analysis) were expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Science (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The analysis of variance

(ANOVA) for multiple comparisons was carried out among groups and  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## Results

### *Immunolocalization and hormonal regulation of IL-8, MCP-1 and RANTES in human endometrium.*

Peripheral  $E_2$  and progesterone levels were determined at the same time as endometrial biopsies were taken (non-receptive, pre-receptive and receptive phases) and were consistent with the expected physiological hormonal levels. On day 13 (non-receptive phase)  $E_2$  levels were  $333.2 \pm 92.9$  pg/ml and progesterone was undetectable. On day 18 (pre-receptive phase)  $E_2$  and progesterone levels were  $331.6 \pm 39.1$  pg/ml and  $9.5 \pm 3.8$  ng/ml respectively. On day 21 (receptive phase)  $E_2$  and progesterone levels were  $362.6 \pm 78.5$  pg/ml and  $10.5 \pm 6.1$  ng/ml respectively. These hormonal levels effectively stimulated endometrial differentiation, as assessed by Noyes histological criteria (Noyes *et al.*, 1950).

Endometrial samples showed a specific immunoreactive staining for IL-8, MCP-1 and RANTES (Figure 1). On day 13, when patients were treated with  $E_2$  valerate only, IL-8 and MCP-1 staining was localized at the luminal and glandular epithelium and perivascular endothelial cells (Figure 1, panels C1, F1). During the pre-receptive and receptive periods, on days 18 and 21, an increase in staining intensity at the same localizations was observed (Figure 1, panels D1, E1, G1, H1; Table I). RANTES was immunolocalized mainly at the stromal compartment and perivascular cells. Significant variation in staining intensity for RANTES on different days was not observed (Figure 1, panels I1, J1, K1; Table I). We attempted to study the pattern of mRNA expression of these chemokines in the whole endometrium, but the corresponding band for IL-8 and MCP-1 was not detected (Figure 2) due to the small contribution of the epithelial fraction to the complete endometrial sample. A band of 1.25 kb corresponding to RANTES was detected in total RNA from endometrial biopsies (Figure 3).

### *Embryonic regulation of chemokines at the mRNA level in cultured EEC*

Northern blot analysis to detect IL-8 mRNA with the control 28S hybridization signal was performed with total RNA from EEC cultured without embryos, with arrested embryos or with blastocysts and from endometrial biopsies. Although IL-8 mRNA was not detected in any of the whole endometrial biopsies at any phase studied, a band of 1.8 kb corresponding to IL-8 mRNA expression was detected in the total RNA from EEC. Quantitative densitometric analysis showed an up-regulation of IL-8 mRNA in EEC co-cultured with human embryos compared with EEC without embryos ( $P < 0.05$ ). Data were expressed as mean  $\pm$  SEM from four patients in each group (Figure 2).

Likewise, MCP-1 mRNA was not detected by Northern blot analysis in whole endometrial samples, but MCP-1 mRNA (a band of 0.7 kb) was detected in RNA prepared from EEC cultures. However, EEC MCP-1 mRNA did not show any

changes in expression in the presence or absence of human blastocysts (Figure 2).

Unlike the previous chemokines, a band of 1.2 kb corresponding to RANTES was detected in total RNA from endometrial biopsies, and no evidence of RANTES mRNA expression in EEC was detected (Figure 3). Since RANTES mRNA was not detected in EEC cultures we did not follow-up the study of this molecule in EEC at the protein level.

### *Embryonic regulation of IL-8 and MCP-1 protein produced by EEC*

To quantify the intracellular expression of IL-8 and MCP-1 in cultured EEC, flow cytometry was performed on EEC using the present in-vitro model for apposition, and the results were expressed as the percentage of stained cells (SC) and FAU (Figure 4).

IL-8 expression was significantly up-regulated in EEC in the presence of blastocysts ( $28.6 \pm 5.2\%$  SC;  $1.63 \pm 0.14$  FAU) compared with the control EEC (without embryos) ( $15.9 \pm 3.6\%$  SC;  $0.77 \pm 0.06$  FAU;  $P < 0.05$ ; Figure 4). Flow cytometric analysis showed quantitatively that EEC expressed higher intracellular MCP-1 concentrations than IL-8. However, MCP-1 flow cytometry analysis did not demonstrate any regulation by the presence of blastocysts ( $46.72 \pm 6.27\%$  SC;  $3.67 \pm 0.47$  FAU) compared with the absence of human embryos ( $41.9 \pm 6.6\%$  SC;  $3.31 \pm 0.59$  FAU) or the presence of arrested embryos ( $52.39 \pm 9.5\%$  SC;  $5.09 \pm 1.15$  FAU).

### *Embryonic regulation of IL-8 and MCP-1 protein secreted by EEC*

To confirm that the chemokines investigated originated exclusively from EEC, the conditioned media from blastocysts and arrested embryos cultured without EEC were analysed. In the conditioned media from human embryos, no measurable level of IL-8, MCP-1 or RANTES was discovered, confirming that these chemokines originate from EEC cultures.

To investigate the effect of  $E_2$  and progesterone on the secretion of EEC chemokines, two different culture media were used: S2 (Scandinavian IVF) supplemented with  $E_2$  (0.2 nmol/l) plus progesterone (10 nmol/l) and M3 (Medicult) without hormones. No statistical differences in chemokine secretion were found in EEC without blastocysts, EEC with blastocysts or EEC with arrested embryos, with or without  $E_2$  and progesterone.

EEC secreted IL-8 and MCP-1 at the ng/ml range. EEC IL-8 secretion was investigated on days 3 and 6 of embryonic development. On day 3, EEC that had been cultured alone secreted more IL-8 than EEC that had been co-cultured with normal developed or arrested embryos (EEC:  $45.5 \pm 2.7$  ng/ml; EEC-blastocyst:  $30.5 \pm 1.7$  ng/ml; EEC-arrested embryo:  $31.3 \pm 1.4$  ng/ml;  $P < 0.05$ ; Figure 5A). However, on day 6 no differences were observed (EEC:  $28.3 \pm 2.3$  ng/ml; EEC-blastocyst:  $29.9 \pm 1.8$  ng/ml; EEC-arrested embryos:  $26.3 \pm 2.3$  ng/ml; Figure 5A).

MCP-1 secretion by EEC exhibited a similar pattern to IL-8. On day 3, EEC that had been cultured alone secreted more MCP-1 than EEC that had been co-cultured with normal developed or arrested embryos (EEC:  $41 \pm 3.9$  ng/ml; EEC-

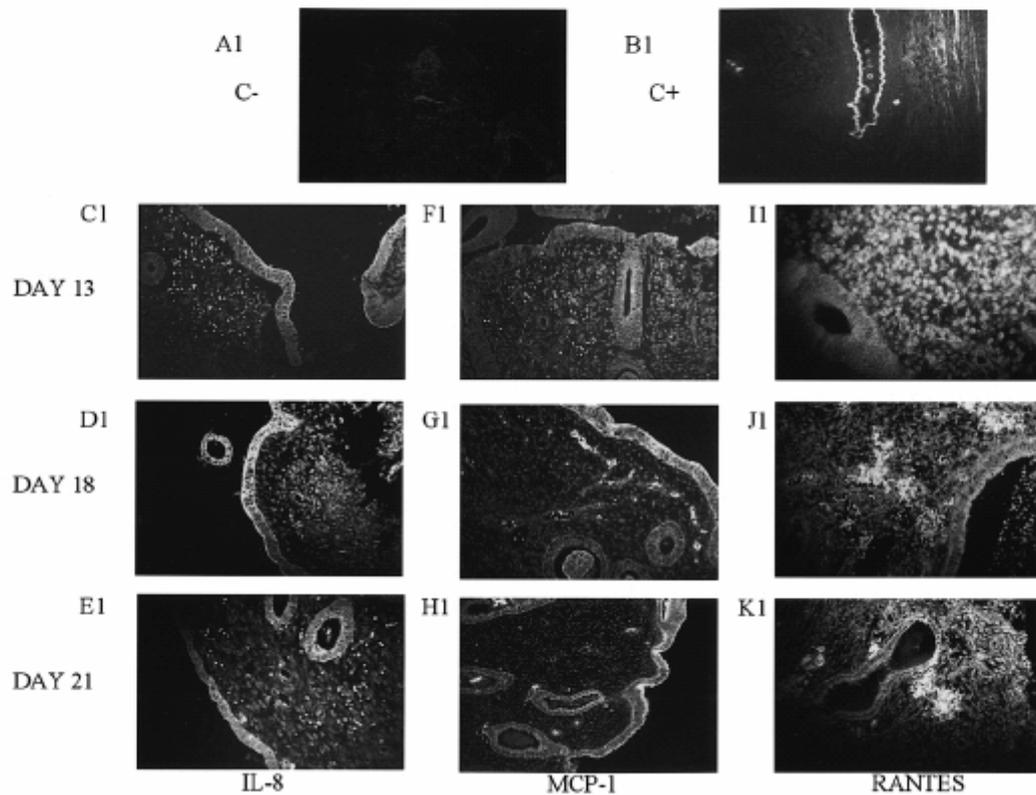


Figure 1. Immunolocalization of chemokines IL-8, MCP-1 and RANTES in human endometrium during an HRT cycle on days 13 (non-receptive phase), 18 (pre-receptive phase) and 21 (receptive phase). (A1) Negative control by omission of the first antibody. (B1) Positive control of IL-8 in tonsils. On day 13, moderate staining for IL-8 was present on perivascular lining, and glandular and luminal epithelium (C1). Staining intensity increased on days 18 (D1) and 21 (E1) in the same areas. On day 13, heterogeneous staining for MCP-1 was present in glandular and luminal epithelium and homogeneous expression was present on perivascular lining (F1). Staining intensity increased on days 18 (G1) and 21 (H1). RANTES staining was mainly immunolocalized at the stromal compartment, forming clusters, and at the perivascular lining. No variation was observed during the three phases studied (I1, J1, K1).

Table I. Summary of the immunohistochemical experiments identifying IL-8, MCP-1 and RANTES in different compartments of the human endometrium during the non-receptive (day 13), pre-receptive (day 18) and receptive (day 21) phases in HRT cycles. Designations of + (weakly positive) to +++ (intensely positive) indicate the relative intensities of the signals averaged for at least three different samples. Variability between readers is indicated with a slash mark

	Day 13			Day 18			Day 21		
	EPIT	ST	END	EPIT	ST	END	EPIT	ST	END
IL-8	+/+	0/0	+/+	+/+/+	0/+	+/+/+	+/+/+/+	+/+	+/+/+/+
MCP-1	+/+	0/0	+/+	+/+/+	0/0	+/+/+	+/+/+/+	0/0	+/+/+/+
RANTES	0/0	+/+/+	+/+	+/+	+/+	+/+/+	0/0	+/+/+	+/+/+

EPIT = epithelial cells; ST = stromal cells; END = endothelial cells; IL-8 = interleukin-8; MCP-1 = monocyte chemoattractant protein-1.

normal developed embryos:  $30.8 \pm 4.6$  ng/ml; EEC-arrested embryos:  $34.7 \pm 0.5$  ng/ml;  $P < 0.05$ ). However, on day 6 of culture, no differences were observed in MCP-1 secretion between different EEC groups (EEC:  $29.6 \pm 3.3$  ng/ml;

EEC-blastocyst:  $23.4 \pm 1.8$  ng/ml; EEC-arrested embryos:  $25.7 \pm 3.3$  ng/ml).

In order to study the influence of embryonic quality on IL-8 secretion patterns, the conditioned media of EEC in

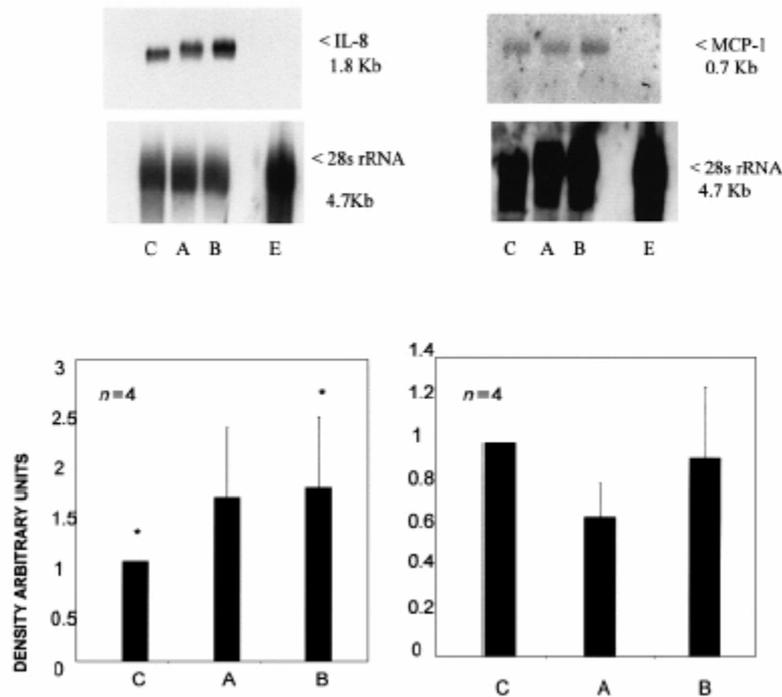


Figure 2. (Left panel) Northern blot analysis of IL-8 mRNA with the control 28S hybridization signal in total RNA from EEC cultured without an embryo (control, C), with an arrested embryo (A), or with a blastocyst (B) and receptive phase endometrial biopsy (samples obtained on day 21 from a normal menstrual cycle) (E). Approximately 10 µg of total RNA per lane was electrophoresed, transferred to a nylon membrane and hybridized with <sup>32</sup>P-labelled IL-8 and 28S probes. No band was detected in the total RNA from the whole endometrium; however, a band of 1.8 kb corresponding to IL-8 mRNA expression was detected in the total RNA from EEC. Densitometric analysis of IL-8 mRNA levels after normalization against the housekeeping probe (lower panel) revealed an up-regulation of IL-8 in EEC that had been co-cultured with human blastocysts compared with the control EEC. Data were expressed as mean ± SEM and cells were obtained from four patients for each group. (Right panel) Similar to IL-8, a band of 0.7 kb corresponding to MCP-1 mRNA expression was detected in the total RNA from EEC and no band was detected in the total RNA from the whole receptive phase endometrium. Densitometric analysis of MCP-1 mRNA levels after normalization against the control probe showed an up-regulation of IL-8 mRNA in EEC that had been co-cultured with human blastocysts compared with the control EEC. Cells were obtained from four patients for each group. Data were expressed as mean ± SEM.

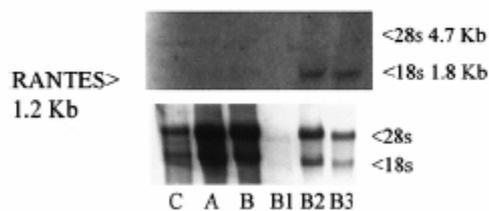


Figure 3. Northern blot analysis of RANTES mRNA in total RNA from EEC and endometrial biopsies. A band of 1.2 kb corresponding to RANTES mRNA was detected in the total RNA loaded from all of the endometrial biopsies (B1 day 13, B2 day 18, B3 day 21), and no band was detected in the total RNA from EEC cultured without an embryo (control, C), with an arrested embryo (A) or with a blastocyst (B).

contact with developing embryos ( $n = 10$ ) was analysed each day (days 3–6). Groups were divided according to the stage of embryonic development on each day. Results showed that, within the same day, those embryos with a normal development (day 3, 8- to 10-cell embryos; day 4, morula; day 5, early blastocyst) induce higher IL-8 secretion in EEC cultures compared with those embryos with retarded development or controls without embryos (Figure 5B). This effect was evident on days 3–5 of embryo development and disappeared on day 6 (Figure 5B).

### Discussion

The development of the uterine receptive stage is regulated by ovarian steroids and involves a multistep process, which includes plasma membrane transformation of the endometrial epithelium, changes in the cytoskeleton, decidualization of the stromal compartment and a specific recruitment of leukocyte

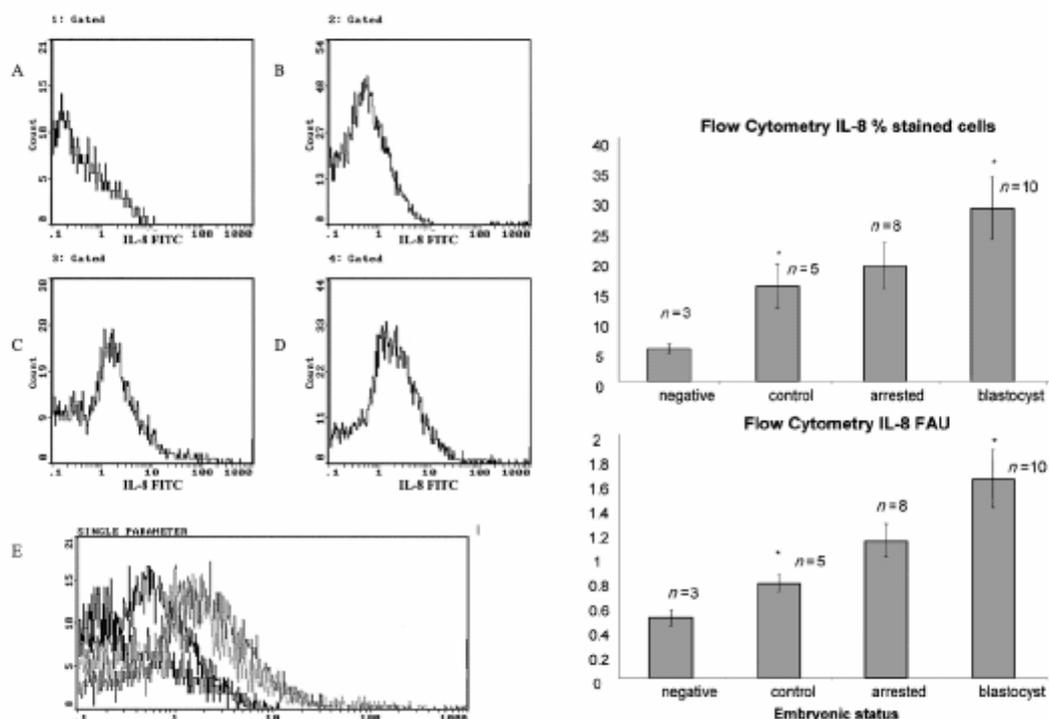


Figure 4. (Left panel) Representative cytofluorometric analysis of EEC stained against IL-8 and secondary anti-mouse IgG conjugated with FITC. The number of cells against fluorescence in logarithmic scale is presented in these graphs. Negative control (A), EEC without an embryo (B), EEC with an arrested embryo (C), EEC with a single blastocyst (D), integrated graphic of the four individual graphics from the same experiment (E). (Right panel) Data from all the experiments was combined and expressed as mean  $\pm$  SEM of percentage of IL-8 stained cells and fluorescence arbitrary units (FAU). Asterisks denote a significant increase ( $P < 0.05$ ) of the percentage of stained cells and FAU from EEC in contact with a human blastocyst versus control EEC without an embryo.

subsets within the stroma. During implantation, leukocyte infiltration occurs in the decidua in humans, comprising of mainly large granular lymphocytes or natural killer cells and also macrophages and T-cells (Bulmer *et al.*, 1991), whereas in rodents the leukocytes implicated are granulocytes and macrophages (Tremellen *et al.*, 1998). Regulation of leukocyte recruitment in the uterus during implantation may be orchestrated by uterine epithelial cells which release an array of chemokines in a precise temporal pattern driven by ovarian steroids in humans (Critchley *et al.*, 1996) and rodents (Robertson *et al.*, 1996).

Our study is focused on the expression and production of endometrial chemokines during the implantation window. For this purpose, we first studied the immunolocalization of chemokines IL-8, MCP-1 and RANTES in the human endometrium. Our findings confirmed previous reports on the endometrial expression of these chemokines (Arici *et al.*, 1993, 1995; Critchley *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1997). Immunohistochemical experiments showed a different localization pattern: IL-8 and MCP-1 were mainly expressed in glandular and luminal epithelium and endothelial cells, whereas RANTES staining

was localized mainly in the stromal and endothelial cells. Northern blot analysis was not sensitive enough to detect IL-8 and MCP-1 mRNA bands from total endometrial RNA. However, these chemokine mRNAs were detected in total RNA from EEC cultures. Since endometrial stromal cells are the principal constituents of endometrial tissue, RANTES mRNA was detected in the entire endometrial RNA extract, and was absent in EEC cultures.

The hormonal regulation of these chemokines during this period was semi-quantitatively assessed at the immunoreactive protein level in an in-vivo model of hormonal regulation (Mesguer *et al.*, 2001). After previous estradiol stimulus, progesterone up-regulated the immunoreactive presence of IL-8 and MCP-1 in endometrial epithelium in the pre-receptive (day 18) and receptive (day 21) periods of the secretory phase of the menstrual cycle. This data is consistent with previous findings in natural menstrual cycles (Jones *et al.*, 1997; Arici *et al.*, 1998; Milne *et al.*, 1999). However, using an in-vivo model of progesterone withdrawal and maintenance, an elevation of IL-8 mRNA after progesterone withdrawal has been documented (Critchley *et al.*, 1999). These findings

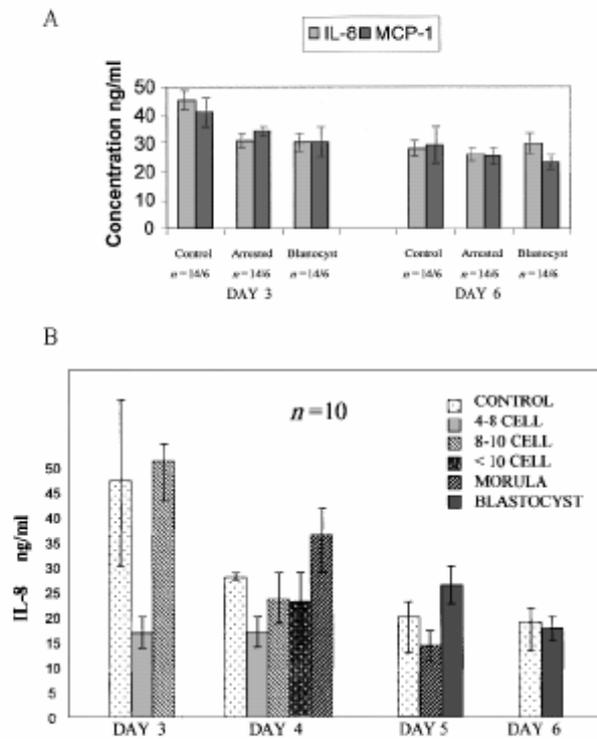


Figure 5. (A) Concentrations of IL-8 and MCP-1 were determined in 24 h conditioned media from the groups indicated on day 3 and 6 of embryonic development. (B) Concentrations of IL-8 in 24 h conditioned media from embryo-EEC cultured for four different days according to the embryonic developmental stage on each day of culture. Values are given in ng/ml as mean  $\pm$  SEM.

suggest the implication of these chemokines in endometrial receptivity by progesterone presence and in the premenstrual migration of leukocytes into the endometrium regulated by progesterone withdrawal.

The second significant information presented in this report concerns the embryonic production and regulation of these EEC chemokines. Neither IL-8, MCP-1 nor RANTES are secreted by the human embryo. However, this report uniquely demonstrates that the human blastocyst up-regulates EEC mRNA expression and peptide production of IL-8. This finding strongly suggests that the human embryo provides an important contribution to the endometrial chemokine network at the time of embryo implantation. Therefore, we hypothesized the existence of two separate EEC chemokine inducing 'programmes', one regulated by maternal hormones and one by the human embryo.

Another important point to be noted is that the hormonal induction of EEC IL-8 and MCP-1 production was not under direct steroid control in our in-vitro model. This finding indicates that steroid regulation of EEC IL-8 and MCP-1 protein *in vivo* might be through an indirect mechanism which involves stromal cells or other endometrial cells (King *et al.*,

1996). However, the embryonic regulation of EEC IL-8 was exerted through a direct mechanism, which involves soluble embryonic factors and their receptors, located in EEC. Nevertheless, the results of the embryonic regulation of endometrial chemokines should be interpreted within the limitations of an in-vitro model.

Paracrine regulation of endometrial epithelial cells by embryonic cytokines, i.e. LIF, HB-EGF and IL-1, has been implicated in the implantation process (Simón *et al.*, 1996). Embryonic cytokines may be involved in the release of endometrial chemokines, which in turn may induce leukocyte attraction and the activation of endometrial adhesion molecules (Del Pozo *et al.*, 1997; Simón *et al.*, 1997; García-Velasco and Arici, 1999a,b) during the adhesion phase of human implantation.

Further investigations are needed to assess the precise mechanism by which chemokines and leukocyte subsets participate in the acquisition of the endometrial receptive state within a spatial and temporally defined period of maximal uterine receptivity. The identification of signalling pathways and target cells responsible for this stage will provide important data to improve our understanding of the implantation process for fertility or contraceptive purposes.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Professor J.E.O'Connor, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Spain, for his expert technical assistance, continued interest and support. We are also very grateful to Professor A.Arici, School of Medicine, Yale University, USA, for his contribution to the IL-8 and MCP-1 molecular biology experiments. This work was supported in part by Spanish Government Grant FISS 00/0643.

## References

- Akoun, A., Lemay, A., McCall S., Turcot-Lemay, L. and Mahem, R. (1996) Elevated concentration and biologic activity of monocyte chemoattractant protein-1 in the fluid of patients with endometriosis. *Fertil. Steril.*, **66**, 17–23.
- Arici, A., Head, J.R., MacDonald, P.C. and Casey, M.L. (1993) Regulation of interleukin-8 gene expression in human endometrial cells in culture. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **94**, 195–204.
- Arici, A., McDonald, P.C. and Casey, M.L. (1995) Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endometrial cells in cultures. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **107**, 189–197.
- Arici, A., Seli, E., Senturk, L.M., Gutierrez, L.S. and Oral, E. (1998) Interleukin-8 in the human endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 1783–1787.
- Baggiolini, M. and Dahinden, A. (1994) CC Chemokines in allergic inflammation. *Immunol. Today*, **15**, 127–133.
- Barclay, C.G., Brennan, J.E., Kelly, R.W. and Calder, A.A. (1993) Interleukin-8 production by human cervix. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **169**, 625–632.
- Bulmer, J.N. and Johnson, P.M. (1985) Immunohistological characterisation of the decidua leukocytic infiltrate related to endometrial gland epithelium in early human pregnancy. *Immunology*, **55**, 35–44.
- Bulmer, J.N., Morrison, L., Longfellow, M., Ritson, A. and Pace, D. (1991) Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum. Reprod.*, **6**, 791–798.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156–159.
- Critchley, H.O.D., Kelly, R.W. and Kooy, J. (1994) Perivascular localization of interleukin-8 in human endometrium: a preliminary report. *Hum. Reprod.*, **8**, 1406–1409.
- Critchley, H.O.D., Kelly, R.W., Lea, R.G., Drudy, T.A., Jones, R.L. and Baird, D.T. (1996) Sex steroid regulation of leukocyte traffic in human decidua. *Hum. Reprod.*, **11**, 2257–2262.
- Critchley, H.O.D., Jones, R.L., Lea, R.G., Drudy, T.A., Kelly, R.W., Williams, A.R. and Baird, D.T. (1999) Role of inflammatory mediators in human endometrium during progesterone withdrawal and early pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**, 240–248.
- De los Santos, M.J., Mercader, A., Francés, A., Portales, E., Remohi, J., Pellicer, A. and Simon, C. (1996) Role of endometrial factors in regulating secretion of components of the immunoreactive human embryonic interleukin-1 system during embryonic development. *Biol. Reprod.*, **54**, 563–574.
- Del Pozo, M.A., Cabanas, C., Mootoya, M.C., Ager, A., Sanchez-Mateos, P. and Sanchez-Madrid, F. (1997) ICAM's redistributed by chemokines to cellular tropoids as a mechanism for recruitment of T-lymphocytes. *J. Cell. Biol.*, **137**, 493–508.
- Dudley, D.J., Troutman, M.S. and Mitchell, M.D. (1993) Inflammatory mediators regulate interleukin-8 production by cultured gestational tissues: evidence for a cytokine network at the chorio-decidual interface. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **76**, 404–410.
- Galin, A., O'Connor, J.E., Valbuena, D., Herrer, R., Remohi, J., Pampfer, S., Pellicer, A. and Simon, C. (2000) The human blastocyst regulates endometrial epithelial apoptosis in embryonic adhesion. *Biol. Reprod.*, **63**, 430–439.
- García-Velasco, J.A. and Arici, A. (1999) Interleukin-8 expression in endothelial stromal cells is regulated by integrin-dependent cell adhesion. *Mol. Hum. Reprod.*, **5**, 1135–1140.
- García-Velasco, J.A., Seli, E. and Arici, A. (1999) Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in human endometrial stromal cells by integrin-dependent cell adhesion. *Biol. Reprod.*, **61**, 548–552.
- Glasser, S.R., Mulholland, J. and Marci, S.K. (1991) Blastocyst endometrial relationships: reciprocal interactions between uterine epithelial and stromal cells and blastocysts. *Trophoblast. Res.*, **5**, 225–280.
- Hornung, D., Ryan, I.P., Chao, V.A., Vigne, J.L., Schriock, E.D. and Taylor, R.N. (1997) Immunolocalization and regulation of the chemokine RANTES in human endometrial and endometriosis tissues and cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **82**, 1621–1628.
- Jones, R.L., Kelly, R.W. and Critchley, H.O.D. (1997) Chemokines and cyclooxygenase-2 expression in human endometrium coincides with leukocyte accumulation. *Hum. Reprod.*, **12**, 1300–1306.
- Jung, T., Schauer, U., Heusser, C., Neumann, C. and Rieger, C. (1993) Detection of cytokines by flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, **159**, 197–207.
- King, A., Gardner, L. and Loke, Y.W. (1996) Evaluation of oestrogen and progesterone receptors expression in uterine mucosal lymphocytes. *Hum. Reprod.*, **11**, 1079–1082.
- Larsen, C., Anderson, A., Aella, E., Oppenheim, J.J. and Matsushima, K. (1989) The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science*, **243**, 1464–1466.
- Manni, A., Kleinberg, J., Ackerman, V., Bellini, A., Patalano, F. and Mattoli, S. (1996) Inducibility of RANTES mRNA by IL-1 $\beta$  in human bronchial epithelial cells is associated with increased NF- $\kappa$ B DNA binding activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **220**, 120–124.
- Matsushima, K., Moushita, K., Yoshimura, T., Lavu, S., Kobayashi, Y., Lew, W., Appella, E., Kung, H.F., Leonard, E.J. and Oppenheim, J.J. (1988) Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemoattractant factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by IL-1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, **167**, 1883–1893.
- Meseguer, M., Aplin, D., Caballero-Campo, P., O'Connor, J.E., Martín, J.C., Remohi, J., Pellicer, A. and Simon, C. (2001) Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated *in vitro* by the human blastocyst. *Biol. Reprod.*, **64**, 590–601.
- Milne, S.A., Critchley, H.O., Drudy, T.A., Kelly, R.W. and Baird, D.T. (1999) Perivascular interleukin-8 mRNA expression in human endometrium varies across the menstrual cycle and in early pregnancy deciduas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**, 2563–2567.
- Mukaich, N., Shiroo, M. and Matsushima, K. (1989) Genomic structure of the human monocyte derived neutrophil chemoattractant factor IL-8. *J. Immunol.*, **143**, 1366–1371.
- Noyes, R.W., Hertig, A.T. and Rock, J. (1950) Dating the endometrial biopsy. *Fertil. Steril.*, **1**, 3–25.
- Oppenheim, J., Zachariae, C.O.C., Mukaida, N. and Matsushima, K. (1991) Properties of the novel proinflammatory supergene 'intercine' cytokine family. *Annu. Revol. Immunol.*, **9**, 617–648.
- Prussin, C. and Metcalfe, D.D. (1995) Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J. Immunol. Methods*, **188**, 117–128.
- Remohi, J., Gutiérrez, A., Cano, F., Ruiz, A., Simon, C. and Pellicer, A. (1995) Long oestradiol replacement in an oocyte donation programme. *Hum. Reprod.*, **10**, 1387–1391.
- Robertson, S.A., Mayrhofer, G., and Seamark, F. (1996) Ovarian steroid hormones regulate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synthesis by uterine epithelial cells in the mouse. *Biol. Reprod.*, **54**, 183–196.
- Saito, S., Kasahara, T., Sakakura, S., Umekage, H., Harada, N. and Ichijo, M. (1994) Detection and localization of interleukin-8 mRNA and protein in human placenta and decidua tissues. *J. Reprod. Immunol.*, **27**, 161–172.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sica, A., Wang, J.M., Colotta, F., Dejana, E., Mantovani, A., Oppenheim, J.J., Larsen, C.G., Zachariae, C.O. and Matsushima, K. (1990) Monocyte chemoattractant and activating factor gene expression induced in endothelial cells by interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ). *J. Immunol.*, **144**, 3034–3038.
- Simón, C., Piquette, G., Francés, A. and Polan, M.L. (1993) Localization of interleukin-1 type 1 receptor and interleukin-1 $\beta$  in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **77**, 549–555.
- Simón, C., Piquette, G.N., Francés, A., el-Danasoury, I., Irwin, J.C. and Polan, M.L. (1994) The effect of interleukin-1 $\beta$  on the regulation of IL-1 receptor type 1 messenger ribonucleic acid and protein levels in cultured human endometrial stromal and glandular cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **78**, 675–682.
- Simón, C., Gimeno, M.J., Mercader, A., Francés, A., García-Velasco, J., Remohi, J., Polan, M.L. and Pellicer, A. (1996) Cytokines adhesion molecules-invasive proteinases. The missing paracrine/autocrine link in embryonic implantation? *Mol. Hum. Reprod.*, **2**, 405–424.
- Simón, C., Gimeno, M.J., Mercader, A., O'Connor, J.E., Remohi, J., Polan, M.L. and Pellicer, A. (1997) Embryonic regulation of integrins  $\beta$ 3,  $\alpha$ 4 and

- od in human endometrial epithelial cells *in vitro*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82, 2607-2616.
- Simon, C., Caballero-Campo, P., Garcia-Velasco, J.A. and Pellicer, A. (1998) Potential implications of chemokines in reproductive function: an attractive idea. *J. Reprod. Immunol.*, 38, 169-193.
- Simón, C., Mercader, A., García-Velasco, J.A., Nikas, G., Moreno, C., Remohi, J. and Pellicer, A. (1999) Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84, 2638-2646.
- Tremellen, K.P., Seaman, R.F. and Robertson, S.A. (1998) Seminal transforming growth factor beta 1 stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and inflammatory cell recruitment in the murine uterus. *Biol. Reprod.*, 58, 1217-1225.
- Yoshimura, T. and Leonard, E.J. (1990) Secretion by human fibroblasts of monocyte chemoattractant protein-1, the product of the gene JE. *J. Immunol.*, 144, 2377-2383.
- Yoshimura, T., Yuhki, N. and Moore, S. (1989) Human monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1): full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett.*, 244, 487-493.

Submitted on February 16, 2001; resubmitted on September 18, 2001; accepted on January 30, 2002

# II

# Hormonal and embryonic regulation of chemokine receptors CXCR1, CXCR4, CCR5 and CCR2B in the human endometrium and the human blastocyst

Francisco Dominguez<sup>1</sup>, Arancha Galan<sup>1</sup>, Jose Juan Luna Martin<sup>1</sup>, Jose Remohi<sup>1,2</sup>, Antonio Pellicer<sup>1,2,3</sup> and Carlos Simón<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Instituto Valenciano de Infertilidad Foundation (FIVIER) and <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, Valencia University School of Medicine, Valencia and <sup>3</sup>Department of Obstetrics and Gynecology Hospital Dr. Peset, Valencia, Spain

<sup>4</sup>To whom correspondence should be addressed at: Instituto Valenciano de Infertilidad, Plaza de la Policia Local 4 Valencia 46015, Spain. E-mail: csimon@interbook.net

Chemokines are implicated in the implantation process. The aim of this study was to investigate mRNA expression and protein levels of chemokine receptors CXCR1, CXCR4, CCR5 and CCR2B in human endometrium throughout the menstrual cycle, during HRT and in the human blastocyst. The regulation of chemokine receptors in the endometrial epithelium was also studied using an in-vitro model for the apposition phase of human implantation. We found up-regulation of endometrial CXCR1 mRNA (419-fold increase), CCR5 mRNA (612-fold increase) and CCR2B mRNA (657 fold-increase) during the luteal phase peaking in the pre-menstrual endometrium. CXCR4 mRNA levels presented a specific although modest (18-fold increase) up-regulation during the implantation window. These findings were corroborated at the protein level in natural and HRT cycles. Immunoreactive CCR5 and CCR2B receptors were detected in human blastocysts whereas CXCR4 and CXCR1 were not present. Chemokine receptors in cultured endometrial epithelial cells showed an up-regulation and polarization of CXCR1, CXCR4 and CCR5 receptors when a human blastocyst was present. The specific distribution and regulation of chemokine receptors in the endometrial epithelium and the human blastocyst suggest a possible implication of these receptors in the apposition and adhesion phases of human implantation.

*Key words:* blastocyst/chemokine receptors/endometrial epithelial cells/human endometrium/implantation

## Introduction

Chemokines (short for chemoattractant cytokines), a family of small polypeptides with a molecular weight in the range of 8–12 kDa, are specialized in the attraction of specific leukocyte subsets through their binding to cell-surface receptors. In reproductive biology, these molecules have been implicated in crucial processes such as ovulation, menstruation, embryo implantation, parturition and pathological processes such as preterm delivery, HIV infection, endometriosis and ovarian hyperstimulation syndrome (Cocchi *et al.*, 1995; Simón *et al.*, 1998).

Chemokines and their receptors are divided into two families based on structural and genetic considerations. All chemokines are structurally similar, having at least three  $\beta$ -pleated sheets and a C-terminal  $\alpha$ -helix. Most chemokines also have at least four cysteines in conserved positions (Kayisli *et al.*, 2002). In the CXC chemokine family ( $\alpha$ -chemokines), the two nearest cysteines (C) to the N-termini of family members are separated by a single (and variable) amino acid (X). Interleukin-8 (IL-8) ( $\alpha$ -chemokine) is a potent chemoattractant and activator for neutrophils (Mukeida *et al.*, 1989) and T lymphocytes (Larsen *et al.*, 1989). IL-8 is produced by a variety of cell types: monocytes, fibroblasts (Dudley *et al.*, 1993), lymphocytes, epithelial and endothelial cells (Baggiolini and Dahinden, 1994). It has been detected in the human reproductive tract, at the cervix (Barclay *et al.*, 1993), placenta (Saito *et al.*, 1994) and endometrium

(Arici *et al.*, 1993). Monocyte chemoattractant protein (MCP-1;  $\beta$ -chemokine) has been reported to attract NK cells (Loetscher *et al.*, 1996) as well as T lymphocytes (Loetscher *et al.*, 1994). MCP-1 is secreted by a number of cell types such as endothelial cells (Sica *et al.*, 1990), fibroblasts (Yoshimura and Leonard, 1990), monocytes and lymphocytes (Yoshimura and Leonard, 1989). It has been detected in normal endometrium (Arici *et al.*, 1995) and endometriotic cells (Akoum *et al.*, 1996). The  $\beta$ -chemokine RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted) is a chemoattractant for monocytes, eosinophils and basophils, and is localized in eutopic endometrium and ectopic endometriotic implants (Hornung *et al.*, 1997). Stromal-derived factor-1 (SDF-1;  $\alpha$ -chemokine) is involved in regulating a wide array of leukocytes, lymphopoiesis and controls integrin-dependent adhesion of T-cells to the endothelium (Campbell *et al.*, 1998). Most chemokines bind to the cell-surface or connective-tissue components such as glycosaminoglycans. Therefore, dimerization is favoured when chemokines associate with these molecules (Witt *et al.*, 1994). These interactions provide strong evidence that chemokine dimerization is a critical process *in vivo*.

Chemokine receptors belong to the superfamily of G-protein-coupled receptors (GPCR). The former receptors have seven sequences of 20–25 hydrophobic residues that form an  $\alpha$ -helix and span the plasma membrane, an extracellular N-terminus, three extracellular loops, three intracellular domains and an intracellular

**Table I.** Oligonucleotide primers with predicted respective PCR product sizes.

Gene	Sense Primers	Antisense Primers	bp
<b>CXCR1</b>	5'- ACACGCACACTGACCCAGGAA -3'	5'-CATCCGCCATTTTGCTGTGT- 3'	174
<b>CXCR4</b>	5'- TTGTGGGTGGTTTGTGTTCCA -3	5'-CTGTGGTCTTGAGGGCCTTG- 3'	145
<b>CCR2</b>	5'- AGTGGGTCTTTGGGAATGCA -3'	5'-CCGTCCTGGCTTTAAAGCA- 3'	147
<b>CCR5</b>	5'-GGACCAAGCTATGCAGGTGAC -3'	5'-TTGGCAATGTGCTTTTGGAA- 3'	129
<b>GAPDH</b>	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC -3'	5'-GAAGATGGTGATGGGATTC-3'	192

C-terminal tail. These receptors transmit information to the cell about the presence of chemokine gradients in the extracellular environment. They are named depending on the structure of their ligand (CXC or CC). CXCR4 is expressed on neutrophils, monocytes, B and T lymphocytes, and its primary ligand is SDF-1 (Nagasawa *et al.*, 1996). CCR5, receptor for RANTES and macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1)  $\alpha$  and  $\beta$  is expressed on monocytes, dendritic cells, activated T lymphocytes and natural killer (NK) cells (Chantakru *et al.*, 2001). CCR2B, expressed in monocytes, basophils, dendritic cells, NK cells and activated T lymphocytes is the main receptor for MCP-1, -2, -3 and -4 (Polentarutti *et al.*, 1997). CXCR1, a receptor for interleukin 8 (IL-8) and GCP-2, is expressed mainly in neutrophils and dendritic cells (Wuyts *et al.*, 1998).

The binding of chemokines to their receptors is followed by the involvement of heterotrimeric G proteins (Reif and Cantrell, 1998; Ward *et al.*, 1998) and the triggering of intracellular second messengers such as cAMP and calcium. One of the most impressive effects of the binding of chemokines to their receptors on leukocytes is the morphological change which this provokes; the cytoskeleton is rearranged, integrin-mediated focal adhesions are formed and the cell binds and detaches from the substrate in a coordinated manner, with extension and retraction of pseudopods responsible for directional migration (Bokoch, 1995; Ward *et al.*, 1998).

A specific molecular crosstalk between embryo and endometrium has been reported during the human implantation process (Glasser *et al.*, 1991; De los Santos *et al.*, 1996). The endometrial epithelium is an important element where the molecular interactions between the embryo and the endometrium seem to be initiated (Simón *et al.*, 1997; Galan *et al.*, 2000; Meseguer *et al.*, 2001). The endometrial epithelium produces and secretes chemokines (Arici *et al.*, 1998; Caballero-Campo *et al.*, 2002).

In the present study, we have analysed mRNA expression and immunolocalization of chemokine receptors (CXCR1, CCR5, CXCR4 and CCR2B) in the human endometrium throughout the natural menstrual and HRT cycles and in the human blastocyst. Furthermore, we have also studied the embryonic regulation of these endometrial chemokine receptors using an in-vitro model for the apposition phase of human implantation.

## Materials and methods

### Institutional approval and informed consent

This study was approved by the Institutional Review Board on the use of human subjects in research at the Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI), and complies with Spain's Law of Assisted Reproductive Technologies (35/88). All patients participating in this study signed a written statement of consent and were informed of the details of the study.

### Experimental design

To investigate the mRNA expression of endometrial chemokine receptors (CXCR1, CXCR4, CCR2B and CCR5) throughout the menstrual cycle and their hormonal regulation *in vivo*, we used two different models: (i) endometrial samples from fertile patients undergoing natural cycles and (ii) HRT in mock cycles from participants in the ovum donation programme. To study the embryonic regulation of endometrial chemokine receptors, we have used an in-vitro model of the apposition phase of human implantation, with endometrial epithelial cells co-cultured with or without human blastocysts. Triploid embryos were analysed in order to localize the chemokine receptors on the human blastocyst.

### Endometrial samples

Human endometrial tissues were obtained throughout the menstrual cycle from normal fertile women aged 23–39 years ( $n = 15$ ). A small portion of each specimen was histologically examined and dated according to Noyes *et al.* (1950). Endometrial biopsies were distributed into five groups: group I, early-mid-proliferative (days 1–8); group II, late proliferate phase (days 9–14); group III, early secretory phase (days 15–18); group IV, mid-secretory phase (days 19–22); and group V, late secretory phase (days 23–28). Endometrial expression (real time PCR) and localization (immunohistochemistry) of the four receptors were analysed using these samples.

Hormonal regulation of these receptors was also investigated at the protein level in endometrial biopsies from ovum donation recipients undergoing HRT (Meseguer *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2000). Serum and endometrial samples were obtained in mock cycles from five patients (23–29 years) receiving ovum donation and HRT, as previously described (Caballero-Campo *et al.*, 2002). Briefly, serum samples (S) and uterine biopsies (B) were taken from each patient at day 13 (S1, B1), 18 (S2, B2) and 21 (S3, B3). Therefore, at the time when serum and biopsies were collected, patients were treated for 3 days with 6 mg/day of estradiol valerate (EV) and for 6 days with 6 mg/day of EV plus 800 mg/day of progesterone. Biopsies were dated histologically according to Noyes *et al.* (1950). E<sub>2</sub> was measured in the serum by immunoenzymatic assay (MEIA, Imx; Abbot Scientific, Madrid, Spain). Progesterone was measured by radioimmunoassay (biomerieux, Charbonnières Les Bains, France).

### RNA isolation

RNA extraction was performed according to Chomczynski and Sacchi (1987), with minor modifications using the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Briefly, each tissue was weighed and 500  $\mu$ l Trizol reagent was added for every 100 mg. Total RNA was separated from DNA and proteins by adding chloroform, and was precipitated with isopropanol (overnight,  $-20^{\circ}\text{C}$ ). The precipitate was washed twice in ethanol, air-dried and resuspended in 75% diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water. RNA was quantified by spectrophotometry on a SmartSpec 3000 spectrophotometer (Biorad, Barcelona, Spain). A260/A280 ratios for all samples used varied between 1.6 and 1.9.

### Reverse transcription

RT was carried out using a Advantage RT-for-PCR kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA). The mastermix per sample was prepared as follows: 5 $\times$ reaction buffer, dNTP mix (10 mmol/l each), recombinant RNase inhibitor and MMLV

(Moloney-Murine Leukemia Virus) reverse transcriptase. One  $\mu\text{g}$  of each sample was diluted in DEPC-treated water with oligo (dT)18. The mixture was then heated for 2 min at 70°C and kept on ice until the mastermix was added. For each RT, a blank was prepared using all the reagents except the RNA sample, for which an equivalent volume of DEPC-treated water was substituted. The RT blank was used to prepare the PCR blank (below). Once all the components were mixed, the samples were incubated for 1 h at 42°C, and heated for 5 min at 94°C to prevent cDNA synthesis and destroy DNase activity. The product was diluted with DEPC-treated water to a final volume of 100  $\mu\text{l}$  and stored at -20°C until PCR analysis was performed.

#### Real time fluorescent PCR

The LightCycler (Roche Diagnostics, GmbH Mannheim, Germany) Instrument was used to determine the relative quantification of gene expression of CXCR1, CXCR4, CCR2B and CCR5 receptors; GAPDH was chosen as the housekeeping gene control. The SYBR<sup>®</sup> Green I double-stranded DNA binding dye (Roche Diagnostics, GmbH Mannheim, Germany) was chosen for these assays. Oligonucleotides were designed using Primer Express<sup>®</sup> software (AB, Foster City, CA, USA). Oligonucleotide sequences designed for the amplification of the different genes are shown in Table I. All real time PCR assays were run using SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix and the universal thermal cycling parameters indicated by the manufacturer (60°C annealing temperature for all primers). Relative quantification was carried out by employing the standard curve method using the SYBR<sup>®</sup> Green I dye. Data were presented as the relative average value for each gene investigated and then normalized with the average value of the housekeeping gene obtained on different days of each designated phase of the menstrual cycle. No direct comparison among different genes could be made as the standard was composed of different cDNA species, each at different concentrations. Quantification data were analysed at the beginning of the exponential phase (cycles 30–35) with the LightCycler analysis software 3.5 version. Background fluorescence was removed by setting a noise band. Duplicates showing >5% variation were discarded. To validate a real time PCR, standard curves with  $r > 0.95$  and slope values between 3.1 and 3.4 were required. To explore whether other non-expected products were also amplified, PCR products after 40 cycles were subjected to a subsequent agarose 2% gel electrophoresis with ethidium bromide to confirm amplification specificity (data not shown).

#### Immunohistochemistry of human endometrium

Formalin-fixed and paraffin-embedded endometrial biopsies were sectioned and mounted on glass slides coated with Vectabond<sup>™</sup> (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Twelve serial sections (6  $\mu\text{m}$ ) from each sample were prepared and the first and last sections stained with haematoxylin-eosin. After deparaffinization and rehydration, sections were washed three times for 5 min with phosphate-buffered saline (PBS). Non-specific binding was blocked with non-fat milk (50 mg/ml in PBS). Sections were then washed three times with PBS/0.05% Tween 20, pH 7.4 (PBS-T) and incubated for 1.5 h at 37°C with the following specific antibodies: primary monoclonal antibody (Ab) against human CXCR4 and CCR5 from Pharmingen (San Diego, CA, USA), primary rabbit polyclonal Ab for human CXCR1 and CCR2B from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), each at 10 mg/ml. Negative controls were incubated with PBS with 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% Tween 20. After being washed four times with PBS-T, sections were incubated for 1.5 h at 37°C with the secondary antibody, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG whole molecule (Sigma, St Louis, MO, USA). Afterwards, sections were washed four times with PBS-T and gently washed with distilled water. Sections were mounted in aqueous mounting medium (Dako, Barcelona, Spain) and immunolocalization of HRT endometrial chemokines was visualized and photographed using an Olympus 35 mm camera attached to a fluorescence microscope (Nikon, Japan). Natural cycle endometrium photomicrographs were obtained using a Nikon digital camera coolpix 995.

Immunostaining intensity was evaluated in at least three different specimens and interpreted as absent (0), weak (+), moderate (++) or intense (+++) by three independent observers. Positive controls were tonsil sections and negative controls were endometrial samples incubated in PBS with 1% BSA and 0.1% Tween 20 without primary antibody.

#### Immunocytochemistry of human blastocysts

For the immunostaining of human blastocysts, we employed an avidin–peroxidase staining method using primary monoclonal antibody (Ab) against human CXCR4 and CCR5 (Pharmingen), primary rabbit polyclonal Ab for human CXCR1 and CCR2B (Santa Cruz) each at 10 mg/ml. Embryos were previously fixed for 30 min at 4°C with freshly prepared 2% paraformaldehyde in PBS micro-drops covered by oil (Simón *et al.*, 1994). After fixation, blastocysts were treated with 0.2% Triton X-100 (Sigma) in PBS for 10 min at 4°C to permeabilize the fixed cells and thereby facilitate the access of the antibody. Biotin-labelled goat secondary antibodies (Sigma) were incubated for 30 min at 37°C. Incubation for 4–6 min with a working substrate solution of avidin–peroxidase (Sigma), diluted 1/40, was carried out. Blastocysts were photographed using an Olympus 35 mm camera attached to an inverted microscope (Nikon, Japan). Of a total of 24 blastocysts used, six human triploid blastocysts were analysed for each molecule and three were used as negative controls.

#### In-vitro model for apposition

Based on our previous study, we have developed an in-vitro model to observe interactions between the human embryo and endometrial epithelial cells (EEC). This model has led to a clinical programme in which embryos are co-cultured with EEC until blastocyst stage and then transferred back to the mother (Simón *et al.*, 1999). Embryos were obtained after ovulation induction and insemination, employing routine IVF or ICSI procedures.

Endometrial biopsies from patients were minced into small pieces (<1 mm) and digested with a mild collagenase solution (0.1%) for 1 h at 37°C. The endometrial epithelium was isolated and purified as previously described (Simón *et al.*, 1993). EEC were cultured to confluence in a steroid-depleted medium containing a 3:1 mixture of DMEM (Sigma), MCDB-105 (Sigma) and 5 mg insulin (Sigma) and supplemented with 10% charcoal–dextran-treated bovine fetal serum (Hyclone, Logan, UT, USA). The homogeneity and purity of EEC cultures were assessed using immunohistochemical markers (Simón *et al.*, 1994) and morphological characteristics (scanning electron microscopy) (Simón *et al.*, 1999). After confluence, the culture media were replaced by a 1:1 mixture of IVF:S2 medium (Scandinavian IVF Science AB, Gothenburg, Sweden).

Forty-eight hours after insemination of oocytes, each 2–4-cell human embryo was transferred to an EEC monolayer. When embryos reached the 8-cell stage, the medium was replaced by S2 medium (Scandinavian IVF) until blastocyst stage. Embryonic development was checked daily and the medium changed every 24 h. On day 6 of co-culture, blastocysts were transferred to the recipient using a Frydman catheter. EEC cultured alone under the same conditions were used as controls. Individual human embryos were co-cultured with EEC for 5 days (from day 2 to day 6 of embryonic development). After embryo transfer, EEC wells were divided into two groups: EEC with embryos which had reached the blastocyst stage and EEC without embryos (controls).

#### Confocal analysis

Immunocytochemistry was performed following the same protocol as that previously described with the same antibodies but using EEC from our in-vitro apposition model. Confocal analysis was performed with an NRC 1024 instrument (Bio-Rad, Hempstead, UK). The excitation line used was 488 (FITC). The filter used was HQ515/10 (FITC). Transmitted light images were acquired for every field.

## Results

### mRNA expression and protein localization of CXCR1, CXCR4, CCR2B and CCR5 receptors throughout the menstrual cycle

The mRNA expression of the four chemokine receptors was analysed throughout the menstrual cycle in three separate experiments each with five patients using real time PCR. Data is presented as a relative average value for each gene investigated and normalized with the average value of the housekeeping gene obtained on different days of each phase of the menstrual cycle in three different experiments. The lowest value for each receptor in each phase of the menstrual cycle

was considered as basal expression and quantified as 1. The intensity of expression for a given receptor in a specific phase of the menstrual cycle is expressed as fold increase compared with the basal expression.

CXCR1 (Figure 1A), CCR2B (Figure 1C) and CCR5 (Figure 1D) mRNA are highly regulated throughout the menstrual cycle with maximal expression in the luteal phase. The mRNA expression of these three receptors suggested a progesterone-dependent pattern starting low in the early secretory phase and continuing through the mid-secretory phase and peaking in the late secretory phase (612-fold increase for CCR5, 419-fold increase for CXCR1 and 657-fold increase for CCR2B).

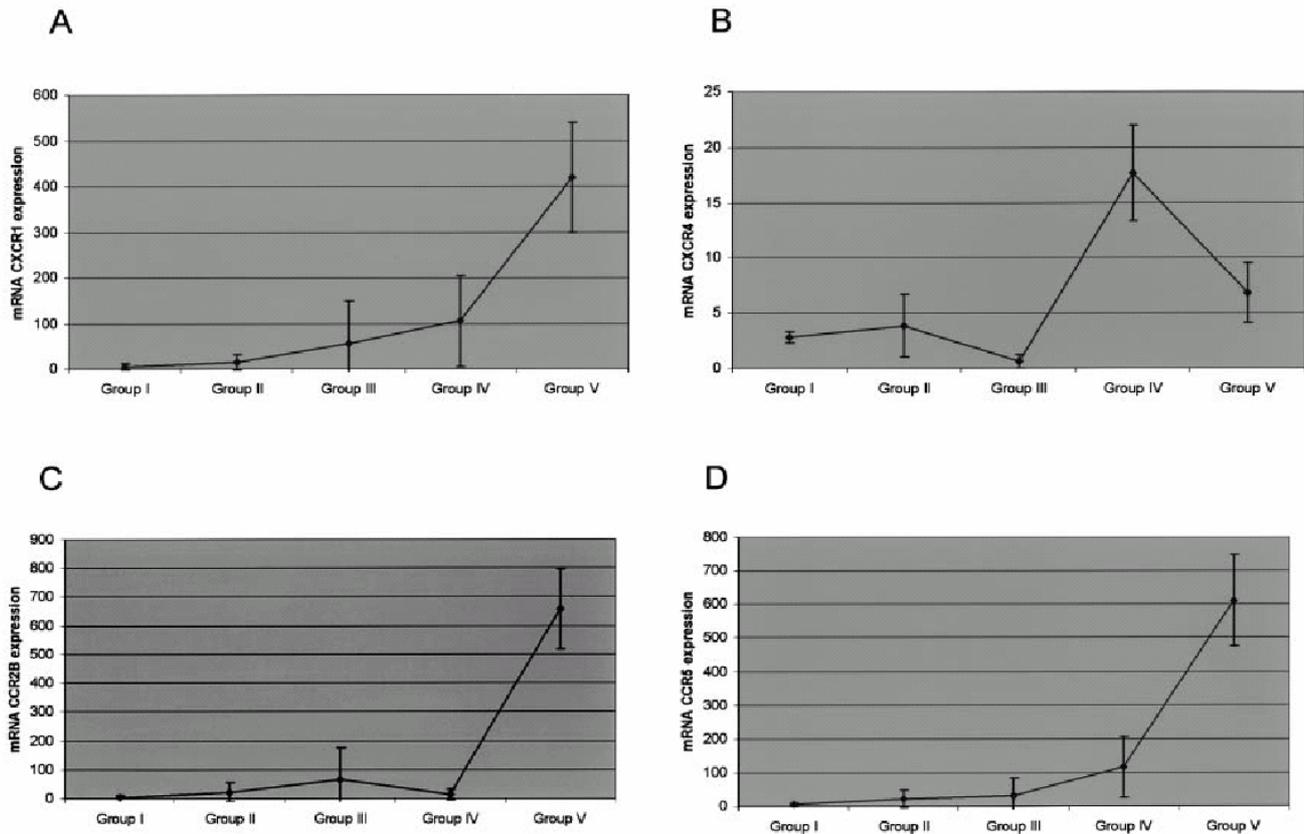
Unlike the other receptors, CXCR4 receptor mRNA (Figure 1B) presented a specific increase in the mid-luteal phase compared to the early and late luteal phases (17.7-fold increase in mid-luteal phase versus 1- and 6.8-fold increase in early and late luteal phases respectively). This illustrates that this receptor is specifically up-regulated during the implantation window and its lowest expression is noted in the early secretory phase.

We have also studied the four receptors at the protein level, throughout the natural menstrual cycle (see Table III for semi-quantitative analysis). CXCR1 receptor shows higher staining when compared to the other receptors. CXCR1 peaks in the early and mid-

secretory phases (groups III and IV) (Figure 2A and B). CXCR4 receptor also displays high staining across the whole cycle as in the case of CXCR1 receptor, it shows maximal expression in the mid-secretory phase (group IV) (Figure 2C), confirming the real time RT-PCR experiments. CCR receptors in general show lower expression in the endometrium than CXCR receptors. CCR2B staining appears in the late proliferate phase (group II) and reaches a moderate signal in the early secretory phase (group III), maintaining a low-to-moderate staining in the rest of the cycle (Figure 2D and E). CCR5 receptor signal starts in the late proliferate phase (group II) and remains low to moderate in different compartments (Figure 2F and G) (see Table II for localization and semi-quantitative analysis).

**Hormonal regulation of immunoreactive CXCR1, CXCR4 CCR5 and CCR2B in human endometrium**

Peripheral E<sub>2</sub> and progesterone levels were determined at the time of obtaining endometrial biopsies (non-receptive, pre-receptive and receptive phases) and were consistent with the physiological hormone levels expected. At day 13 (non-receptive phase), E<sub>2</sub> levels were 333.2 ± 92.9 pg/ml and progesterone was undetectable. At day 18 (pre-receptive phase), E<sub>2</sub> and progesterone levels were 331.6 ± 39.1 pg/ml and 9.5 ± 3.8 ng/ml respectively. At day 21 (receptive phase) E<sub>2</sub> and progesterone levels were 362.6 ± 78.5 pg/ml and 10.5 ± 6.1 ng/ml



**Figure 1.** Quantitative mRNA analysis of chemokine receptors in human endometrium throughout the menstrual cycle by real time fluorescent RT-PCR. (A) CXCR1 receptor expression. (B) CXCR4 receptor. (C) CCR2B receptor. (D) CCR5 receptor. Endometrial biopsies were distributed in five groups, each corresponding to a different phase: group I; early-mid-proliferative (days 1–8), group II; late proliferative (days 9–14), group III; early secretory (days 15–18), group IV; mid-secretory (days 19–22), and group V; late secretory (days 23–28). Data are presented as mRNA expression fold increase compared with the group of basal expression for each receptor. Three experiments were performed in a total of 15 endometrial samples to obtain the mean shown in the graphs. CXCR1, CCR2B and CCR5 show a typical pattern of decidualization increasing their expression in the late proliferative phase (group V) whereas CXCR4 shows an implantation expression pattern, increasing in the mid-secretory phase (receptive phase). Error bars show SD.

respectively. These hormonal levels stimulated endometrial differentiation as assessed by classical histological criteria (Noyes *et al.*, 1950).

On day 13 ( $n = 3$ ), when patients were treated solely with estradiol, a very weak staining for CCR2B, CCR5 and CXCR4 was localized in the luminal and glandular epithelium and endothelial cells (Figure 3A–C). During the pre-receptive and receptive periods (days 18 and 21 respectively), an increase in staining intensity was noted for CXCR1 receptor at the glandular compartment (Figure 3D, G). A slight signal was observed in stromal cells. CCR5 receptor was also immunolocalized, mainly at the luminal epithelium but also at the stromal and perivascular cells (Figure 3E, H), showing a slight increase compared with the non-receptive phase. CCR2B receptor shows a moderate increase in staining on day 18 and 21 in the luminal epithelium, while no staining was observed in endothelial cells or stroma (Figure 3F, L). CXCR4 receptor shows the same staining as CCR5, mainly expressed in epithelium on days 18 and 21 (data not shown). Endothelial and stromal cells were also positive.

We used human tonsil sections (data not shown) as positive controls and negative controls were performed by deletion of the first antibody. Immunostaining intensity was evaluated in at least three different specimens and interpreted as absent (0), weak (+), moderate (++) or intense (+++) by three independent observers (Table II).

#### Immunolocalization of CXCR1, CXCR4, CCR2B and CCR5 in human blastocysts

We have detected immunoreactive CCR2B (Figure 4A, B) and CCR5 receptors (Figure 4E, F) in the human blastocyst. CCR2B staining is localized mainly at the inner cell mass, whereas CCR5 staining can be visualized across the trophectoderm. In all cases ( $n = 3$ ) CCR5 staining

was more intense than that of CCR2B receptor and the pellucide zonae was not stained in any case. Immunoreactive CXCR4 and CXCR1 were not detected in human blastocysts when the same technique was used (Figure 4C, D, G, H).

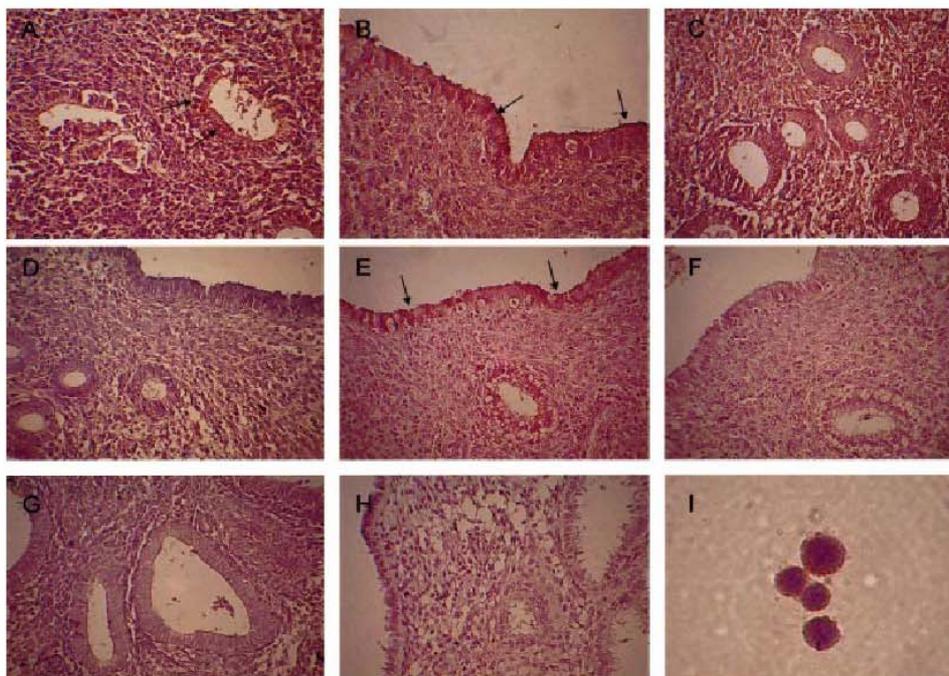
#### Embryonic regulation of chemokine receptors in human EEC

The embryonic impact on immunolocalization and polarization of chemokine receptors CXCR1, CXCR4, CCR5 and CCR2B in cultured EEC was investigated using our apposition model for human implantation. Chemokine receptors CXCR1 (Figure 5A), CXCR4 (Figure 5D) and CCR5 (Figure 5G) produced a barely detectable staining in few cells at the EEC monolayer when the blastocyst was absent. However, when a human blastocyst was present there was an increase in the number of stained cells for CXCR1 (Figure 5B), CXCR4 (Figure 5E), and CCR5 (Figure 5H) and polarization of these receptors in one of the cell poles of the endometrial epithelium (Figure 5I).

Immunolocalization and polarization changes in CCR2B receptor were not present in the EEC monolayer and this receptor was not up-regulated by the presence of the human blastocyst.

#### Discussion

Chemokines were originally defined as host defence proteins and it is now clear that their repertoire of functions extends well beyond this role. Chemokines can mediate or inhibit angiogenesis and may be important targets for leukocyte adhesion (Payne and Cornelius, 2002). In this study, we present data that highlight the involvement of chemokine receptors at the human blastocyst–endometrial interface



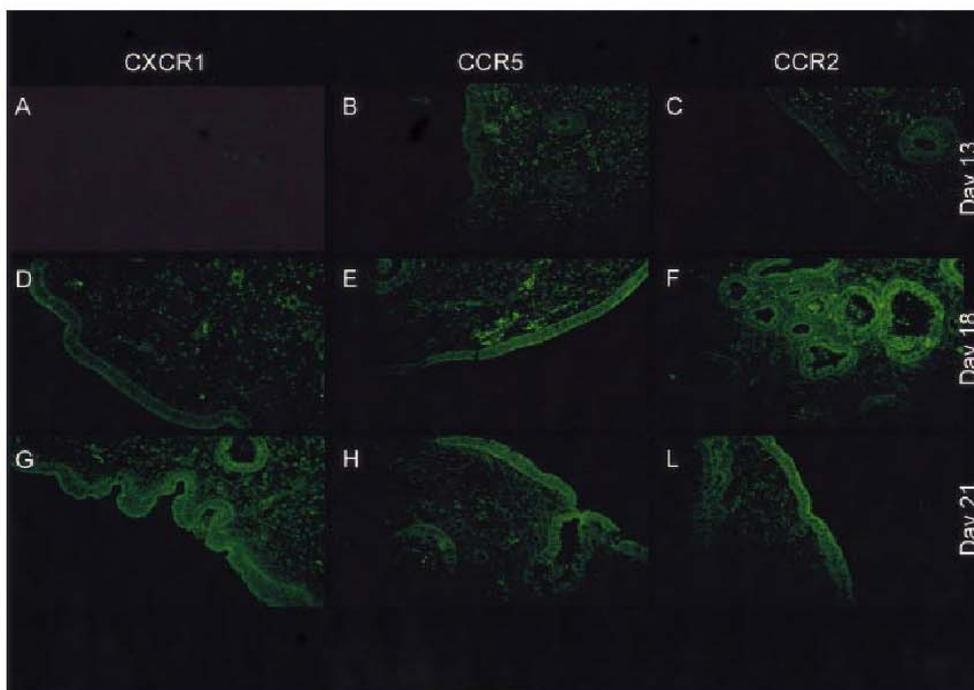
**Figure 2.** Immunolocalization of CXCR1, CXCR4, CCR5 and CCR2B in human endometrium throughout the menstrual cycle. (A) Group I, CXCR1 receptor shows moderate staining in glandular epithelium (arrow). (B) Group II, CXCR1 receptor. Arrows indicate strong staining in luminal epithelium and stromal cells. (C) Group II CXCR4 receptor. Moderate-to-strong staining is observed in luminal, glandular and stromal cells. (D) Group II, CCR2 receptor. Faint staining in luminal epithelium and some stromal cells. (E) Group III, CCR2 receptor. Arrows show moderate staining in luminal epithelium. Glandular epithelium also stained. (F) Group III CCR5 receptor. Faint-to-moderate staining in the three compartments. (G) Group V CCR5 receptor. Gland showing staining in the lumen. (H) negative control. (I) Positive control ThP1 cells. The semi-quantitative analysis of the data is presented in Table III.

**Table II.** Semi-quantitative analysis of immunohistochemistry in human endometrium

	Day 13			Day 18			Day 21		
	Epit.	St.	End.	Epit.	St.	End.	Epit.	St.	End.
CXCR1	0/0	0/0	+/+	+/+++	+/+	+/+	+++/>+++	+/+	+/+
CXCR4	0/0	0/0	+/+	+++/>+++	+/+	+/+++	+++/>+	+++/>+	+++/>+
CCR2	+/+	0/+	+/+	+++/>+++	0/+	+/+++	+++/>+++	0/+	+/+
CCR5	+/>0	0/+	+/+	+++/>+++	+/>+++	+/>+++	+/>+++	+/>+	+/>+

Summary of the immunohistochemical experiments identifying CXCR1, CXCR4, CCR5 and CCR2 in different compartments of the human endometrium during the non-receptive (day 13), pre-receptive (day 18) and receptive phases (day 21) in hormone replacement therapy cycles. Designations of 0 (negative), + (weakly positive) to +++ (intensely positive) indicate the relative intensities of the signals averaged for at least three different samples. Variability between readers is indicated with a slash mark.

Epit. = epithelial cells; St. = stromal cells; End. = endothelial cells.



**Figure 3.** Immunolocalization and hormonal regulation of CXCR1, CCR5 and CCR2B in human endometrium. (A, D, G) CXCR1 receptor. (B, E, H) CCR5 receptor. (C, F, I) CCR2B receptor. Endometrial samples from hormonal replacement therapy cycles in ovum donation recipients were obtained during non-receptive (day 13; A, B, C), pre-receptive (day 18; D, E, F) and receptive phases (day 21; G, H, I). The semi-quantitative analysis of the data is presented in Table II.

and which expand the biological relevance of chemokines in the embryonic implantation process.

In this paper, we have detected that the protein staining for CXCR1, CCR2B and CCR5 receptors in epithelium and stroma decreases in the late secretory phase whereas mRNA expression for these receptors analysed by real time RT-PCR is maximal in this phase of the menstrual cycle. Therefore, a possible explanation to reconcile these findings is the high number of white blood cells which express chemokine receptors recruited during this period in the human endometrium.

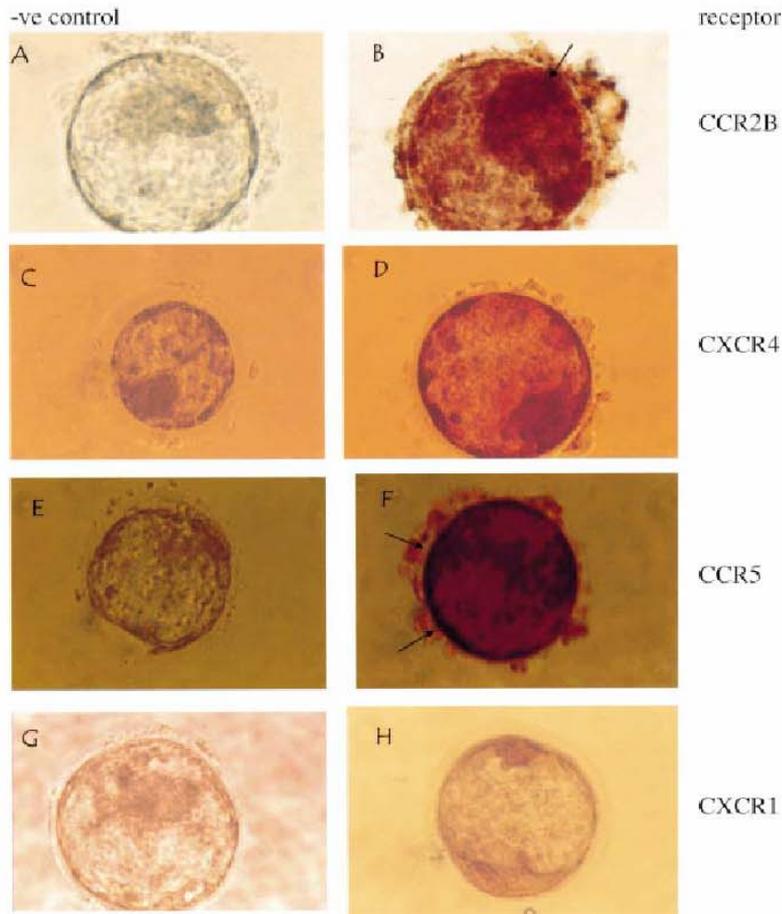
Remarkably, CXCR4 mRNA levels present a specific though modest up-regulation (18-fold) during the implantation window versus the early implantation phase. These findings echoed the

semi-quantitative immunohistochemical data and were corroborated using an in-vivo model of hormonal regulation. Our in-vivo model demonstrated that these receptors were present mainly in the endometrial epithelium but they were also present in the stromal and endothelial cells. The selective hormonal-dependent up-regulation of these receptors suggests that CXCR1, CCR2B and CCR5 display specific function(s) in the pre-menstrual endometrium, whereas CXCR4 seems to be implicated in endometrial receptivity. A possible limitation of the in-vivo model of hormonal regulation used in this study is that three consecutive endometrial biopsies (day 15, 18 and 21) were obtained in the same patient and therefore a non-specific inflammatory reaction in the last biopsy may be present. Nevertheless, this possibility seems unlikely because the pattern of

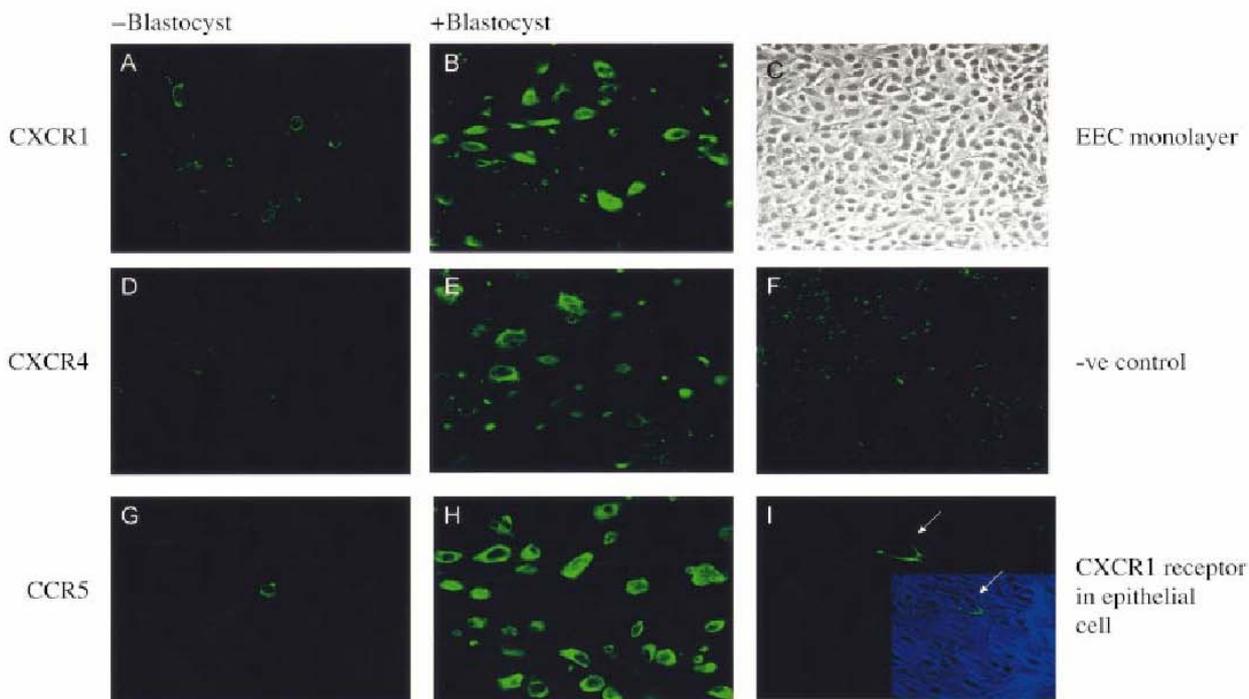
**Table III.** Semi-quantitative analysis of immunohistochemistry results of chemokine receptors CXCR1, CXCR4, CCR2B and CCR5 in different compartments of the human endometrium throughout the menstrual cycle

	Group I			Group II			Group III			Group IV			Group V		
	LE	GE	SC	LE	GE	SC	LE	GE	SC	LE	GE	SC	LE	GE	SC
CXCR1	++	++	++	+++	+++	+++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	+/+	+/+	+
CXCR4	+/+	+/+	+/+	++	++	++/+++	++	++/+++	++/+++	+++	+++	+++	+/+	+/+	+/+
CCR2	0/+	0/+	0/+	+	+	+	++	++	+/+	+	+	+/+	+	+/+	+
CCR5	0/+	0/+	0/+	++	+/+	++/+++	+/+	+/+	++	+/+	+/+	++	+/+	+/+	++

Designations - (negative), + (weakly positive), ++ (intensely positive) and +++ (strongly positive) indicate the relative intensities of the signals averaged for three different blind observers. LE = luminal epithelium; GE = glandular epithelium; SC = stromal cells.



**Figure 4.** Immunolocalization of chemokine receptors in human blastocysts. (A) Negative control for CCR2B receptor. (B) Arrow indicates the staining for CCR2B at the inner cell mass. (C) CXCR4 negative control. (D) CXCR4 staining in the human blastocyst (E). CCR5 negative control. (F) Arrows indicate the positive staining for CCR5 at the trophoblast. (G) CXCR1 negative control. (H) A human blastocyst stained for CXCR1 receptor. The staining for CCR2B is localized mainly at the inner cell mass whereas CCR5 staining can be visualized across the trophoblast. CXCR1 and CXCR4 staining was not detected in the human blastocyst.



**Figure 5.** Embryonic effect on immunolocalization and polarization of chemokine receptors CXCR1, CXCR4, CCR5 and CCR2B in cultured endothelial endometrial epithelial cells (EEC). (A, B) CXCR1 receptor staining in non-polarized EEC cultured without and with an individual blastocyst respectively. (C) Phase contrast of EEC monolayer. (D, E) CXCR4 receptor staining in EEC without or with blastocyst, respectively. (F) Negative control with deletion of the first antibody. CCR5 staining in EEC cultured without (G) or with an individual blastocyst (H). (I) Detail of a single non-polarized epithelial cell expressing CXCR1 receptor (see arrows). Inner square: contrast phase of the EEC monolayer with the stained cell. CXCR1, CXCR4 and CCR5 staining were barely detected only in a few cells at the EEC monolayer without the blastocyst. Staining for CCR2B was not present in cultured EEC in the presence or absence of a human blastocyst.

chemokine receptors expression reported in this model was reproduced when single biopsies were obtained in natural cycles from different patients.

The chemotactic response is fundamental in leukocyte physiology and implies recognition of an external gradient of chemokines (Sanchez-Madrid and Del Pozo, 1999). Leukocyte trafficking through the endothelium is, in some aspects, comparable to the implantation process, where the contact and invasion of the endometrium with and by the blastocyst is similar to the rolling, attachment and crossing process of the lymphocytes through the endothelium. It has been demonstrated that CCR2B and CCR5 receptors are polarized at the leading edge of migrating lymphocytes (Nieto *et al.*, 1997) and that leukocyte adhesion through integrins is required to induce cell polarization (Del Pozo *et al.*, 1997) and redistribution of chemokine receptors (Del Pozo *et al.*, 1995). These data further suggest that chemokines may act in combination with adhesion molecules to steer leukocyte traffic to tissues (Butcher, 1991; Moser and Loetcher, 2001). Leukocyte migration is a complex phenomenon where chemokines and their receptors are important players. The patching of chemokine receptors to the leading edge of a cell implies two remarkable consequences: (i) the functional specialization of this cell's domain in signal transduction; and (ii) the establishment of an endogenous polarity in the cell, which may be crucial for chemotaxis and other immune responses involving chemokines (Nieto *et al.*, 1998).

In our study, when a human blastocyst was present, there was an increase in the number of endometrial epithelial cells stained for CXCR1, CXCR4 and CCR5, and polarization of these receptors in one

of the cell poles became evident. These chemokines, secreted locally by the endometrium in the implantation window or by the human blastocyst in the apposition phase (Caballero-Campo *et al.*, 2002), may act as a signal for receptor polarization/dimerization, thereby acting as a sensor mechanism for increasing local cell responsiveness in the activation of endometrial adhesion molecules.

Recently, it has been shown that the binding of a chemokine to its receptors induces homo or heterodimerization of the latter (Rodriguez-Frade *et al.*, 2001). This effect has been noted on CCR2B and CCR5 receptors (Mellado *et al.*, 2001). The simultaneous presence of RANTES and MCP-1 induces the heterodimeric receptor complex CCR2B-CCR5, which has unique features, including the reduction of the threshold concentration of chemokine required to induce a response. This might have functional relevance in the cell. The formation of these complexes in lymphocytes activates cell adhesion in contrast to the cell migration triggered by homodimers. We have demonstrated that immunoreactive CCR2B and CCR5 receptors are localized at the human blastocyst. Could the blastocyst form these complexes in response to endometrial chemokines and therefore trigger a similar response?

An array of different chemokines is expressed (Kao *et al.*, 2002) and produced in the human endometrium at the time of implantation (Caballero-Campo *et al.*, 2002; Kayisli *et al.*, 2002). These chemokines could be immobilized by low-affinity binding to heparin-bearing proteoglycans on the vascular endothelial or epithelial surface, thereby facilitating the oligomerization of chemokines (Hoogewerf *et al.*, 1997). This effect permits effective presentation

of chemokines to cells or groups of cells, which are then able to respond to the chemokines' presence. In this way, variations in the availability of these chemokines would affect the ability of a ligand to trigger homo- or heterodimerization. At low concentrations of chemokines, receptor heterodimerization is favoured and cell adhesion is triggered (Mellado *et al.*, 2001). Caballero-Campo *et al.* (2002) have investigated the hormonal and embryonic regulation of IL-8, RANTES and MCP-1 in the endometrium. IL-8 and MCP-1 were present in the glandular and luminal epithelium, and RANTES was mainly localized on stromal cells. IL-8 and MCP-1 were up-regulated in the presence of E<sub>2</sub> and progesterone. IL-8 mRNA expression and protein were up-regulated in the presence of the human blastocyst using our co-culture model.

In this paper, we have detected that some chemokine receptors (CXCR1, CXCR4 and CCR5) are present and regulated hormonally in EEC. They display the typical polarization present in lymphocytes, creating a polarized cell capable of responding to different chemokines. We have also detected two of these receptors, CCR5 and CCR2B, in the human blastocyst. White blood cells are not an organized group of cells such as the cells which form the human blastocyst, but the polarization of the latter at the time of adhesion is a constant process that is intriguing and deserves special consideration. The blastocyst is guided to the implantation site in a polarized manner that is species specific, driven by unknown mechanisms and crosses the epithelial barrier penetrating into the stroma. Although the chemokine receptor expression in the blastocyst is homogeneous over the surface of the blastocyst, including the trophectoderm and the inner cell mass, these receptors may polarize if they encounter an adequate gradient of chemokines secreted by the endometrium, (epithelium, stroma or white blood cells) either free or bound to proteoglycans of the epithelial surface. The blastocyst could respond at this point with chemokine polarization and/or homo/heterodimerization. The possible heterodimerization of receptors, in our case CCR2B and CCR5 receptors, might develop in the human blastocyst an expression pattern of different integrins and adhesion molecules such as  $\beta$ 1,  $\beta$ 5,  $\alpha$ 6 or E-cadherin. These have been discovered in the blastocyst at the time of implantation and are necessary for the first steps of embryo adhesion (Bloor *et al.*, 2002). Further studies of chemokine polarization and blastocyst chemotaxis are needed to confirm our hypothesis.

## Acknowledgements

We would like to thank all of the IVF group of IVI, especially Amparo Mercader, for the collection of samples. We also thank Marcos Meseguer, Nicolas Garrido and Pedro Caballero-Campo for their support and Dr Alvarez Barrientos for his help with the confocal analysis. This study was financed by grants MT1999-B24364784, FISS 00/0643 and SAF2001.2948 from the MCYT of the Spanish Government.

## References

Akoum, A., Lemay, A., McColl, S., Turcot-Lemay, L. and Maheux, R. (1996) Elevated concentration and biologic activity of monocyte chemoattractant protein-1 in the fluid of patients with endometriosis. *Fertil. Steril.*, **66**, 17–23.

Arici, A., Head, J.R., MacDonald, P.C. *et al.* (1993) Regulation of interleukin-8 gene expression in human endometrial cells in culture. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **94**, 195–204.

Arici, A., McDonal, P.C. and Casey, M.L. (1995) Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endometrial cells in cultures. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **107**, 189–197.

Arici, A., Seli, E., Senturk, L.M., Gutierrez, L.S., Oral, E. and Taylor, H.S. (1998) Interleukin-8 in the human endometrium. *Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 1783–1787.

Baggiolini, M. and Dahinden, A. (1994) CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol. Today*, **15**, 127–133.

Barclay, C.G., Brennard, J.E., Kelly, R.W. and Calder, A.A. (1993) Interleukin-8 production by human cervix. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **169**, 625–632.

Bloor, D.J., Metcalfe, A.D., Rutherford, A., Brison, D.R. and Kimber, S.J. (2002) Expression of cell adhesion molecules during human preimplantation embryo development. *Mol. Hum. Reprod.*, **8**, 237–245.

Bokoch, G.M. (1995) Chemoattractant signalling and leukocyte activation. *Blood*, **86**, 1649–1657.

Butcher, E.C. (1991) Leukocyte–endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, **67**, 1033–1036.

Caballero-Campo, P., Dominguez, F., Coloma, J., Meseguer, M., Remohi, J., Pellicer, A. and Simon, C. (2002) Hormonal and embryonic regulation of chemokines IL-8, MCP-1 and RANTES in human endometrium during the window of implantation. *Mol. Hum. Reprod.*, **8**, 375–384.

Campbell, J.J., Hedrick, J., Zlotnik, A., Siani, M.A., Thompson, D.A. and Butcher, E.C. (1998) Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science*, **279**, 381–384.

Chantakru, S., Kuziel, W.A., Maeda, N. and Croy, B.A. (2001) A study on the density and distribution of uterine natural killer cells at mid pregnancy in mice genetically-ablated for CCR2B, CCR 5 and the CCR5 receptor ligand, MIP-1 alpha. *J. Reprod. Immunol.*, **49**, 33–47.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156–159.

Cocchi, F., DeVico, A.L., Garzino-Demo, A., Arya, S.K., Gallo, R.C. and Lusso, P. (1995) Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*, **270**, 1811–1815.

De los Santos, M.J., Mercader, A., Francés, A., Portoles, E., Remohi, J., Pellicer, A. and Simon, C. (1996) Role of endometrial factors in regulating secretion of components of the immunoreactive human embryonic interleukin-1 system during embryonic development. *Biol. Reprod.*, **54**, 563–574.

Del Pozo, M.A., Sánchez-Mateos, P., Nieto, M. and Sanchez-Madrid, F. (1995) Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J. Cell Biol.*, **131**, 495–508.

Del Pozo, M.A., Cabañas, C., Montoya, Ager, A., Sanchez-Mateos, P. and Sanchez-Madrid, F. (1997) ICAM's redistributed by chemokines to cellular uropods as a mechanism for recruitment of T-lymphocytes. *J. Cell Biol.*, **137**, 1–16.

Dudley, D.J., Trantman, M.S. and Mitchel, M.D. (1993) Inflammatory mediators regulate interleukin-8 production by cultured gestational tissues: evidence for a cytokine network at the chorio-decidual interface. *Clin. Endocrinol. Metab.*, **76**, 404–410.

Galan, A., O'Connor, J.E., Valbuena, D., Herrero, R., Remohi, J., Pampfer, S., Pellicer, A. and Simon, C. (2000) The human blastocyst regulates endometrial epithelial apoptosis in embryonic adhesion. *Biol. Reprod.*, **63**, 430–439.

Glasser, S.R., Mulholland, J. and Mani, S.K. (1991) Blastocyst endometrial relationships: reciprocal interactions between uterine epithelial and stromal cells and blastocysts. *Trophoblast Res.*, **5**, 225–280.

Hoogwerf, A.J., Kuschert, G.S.V., Proudfoot, A.E., Chung, C.W., Cooke, R.M., Hubbard, R.E., Wells, T.N. and Sanderson, P.N. (1997) Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry*, **36**, 13570–13578.

Hornung, D., Ryan, I.P., Chao, V.A., Vigne, J.L., Schriock, E.D. and Taylor, R.N. (1997) Immunolocalization and regulation of the chemokine RANTES in human endometrial and endometriosis tissues and cells. *Clin. Endocrinol.*, **82**, 1621–1628.

Kao, L.C., Tulac, S., Lobo, S., Imani, B., Yang, J.P., Germeyer, A., Osteen, K., Taylor, R.N., Lessey, B.A. and Giudice, L.C. (2002) Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology*, **143**, 2119–2138.

Kayisli, U.A., Mahutte, N.G. and Arici, A. (2002) Uterine chemokines in reproductive physiology and pathology. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **47**, 213–221.

Larsen, C., Anderson, A., Aella, E., Oppenheim, J.J. and Matsushima, K. (1989) The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science*, **243**, 1469–1466.

Loetscher, P., Seitz, M., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. and Moser, B. (1994)

- Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *FASEB J.*, **8**, 1055.
- Loetscher, P., Seitz, M., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. and Moser, B. (1996) Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca2+ mobilization, and enzyme release. *J. Immunol.*, **156**, 322.
- Martin, J.C., Jasper, M.J., Valbuena, D., Meseguer, M., Remohi, J., Pellicer, A. and Simon, C. (2000) Increased adhesiveness in cultured endometrial-derived cells is related to the absence of moesin expression. *Biol. Reprod.*, **63**, 1370–1376.
- Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., Vila-Coro, A.J., Fernandez, S., Martín de Ana, A., Jones, D.R., Toran, J.L. and Martínez-A.C. (2001) Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *EMBO J.*, **20**, 2497–507.
- Meseguer, M., Aplin, D., Caballero-Campo, P., O'Connor, J.E., Martin, J.C., Remohi, J., Pellicer, A. and Simon, C. (2001) Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down regulated in vitro by the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 14726–14729.
- Nieto, M., Frade, J.M.R., Sancho, D., Mellado, M., Martínez-A, C. and Sanchez-Madrid, F. (1997) Polarization of chemokine receptors to the leading edge during lymphocyte chemotaxis. *J. Exp. Med.*, **186**, 153–158.
- Nieto, M., Navarro, F., Perez-Villar, J.J., del Pozo, M.A., Gonzalez-Amaro, R., Mellado, M., Frade, J.M., Martínez-A, C., Lopez-Botet, M. and Sanchez-Madrid, F. (1998) Roles of chemokines and receptor polarization in NK-target cell interactions. *J. Immunol.*, **161**, 3330–3339.
- Noyes, R.W., Hertig, A.T. and Rock, J. (1950) Dating the endometrial biopsy. *Fertil. Steril.*, **1**, 3–25.
- Payne, A.S. and Cornelius, L.A. (2002) The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis. *J. Invest. Dermatol.*, **118**, 915–922.
- Polentarutti, N., Allavena, P., Bianchi, G., Giardina, G., Basile, A., Sozzani, S., Mantovani, A. and Introna, M. (1997) IL-2-regulated expression of the monocyte chemotactic protein-1 receptor (CCR2B) in human NK cells: characterization of a predominant 3.4-kilobase transcript containing CCR2B and CCR2A sequences. *J. Immunol.*, **158**, 2689–2694.
- Reif, K. and Cantrell, D.A. (1998) Networking Rho family GTPases in lymphocytes. *Immunity*, **8**, 395–401.
- Rodriguez-Frade, J.M., Mellado, M. and Martínez-A, C. (2001) Chemokine receptor dimerization: two are better than one. *Trends Immunol.*, **22**, 612–617.
- Saito, S., Kasahara, T., Sakakura, S., Umekage, H., Harada, N. and Ichijo, M. (1994) Detection and localisation of interleukin-8 mRNA and protein in human placenta and decidual tissues. *J. Reprod. Immunol.*, **27**, 161–172.
- Sanchez-Madrid, F. and del Pozo, M.A. (1999) Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.*, **18**, 501–511.
- Sica, A., Wang, J.M., Colotta, F., Dejana, E., Mantovani, A., Oppenheim, J.J., Larsen, C.G., Zachariae, C.O. and Matsushima, K. (1990) Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ). *J. Immunol.*, **144**, 3034–3038.
- Simón, C., Piquette, G., Francés, A. and Polan, M.L. (1993) Localization of interleukin-1 type 1 receptor and interleukin-1b in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Clin. Endocrinol. Metab.*, **77**, 549–555.
- Simón, C., Piquette, G.N., Francés, A., el-Danasouri, I., Irwin, J.C. and Polan, M.L. (1994) The effect of interleukin-1b on the regulation of IL-1 receptor type 1 messenger ribonucleic acid and protein levels in cultured human endometrial stromal and glandular cells. *Clin. Endocrinol. Metab.*, **78**, 675–682.
- Simón, C., Gimeno, M.J., Mercader, A., O'Connor, J.E., Remohi, J., Polan, M.L. and Pellicer, A. (1997) Embryonic regulation of integrins b3, a4 and a1 in human endometrial epithelial cells *in vitro*. *Clin. Endocrinol. Metab.*, **82**, 2607–2616.
- Simón, C., Caballero-Campo, P., García-Velasco, J.A. and Pellicer, A. (1998) Potential implications of chemokines in reproductive function: an attractive idea. *J. Reprod. Immunol.*, **38**, 169–193.
- Simón, C., Mercader, A., García-Velasco, J.A., Nikas, G., Moreno, C., Remohi, J. and Pellicer, A. (1999) Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**, 2638–2646.
- Ward, S.G., Bacon, K. and Westwick, J. (1998) Chemokines and T lymphocytes: more than a attraction. *Immunity*, **9**, 1–11.
- Witt, D.P. and Lander, A.D. (1994) Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations. *Curr. Biol.*, **4**, 394.
- Wuyts, A., Proost, P., Lenaerts, J.P., Ben-Baruch, A., Van Damme, J. and Wang, J.M. (1998) Differential usage of the CXC chemokine receptors 1 and 2 by interleukin-8, granulocyte chemotactic protein-2 and epithelial-cell-derived neutrophil attractant-78. *Eur. J. Biochem.*, **255**, 67–73.
- Yoshimura, T. and Leonard, E.J. (1990) Secretion by human fibroblasts of monocyte chemoattractant protein-1, the product of the gene JE. *J. Immunol.*, **144**, 2377–2383.
- Yoshimura, T., Yuhki, N. and Moore, S. (1989) Human monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1): full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett.*, **244**, 487–493.

Submitted on July 30, 2002; resubmitted on September 5, 2002; accepted on December 13, 2002

# III

## A Combined Approach for Gene Discovery Identifies Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-Related Protein 1 as a New Gene Implicated in Human Endometrial Receptivity

FRANCISCO DOMÍNGUEZ, SILVIA AVILA, ANA CERVERO, JULIO MARTÍN, ANTONIO PELLICER, JOSÉ LUIS CASTRILLO, AND CARLOS SIMÓN

*Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI-FIVIER) (F.D., A.C., J.M., A.P., C.S.) and Department of Pediatrics, Obstetrics, and Gynecology (F.D., J.M., A.P., C.S.), School of Medicine, University of Valencia, 46010 Valencia; and Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM) (S.A., J.L.C.), Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain*

In the past, human endometrial receptivity has been investigated by chasing specific molecules throughout the menstrual cycle. Now the genomic approach allows us to investigate the hierarchical contribution of a high number of genes to a specific function. In this study, we analyzed differentially the gene expression pattern of 375 human cytokines, chemokines, and related factors, plus that of their receptors, in endometrial receptivity. To do this, we used a combined approach of human endometrium and cell lines. We have compared the gene expression pattern in receptive vs. prereceptive human endometria and contrasted the results with gene expression in the highly adhesive cell line (to JAR cells and mouse blastocysts) RL95-2 vs. HEC-1A, a cell line with markedly less adhesiveness. IGF-binding protein-related protein 1 (IGFBP-rP1), also known as IGFBP-7/mac 25, was the second most up-regulated gene in both of the investigated models. These results were corroborated by performing RT-PCR on the same RNA samples and validated by quantitative fluorescent RT-

PCR and *in situ* hybridization in endometrium throughout the menstrual cycle. Interestingly, a 35-fold increase in expression during the receptive phase was compared with the prereceptive phase followed by a sharp increase in the late luteal. Further quantitative fluorescent RT-PCR experiments using the epithelial and stromal endometrial fraction throughout the menstrual cycle confirmed that IGFBP-rP1 expression was localized in the epithelial and stromal compartments and up-regulated mainly in the latter. *In situ* experiments confirmed the endometrial localization and regulation of IGFBP-rP1 mRNA. At the protein level, IGFBP-rP1 was localized by immunohistochemistry at the apical part of the luminal and glandular epithelium, stromal, and endothelial cells. In conclusion, using a genomic approach with a combined experimental design of receptivity *in vivo* and *in vitro*, we have discovered the implication of IGFBP-rP1 in endometrial physiology, which seems related to endometrial receptivity. (*J Clin Endocrinol Metab* 88: 1849–1857, 2003)

ENDOMETRIAL RECEPTIVITY IS a self-limited period in which the endometrial epithelium acquires a functional and transient ovarian steroid-dependent status, which in turn permits allowing blastocyst adhesion (1). In humans, the luminal endometrial epithelium acquires this status simultaneously with the development of the decidualization process in the stromal compartment (2), which is due mainly to the presence of progesterone (P) after appropriate 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) priming.

This period, termed the window of implantation, opens 4–5 d and closes 9–10 d after P production or administration. Therefore, the receptive window is limited to d 19–24 of the menstrual cycle in humans (3) and 8–10 d post ovulation in other primates (4). Indeed, the administration of P antagonist (5, 6) or E<sub>2</sub> antiserum (7) during the preimplantation period disrupts endometrial receptivity in primates. Using this concept of E<sub>2</sub> and P priming, a clinical endometrial receptivity

window is routinely induced in ovum donation programs to synchronize the timing of embryo transfer (8).

Using different animal models, including the human, we have learned that to acquire the functional receptive phenotype, the endometria suffers structural and biochemical modifications that must be induced by specific gene regulation. These morphological changes include modifications in the plasma membrane (9) and cytoskeleton (10, 11). A number of biochemical markers for endometrial receptivity have been proposed (12), until now without clinical application. However, a hierarchical perspective of the genes modified during this process in humans is still lacking.

The human endometrial cell line RL95-2 is an epithelial cell line derived from a moderately differentiated endometrial adenocarcinoma (13) with specific morphological and biological characteristics (14). This cell line exhibits more pronounced adhesiveness for trophoblast-derived cells (JAR cells) (15) and mouse blastocysts (11) than any other human endometrial epithelial cell (EEC) line, including HEC-1-A and primary epithelium. The HEC-1-A cell line, in contrast, has poor adhesive properties and exhibits a polarized distribution of integrins, but the RL95-2 cell line shows atypical features in adherens junctions, with nonpolarized actin cy-

Abbreviations: E<sub>2</sub>, 17 $\beta$ -Estradiol; EEC, endometrial epithelial cell; IGFBP, IGF-binding protein; IGFBP-rP1, IGF-binding protein-related protein 1; LH+2, prereceptive phase; LH+7, receptive phase; P, progesterone; QF-PCR, quantitative fluorescent RT-PCR; SSC, saline sodium citrate; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinase.

toskeleton and integrin distribution (16). Embryonic adhesion experiments using mouse blastocysts showed pronounced receptive and nonreceptive phenotypes in RL95-2 and HEC-1-A cells (81% vs. 46% of blastocyst adhesion, respectively), when compared with an intermediate adhesion rate in primary EEC cultured on extracellular matrix (67% of blastocyst adhesion) (11). Therefore, we used these cell lines as *in vitro* models for higher receptivity (RL95-2) and lower receptivity (HEC-1-A).

In the present study, we differentially analyzed the expression pattern of 375 human genes including cytokines, chemokines, adhesion molecules, and their receptors in receptive (LH+7) vs. prereceptive (LH+2) human endometrium and human endometrial cell lines with higher (RL95-2) and lower (HEC-1A) adhesiveness to JAR cells and mouse blastocysts. Using this combined approach, we found that IGF-binding protein-related protein 1 (IGFBP-rP1) was the second most up-regulated gene in the receptive status in both models. In addition, its quantitative mRNA expression, mRNA and the gene's protein localization was assessed throughout the human menstrual cycle by quantitative fluorescent RT-PCR (QF-PCR), *in situ* hybridization, and immunohistochemistry.

## Materials and Methods

### Endometrial biopsies and cell lines

Human endometrial samples were obtained for research after written consent from patients. This project was approved by the Institutional Review Board on the use of human subjects in research at the Instituto Valenciano de Infertilidad and complies with Spanish Law of Assisted Reproductive Technologies (35/1988). To investigate the differential expression pattern between LH+2 and LH+7 phases, two endometrial samples from each of the two fertile patients (aged 23–39 yr) were obtained in the luteal phase at LH+2 and LH+7 d. A portion of each specimen was dated according to the criteria of Noyes et al. (17). We also obtained endometrial biopsies from 10 additional patients at different days of the menstrual cycle to analyze the expression pattern of the selected gene by QF-PCR and immunohistochemistry. Endometrial biopsies were distributed in five groups according to each phase: group I, early-mid-proliferative (d 1–8); group II, late proliferative phase (d 9–14); group III, early secretory (d 15–18); group IV, midsecretory (d 19–22); and group V, late secretory (d 23–28).

RL95-2 (CRL-1671) and HEC-1-A (HTB-112) human endometrial cell lines were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and cultured and grown as described previously (11).

### Separation of epithelial and stromal cells

The endometrial samples were minced into less than 1-mm pieces with two sterile blades, and we separated blood and mucus. Pieces were digested for 1 h in a 37°C shaker bath with 0.1% (wt/vol) collagenase type IA (Sigma, St. Louis, MO) in DMEM (Sigma).

Endometrial stromal cells were isolated by filtration through a 30- $\mu$ m sieve, and the epithelial fraction was obtained by gravity sedimentation as previously described (18–20). Samples were collected in Trizol (Life Technologies, Inc./BRL, Madrid, Spain) and immediately frozen for RNA extraction. The purity of the fractions obtained has been assessed by immunohistochemistry using cytokeratin, vimentin, and CD68 antigens (19). Two samples of each phase of the cycle were separated in this manner.

### RNA isolation and DNase I digestion

Total RNA was extracted from whole endometrial biopsies obtained at LH+2 and LH+7 and fresh RL95-2 and HEC-1 human endometrial cell lines. Samples were collected and processed in Trizol (Life Technologies, Inc./BRL) according to the manufacturer's instructions. This

was followed by two rounds of phenol/chloroform cleanup, precipitated overnight at  $-20^{\circ}\text{C}$  with 0.5 volumes of isopropanol and washed with 70% (vol/vol) ethanol. Total RNA (20  $\mu\text{g}$ ) of endometrial biopsies and cell lines were treated for 30 min with 5  $\mu\text{l}$  DNase I (CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) at 37°C, followed by one round of phenol/chloroform and another solely with chloroform. The RNA was then precipitated overnight at  $-20^{\circ}\text{C}$ , using 0.1 volume of 2 M sodium acetate (pH 5.2) and 2.5 volumes of 100% ethanol. The RNA was washed with 80% ethanol and the pellet dissolved in 20  $\mu\text{l}$  RNase-free water. The integrity of the RNA was assessed using a 1% (wt/vol) guanidinium isothiocyanate agarose gel. The RNA concentrations were determined by OD with a GeneQuant II spectrophotometer (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The 260/280-nm absorbance ratio for each sample was between 1.6 and 1.9.

### cDNA array hybridization and statistical analysis

Two identical cDNA arrays membranes (human cytokine expression array; R&D Systems, Minneapolis, MN) and their gene-specific primers were used. For the preparation of cDNA probes, the Atlas cDNA expression array kit (CLONTECH Laboratories, Inc.) was used, and the recommended protocols were followed. The cDNA probes were synthesized from purified total RNA using [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] dATP, dCTP, dGTP and deoxythymidine 5'-triphosphate. Unincorporated  $^{32}\text{P}$ -labeled nucleotides were removed by CHROMA SPIN-200 column chromatography (CLONTECH Laboratories, Inc.). After prehybridization for 30 min at 68°C in Express Hyb solution (CLONTECH Laboratories, Inc.), the probes were hybridized overnight with the cDNA array filters. Membranes were washed at 68°C three times in 2 $\times$  saline sodium citrate (SSC), 1% SDS (wt/vol) and once in 0.1 $\times$  SSC, 0.5% SDS (wt/vol). Following this they were washed in 2 $\times$  SSC at room temperature. After overnight exposure, membranes were analyzed using a bioimaging analyzer (BAS-MP20240; Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokyo, Japan). The image files were quantified using both the manufacturer and NIH Image 1.62 software. In addition, arrays were subjected for 3 d to x-ray film autoradiography (BioMax MS, Kodak, Rochester, NY), and the films were scanned using an Agfa StudioStar scanner (Agfa Corp., Mortsel, Belgium). The image files were quantified as before. The normalized signals on both arrays were used to determine fold induction or fold reduction in expression of gene-specific RNAs between samples.

### RT-PCR and QF-PCR

Total RNA (1  $\mu\text{g}$ ) was reverse transcribed and PCR amplified by means of a single-buffer system (Access RT-PCR; Promega Corp., Madison, WI), using oligonucleotide primers specific to human IGFBP-rP1 transcript (forward primer 5'-CATCTGGAATGTCACCTGGTCCAG-3' and reverse primer 5'-GAGGTTTATAGCTCCGCCACCTTACC-3') or human  $\beta$ -actin transcript (forward primer 5'-GCATGGAGTCTCTGGCATCCACC-3' and reverse primer 5'-GGTGTAACGCCAACTAAGTCATAG-3'). Equivalent aliquots of each amplification reaction were separated in a 2% (wt/vol) agarose gel in 1 $\times$  Tris-acetate/EDTA buffer and stained with ethidium bromide.

DNase I-treated RNA (50 ng) was reverse transcribed and PCR amplified using the one-step LightCycler-RNA amplification SYBR Green I kit with the LightCycler instrument (Roche, Mannheim Germany).  $\beta$ -Actin was used as a housekeeping internal control and RT-PCR amplified in all the RNA samples. Oligonucleotide sequences designed for the amplification of both genes were those previously described. Relative quantification was carried out using the standard curve method and the SYBR Green I dye. Data are presented as a relative average value  $\pm$  SEM for IGFBP-rP1 gene and then normalized with the average value of the  $\beta$ -actin gene obtained at different days in each designated phase of the menstrual cycle.

### In situ hybridization

Total RNA (1  $\mu\text{g}$ ) was reverse transcribed and PCR amplified using a single-buffer system (Access RT-PCR; Promega Corp.) and oligonucleotide-specific primers to human IGFBP-rP1/MAC25 mRNA (sense 5'-CCACCTCGGAGCAAGGTCC-3' and antisense 5'-CCACCTTCACCTTTTTCACCTGGC-3'). PCR products (382 bp) were inserted in the EcoRV site of pBluescript KSII (Stratagene, La Jolla, CA) via thymidine-

adenine cloning and characterized by restriction analysis. DNA sequence was reconfirmed using T3 and T7 primers. Digoxigenin cRNA antisense and sense probes were created by either T3 (antisense) or T7 (sense) RNA polymerase-mediated transcription of linearized plasmids with EcoRI and HindIII. Paraffin-embedded sections were baked for 2 h at 60°C, dewaxed with two baths of xylene and hydrated in a series of alcohols. A further bath with 0.2 M HCl and diethylpyrocarbonate-treated water was performed. Digestion was implemented with proteinase K (10 mg/ml) (Life Technologies, Inc./BRL) for 30 min at 37°C. Following this, a further wash with 0.1 M triethanolamine with acetic anhydride (0.25% vol/vol) was performed. Sections were prehybridized for 2 h at 50°C with hybridization buffer containing 60% deionized formamide, 25 mM Tris (pH 7.4), 1 mM EDTA (pH 8), 0.4 M NaCl, dextran sulfate (12% wt/vol), and Denhardt solution (1×). Then, 5 µg/ml tRNA and 5 µg/ml salmon sperm DNA were added to the buffer. Overnight hybridization was performed in hybridization buffer with 0.1 mM dithiothreitol, sodium trisulfate (0.1% vol/vol), and SDS (0.1%) at 50°C with 500 ng/ml sense and antisense probes. Sections were consecutively washed in 2× SSC at room temperature, 2× SSC at 50°C, 1× SSC, and finally 0.1× SSC. RNase A (20 µg/ml) digestion for 1 h at 37°C shaking was implemented. Afterward, 1× blocking solution (Roche) was added in buffer 1 (pH 7.5) containing 100 mM maleic acid and 150 mM NaCl. Sections were incubated for 1 h at room temperature with alkaline phosphatase anti-DIG antibody (casa commercial, diluted 1:500) in buffer 1 containing 1× blocking solution. Color development was performed for 2 h at room temperature in buffer 3 [0.1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M Tris (pH 9.5)] containing NBT/BCIP (Roche) (1% vol/vol) and 1 mM levamisole. Counterstaining was performed with 0.1% methyl green for 30 sec. Sections were mounted using Kaiser's glycerol gelatin (Sigma). Photomicrographs were obtained using a digital camera (coolpix 995; Nikon, Tokyo, Japan).

#### Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on endometrial sections using an LSAB peroxidase kit (DAKO Corp., Barcelona, Spain). Briefly, sections were incubated with 3% hydrogen peroxide for 5 min at room temperature (RT). After each step, the sections were washed with PBS incubated for 30 min at room temperature with antihuman IGFBP-rP1 polyclonal antiserum (obtained from rabbits immunized with a synthetic peptide of human IGFBP-rP1; IBT-Immunological and Biochemical Testsystems GmbH, Reutlingen, Germany) diluted 1:1000. No cross-reactivity was found with human IGFBP's 1–6. After 25-min incubation with the linker, streptavidin-peroxidase was added for 15 min and the substrate-chromogen solution used for 5 min to stain the slides. A counterstain with Mayer's hematoxylin was performed. The slides were mounted with entellan (Merck, Darmstadt, Germany). Negative control was provided by a commercial kit and performed by deletion of primary antibody.

#### Results

##### Comparative gene analyses of LH+2 vs. LH+7 endometria and HEC-1-A vs. RL95-2 cell lines

The results of the differential gene expression pattern in LH+2 vs. LH+7 endometrium when 375 candidate genes were analyzed are shown in Table 1. In the list of regulated genes, we identified genes that were already known to be expressed differently in the LH+2 and LH+7 phases, such as placental protein 14 (PP14) (14.4 fold-up), osteopontin (3.7 fold-up), integrin alpha3 (2.3 fold-up), and IL-1RtI (1.8 fold-up). However, we also detected a number of genes that have not been previously identified in the human endometrium and whose difference of expression in the LH+2 and the LH+7 phases has not been described (Table 1). These genes can be classified in different groups: extracellular matrix proteins (decorin), heparin-binding molecules (pleiotrophin), genes related to tyrosine kinases (EFNA2), and growth factors (bone morphogenetic protein-7).

Other well-studied genes in the human endometrium are expressed in different change fold in receptive endometrium; tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) protease inhibitors such as TIMP1, 2, and 3; matrix metalloproteinase 13; and IGFII among others.

Only four genes were minimally down-regulated in the receptive endometrium (between 1.32- and 1.89-fold change). These genes were two IL receptors (IL-15R $\alpha$  and IL-9R); bone morphogenetic protein 7; a growth factor of the TGF- $\beta$  family; and ephrin-A2 (a tyrosine kinase ligand).

In Table 2 we present the comparative results obtained after the cDNA array hybridization of the endometrial cell lines, HEC-1-A vs. RL95-2. The two highly expressed genes in the RL95-2 cell line were neurite growth-promoting factor 2 (NEGF2/midkine) and IGFBP-rP1, with a 16- and 12-fold change, respectively. The rest of the up-regulated genes were chemokines (GRO oncogene 1 and 2), growth factor receptors (erbB1 and TNFRSF16), and growth factors (TGF $\alpha$ ). The group of adhesion molecules appears minimally up-regulated (between 1.30- and 3.69-fold change) and includes Ep-CAM, integrins  $\beta$  1,  $\alpha$  4, and  $\alpha$  1.

Remarkably, IGFBP-rP1 was the second most up-regulated gene in the two models investigated, 4.6-fold change in LH+7 vs. LH+2 endometria and 11.8-fold change in high-adhesive vs. low-adhesive cell lines, respectively (Fig. 1, A and B). RT-PCR was performed using the same RNA of both cell lines and endometrial biopsies to confirm the RNA expression of the cDNA arrays (Fig. 1C). IGFBP-rP1 expression in both models exhibits a clear trend, reflecting the results obtained in the cDNA arrays (Fig. 1C).

Of the remaining genes, only the inhibitor of the metalloproteinase 3 (TIMP-3) and integrin  $\beta$ -4 were up-regulated in both models. There were some discrepancies between these two models; up-regulated genes in the receptive endometrium, such as osteopontin and integrin  $\alpha$ -3, were down-regulated in the high-adhesive cell line and down-regulated genes in the receptive endometrium, such as ephrin-A2, were up-regulated in the high-adhesive cell line.

##### Expression and localization of IGFBP-rP1 mRNA in the human endometrium

To further corroborate these findings, we investigated the expression pattern and distribution of IGFBP-rP1 in the human endometrium. QF-PCR for this gene was investigated in different patients ( $n = 10$ ) throughout the menstrual cycle.

QF-PCR experiments in total endometrium throughout the menstrual cycle revealed that expression increases 35-fold during the LH+7 phase (d 19–22), compared with the LH+2 phase (d 15–18), followed by a sharp increase in the late luteal phase. This conforms to a profile consistent with a marker of endometrial decidualization (Fig. 2A).

Further QF-PCR experiments using the epithelial and stromal endometrial fraction throughout the menstrual cycle confirmed that IGFBP-rP1 expression was present in both the epithelial and stromal fractions. Furthermore, up-regulation during the period of endometrial receptivity (group IV) affected both compartments but to a higher extent in the stromal compartment; 150-fold up-regulation, compared with the epithelial fraction 8-fold up-regulation (Fig. 2B). A similar

TABLE 1. Human cytokine and cytokine-related genes differentially expressed in receptive vs. prereceptive endometrium

Gene <sup>a</sup>	LocusLink ID <sup>b</sup>	Gene description	Relative-expression <sup>c</sup> (%)	Change (fold) <sup>d</sup>	Protein category
PAEP	5047	Placental protein 14 (PP-14), PEP	100	14.40	Glycodelin
IGFBP7	3490	IGFBP 7, MAC25	57	4.60	IGF-binding
SPP1	6696	Osteopontin (OPN)	39	3.76	Extracellular matrix
TIMP3	7078	Inhibitor of the matrix metallo-proteinase 3 (TIMP-3)	31	3.34	Protease inhibitor
IGF2	3481	IGF-II, somatomedin A	37	2.90	Cytokine
DCN	1634	Decorin, DSPG2	31	2.46	Extracellular matrix
ITGA3	3675	Integrin $\alpha$ 3, CD49C	19	2.37	Integrin, cell surface
TIMP1	7076	Inhibitors of the matrix metallo-proteinase 1 (TIMP-1)	47	1.99	Protease inhibitor
IL1R1	3554	IL-1 receptor, type I (IL1R)	45	1.85	Interleukin receptor
MMP13	4322	Matrix metalloproteinase 13, collagenase 3 (CLG3)	23	1.83	Matrix metalloproteinase
ITGB4	3691	Integrin $\beta$ 4	51	1.79	Integrin, cell-surface
IGFBP5	3488	IGFBP 5, IBP5	27	1.76	IGF-binding
PTN	5764	Pleiotrophin, HBNF, NEGF1	33	1.65	Heparine-binding, extracellular
FGFR2	2263	Fibroblast growth factor receptor 2, BEK, K-SAM	11	1.39	Growth factor receptor
TIMP2	7077	Inhibitors of the matrix metallo-proteinase 2 (TIMP-2)	38	1.32	Protease inhibitor
IL15RA	3601	IL-15 receptor, $\alpha$	<1	-1.89	Interleukin receptor
IL9R	3581	IL-9 receptor	<1	-1.75	Interleukin receptor
BMP7	655	Bone morphogenetic protein 7, OP-1	2	-1.53	Growth factor, TGF- $\beta$ family
EFNA2	1943	Ephrin-A2, ELF-1	16	-1.32	Ligand of tyrosine kinases

<sup>a</sup> Official gene symbol. HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC).

<sup>b</sup> LocusLink (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink>; Ref. 39).

<sup>c</sup> The relative gene-expression of these genes in receptive endometrium cells.

<sup>d</sup> Positive number indicates up-regulation in receptive vs. prereceptive phase, whereas negative number indicates down-regulated genes in receptive phase. The fold change in gene expression was determined by comparison of mean average difference scores in two patients.

TABLE 2. Human cytokine and cytokine-related genes differentially expressed in RL95-2 and HEC-1-A endometrial cell lines

Gene <sup>a</sup>	LocusLink ID <sup>b</sup>	Gene description	Change <sup>c</sup> (fold)	Protein category
MDK	4192	Midkine, neurite growth-promoting factor 2, NEGF2	15.93	Heparine-binding, extracellular
IGFBP7	3490	IGFBP 7, MAC25	11.86	IGF-binding
EPHA4	2043	Eph-related receptor tyrosine kinase A4, HEK8	6.69	Ephrin receptor
GRO2	2920	GRO oncogene 2, GRO- $\beta$	6.46	Chemokine
EGFR	1956	Epidermal growth factor receptor, erbB1	6.30	Growth factor receptor
TIMP3	7078	Inhibitor of the matrix metallo-proteinase 3 (TIMP-3)	6.20	Protease inhibitor
NGFR	4804	Nerve growth factor receptor, TNFRSF16	5.32	Growth factor receptor
MMP14	4323	Matrix metalloproteinase 14, MT1-MMP	4.97	Matrix metalloproteinase
TGFA	7039	TGF- $\alpha$	4.95	Growth factor
GRO1	2919	GRO oncogene 1, GRO- $\alpha$	4.53	Chemokine
EPHA7	2045	Eph-related receptor tyrosine kinase A7, HEK11	3.69	Ephrin receptor
EFNA2	1943	Ephrin-A2, ELF-1	2.80	Ligand of TKreceptors
TACSTD2	4070	Tumor-associated calcium signal transducer 2, EpCAM	2.73	Adhesion molecule
GRO3	2921	GRO oncogene 3, GRO- $\gamma$	2.47	Chemokine
EDN2	1907	Endothelin 2, ET2	2.41	Angiogenic factor
ITGB1	3688	Integrin $\beta$ 1, fibronectin receptor, CD29, MDF2	2.35	Integrin, cell-surface
IFNGR2	3460	Interferon $\gamma$ receptor 2, AF-1, IFGR2	2.16	Interferon receptor
ITGA4	3676	Integrin, $\alpha$ 4, CD49D	2.01	Integrin, cell surface
CCR5	1234	Chemokine (C-C motif) receptor 5, CKR-5	1.80	Chemokine receptor
ITGB4	3691	Integrin $\beta$ 4	1.75	Integrin, cell-surface
MIF	4282	Macrophage migration inhibitory factor, GIF	1.31	Cytokine
SPP1	6696	Osteopontin (OPN)	-1.93	Extracellular matrix
ITGA3	3675	Integrin $\alpha$ 3, CD49C	-1.49	Integrin, cell surface

<sup>a</sup> Official gene symbol. HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). *Underscore* indicates genes also expressed in Table 1.

<sup>b</sup> LocusLink (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink>; Ref. 39).

<sup>c</sup> Positive number indicates up-regulation in RL95-2 vs. HEC-1-A cells, whereas negative number indicates down-regulated genes in RL95-2 cells. The fold change in gene expression was determined by comparison of mean average difference scores in two patients.

experiment was performed using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an internal housekeeping gene, with identical results.

To confirm these results, *in situ* hybridization was performed using endometrial tissue throughout the menstrual cycle. Our results indicated that IGFBP-rP1 mRNA is localized to the luminal and glandular epithelium, stromal cells,

and blood vessels (Fig. 3). In the luminal epithelium, higher expression is noted in the early secretory phase (group III), with a slight decrease in mid and late secretory phases (groups IV and V) (Table 3). Glandular epithelium has a different expression pattern, showing minimal expression in early secretory (group III) and increasing in mid and late luteal phases. Finally, stromal cells show very slight expres-

sion in proliferative and early secretory phases, which increases sharply in the luteal phase (groups IV and V).

At the protein level, IGFBP-rP1 was morphologically in-

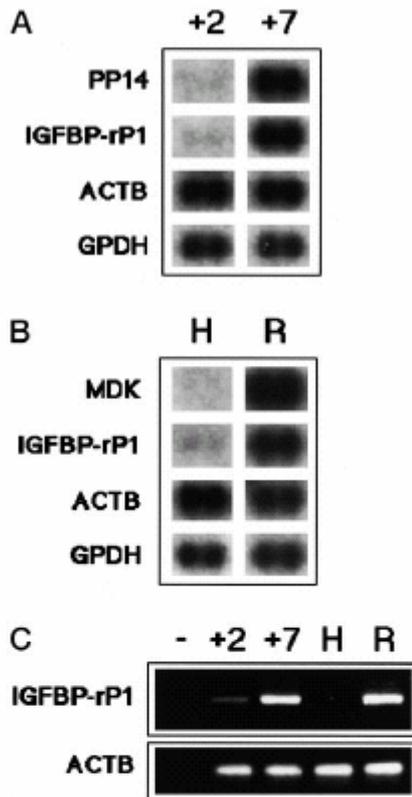
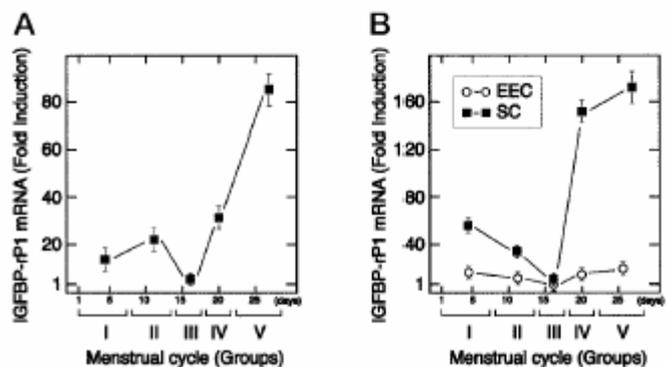


FIG. 1. A, Spot density of the cDNA array showing the two most up-regulated genes (PP-14 and IGFBP-rP1) and housekeeping genes (ACTB and GPDH) in LH+2 *vs.* LH+7 endometrium. B, Spot density of the same cDNA array in HEC-1-A (H) and RL95-2 (R) cell lines. Remarkably, IGFBP-rP1 was the second most up-regulated gene in the two models investigated. C, RT-PCR using the same RNA of both cell lines and endometria confirm the RNA expression of the cDNA arrays. PP14, Placental protein 14; ACTB,  $\beta$ -actin; GPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; MDK, midkine.

FIG. 2. Quantitative fluorescent RT-PCR of IGFBP-rP1 in human endometrium throughout the menstrual cycle. A, The mRNA expression of IGFBP-rP1 across the menstrual cycle in total endometrium. Two different samples were obtained from each group: group I, early-mid-proliferative phase (d 1–8); group II, late proliferate phase (d 9–14); group III, early secretory phase (d 15–18); group IV, mid-secretory (d 19–22); and group V, late secretory phase (d 23–28). B, The mRNA expression of IGFBP-rP1 across the human menstrual cycle in endometrial epithelial (○) and stromal (■) fraction separated from the above-mentioned endometrial samples. Three independent experiments were performed with each sample, and data are presented as a relative average value  $\pm$  SEM for IGFBP-rP1 gene and then normalized with the average value of the  $\beta$ -actin gene obtained at different days in each designated phase of the menstrual cycle. EEC, Endometrial epithelial cells; SC, stromal cells.



vestigated throughout the menstrual cycle. The five groups corresponding to the different phases of the menstrual cycle were analyzed. Immunohistochemical results of IGFBP-rP1 showed that cytoplasmic staining was localized at the apical zone of the luminal and glandular epithelium and stromal cells (Fig. 4). The intensity of staining increases in the mid-secretory phase (group IV) (Fig. 4F) but remains throughout the cycle with more or less intensity. Endothelial cells were also positive for IGFBP-rP1 (Fig. 4I).

**Discussion**

Profiling of RNA on cDNA arrays provides a method for screening the hierarchical contribution of the genes investigated in a given situation or function. Human endometrial receptivity is characterized by two main features. First, it occurs in a specific period of time in which this tissue acquires a differential functional and transient status, and, second, this new status is characterized by the development of adhesiveness to the blastocyst. Therefore, we used this approach to profile the similarity between the differential transcriptional response in two related models: receptive *vs.* prereceptive human endometrium and human endometrial cell lines with higher (RL95-2) and lower (HEC-1A) adhesiveness to JAR cells and mouse blastocysts. There was remarkable concordance in the up-regulation of IGFBP-rP1 in both of the investigated models, which was further corroborated by RT-PCR, QF-PCR, and immunohistochemistry. We also confirmed that other known genes are up-regulated in the receptive endometrium. The most expressed gene was the well known PP14, studied in the endometrium and considered to be one of the principal markers of uterine receptivity (21). These results reflect those of a recent publication using a global gene profile of secretory *vs.* late proliferative endometrium (22), in which osteopontin (23, 24) and TIMP-3 (25) were shown to be up-regulated.

The IGF axis is a network of ligands (IGF-I and -II), receptors (IGF-RI and IGF-RII), and binding proteins (IGFBPs) (26). The actions of IGFs are regulated in part by IGFBPs, which are responsible for the former's bioavailability for activating the receptors. IGFBPs are subdivided into two groups: high-affinity binding proteins (IGFBP-1 to -6) and low-affinity IGFBPs (IGFBP-7 to -10) (27). Their low affinity for IGF and the conserved structural homology with the IGFBP family suggests that these molecules may have unique

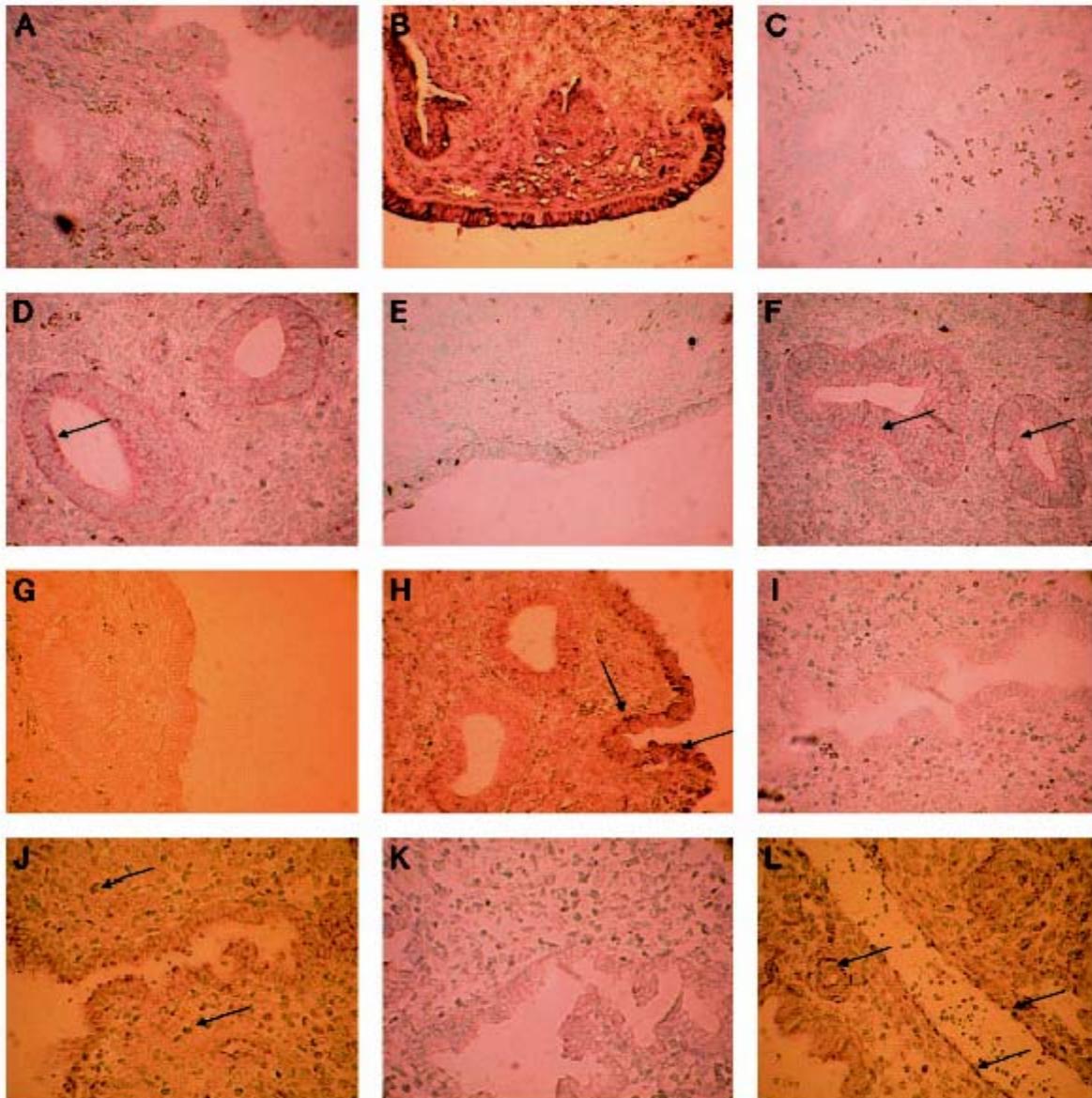


FIG. 3. *In situ* hybridization of IGFBP-rP1 in human endometrium throughout the menstrual cycle. A,  $\beta$ -Actin sense (group I), negative control. B,  $\beta$ -Actin antisense (group I) is expressed throughout the complete endometrium, positive control. C, IGFBP-rP1 sense probe (group I). D, IGFBP-rP1 antisense probe (group I) in which moderate expression at the glandular epithelium can be observed (arrows). E, Group II IGFBP-rP1 sense. F, Group II IGFBP-rP1 antisense-detecting glandular staining (arrows). G, Group III IGFBP-rP1 sense. H, Group III IGFBP-rP1 antisense with higher expression in luminal epithelium (arrows) and moderate expression in glands and some stromal cells. I, Group IV IGFBP-rP1 sense. J, Group IV IGFBP-rP1 antisense observing moderate staining in glandular epithelium and stromal cells (arrows). K, Group V IGFBP-rP1 sense. L, Group V IGFBP-rP1 antisense localizing an intense staining in stromal cells and glandular epithelium. Endothelial cells also stained (arrows). Magnification,  $\times 200$ .

biological properties independent of their capacity to bind IGF.

Mac-25 (also known as IGFBP-7 or IGFBP-rP1) was initially cloned as a gene whose expression was decreased in

meningioma cells and tumor-related leptomeningeal cells (28) and subsequently reisolated, through differential display as a sequence preferentially expressed in senescent human mammary epithelial cells (29). The deduced amino acid

TABLE 3. Semiquantitative analysis of *in situ* hybridization results of IGFBP-rP1 in different compartments of the human endometrium throughout the menstrual cycle

	Group I	Group II	Group III	Group IV	Group V
Luminal epithelium	-/+	+	++/+++	++	+/++
Glandular epithelium	+/++	+	-	+/+++	++
Stroma	-/+	-/+	-/+	+/++	++

Designations of - (negative), + (weakly positive), ++ (moderately positive), and +++ (strongly positive) indicate the relative intensities of the signals averaged for three different blind observers.

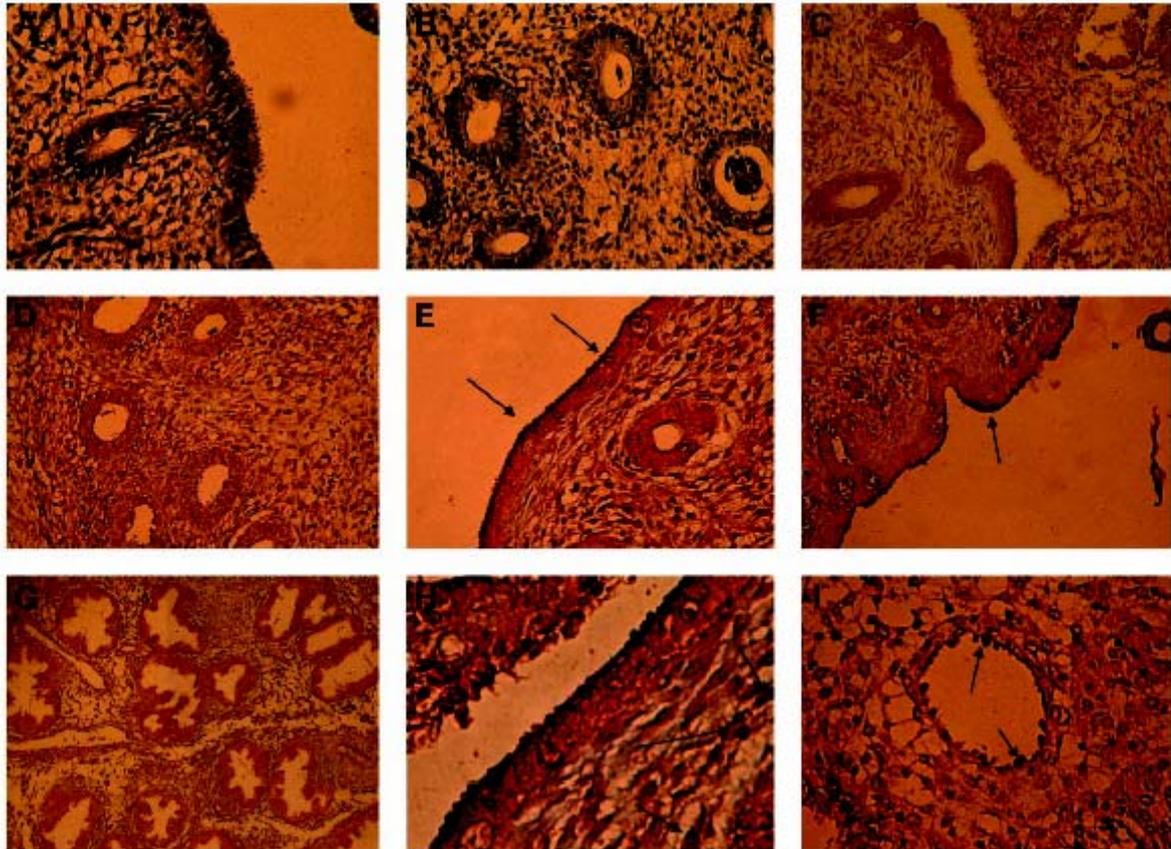


FIG. 4. Immunohistochemical localization of IGFBP-rP1 in human endometrium throughout the menstrual cycle. A and B, Negative controls. C and D, Groups I and II: proliferative endometrium faint staining is present at the apical part of glandular and luminal epithelium and some stromal cells (magnification,  $\times 100$ ). E, Group III: staining increases at luminal epithelium (arrows). F, Group IV, midsecretory endometrium, maximal staining in luminal epithelium (black arrow) and stromal cells (magnification,  $\times 100$ ). G, Group V: late secretory endometrium showing the glandular epithelium and stromal cells (magnification,  $\times 40$ ). H, Detail of the luminal epithelium of midsecretory endometrium. IGFBP-rP1 shows a typical distribution of a secreted protein, with maximal staining at the apical. Stromal cells also show strong staining (arrows; magnification,  $\times 200$ ). I, Detail of stained endothelial cells (arrows;  $\times 200$  magnification).

sequence of the human mac25 polypeptide shares a 20–25% identity with human IGFbps, and recombinant mac25 was found to function as an IGFBP (30). Mac25 was, therefore, renamed as IGFBP-7 and, more recently, as IGFBP-rP1 (31).

This molecule was the second most expressed gene of the 375 analyzed in the receptive endometrium and adhesive cell line (RL95-2). Because a role for IGFBP-rP1 in human endometrial receptivity has not been previously described, we have investigated its gene expression and localization, as

well as its protein localization, throughout the menstrual cycle. QF-PCR experiments identified a 35-fold increase during the receptive phase when compared with the prereceptive phase, followed by a sharp increase in the late luteal phase. In addition, QF-PCR experiments using the epithelial and stromal endometrial fraction separately confirmed that IGFBP-rP1 expression was present in both compartments but mainly up-regulated in the stromal fraction. In general, *in situ* hybridization experiments corroborate the quantitative re-

sults obtained in the QF-PCR experiments. However, there were some discrepancies; QF-PCR showed minimal expression in the epithelial compartment in the early secretory phase (group III), but we detected, through *in situ* hybridization, higher expression of IGFBP-rP1 in the luminal epithelium when compared with the glandular epithelium. Considering that glandular epithelium represents almost 80% of the epithelial compartment, probably this may be the reason mRNA expression for this molecule is not picked up when the complete compartment is analyzed by QF-PCR. Immunohistochemical experiments corroborated the epithelial and stromal localization for this molecule and showed to be also IGFBP-rP1 localized at the endothelial cells. The localization of this protein reflects findings of a previous study that explored the distribution of IGFBP-rP1 in normal human tissues (32).

Although the function of this molecule remains to be demonstrated, this study strongly suggests that IGFBP-7/mac25/IGFBP-rP1 is implicated in human endometrial receptivity. It is unlikely that the role of this molecule in endometrial receptivity is that of IGFBP because of the low affinity of the former for IGF. However, several independent functions of vascular biology that may be involved in endometrial receptivity have been attributed to this molecule. IGFBP-rP1 has been reported as a prostacyclin-stimulating factor in vascular endothelial cells (33) and has been shown to contribute to the organization of new capillary vessels in tumor tissues by modulating the interaction of endothelial cells with type IV collagen (34). IGFBP-rP1 contains an amino-terminal domain with homology with IGFBPs that is responsible for low-affinity binding to IGFs. This sequence is followed by a follistatin-like module that has a low but significant homology with the cysteine-rich, follistatin-like module of hevin/SC1, which is known to mediate cytokine binding in other proteins. These two modules in IGFBP-rP1 are likely to be involved in growth factor binding and may facilitate the retention of growth factors or chemokines (35). This molecule has also been defined as a tumor-derived adhesion factor (recently renamed angiomodulin) (36). At the ultrastructural level, a noteworthy feature associates IGFBP-rP1 with microvillous structures that constitute the initial point of contact between the endothelium and the adherent lymphocytes. It has been demonstrated that this molecule may harbor chemokines (37) and adhesion molecules such as the L-selectin counterreceptor CD34/53 and L-selectin ligands (38), suggesting that this molecule may contribute to the lymphocyte migration through high endothelial venules.

Therefore, in addition to its vascular functions, these properties indicate that IGFBP-rP1 is a good candidate for the presentation of adhesion-triggering cytokines to the lymphocytes rolling on, or migrating across, in and through the human endothelial epithelium, this process being remarkably similar to the implantation process. We hypothesized that this molecule acts in this way in the luminal endometrium. As we have seen with the immunohistochemistry, IGFBP-rP1 behaves as a secreted protein, perhaps secreted by stromal cells and transported to the luminal and glandular epithelium in which it accumulates, mainly in the receptive phase. In this localization, it is possible that IGFBP-rP1 binds

cytokines, chemokines, growth factors, or key adhesion molecules implicated in the implantation process.

In summary, using this combined approach, we have discovered that IGFBP-rP1 is the second most up-regulated gene in both models of endometrial and epithelial receptivity. These results have been validated by QF-PCR and immunohistochemistry and suggest a novel function for this molecule in human endometrial receptivity. Further experiments need to be undertaken to unravel the implication of this molecule in the human endometrium at the time of implantation.

#### Acknowledgments

We thank the IVI group for the sample collection.

Received May 8, 2002. Accepted December 4, 2002.

Address all correspondence and requests for reprints to: Carlos Simón, M.D., Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI-FIVIER), C/Policia Local, 3, 46015 Valencia, Spain. E-mail: csimon@ninterbook.net.

This work was supported by Grants SAF2001-2948, MT1999-B24364784 MCYT and 1FD97-0582 from the Spanish Government and an institutional grant from the Fundación Ramon Areces.

F.D. and S.A. made equal contributions to this work.

#### References

1. Psychoyos A 1973 Endocrine control of egg implantation. In: Gneap RO, Astwood EB, eds. Handbook of physiology, section 7, endocrinology, vol II, pt II. Washington, DC: American Physiological Society; 187–215
2. Popovici RM, Kao LC, Giudice LC 2000 Discovery of new inducible genes in *in vitro* decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology* 141:3510–3513
3. Navot D, Borge PA, Williams M, Garrist GJ, Guzman I, Sandler B, Fox J, Schweiner-Engel P, Hofmann GE, Grunfeld L 1991 An insight into early reproductive processes through the *in vitro* model of ovum donation. *J Clin Endocrinol Metab* 72:408–414
4. Fazleabas A, Donnelly KM, Srinivasan S, Fortman JD, Miller JB 1999 Modulation of the baboon (*Papio anubis*) uterine endometrium by chorionic gonadotropin during the period of uterine receptivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2543–2548
5. Hegelo-Harting C, Mootz U, Beter M 1992 Luteal control of endometrial receptivity and its modification by progesterone antagonists. *Endocrinology* 131:2446–2460
6. Banaszak S, Donnelly KM, Brudney A, Chai D, Chwalisz K, Fazleabas AT 2000 Modulation of the action of chorionic gonadotropin on the baboon endometrium by a progesterone receptor antagonist (ZK 137.316). *Biol Reprod* 63:819–823
7. Ravindranath N, Moudgal R 1990 Effect of a specific estrogen antibody on pregnancy establishment in the bonnet monkey (*Macaca radiata*). *Fertil Steril* 54:1162–1167
8. Remohí J, Gartner B, Gallardo E, Yañes S, Simón C, Pellicer A 1997 Pregnancy and birth rates after oocyte donation. *Fertil Steril* 67:717–723
9. Murphy CR 2000 The plasma membrane transformation of uterine epithelial cells during pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl* 55:23–28
10. Thie M, Harrach-Ruprecht B, Sauer H, Fuchs P, Alberts A, Denker HW 1995 Cell adhesion to the apical pole of epithelium: a function of cell polarity. *Eur J Cell Biol* 66:180–191
11. Martin JC, Jasper MJ, Valbuena D, Meseguer M, Remohí J, Pellicer A, Simón C 2000 Increased adhesiveness in cultured endometrial-derived cells is related to the absence of moesin expression. *Biol Reprod* 63:1370–1376
12. Giudice LC 1999 Potential biochemical markers of uterine receptivity. In: Simón C, Pellicer A, Remohí J, eds. Emerging concepts on human implantation. *Hum Reprod Suppl* 143–146
13. Way DL, Grosso DS, Davis JR, Surwit EA, Christian CD 1983 Characterization of a new human endometrial carcinoma (RL95-2) established in tissue culture. *In Vitro* 19:147–158
14. Tinel H, Denker HW, Thie M 2000 Calcium influx in human uterine epithelial RL95-2 cells triggers adhesiveness for trophoblast-like cells. Model studies on signalling events during embryo implantation. *Mol Hum Reprod* 6:1119–1130
15. John NJ, Linke M, Denker HW 1993 Quantitation of human choriocarcinoma spheroid attachment to uterine epithelial cell monolayers. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 29:461–468
16. Thie M, Fuchs P, Butz S, Steckmann F, Hoschutzky H, Kemler R, Denker HW 1996 Adhesiveness of the apical surface of uterine epithelial cells: the role of junctional complex integrity. *Eur J Cell Biol* 70:221–232

17. Noyes RN, Hertig AT, Rock J 1950 Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1:3–25
18. Simon C, Mercader A, Garcia-Velasco J, Nikas G, Moreno C, Remohi J, Pellicer A 1999 Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2638–2646
19. Simon C, Piquette G, Frances A, Polan ML 1995 Localization of interleukin-1 type I receptor and interleukin-1 $\beta$  in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 77:549–555
20. Simon C, Gimeno MJ, Mercader A, O'Connor JE, Remohi J, Polan ML 1997 Embryonic regulation of integrins  $\beta 3$   $\alpha 4$  and  $\alpha 1$  in human endometrial epithelial cells *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2607–2616
21. Damario MA, Lesnick TC, Lessey BA, Kowalik A, Mandelin E, Seppala M, Rosenwaks Z 2001 Endometrial markers of uterine receptivity utilizing the donor oocytes model. *Hum Reprod* 16:1893–1899
22. Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, Osteen K, Taylor RN, Lessey BA, Giudice LC 2002 Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 143:2119–2138
23. Apparao KB, Murray MJ, Fritz MA, Meyer WR, Chambers AF, Truong PR, Lessey BA 2001 Osteopontin and its receptor  $\alpha v \beta 3$  integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4991–5000
24. Von Wolff M, Strowitzki T, Becker V, Zepf C, Tabibzadeh S, Thaler CJ 2001 Endometrial osteopontin, a ligand of  $\beta 3$ -integrin, is maximally expressed around the time of the "implantation window." *Fertil Steril* 76:775–781
25. Zhang J, Salomonson LA 1997 Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1, 2 and 3 in human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 3:735–741
26. Jones JJ, Clemmons DR 1995 Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16:3–34
27. Kim HS, Nagalla SR, Oh Y, Wilson E, Roberts CT, Rosenfeld RG 1997 Identification of a family of low affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12981–12986
28. Murphy M, Pykett MJ, Harnish P, Zang KD, George DL 1993 Identification and characterization of genes differentially expressed in meningiomas. *Cell Growth Differ* 4:715–722
29. Swishelm K, Ryan K, Tsuchiya K, Sager R 1995 Enhanced expression of an insulin growth factor-like binding protein (mac25) in senescent human mammary epithelial cells and induced expression with retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4472–4476
30. Oh Y, Nagalla SR, Yamanaka Y, Kim HS, Wilson E, Rosenfeld RG 1996 Synthesis and characterization of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-7. Recombinant human mac25 protein specifically binds IGF-I and -II. *J Biol Chem* 271:30322–30325
31. Baxter RC, Binoux MA, Clemmons DR, Conover CA, Drop SL, Holly JM, Mohan S, Oh Y, Rosenfeld RG 1998 Recommendations for nomenclature of the insulin-like growth factor binding protein superfamily. *Endocrinology* 139:4036
32. Degeorges A, Wang F, Frierson HF, Seth A, Sikes RA 2000 Distribution of IGFBP-rP1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 48:747–754
33. Yamauchi T, Umeda F, Masakado M, Isaji M, Mizushima S, Nawata H 1994 Purification and molecular cloning of prostacyclin-stimulating factor from serum-free conditioned medium of human diploid fibroblast cells. *Biochem J* 303:591–598
34. Akaogi K, Okabe Y, Sato J, Nagashima Y, Yasumitsu H, Sugahara K, Miyazaki K 1996 Specific accumulation of tumor-derived adhesion factor in tumor blood vessels and in capillary tube-like structures of cultured vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8384–8389
35. Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT 1998 A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:258–263
36. Akaogi K, Okabe Y, Funahashi K, Yoshitake Y, Nishikawa K, Yasumitsu H, Umeda M, Miyazaki K 1994 Cell adhesion activity of a 20-kDa major secreted protein from human bladder carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 198:1046–1053
37. Middleton J, Neil S, Wintle J, Clark-Lewis I, Moore H, Lam C, Auer M, Hub E, Rot A 1997 Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 91:385–395
38. Girard JF, Baekkevoid ES, Yamanaka T, Haraldsen G, Brandtzaeg P, Almalric F 1999 Heterogeneity of endothelial cells. The specialized phenotype of human high endothelial venules characterized by suppression subtractive hybridization. *Am J Pathol* 155:2043–2055
39. Pruitt KD, Maglott DR 2001 RefSeq and LocusLink: NCBI gene-centered resources. *Nucleic Acids Res* 29:137–140

# **RESUMEN DE LOS RESULTADOS**

## RESUMEN DE LOS RESULTADOS

- 1. Hormonal and embryonic regulation of chemokines IL-8, MCP-1 and RANTES in the human endometrium during the window of implantation.** *Mol.Hum.Reprod.* vol.9 n°4 189-198. 2003 (“Regulación hormonal y embrionaria de las quimoquinas IL-8, MCP-1 y RANTES en el endometrio humano durante la ventana de implantación”).

En este trabajo, nuestro interés se centró, en principio, en investigar la inmunolocalización y regulación hormonal de las quimoquinas IL-8, MCP-1 y RANTES en el endometrio humano. También analizamos la regulación embrionaria de dichas quimoquinas en las células epiteliales endometriales (CEE) cultivadas *in vitro*.

Para el primer objetivo (localización y regulación hormonal) el diseño experimental se basó en ciclos hormonales sustituidos, en los cuales se obtuvieron biopsias endometriales en los días 13 (fase no receptiva), 18 (pre-receptiva) y 21 (receptiva) respectivamente (ver Material y Métodos “Serum and endometrial samples obtained from HRT cycles”).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1 y se cuantificaron por tres observadores independientes. Estos datos se hayan reflejados en la tabla 1. En el día 13, cuando el endometrio ha sido tratado sólo con E<sub>2</sub>, IL-8 y MCP-1 se localizaron en el epitelio glandular, luminal y zonas perivasculares endoteliales (Fig.1 C1 y F1). En las fases pre-receptiva y receptiva, se observó un incremento de la tinción en todas las localizaciones (Fig.1 D1, E1, G1, H1). RANTES fue inmunolocalizado en células del estroma y en zonas perivasculares. No se observaron cambios significativos de RANTES en ninguno de los días estudiados.

El segundo objetivo fue investigar el impacto del embrión en la regulación de las tres quimoquinas en las CEE *in vitro* (ver Materiales y Métodos “Endometrial

separation, culture and embryo co-culture”). El diseño es simple: se trata de estudiar la expresión génica de dichas moléculas de las CEE cultivadas en presencia o en ausencia de un blastocisto humano (co-cultivo) (Fig. 2). Este análisis se llevó a cabo mediante la técnica de Northern Blot. (ver Materiales y Métodos “ARN isolation, oligonucleotide probe synthesis and Northern blot analysis”)

Mediante Northern Blot se obtuvieron los siguientes resultados: se detectó el ARNm de la IL-8 de forma constitutiva, tanto cuando había blastocisto como cuando no lo había. El análisis densitométrico de las bandas demostró una regulación positiva significativa de la IL-8 cuando un blastocisto estaba presente (Fig. 2 izquierda). No se pudo detectar IL-8 en el endometrio completo, probablemente por la elevada cantidad de células del estroma en comparación con las células epiteliales. Tampoco se pudo detectar MCP-1 en biopsia completa; sin embargo, sí se detectó en CEE, aunque no se observó ninguna regulación por la presencia o ausencia del blastocisto (Fig. 2 derecha). RANTES se detectó en endometrio completo, pero no se detectó ninguna evidencia de RANTES en EEC, con lo que no se siguió el estudio con esta quimocina (Fig.3).

Para cuantificar la IL-8 y MCP-1 a nivel de proteína en estos co-cultivos se realizó citometría de flujo (ver Material y Métodos “flow cytometry”) y se obtuvieron los siguientes resultados: La IL-8 estaba ligeramente aumentada por la presencia de blastocistos competentes (Fig. 4). En el caso de blastocistos bloqueados, el aumento no fue significativo. Los resultados se expresaron en porcentaje (%) de células teñidas y en unidades arbitrarias de fluorescencia (FAU). No se detectaron variaciones significativas en cuanto a la expresión de MCP-1, aunque la expresión de MCP-1 fue mayor que la de IL-8.

Posteriormente, se midió en los medios de los co-cultivos la proteína secretada por las CEE con o sin blastocisto. Para ello, se utilizó ELISA (ver Material y Métodos “determination of chemokine secretion”). En los medios condicionados de blastocistos sin EEC no se detectó ninguna de las quimocinas estudiadas, con lo que confirmamos que las quimocinas secretadas procedían de las CEE en cultivo. Pese a que no se obtuvieron diferencias significativas entre cultivos con o sin blastocisto, se detectó IL-8 y MCP-1 en un rango de ng/ml (Fig. 5A), en medios que habían estado 3

ó 6 días en contacto con los embriones. También se estudió la relación entre la calidad embrionaria y la secreción de IL-8. Se analizaron los medios desde el día 3 al 6. Los resultados concluyen que, en el mismo día, aquellos embriones con un desarrollo normal inducen mayores tasas de producción de IL-8 en CEE que aquellos que mostraban un retraso en el desarrollo (Fig. 5 B). Este efecto se exhibe de los días 3 al 5 y desaparece en el día 6.

Las conclusiones más importantes de este trabajo son que, durante la ventana de implantación, se produce un aumento de IL-8 y MCP-1 en el endometrio y, además, que el blastocisto humano es capaz de estimular la producción de IL-8 tanto a nivel de ARNm como de proteína.

**2. Hormonal and Embryonic regulation of chemokine receptors CXCR1, CXCR4, CCR5 and CCR2B in the Human Endometrium and the Human Blastocyst.** *Mol.Hum.Reprod.* vol. 9 n°4 pp 189-198, 2003 (“Regulación hormonal y embrionaria de los receptores de quimoquinas CXCR1, CXCr4, CCR5 y CCR2B en el endometrio humano y el blastocisto humano”).

Nuestro objetivo en este trabajo fue investigar los receptores de las quimoquinas previamente mencionadas, denominados CXCR1, CXCR4, CCR5, CCR2B, en el endometrio y blastocisto humanos a nivel de ARNm y proteína. Para cuantificar la expresión de cada uno de los receptores de quimoquinas estudiados a lo largo del ciclo menstrual, utilizamos biopsias endometriales de todo el ciclo menstrual (ver Material y Métodos “Endometrial samples”) y las analizamos mediante PCR cuantitativa fluorescente (ver Material y Método: “Real Time fluorescent PCR”).

Los resultados obtenidos (Fig.1) nos muestran que tres de los cuatro receptores tienen un comportamiento similar. CXCR1, CCR2B y CCR5 presentan un patrón de expresión mínimo durante la fase proliferativa (grupos I y II), comienzan a elevarse en la fase secretora temprana, continúan incrementándose durante la fase media secretora (Grupo IV) y alcanzan su máximo en la fase secretora tardía (grupo V). Su clara regulación positiva (entre 400 y 650 veces) nos indica su relación con el proceso de decidualización y menstruación. Sin embargo, uno de estos receptores, CXCR4, se comporta de forma completamente distinta, ya que presenta un típico patrón implantatorio, con una expresión ligera durante las primeras fases del ciclo y un aumento moderado (unas 18 veces), pero brusco en la fase receptiva (grupo IV), seguido de un nuevo descenso a niveles prácticamente basales en la fase secretora tardía (ver fig.1D).

El siguiente paso fue inmunolocalizar las proteínas de estos cuatro receptores en el endometrio humano. Para ello, se realizaron técnicas inmunohistoquímicas (ver Materiales y Métodos: “immunohistochemistry of human endometrium”). Los

resultados obtenidos se pueden observar en la tabla II, donde se muestra una valoración semi-cuantitativa de los cuatro receptores estudiados.

CXCR1 presentó una tinción más elevada que el resto de receptores, mostrando un pico de expresión en las fases temprana y media secretora (Fig. 2A y B). Su expresión se localizó principalmente en epitelio luminal y glandular. CXCR4 también presentó una intensidad de tinción elevada a lo largo de todo el ciclo menstrual, como CXCR1 mostrando máxima intensidad en la fase secretora media (grupo IV, Fig. 2C), confirmando los experimentos de PCR cuantitativa.

Los receptores CC, en general, presentaron una tinción mucho más baja que los CXC. CCR2B apareció en la fase media proliferativa y alcanzó una tinción moderada en la fase temprana secretora, manteniendo una tinción baja-moderada en el resto del ciclo menstrual (Fig. 2D y E). CCR5 empezó a expresarse en fase proliferativa tardía y permaneció en expresión baja a moderada en diferentes compartimentos epiteliales y estromales (Fig. 2F y 2G).

Posteriormente, se realizó la localización de estos receptores en el blastocisto humano mediante inmunohistoquímica (ver Material y Métodos: “immunocytochemistry of human blastocysts”). Se detectaron dos de los cuatro receptores: CCR2B y CCR5 (Fig. 4 B y F), mientras que no se consiguió detectar CXCR4 y CXCR1 mediante esta técnica (Fig. 4 D y H). La localización de CCR2B se estableció principalmente en la zona de la masa celular interna (ver flechas), mientras que la tinción de CCR5 se visualizó por todo el trofoectodermo. En todos los experimentos realizados, la expresión de CCR5 fue más intensa que la de CCR2B.

También nos interesaba saber cuál era el papel de las hormonas esteroideas progesterona y estradiol (necesarias para una correcta receptividad uterina) en la regulación de la expresión de los receptores de quimoquinas. Para ello, recogimos biopsias endometriales de ciclos hormonales sustituidos (ver Material y Métodos: “Endometrial samples”) y realizamos cortes de endometrio, que analizamos mediante inmunohistoquímica fluorescente (Fig. 3). La semi cuantificación de los resultados obtenidos se muestra en la tabla III.

En el día 13, cuando las pacientes sólo habían sido tratadas con estradiol, se obtuvo una señal muy débil de los receptores CCR2B, CCR5 y CXCR4, localizados principalmente en el epitelio glandular y luminal, así como en algunas células estromales. Durante las fase pre-receptiva (día 18) y receptiva (día 21) se observó un ligero incremento en la señal de CXCR1 en el compartimento glandular (Fig. 3D y G), con una ligera tinción en las células del estroma. CCR5, también localizado principalmente en el epitelio luminal y glandular en las fases pre-receptiva y receptiva, aunque también se observaron algunas células estromales teñidas (Fig. 3E y H). Un patrón similar presentó CXCR4. CCR2B presentó tinción moderada en los días 18 y 21, fundamentalmente en el epitelio luminal, pero no se observó tinción ni en células endoteliales ni estromales. (Fig. 3F. y L).

Por último, también nos interesaba comprender si el blastocisto humano era capaz de regular la expresión y/o localización de dichos receptores en el endometrio humano. Para ello, utilizamos cultivos primarios de células epiteliales humanas y las co-cultivamos con blastocistos humanos (ver material y métodos: “*in vitro* model for apposition”). Los resultados obtenidos analizados por microscopía Confocal (ver material y métodos: “Confocal analysis”) demostraron que los receptores CXCR1, CXCR4 y CCR5 apenas se visualizaban en células epiteliales primarias cuando el blastocisto estaba ausente (Fig. 5A, D y G) , mientras que, cuando se co-cultivaron con un blastocisto humano, la expresión aumentaba drásticamente y, más aún, se polarizaba hacia uno de los polos de la célula. La presencia de CCR2B inmunorreactiva en monocapas epiteliales primarias fue indetectable. No se encontraron cambios en la expresión del receptor CCR2B en presencia o ausencia de blastocistos humanos.

La conclusión más importante de este trabajo es que los receptores CXCR1, CCR2B y CCR5 aumentan su expresión en la fase secretora tardía, mientras que CXCR4 presenta un aumento durante la ventana de implantación. El blastocisto humano es capaz de polarizar estos receptores en células epiteliales en cultivo. Asimismo, los receptores CCR5 y CCR2B se encuentran en la superficie del blastocisto.

**3. A Combined Approach for Gene Discovery Identifies Insulin-like Growth factor- Protein-Related Protein 1 as a New Gene Implicated in Human Endometrial Receptivity.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. Vol. 88 n°4 pp 1849-57 (“Una estrategia combinada para el descubrimiento de genes identifica la proteína relacionada con el factor de crecimiento tipo insulina 1 en la receptividad endometrial humana”)

Nuestro objetivo principal en este trabajo fue identificar y cuantificar jerárquicamente los genes implicados en la receptividad endometrial mediante el estudio comparativo del endometrio receptivo (LH+7) versus endometrio pre-receptivo (LH+2) y dos líneas celulares paradigma de alta y baja adhesividad. RL95-2 (R) es una línea celular procedente de células epiteliales tumorales y tiene propiedades adhesivas, mientras que HEC-1-A (H) no presenta dichas propiedades (ver Material y Métodos “endometrial biopsies and cell lines”). De esta forma, pretendemos descubrir genes asociados con receptividad endometrial.

Para llevar a cabo este trabajo, se utilizó un “macroarray” con 375 genes (ver Material y Métodos: “cDNA array hybridization and statistical analysis”). Además, se realizó el mismo diseño experimental (ver Material y Métodos: “endometrial biopsies and cell lines”).

Los resultados de las hibridaciones realizadas en ambos experimentos se muestran en la tabla 1 y 2 de este artículo. El gen más expresado en el endometrio receptivo (LH+7) versus el pre-receptivo (LH+2) fue *Placental Protein 14*, más conocido por PP14 o glicodelina. La literatura publicada sobre este gen es muy abundante y, actualmente, se considera uno de los marcadores de receptividad endometrial más importante, debido a su abundante expresión en el endometrio receptivo. El segundo de los genes más regulados positivamente fue IGFBP-7, también denominado mac25 y actualmente renombrado como **IGFBP-rP1**. Otro gen importante es la *Osteopontina*, inhibidor de metaloproteinasas como *TIMP-3* o la propia IGF-II. En la Tabla 1 se indica su nombre, regulación así como la abundancia relativa de su expresión. También se incluye la categoría a la que pertenece.

En la Tabla 2 se muestran los datos referidos al mismo “macroarray”, pero esta vez utilizando las líneas celulares. El gen más expresado en la línea RL95-2 con respecto a la HEC-1-A es *midkine*, una quimoquina, pero, curiosamente, el segundo gen regulado al alza de nuevo es **IGFBP-rP1**. Este dato nos confirma la participación de este gen en la receptividad endometrial.

El siguiente paso fue reconfirmar la expresión de IGFBP-rP1 mediante RT-PCR (Fig. 1C) en los dos modelos *in vitro* e *in vivo*. Extrajimos ARN de líneas celulares HEC-1-A (H) y RL95-2 (R) y de biopsias endometriales de LH+2 y LH+7, obteniendo los mismos resultados. Una elevada expresión en LH+7 comparado con LH+2 y en la línea celular R comparada con la H. Para cuantificar la expresión de IGFBP-rP1, utilizamos PCR cuantitativa fluorescente (QF-PCR) y no sólo nos centramos en los días LH +2 y +7, sino que analizamos el ciclo menstrual completo para determinar la expresión de dicho gen (ver Material y Métodos “RT-PCR and QF-PCR”).

Los resultados obtenidos (Fig. 2 A) demuestran que la expresión de IGFBP-rP1 es leve en las primeras fases del ciclo menstrual, fase temprana, media y tardía proliferativa y temprana secretora (Grupos I, II y III). El ascenso en la expresión comienza en la fase secretora media (grupo IV), convirtiéndose en máxima en la fase secretora tardía (80 veces superior). Un experimento posterior se realizó separando los dos tipos principales celulares del endometrio, células epiteliales y células del estroma. Para ello, y siguiendo el protocolo de separación (ver Material y Métodos: “separation of epithelial and stromal cells”), extrajimos ARN de estos dos tipos celulares y repetimos el experimento. Los datos obtenidos (Fig.2B) nos demuestran que la cantidad de ARN mensajero de IGFBP-rP1 se debe, principalmente, a las células del estroma (cuadrados negros) y no a las células epiteliales, tanto luminarias como glandulares (círculos blancos) (Fig. 2 A).

Para localizar en el tejido endometrial dicha molécula a nivel de proteína y ARNm procedimos a realizar inmunohistoquímica e hibridación *in situ* (ver Material y Métodos “immunohistochemistry” e “in situ hybridization”). Los resultados a nivel de proteína (Fig. 4) indican tinción citoplasmática en la zona apical del epitelio glandular

y luminal, principalmente. La intensidad de la tinción permaneció constante durante todo el ciclo y aumentó en la fase media secretora (grupo IV). También se observó marcada tinción en las células endoteliales (Fig. 4 I). Una vez obtenidas las sondas sentido y antisentido de nuestro gen control (Beta-actina) y de IGFBP-rP1, procedimos con la hibridación *in situ*: el ARN m de IGFBP-rP1 se localiza principalmente en el epitelio glandular y luminal, en las células del estroma y también en los capilares sanguíneos. En el epitelio luminal, la máxima expresión se detecta en la fase secretora temprana (Grupo III), con un ligero aumento en las fases media y tardía secretora. El epitelio glandular presenta un patrón de expresión ligeramente distinto, con expresión mínima en la fase secretora temprana e incrementando su expresión en las fases media y tardía. Las células del estroma presentan expresión mínima en fase proliferativa y temprana secretora, seguido de un brusco aumento en las fases media y tardía secretoras (Grupos IV y V).

Las conclusiones más importantes de este trabajo son la investigación del patrón génico del endometrio receptivo, así como la caracterización de IGFBP-rP1 en el endometrio humano.

# DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

Nuestro trabajo ha pretendido investigar la existencia y posible función de las quimoquinas **IL-8**, **MCP-1**, **RANTES**, y **SDF-1**, sus receptores **CXCR1**, **CXCR4**, **CCR2b**, **CCR5**, y una molécula de unión a IGF, **IGFBP-rP1**, en el endometrio.

Nuestra hipótesis presenta a las quimoquinas **IL-8**, **MCP-1** y **RANTES** (sin descartar el resto de moléculas quimiotácticas) como candidatos, a nivel local, para modular el reclutamiento y función de los leucocitos en el endometrio/decidua, además de participar en el proceso de implantación del blastocisto a través de sus receptores. Los resultados de estos trabajos pretenden avanzar en el entendimiento de este proceso, investigando las implicaciones de las quimoquinas en la implantación embrionaria.

Debido a que la acción de estas quimoquinas se produce a través de su unión a receptores, también se pretendió analizar la expresión de dichos receptores, tanto en el endometrio, como en el blastocisto humano. Para ello, se llevó a cabo un ambicioso estudio de 4 receptores **CXCR1**, **CCR2B**, **CXCR4** y **CCR5**. Nuestro último objetivo fue detectar genes regulados positivamente en el endometrio receptivo relacionados con citoquinas, quimoquinas, factores de crecimiento y sus receptores. Curiosamente, el gen mayormente regulado fue **IGFBP-rP1**.

La función endometrial está modulada por dos procesos interrelacionados entre sí, uno endocrino u hormonal y otro paracrino mediante mediadores locales. En la regulación hormonal, los esteroides ováricos desempeñan una función fundamental, preparando el endometrio para la implantación embrionaria, induciendo toda una cascada de factores encargados de modular la expresión, regulación y acción de las citoquinas/quimoquinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión durante la ventana de implantación (Tabidzadeh, 1991; Giudice *y cols*, 1994) (revisado por Simón, *y cols*, 1997).

En nuestro primer trabajo, no se apreció ningún efecto regulador del E2 y la P sobre la secreción de IL-8 en nuestro modelo de cocultivo embrionario. Si se considera que otros modelos *in vitro*, (Kelly *y cols*, 1994) sí responden al tratamiento

hormonal, el efecto observado sobre la IL-8 en nuestro modelo podría explicarse por la falta de capacidad de respuesta a los tratamientos con E2 y P de un cultivo primario de CEE; no obstante, las células del estroma endometrial mantienen esa capacidad de respuesta (Glasser *y cols*, 1993). En cultivos primarios de CEE los receptores de E2 y P están presentes, aunque no son funcionales debido a la incapacidad de estas células de mantener la polaridad (Glasser *y cols*, 1993).

En los estudios *in vivo* de localización y regulación hormonal en el endometrio humano, la IL-8 ha sido detectada en la zona perivascular del endometrio, en el epitelio glandular y en el epitelio luminal; como demuestran nuestro trabajo y otros (Critchley *y cols*, 1994), su expresión aumenta con la aparición de la P en los días 18 y 21, sugiriendo que esta molécula podría participar en el reclutamiento de neutrófilos y, adicionalmente, en el proceso de angiogénesis (Koch *y cols*, 1992).

MCP-1 también tiene actividad quimiotáctica y es un potente activador de macrófagos, células T (Cai *y cols*, 1995; Roth *y cols*, 1995), basófilos, mastocitos (Feliciani *y cols*, 1995) y células “asesinas” (NK) (Allaveda *y cols*, 1994). En este trabajo se ha encontrado MCP-1 en el endometrio tanto en localización perivascular, como en el epitelio luminal y glandular. Su expresión aumenta con la aparición de la P en los días 18 y 21. RANTES actúa principalmente en el reclutamiento de monocitos (Wiedermann, 1993); se localizó mayoritariamente a nivel perivascular y en el estroma endometrial, adyacente a glándulas o formando acúmulos estromales.

Estas quimoquinas presentes en el endometrio podrían actuar reclutando y dirigiendo células blancas. Los leucocitos están implicados en la función uterina y su actividad varía de una manera predecible durante el ciclo ovulatorio y el embarazo (Bulmer *y cols*, 1985); en la fase proliferativa aumenta el número de neutrófilos, en la fase secretora media aumenta el número de macrófagos y células NK, en la fase premenstrual aumenta el número de macrófagos. En el embarazo, en el sitio de implantación, embarazo ectópico tubárico y en la decidua aumentan los macrófagos. En el endometrio, los macrófagos tienden a agregarse alrededor de las arteriolas y, en localización adyacente, a las glándulas endometriales (Arici *y cols*, 1993, 1995), lo que explicaría el acúmulo de quimoquinas a nivel perivascular y glandular.

El aumento y acumulación de leucocitos en el endometrio podría explicarse por un aumento de su proliferación “*in situ*”, o mediante una migración leucocitaria procedente de la circulación periférica. Sin embargo, parece que la migración de leucocitos de la circulación periférica contribuye con este acúmulo de un manera más relevante (Pace *y cols*, 1989; King *y cols*, 1991).

No sólo el endometrio/decidua produce citoquinas (PDGF, IFN  $\gamma$ , TNF- $\alpha$  o IL-1) (revisado por Simón *y cols*, 1996) (moduladores primarios), también el embrión (blastocisto) (De los Santos *y cols*, 1996) es capaz de producir estas moléculas, que actuarían sobre el endometrio y la decidua induciendo la expresión de quimoquinas y, con ello, modulando el reclutamiento de neutrófilos/monocitos/macrófagos (Chard, 1995; Simón *y cols*, 1996; Tabibzadeh y Babaknia 1995; Glasser *y cols*, 1991).

Este trabajo considera que señales locales (como las descritas anteriormente), procedentes del embrión preimplantatorio, podrían inducir la producción de citoquinas y/o quimoquinas por el endometrio, que, a su vez, y mediante la unión a receptores específicos de membrana, activarían la expresión de moléculas de adhesión - tanto en el endometrio como en el blastocisto- como las integrinas, encargadas de mediar la adhesión del blastocisto (revisado por Simón *y cols*, 1996).

En las fases iniciales (aposición, adhesión) de la implantación, los factores embrionarios secretados (IL-1, HB-EGF, LIF etc) (De los Santos *y cols*, 1996) podrían actuar sobre las quimoquinas endometriales, como el PAF (“platelet activating factor”), secretado por la decidua y los embriones, que aumenta la expresión de la proteína y el ARNm de IL-8 en células endometriales (Nasu *y cols*, 1999). Las quimoquinas, a su vez, serían responsables de dirigir y reclutar distintas poblaciones de células blancas (como ocurre en el modelo de la inflamación), que proporcionarían la secreción leucocitaria (citoquinas, factores de crecimiento, proteasas) necesaria para el desarrollo del proceso (revisado por Simón *y cols* 1996; Simón y Caballero-Campo, 1998c). Otra posibilidad sería la actuación directa de las quimoquinas sobre las moléculas de adhesión (integrinas) y los componentes de la matriz extracelular del epitelio endometrial. Tanto las citoquinas TNF- $\alpha$ , CSF-1 y, en especial, el sistema de la IL-1 (De los Santos *y cols*, 1996), como las integrinas (Simón *y cols*, 1997a) desempeñan un papel importante en la implantación embrionaria.

En nuestro segundo trabajo, hemos detectado que las proteínas de los receptores CXCR1, CCR2B y CCR5 se expresaron en el epitelio y estroma, principalmente en las fases proliferativa tardía y secretora inicial/media, mientras que, a nivel de ARNm, parece ser máximo en la fase secretora tardía. Esta discrepancia se debe a que, al tratarse de endometrio completo, gran cantidad de linfocitos son atraídos al endometrio premenstrual y pueden enmascarar la presencia de receptores en el endometrio. Sin embargo, CXCR4 se comporta de forma totalmente distinta, ya que su expresión aumenta en fase media secretora (durante la ventana de implantación), tanto a nivel de ARN como de proteína. Además, nuestro modelo *in vitro* demostró que los receptores estaban presentes principalmente en el epitelio endometrial, pero también se hallaron en células estromales y endoteliales. Si a esto le añadimos nuestros resultados sobre regulación hormonal, todo parece indicar que CXCR1, CCR2b y CCR5 desempeñan funciones específicas en el endometrio premenstrual, mientras que CXCR4 puede estar más implicado en receptividad endometrial.

La respuesta quimiotáctica es fundamental en la fisiología leucocitaria e implica el reconocimiento de un gradiente externo de quimoquinas (Sánchez-Madrid, 1999). El tráfico leucocitario a través de los capilares sanguíneos es, en cierta forma, comparable al proceso implantatorio, donde el contacto y la posterior invasión del blastocisto es similar al “rolling” linfocitario a través del endotelio. Se ha demostrado que los receptores CCR5 y CCR2b se encuentran polarizados en el eje líder de los linfocitos que migran (Nieto *y cols*, 1997) y que la adhesión leucocitaria a través de integrinas (al igual que se sugiere en el blastocisto) es necesaria para producir la polarización y redistribución de receptores (Del Pozo *y cols*, 1995 y 1997). Estos datos sugieren que las quimoquinas pueden actuar junto con moléculas de adhesión, como integrinas y otras, para dirigir el tráfico leucocitario.

Diversos estudios han demostrado la expresión de algunas moléculas de adhesión en el blastocisto humano como integrinas Beta1, Beta5, Alpha6 o E-Cadherin (Bloor *y cols*, 2002) y en el nuestro se ha demostrado la presencia de dos receptores de quimoquinas, CCR5 y CCR2b.

La migración leucocitaria es un complejo fenómeno, en el cual quimoquinas y receptores juegan un importante papel. Los receptores de quimoquinas se colocan generalmente en el polo líder de la célula, y esto implica la especialización de funciones en dos polos a la célula y el establecimiento de una polaridad endógena.

En nuestro estudio, cuando se co-cultivó CEE con blastocistos humanos, vimos cómo los receptores CXCR1, CXCR4 y CCR5 se polarizaban, es decir, aparecían claramente en un polo de la célula, indicando así una particular función de estos receptores. Estas quimoquinas secretadas, como ya hemos visto en este trabajo, por el endometrio, o bien por el propio blastocisto, podrían inducir una señal de polarización o dimerización en los receptores del endometrio o el propio blastocisto, activando mecanismos para incrementar la respuesta local y la activación de moléculas de adhesión como integrinas u otras, que llevarían al contacto celular blastocisto-endometrio.

Estudios recientes han demostrado la capacidad de algunos receptores de quimoquinas, como CCR5 y CCR2b, para homo o heterodimerizarse cuando determinados ligandos se unen a estos receptores (Mellado *y cols*, 2001, Rodríguez-Frade *y cols* 2001). La presencia simultánea de RANTES y MCP-1 induce la formación de un dímero CCR2b-CCR5, con propiedades distintas para cada uno de los receptores por separado, incluyendo la reducción del nivel de quimoquinas necesario para que el receptor sea activado. Este hecho tiene una relevancia muy importante en la célula, ya que la formación de este tipo de dímeros activa la adhesión linfocitaria en vez de la migración que se produce cuando sólo se dan homodímeros. El blastocisto, por el mismo mecanismo, podría formar esta clase de dímeros CCR5-CCR2b cuando encontrara de forma local una expresión determinada, por parte del endometrio, de las quimoquinas MCP-1 y RANTES. La formación de estos dímeros produciría un cambio en el patrón de expresión del blastocisto, comenzando a producir moléculas de adhesión y consiguiendo adherirse al endometrio cercano.

Multitud de quimoquinas se expresan en el momento de la implantación (Kao *y cols*, 2002); algunas de ellas son las estudiadas en este trabajo (Kayisli *y cols*, 2002). Estas quimoquinas pueden ser inmovilizadas en la superficie epitelial o endotelial por proteoglicanos de membrana o incluso moléculas como IGFBP-rP1, facilitando la

oligomerización de quimoquinas (Hoogewerf *y cols*, 1997) y variando localmente la concentración de dichas quimoquinas. Este efecto de presentación podría activar la homo/heterodimerización de receptores y desencadenar una respuesta de adhesión en el blastocisto. Debemos tener en cuenta que la concentración de quimoquinas es un factor importante a la hora de la homo o heterodimerización. A bajas concentraciones de quimoquinas, la heterodimerización se favorece, mientras que a elevadas concentraciones, se favorece la adhesión. Este fenómeno es altamente lógico, ya que, en el caso de una inflamación, en el foco inflamatorio la concentración de quimoquinas es localmente muy fuerte, disminuyendo poco a poco conforme nos alejamos del foco.

Los linfocitos que deban responder a este foco primero “sentirán” a través de sus receptores una baja concentración de quimoquinas y migrarán hacia el foco inflamatorio; una vez llegados a él, cuando la concentración de quimoquinas libre es máxima, se favorece la heterodimerización y, con ello, el cambio del patrón génico a adhesión y posterior infiltración. Este fenómeno podemos trasladarlo a la implantación. De la misma forma, el blastocisto podría “sentir”, gracias a sus receptores en superficie, determinadas concentraciones de quimoquinas secretadas por el endometrio y guiarse o ser guiado hacia ellas. Una vez llegado a ese foco de quimoquinas, sus receptores podrían crear heterodímeros en función de qué tipo de quimoquinas sean secretadas y cambiar su patrón de expresión hacia uno adhesivo y proceder a la implantación.

Hoy en día todavía se desconoce cómo el blastocisto se mueve o desplaza hacia el lugar de implantación, pero, al igual que ocurre con los linfocitos, en los cuales la polarización de sus receptores produce un fenotipo distinto en cada polo celular, podría ocurrir lo mismo con el blastocisto. Estimulado correctamente por distintas concentraciones de quimoquinas, el blastocisto podría polarizarse, expresando distintas moléculas y propiedades, lo que explicaría porqué en determinadas especies es siempre una zona específica del trofoblasto la que contacta con el endometrio, por ejemplo, la zona de la masa celular interna en humanos y la zona contraria en ratones.

El rastreo de genes por medio de la tecnología de “arrays” nos permite investigar multitud de genes en dos situaciones distintas. En nuestro tercer trabajo, caracterizamos génicamente la propiedad del endometrio para poder implantar un blastocisto también llamada “receptividad endometrial”. En este estudio se usaron dos modelos: el primero

constituido por endometrio en fase receptiva (LH+7) y pre-receptiva (LH+2) y el segundo por dos líneas celulares, una de ellas (R) mucho más “receptiva” (81% de adhesión de blastocistos) versus (H) (40% de adhesión de blastocistos). IGFBP-rP1 fue la segunda molécula más expresada entre los más de 375 genes analizados en endometrio receptivo (LH+7) y nuestra línea celular “receptiva” RL-95-2.

Esta proteína, también conocida como mac25 e IGFBP-7, fue clonada originariamente como un gen cuya expresión era regulada negativamente en células tumorales de meninges y leptomeninges (Murphy y cols, 1993) y fue posteriormente reaislada como una secuencia que se expresaba principalmente en las células mamarias senescentes (Swisshelm y cols, 1995). IGFBP-rP1 comparte entre un 20-25% de secuencia de nucleótidos con otras IGFbps descritas. Debido a que el papel de esta molécula en el endometrio humano no había sido descrito, investigamos su expresión y localización de su ARNm, así como la localización de su proteína en el ciclo menstrual humano.

Mediante PCR cuantitativa demostramos el incremento de IGFBP-rP1 durante la fase receptiva (fase lútea media), seguido de un fuerte aumento de la expresión en la fase lútea tardía. Posteriores experimentos aislando las células epiteliales y estromales confirmaron que la expresión se encontraba principalmente en las células del estroma. Los experimentos de hibridación *in situ* confirmaron nuestros resultados de PCR cuantitativa, pero se encontraron pequeñas discrepancias, ya que, mediante PCR cuantitativa, detectamos una mínima expresión de IGFBP-rP1 en las células epiteliales en la fase lútea temprana (grupo III), mientras que, mediante hibridación *in situ*, se encontró un aumento de expresión en el epitelio luminal en dicha fase. Considerando que el epitelio glandular representa, aproximadamente, un 80% del total del epitelio, es probable que en la PCR cuantitativa se esté detectando tan sólo la expresión del epitelio glandular y el ligero aumento del epitelio luminal quede eclipsado por la expresión del epitelio glandular.

Aunque la función de esta proteína en el endometrio permanece sin esclarecer todavía, nuestro estudio sugiere que IGFBP-rP1 está implicada de cierta forma en la receptividad endometrial humana. Es poco probable que esta molécula desempeñe un mero papel de transportador de IGF, debido a su baja afinidad por este factor. Se han

descrito varias funciones para esta proteína, fuera del contexto de la biología vascular, como la angiogénesis (Akaogi *y cols* 1994; Gunn *y cols*, 1998). IGFBP-rP1 contiene un extremo amino terminal que presenta un dominio con elevada homología a las IGFBPs, responsable de la unión con baja afinidad por IGF, y seguido de este dominio posee otro de elevada riqueza en cisteínas, denominado Hevin/CS-1, caracterizado en otras moléculas por la unión a citoquinas. Ambos dominios hacen de esta proteína una candidata ideal para la retención de este tipo de factores y citoquinas o quimoquinas. De hecho, ha sido demostrado que IGFBP-rP1 se asocia a estructuras tipo microvilli en el endotelio vascular, que constituyen el principal punto de encuentro entre el endotelio y los linfocitos circulantes. Esta molécula podría presentar quimoquinas (Middelton *y cols*, 1997) y otras sustancias como moléculas de adhesión (Girard *y cols*, 1999), contribuyendo a la migración leucocitaria a través de vénulas endoteliales.

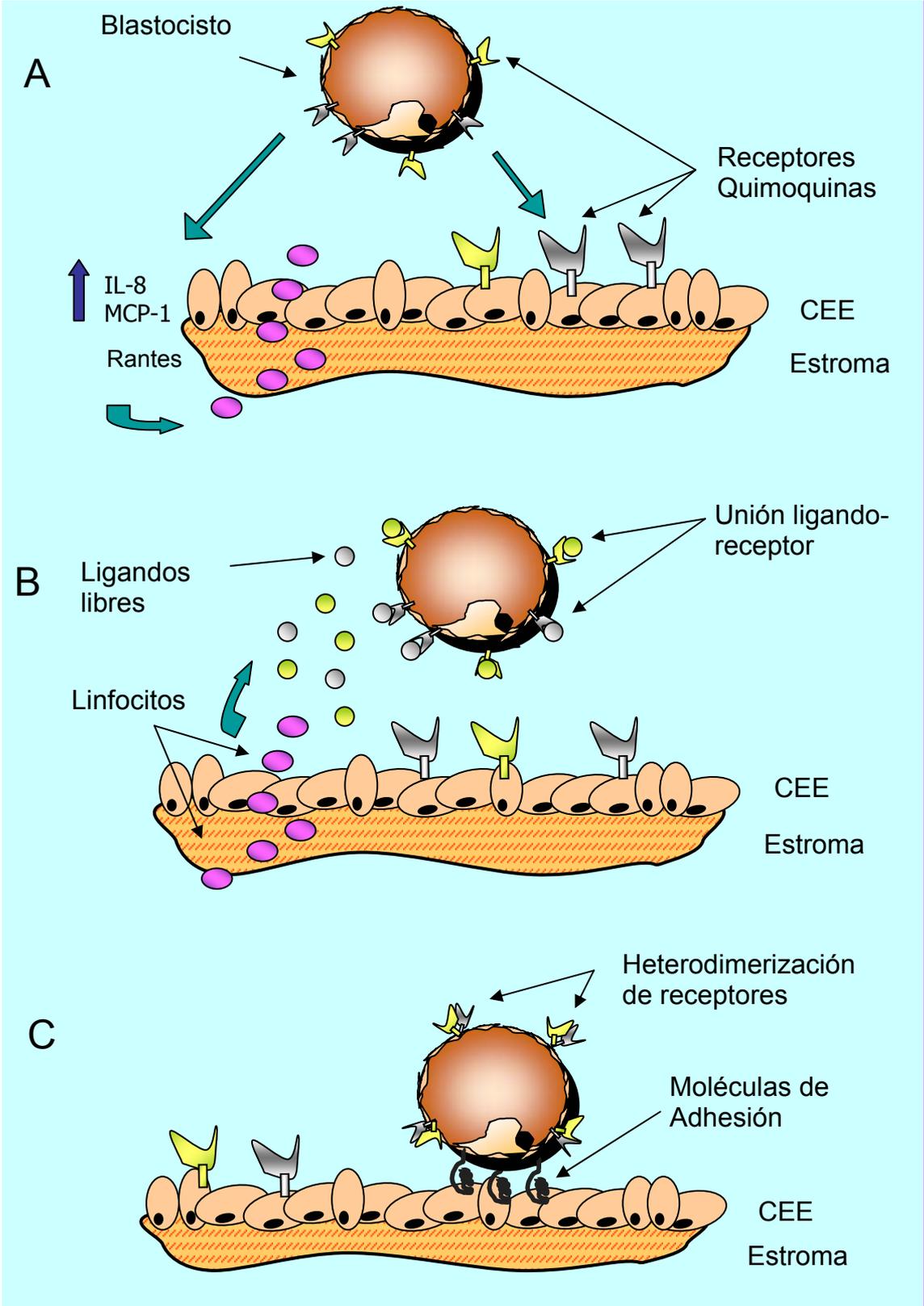
Estas propiedades de IGFBP-rP1 hacen de esta nueva molécula una buena candidata para la presentación de diversos factores como citoquinas y quimoquinas en la superficie epitelial, donde se haya localizada principalmente la proteína. Como hemos descrito, IGFBP-rP1 se comporta como una molécula secretada, ya que es sintetizada principalmente por las células del estroma y transportada hacia el epitelio luminal y endotelial, donde se acumula, probablemente para ejercer su función. Es probable, pues, que IGFBP-rP1 sirva de molécula presentadora de algunas de la quimoquinas estudiadas en esta tesis o de otras moléculas de adhesión implicadas en el proceso de implantación embrionaria, ya que su aumento tiene lugar, principalmente, en el periodo receptivo y post-receptivo.

# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

1. IL-8 y MCP-1 a nivel de proteína se localizan en el epitelio luminal y glandular, así como en células endoteliales. RANTES fue localizada principalmente en células del estroma y endoteliales.
2. Los niveles de IL-8 y MCP-1 aumentaron debido a la administración de progesterona durante la fase receptiva del ciclo menstrual.
3. El blastocisto humano no produce cantidades medibles de IL-8, MCP-1 y RANTES, pero induce un aumento en el ARN mensajero de IL-8 en células epiteliales endometriales en cultivo.
4. Los receptores de quimoquinas CXCR1 (IL-8), CCR5 (RANTES) y CCR2b (MCP-1) a nivel de ARNm está aumentado en el endometrio premenstrual, mientras que CXCR4 (SDF-1) se encontró aumentado ligeramente durante la ventana de implantación (fase secretora media).
5. El blastocisto humano posee los receptores CCR5 (RANTES) y CCR2b (MCP-1) a nivel de proteína.
6. Las células endometriales epiteliales en cultivo poseen los receptores CXCR1 (IL-8), CCR5 (RANTES) y CCRb (MCP-1). El embrión humano induce una polarización de dichos receptores endometriales.
7. IGFBP-rP1 fue la segunda molécula más expresada, tanto por el endometrio receptivo (LH+7) como en la línea celular RL95-A (receptiva), entre más de 375 genes analizados de citoquinas, quimoquinas, factores de crecimiento y sus receptores.

8. El ARN mensajero de IGFBP-rP1 aumentó unas 35 veces durante la fase receptiva comparado con el endometrio pre-receptivo, mostrando además un pico de expresión en la fase lútea tardía. La separación de estroma y epitelio demostró que la expresión de IGFBP-rP1 aumentaba principalmente en células del estroma.
  
9. La localización del ARNm de IGFBP-rP1 por hibridación *in situ* confirmó la localización de dicha molécula en células del estroma, aunque también se observó en epitelio y células endoteliales. La localización de la proteína se concentró en la superficie apical del endometrio, sugiriendo su posible función en la fisiología de la receptividad endometrial.
  
10. Concluimos que algunas quimoquinas secretadas por el endometrio de forma local como IL-8, RANTES, MCP-1 u otras pueden activar sus receptores en la superficie del blastocisto, lo que supondría su heterodimerización y, con ello, se provocaría un fenotipo adhesivo en el blastocisto y su posterior implantación (ver Figura 9).



**Figura 9.** Esquema de la hipótesis de trabajo

- A. El blastocisto estimula la producción de IL-8, MCP-1 y RANTES en el endometrio, lo que conlleva la infiltración de multitud de células blancas hacia el tejido endometrial. El blastocisto también produce la polarización de algunos receptores de quimoquinas sobre la superficie epitelial.
  
- B. El blastocisto presenta en superficie los receptores CCR5 y CCR2 (RANTES y MCP-1). MCP-1 y RANTES (entre otras quimoquinas) es secretada por los linfocitos y el endometrio, con lo que se produce la unión ligando receptor en la superficie del blastocisto.
  
- C. La formación de heterodímeros entre los dos receptores en la superficie del blastocisto provoca el cambio de estatus embrionario hacia la adhesión, con la consecuente expresión de moléculas de adhesión.

# REFERENCIAS

## REFERENCIAS

- Abisogun AO, Daphna-Iken D, Reich R, Kranzfelder D, Tsafiriri A. Modulatory role of eicosanoids in vascular changes during the preovulatory period in the rat. *Biol. Reprod.* 38:756-762. 1988
- Abramov Y, Schenker JG, Lewin A, Friedler S, Barak V. Plasma inflammatory cytokines correlate to the ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum. Reprod.* 11: 1381-1386. 1996
- Ainsworth L, Baker RD, Amstrong DT. Preovulatory changes in follicular fluid prostaglandin-F levels in mice. *Prostaglandins.* 9:915-925. 1975
- Akaogi K, Okabe Y, Funahashi K, et al. Cell adhesion activity of a 30-kDa major secreted protein from human bladder carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 198:1046-1053. 1994
- Akoum A, Lemay A, McColl S, Turcot-Lemay L, Maheux R. Elevated concentration and biologic activity of monocyte chemotactic protein-1 in the fluid of patients with endometriosis. *Fertil. Steril.* 66:17-23. 1996a
- Alexander CM, Werb Z. Extracellular matrix degradation. *Cell Biology of Extracellular Matrix.* 255-302. 1991
- Allavena P, Bianchi G, Zhou D, Van Damme J, Jile KL, Sozzani S, Mantovani A. Induction of natural-killer-cell migration by monocyte chemotactic protein-1, protein-2 and protein-3. *Eur. J. Immunol.* 24:3233-3236. 1994
- Aplin JD. Adhesion molecules in implantation. *J. Reprod. Fertil.* 2:84-93. 1997
- Arici A, Head JR, MacDonald PC, Casey ML. Regulation of interleukin-8 gene expression in human endometrial cells in culture. *Mol. Cell. Endocrinol.* 94:195-204. 1993
- Arici A, McDonal PC, Casey ML. Regualtion of monocyte chemotactic protein-1 gene expression in human endometrial cells in cultures. *Mol. Cell. Endocrinol.* 107:189-197. 1995
- Arici A, Mcdonald PC, Cassey ML. Modulation of interleukin-8 mRNA expresion in endometrial stromal cells by fetal bovine serum. *Am. J. Reprod. Immunol.* 27:53. 1992
- Arici A, Oral E, Bukulmez O, Buradagunta S, Engin O, Olive DL. Interleukin-8 expression and modualtion in human preovulatory follicles and ovarian cells. *Endocrinology.* 137:3762-3769. 1996a
- Arici A, Seli E, Sentrurk LM, Gutierrez LS, Oral E, Taylor HS. Interleukin-8 in the human endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 83: 1783-1787. 1998
- Baggiolini M, Dahinden A. Neutrophils activating peptide-1/ interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clin. Invest.* 84:1045-1049. 1989
- Banchereau J, Roussef F. Human B lymphocytes phenotype, proliferation and differentiation. *Adv. Immunol.* 52:125-262. 1992
- Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385:640. 1997
- Beers WH, Strickland S. A cell culture assay for follicle-stimulating hormone. *J. Biol. Chem.* 253:3877-3881. 1978

- Beers WH. Follicular plasminogen and plasminogen activator and the effect on ovarian follicle wall. *Cell*. 6:379-386. 1975
- Bischof P, Campana A. Trophoblast differentiation and invasion: its significance for human embryo implantation. *Early. Pregn. Biol. Med.* 3: 81-95. 1997
- Bischof P, Haenggeli L, Campana A. Gelatinase and oncofetal fibronectin secretion are dependent upon integrin expression in human cytotrophoblast. *Mol. Hum. Reprod.* 10:734-742. 1995
- Bjersing L, Cajander S. Ovulation and the mechanism of follicular . VI. Ultrastructure of the theca interna and the inner vascular network surrounding rabbit Graafian Follicles prior to induced ovulation. *Cell. Tissue. Res.* 153:31-44. 1974
- Blandau RJ, Rumery RE. Measurements of intrafollicular pressure in ovary and preovulatory follicles of rat. *Fertil. Steril.* 14:330-341. 1963
- Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J. Exp. Med.* 184:1101. 1996
- Bloor DJ, Metcalfe AD, Rutherford A, *et cols*. Expression of cell adhesion molecules during human preimplantation embryo development. *Mol. Hum. Reprod.* 8: 237-45. 2002
- Borthwick JM, Charnock-Jones D, Tom BD, Hull ML, Tierney R, Phillips SC, Smith SK. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* 9:19-33. 2003
- Brigstock DR. The connective tissue growth factor/ cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr. Rev.* 20: 189-206. 1999
- Bronson RA, Bryant G, Balk M, Emanuele N. Intrafollicular pressure within preovulatory follicles of the pig. *Fertil. Steril.* 31:205-213. 1979
- Bulmer JN, Johnson PM. Immunohistological characterization of the decidual leukocytic infiltrate related to endometrial gland epithelium in early human pregnancy. *Immunology.* 55:35-44. 1985
- Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum. Reprod.*6:761-768. 1991
- Burren CP, Wilson EM, Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. Binding properties and distribution of insulin-like growth factor binding protein-related protein 3 (IGFBP-rP3/NovH), an additional member of the IGFBP superfamily. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84: 1096-1103. 1999
- Cai JP, Hudson S, Chin YH. Stimulation of human T cell trans-dermal microvascular endothelial cell migration by MCP-1. *J. Invest. Dermatol.* 104:558. 1995
- Campbell S, Swann HR, Seif MW, Kimber SJ, Aplin JD. Cell adhesion molecules on the oocyte and pre-implantation human embryo. *Mol. Hum. Reprod.*; 1:1571-1578. 1995
- Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. Monocyte chemoattractant protein-1 acts as a T-Lymphocyte chemoattractant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:3652-3656. 1994
- Carson DD, Lagow E, Thathiah A, *et cols* . Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Mol Hum Reprod.* 8: 871-9. 2002
- Chard T. Cytokines in implantation. *Hum. Reprod. Update.* 4:385-396. 1995

Charo IF, Myers S, Herman A, Franci C, Cormolly A, Coughlin S. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein-1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91:2752-2756. 1994

Cherouny PH, Pankuch GA, Romero R, Botti JJ, Kuhn DC, Demers LM Appelbaum PC. Neutrophil attractant/activating peptide-1/interleukin-8: association with histologic chorioamnionitis, preterm delivery, and bioactive amniotic fluid leukoattractants. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 169:1299-1303. 1993

Chia CM, Winston RML, Handyside AH. EGF, TGF $\alpha$  and EGFR expression in human preimplantation embryos. *Development.* 121:299-307. 1995

Clark-Lewis I, Schumacher C, Baggiolini M. Structure-activity relationship of Interleukin-8 determined using chemically synthesised analogs. Critical role of NH<sub>2</sub>-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis and receptor binding activities. *J. Biol. Chem.* 266:23128-23134. 1991

Clemmons DR, Moses AC, McKay MJ, Sommer A, Rosen DM, Ruckle J. The combination of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein-3 reduces insulin requirements in insulin-dependent type 1 diabetes: evidence for *in vivo* biological activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85: 1518-1524. 2000

Coditz IG. Effect of exogenous prostaglandin E2 and actinomycin D on plasma leakage induced by neutrophil activating peptide-1/ interleukin-8. *Inmunol. Cell. Biol.* 68:397-403. 1990

Creus M, Balasch J, Ordi J, Fabregues F, Casamitjana R, Quinto L, Coutifaris C, Vanrell JA. Integrin expression in normal and out-of-phase endometria. *Hum. Reprod.* 13:3460-3468. 1998

Creus M, Ordi J, Fabregues F, Casamitjana R, Carmona F, Cardesa A, Vandrell JA, Balasch J. The effect of different hormone therapies on integrin expression and pinopode formation in the human endometrium: a controlled study. *Hum. Reprod.* 18: 683-693. 2003

Critchley HOD, Kelly RW, Kooy J. Perivascular localization of interleukin-8 in human endometrium: a preliminary report. *Hum. Reprod.* 8:1406-1409. 1994

Davis B, Lennard D, Lee C, Tiano H, Morham S, Wetsel W and Langanbach R. Anovulation in Cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by Prostaglandin E2 and Interleukin-1b. *Endocrinology* 140: 2685-2695. 1999

Das SK, Wang X-N, Paria BC, *et cols.* Heparin binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF receptor in implantation. *Development* 120: 1071-1083. 1994

D'Souza MP, Harden VA. Chemokines and HIV-1 second receptors-confluence of two fields generates optimism in AIDS research. *Nat. Med.* 2:1293-1300. 1996

De Clercq E. New anti-HIV agents and targets. *Med. Res. Rev.* 22(6):531-65. 2002

De los Santos MJ, Mercader A, Francés A, Portolés E, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Role of endometrial factors in regulating secretion of components of the immunoreactive human embryonic interleukin-1 system during embryonic development. *Biol. Reprod.* 54:563-574. 1996

De M, Choudhuri R, Wood GW. Determination of the number and distribution of macrophages and granulocytes in the mouse uterus from mating to implantation. *J. Leuko. Biol.* 50: 252-262. 1991

Del Pozo MA, Cabañas C, Montoya MC, Ager A, Sánchez-Mateos P, Sánchez-Madrid F. ICAM's redistributed by chemokines to cellular uropods as a mechanism for recruitment of T-lymphocytes. *J. Cell. Biol.* 137:1-16. 1997

- Del Pozo MA, Sanchez Mateos P, Sanchez Madrid F. Cellular polarization induced by chemokines: a mechanism for leukocyte recruitment?. *Immunol. Today*. 17:127-130. 1996
- Del Pozo MA, Sánchez-Mateos P, Nieto M, Sánchez-Madrid F. Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J. Cell. Biol.* 131:495-505. 1995
- Diczfalusy E, Crosignani PG. Introduction: from reproductive endocrinology to reproductive health. ESHRE work shop Capri. *Hum Reprod. (suplemento)* 1995
- Dudley DJ, Trantman MS, Mitchel MD. Inflammatory mediators regulate interleukin-8 production by cultured gestational tissues: evidence for a cytokine network at the chorio-decidual interface. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76:404-410. 1993
- Emonard H, Christiane Y, Smet M, Grimand JA, Foidart JM. Type IV and interstitial collagenolytic activities in normal and malignant cells are specifically regulated by the extracellular matrix. *Inv. Metast.* 10: 170-177. 1990
- Enders AC. Contributions of comparative studies to understanding mechanism of implantation. En: *Endocrinology of embryo-endometrium interactions*. 11-16. 1994
- Espey LL, Lipner H. Measurements of intrafollicular pressure in the rabbit ovary. *Am. J. Physiol.* 205:1067-1072. 1963
- Espey LL. Ovulation as an inflammatory reaction; a hypothesis. *Biol. Reprod.* 22:73-106. 1980
- Espey LL. Tenacity of porcine Graafian follicle as it approaches ovulation. *Am. J. Physiol.* 212:1397-1401. 1967a
- Espey LL. Ultrastructure of the apex of the rabbit Graafian follicle during the ovulatory process. *Endocrinology.* 81:267-276. 1967b
- Fakih H, Bagget B, Holtz G, Tsang KY, Lee JC, Williamson HO. Interleukin-1: possible role in the infertility associated with endometriosis. *Fertil. Steril.* 47: 213-217. 1987
- Feliciani C, Theoharides T, Mammarella S, Contil P, Reale M, Barbacana RC. Activation of mast cells by MCP-1. *J. Invest. Dermatol.* 104:685. 1995
- Fukumoto M, Yajima Y, Okamura H, Midorikawa O. Collagenolytic enzyme activity activity in human ovary: an ovulatory enzyme system. *Fertil. Steril.* 36:746-750. 1981
- Furutani Y, Nomura H, Notake A. Cloning and sequencing of the cDNA for human monocyte chemotactic and activating factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159:249-255. 1989
- Gao J, Kuhns D, Tiffany H, McDermott D, Li X, Francke U. Structure and functional expression of the human macrophage inflammatory protein-1 alpha/RANTES receptor. *J. Exp.Med.* 177:1421-1427. 1993
- Gao JL, Murphy PM. Human megalovirus open reading frame US 28 encode a functional  $\beta$  chemokine receptor. *J. Biol. Chem.* 269:28539-28542. 1994
- García-Velasco JA, Alvarez M, González González A, Lockwood ChJ. Nuevos marcadores bioquímicos en el parto prematuro con membranas íntegras. *Progr. Obst. Ginecol.* 38: 155-160. 1995
- Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, Yang ZQ, Kiessling LL, Rosen SD, Fisher SJ. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science.* 299:355-6. 2003

Girard JF, Bækkevold ES, Yamanaka T, Haraldsen G, Brandtzaeg P, Almalric F. Heterogeneity of endothelial cells. The specialized phenotype of human high endothelial venules characterized by suppression subtractive hybridization. *Am J Pathol.* 155: 2043-2055. 1999

Giudice L. Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil. Steril.* 61:1-16. 1994

Glasser SR, Mulholland J, Mani SK. Blastocyst endometrial relationships: reciprocal interactions between uterine epithelial and stromal cells and blastocysts. *Trophoblast Res.* 5:225-280. 1991

Glasser SR, Mulholland J. Receptivity is a polarity dependent special function of hormonally regulated uterine epithelial cells. *Microsc. Res. Techn.* 25:106-120. 1993

González RR, Palomino A, Boric A, Vega M, Devoto L. A quantitative evaluation of  $\alpha 1$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha v$  y  $\beta 3$  endometrial integrins from fertile and unexplained infertile woman during the menstrual cycle. A flow cytometric appraisal. *Hum. Reprod.* 10:2485-92. 1999

Goodman RB, Wood RG, Martin TR, Hanson-Panton O, Kinasewitz GT. Cytokine-stimulated human mesothelial cells produce chemotactic activity for neutrophils including NAP-1/IL-8. *J. Immunol.* 148: 457-465. 1992

Graham CH, Lala PK. Mechanism of control of trophoblast invasion *in situ*. *J. Cell. Biol.* 148: 228-234. 1991

Grossman CJ. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science.* 277:257-260. 1985

Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 95:258-263. 1998

Gura T. Chemokine take center stage in inflammatory ills. *Science.* 272:954- 956. 1996

Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 279: 509-514. 1998

Halme J, Becker S, Hammond M, Raj S. Pelvic macrophages in normal and infertile women: the role of patent tubes. *Am J Obstet Gynecol.* 142: 890-895. 1982

Halme J, White C, Kauma S, Estes J, Haskill S. Peritoneal macrophages from patients with endometriosis release growth factor activity . *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66: 1044-1049. 1988

Halme J. Release of tumor necrosis factor-alpha by human peritoneal macrophages *in vivo* and *in vitro*. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 161: 1718-1725. 1989

Harkin DG, Bignold LP, Herriot-Warmes DM, Kirby CA. Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes towards human preovulatory and serum using a "sparse pore" polycarbonate filtration membrane. *Immunol.* 27:151-155. 1994

Hébert C, Bitangol R, Baker J. Scanning mutagenesis of Interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding. *J. Biol. Chem.* 266:18989-18994. 1991

Hellberg P, Thomsom P, Janson PO, Brannstrom M. Leukocyte supplementation increases the luteinizing hormone-induced ovulation "*in vitro*"-perfused rat ovary. *Biol. Reprod.* 44:791-797. 1991

- Herriot DM, Warnes GM, Kerin JF. Pregnancy-related chemotactic activity of human molecular fluid. *Fertil. Steril.* 45:196-201. 1986
- Herting, AT, Rock, J, Adams, EC. Thirty four fertilized human ova, good, bad and indifferent, recovered from 210 women of known fertility. *Paediatrics.* 23: 202-211. 1952
- Hoogewerf, A.J., Kuschert, G.S.V., Proudfoot, A.E.I. et al. Glycosamins mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochem.* 36: 13570-13578. 1997
- Huber A, Kunkel S, Todd RIII, Weiss. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous Interleukin-8. *Science.* 254:99-102. 1991
- Hynes, RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69: 11-25. 1992
- Irving JA, Lala PV. Functional role of the cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF- $\beta$ , IGF-II and IGFBP-1. *Exp. Cell Res.* 217: 419-427. 1995
- Irwin J, Kirk D, King R, Quigley M, Gwatkin R. Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an *in vitro* model for decidualization. *Fertil. Steril.* 52: 761-768. 1989
- Janson PO. Effects of luteinizing hormone on blood in the follicular rabbit ovary as measured by radioactive microspheres. *Acta. Endocrinol.* 1975;79:122-123
- Jiang Y, Beller D, Frenzl G, Graves D. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J. Immunol.* 148:2423-2428. 1992
- Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrinol. Rev.* 16: 3-34. 1995
- Jones RL, Kelly RW, Critchley HOD. Chemokines and cyclooxygenase-2 expression in human endometrium coincides with leukocyte accumulation. *Hum. Reprod.* 12:1300-1306. 1997
- Jonhson RB Jr. Current concepts of immunology: monocytes and macrophages. *N. Engl. Med.* 318:747-752. 1988
- Junqueira LCU, Zugaib M, Montes GS. Morphologic and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical dilatation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 138: 273-281. 1980
- Kamat BR, Isaacson DM, Path FRC. The immunocytochemical distribution of leukocytic subpopulation in human endometrium. *A. J. P.* 127: 66-73. 1986
- Kao LC, Tulac S, Lobo y cols. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinol.* 143: 2119-38. 2002
- Kayisli UA, Mahutte NG, Arici A. Uterine chemokines in reproductive physiology and pathology. *Am. J. Reprod. Immunol.* 47: 213-21. 2002
- Kelly RW, Illingworth P, Baldie G, Leask R, Brown S, Calder AA. Progesterone control of IL-8 production in endometrium and choriondecidual cells underlines the role of neutrophil in menstruation and parturition. *Hum. Reprod.* 9:253-258. 1994
- Kennedy J, Kelner GS, Kleyensteuber S, Schall TJ, Weiss MC, Yssel H, Schneider PV, Cocks BG, Bacon KB, Zlotnik A. Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J. Immunol.* 155: 203-9. 1995
- Khorram O, Taylor RN, Ryan IP, Schall TJ, Landers DV. Peritoneal fluid concentrations of the cytokine RANTES correlate with the severity of endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 169: 1545-1549. 1993

Kim H-S, Nagalla SR, Oh Y, Wilson E, Roberts CT Jr, Rosenfeld RG. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 12981-12986. 1997

King A, Loke YW. On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. *Immunol. Today* 12:432-435. 1991

King A, Wellings V, Gardner L, Loke YW. Immunocytochemical characterization of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum. Immunol.* 24:195-205. 1989

Kissling R, Klein E, Wigzell H. Natural killers cells in the mouse. Cytotoxic cells with specificity for mouse Colony Leukemia Cells. Specificity and distribution according to phenotype. *Eur. J. Immunol.* 5:112-120. 1975

Klentzeris LD, Bulmer JN, Warren A, Morrison L, Li Tch, Cooke ID. Endometrial Lymphoid tissue in the timed endometrial biopsy: Morphologic and immunohistochemical aspects. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 167:667-674. 1992

Koch A, Polverini P, Kunkel S, Harlow LA, Di Pietro LA, Elmer VM, Elmer SG, Strieter RM. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*. 258: 1798-1801. 1992

Koch AE, Kunkel SL, Snah MR, Hosaka S, Halloran MM, Haines GK, Burdick MD, Pope RM, Strieter RM. A chemotactic cytokine for neutrophils in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 155:3660-3666. 1995

Kolle G, Georgas K, Holmes GP, Little MH, Yamada T. CRIM1, a novel gene encoding a cysteine-rich repeat protein, is developmentally regulated and implicated in vertebrate CNS development and organogenesis. *Mech Dev.* 90: 181-193. 2000

Kumar S, Zhu LJ, Polihronis M, Cameron S, Baird DT, Schaltz F, Dua A, Ying YK, Bagchi MK, Bagchi IC. Progesterone induces calcitonin gene expression in human endometrium within the putative window of implantation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 4443-4450. 1998

Larsen C, Anderson A, Aella E, Oppenheim J, Matsushima K. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science*. 243:1469-1466. 1989

Le Marie WJ, Yang NST, Behrman HH, Marsh JM. Preovulatory changes in the concentration of prostaglandins in rabbit Graafian follicles. *Prostaglandins*. 3:367-376. 1973

Lee J, Horuk R, Rice GC, Bennett GL, Camerato T, Wood W Y. Characterization of two high affinity human Interleukin-8 receptors. *J. Biol. Chem.* 26:16283-16287. 1992

Leiva M, Hasty L, Pfeifer S, Mastroiani LJr, Lyttle CR. Increased chemotactic activity of peritoneal fluid in patients with endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 163:592-598. 1993

Lessey B, Castelbaum A. Integrins in endometrium. *Reproductive Medicine Review*. 4: 43-58. 1995

Lessey BA, Castelbaum A, Buck CA. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil. Steril.* 62: 497-506. 1994

Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, Buck CA. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J. Clin. Invest.* 90: 188-195. 1992

Littman DR. Chemokine receptors: keys to AIDS pathogenesis?. *Cell*. 93:677. 1998

López-Bermejo A, Rosenfeld RG. Factores de crecimiento semejantes a la insulina. A: Oliver JA, Lezcano AC, Bouthelie RG i Hierro FR, eds. *Tratado de Endocrinología Pediátrica y de la Adolescencia*. Madrid: Doyma, 2001.

- Luster AD, Ravetch J. Genomic characterization of a  $\gamma$ -interferon inducible cytokine (IP-10) and identification of an interferon- inducible hypersensitive site. *Mol. Cell. Biol.* 7:3723-3731. 1987
- MacGregor JA, French JJ. Questions for the study of infections and preterm labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 175:754-755. 1996
- MacMalman, CD, Furth, EE, Omigbodun, A. Regulated expression of cadherin-11 in human epithelial cells: a role for cadherin-11 in trophoblast endometrium interactions?. *Developmental Dynamics.* 206: 201-211. 1996
- Männel DN, Mizel SB, Diamanstein T, Falk W. Induction of interleukin-2 responsiveness in thymocytes by synergistic action of interleukin-1 and interleukin-2. *J. Immunol.* 134:3108-3110. 1985
- Martel D, Malet C, Gautray J, Psychoyos A. Surface changes of the luminal uterine epithelium during the human menstrual cycle: A scanning electron microscopic study. En *The Endometrium: Hormonal impacts.* Ed: J. Brux, R. Mortel, J.P. Gautray. Plenum Press. Nueva York. 15-29. 1981
- Matsushima K, Baldwin ET, Mukaida N. Interleukin-8 and MCAF: novel leucocyte recruitment and activating cytokines. In Kishimo, t (Eds). *Interleukins: Molecular Biology And Immunology.* Karger, Basel 236-265. 1992
- Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, *y cols.* Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *EMBO J.* 20: 2497-507. 2001
- Middleton J, Neil S, Wintle J, *y cols.* Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell.* 91:385-395. 1997
- Miller JF, Glue J, Williamsom E, Gordon YB, Grudzinkas JG, Sikes A. Fetal loss after implantation. *Lancet.* ii: 554-556. 1980
- Miyamoto S, Akiyama SK, Yamada KM. Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science.* 267:883-885. 1995
- Morales TI, Woessner JF, Howell DS, Marsh JM, LeMarie WJ. A microassay for the direct demonstration of collagenolytic activity in Graafian follicles of the rat. *Biochem. Biophys. Acta.* 524:428-434. 1978
- Morales TI, Woessner JFJ, Marsh JM, Le Marie WJ. Collagen, collagenase and collagenolytic activity in rat Graafian follicles during follicular growth and ovulation. *Biochem Biophys Acta* 756:119-122. 1983
- Mossman TR, Fong TA. Specific assays for cytokine production by T cells. *J. Immunol. Meth.* 116:151-158. 1989
- Mukeida N, Shiroo M, Matsushima K. Genomic structure of the human monocyte derived neutrophil chemotactic factor IL-8. *J. Immunol.* 143:1366-1371. 1989
- Mulherin SA, O'Brien TR, Ioannidis JP, Goedert JJ, Buchbinder SP, Coutinho RA, Jamieson BD, Meyer L, Michael NL, Pantaleo G, Rizzardi GP, Schuitemaker H, Sheppard HW, Theodorou ID, Vlahov D, Rosenberg PS. Effects of CCR5-Delta32 and CCR2-64I alleles on HIV-1 disease progression: the protection varies with duration of infection. *AIDS.* 17:377-387. 2003
- Murphy CR. The cytoskeleton of uterine epithelial cells: a new player in uterine receptivity and the plasma membrane transformation. *Hum. Reprod. Update.* 1: 567-580. 1995
- Murphy P. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Ann. Rev. Immunol.* 12:593-633. 1994
- Murphy CR. Understanding the apical surface markers of uterine receptivity. Pinopodes or uterodomes? *Hum. Reprod.* 15:2451-1454. 2000

- Murphy CR. The plasma membrane transformation of uterine epithelial cells during pregnancy. In: Simón C, Pellicer A and Doberska C (eds), Human Implantation: recent advances and clinical aspects. J Reprod Fert Suppl 55: 23-28. 2000
- Murphy M, Pykett MJ, Harnish P, Zang KD, George DL. Identification and characterization of genes differentially expressed in meningiomas. Cell Growth Differ. 4:715-22. 1993
- Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. Nature. 382:635. 1996
- Nasu K, Narahara H, Matsui N, Kawano Y, Tanake Y, Miyakawa I. Platelet-activating factor stimulates cytokine production by human endometrial stromal cells. Mol. Hum. Reprod. 5:548-553. 1999
- Neote K, DiGregorio D, Mak JY, Horuk R, Schall TJ. Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. Cell. 72:415-425. 1993
- Nicocola AN. Cytokines and their receptors. New York: Oxford University Press. 1994
- Nieto M, Frade JMR, Sancho D, Mellado M, Martinez-A C, Sanchez-Madrid F. Polarization of chemokine receptors to the leading edge during lymphocyte chemotaxis. J.Exp.Med. 186: 153-8. 1997
- Nikas G. pinopodes as markers of endometrial receptivity in clinical practice. Hum Reprod. 14:99-106. 1999
- Oh Y, Nagalla SR, Yamanaka Y, Kim HS, Wilson E, Rosenfeld RG. Synthesis and characterization of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-7. Recombinant human mac25 protein specifically binds IGF-I and -II. J. Biol. Chem. 271:30322-30325. 1996
- Oh Y, Yamanaka Y, Kim H-S, Vorwerk P, Wilson E, Hwa V et al. IGF-independent actions of IGFBPs. A: Tanano K, Hizuka N i Takahashi S-I, eds. Molecular mechanisms to regulate the activities of insulin-like. Amsterdam: Elsevier. 123-133. 1998
- Oppenheim J, Zachariae COC, Mukeida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercine" cytokine family. Ann. Revol. Immunol. 9:617-648. 1991
- Pace D, Morrison L, Bulmer JN. Proliferative activity in endometrial stromal granulocytes through the menstrual cycle and early pregnancy. J. Clin. Pathol. 42:35-39. 1989
- Parr EL. Histological examination of the rat ovarian follicle wall prior to ovulation. Biol. Reprod. 11:483-503. 1974
- Peinado JA, Bolúmar F. Esterilidad e infertilidad: aproximación a su incidencia y a la demanda previsible de servicios. En Remohí J, Simón C, Pellicer A, Bonilla-Musoles F, editores. Reproducción Humana. Madrid, Ed. McGraw-Hill Interamericana 235-245. 1996
- Powrie R, Coffman RL. Cytokine regulation of T-cell function: potential of therapeutic intervention. Immunol. Today. 14:270. 1993
- Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. Endocrine Rev. 18: 801-831. 1997
- Reed SG, Nathan CF, Pihl DL, Rodricks P, Shanebeck K, Conlon PJ, Grabstein KH. Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit *Tripinosoma cruzi* and release hydrogen peroxide: comparison with interferon gamma. J. Exp. Med. 166:1734-1746. 1987
- Reese J, Das S, Paria B y cols. Global gene expression analysis to identify molecular markers of uterine receptivity and embryo implantation. J. Biol. Chem. 276: 44137-45. 2001

- Remohí J, Gutiérrez A, Cano F, Ruiz A, Simón C, Pellicer A. Long oestradiol replacement in an oocyte donation programme. *Hum. Reprod.* 10:1387-1391. 1995
- Revel A, Barak V, Lavy Y, Anteby E, Abranov Y, Schenker JJ, Amit A, Finci-Yeheskel Z, Mayer M, Simon A, Laufer N, Hurwitz A. Characterization of intraperitoneal cytokines and nitrites in women with severe ovarian hyperstimulation Syndrome. *Fertil. Steril.* 66:66-71. 1996
- Riesewijk A, Martín J, Van Os R, *et cols.* Gene Expression profiling of Human Endometrial Receptivity by Microarray Technology. *Mol. Hum. Reprod.* 9: 253-264. 2003
- Robertson SA, Mau VJ, Tremellen KP, Seamark F. Role of high molecular weight seminal vesicle proteins in eliciting the uterine inflammatory response to semen in mice. *J. Reprod. Fertil.* 107: 265-277. 1996a
- Robertson SA, Mayrhofer G, Seamark RF. Ovarian steroid hormones regulate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synthesis by uterine epithelial cells in the mouse. *Biol. Reprod.* 54:183-196. 1996b
- Rodriguez-Frade JM, Mellado M, Martinez-A C. Chemokine receptor dimerization: two are better than one. *Trends. Immunol.* 22:612-7. 2001
- Rollins BJ. Chemokines. *Blood.* 90: 909-928. 1997
- Romero R, Mazor M, Wu YK, Sirtori M, Oyarzun E, Mitchell MD, Hobbins JC. Infection in the pathogenesis of preterm labor. *Semin. Perinatol.* 161: 262-279. 1988
- Roth SJ, Woldemar Carr M, Springer TA. C-C chemokines but not the C-X-C chemokines interleukin-8 and interferon-gamma inducible protein-10 stimulate transendothelial chemotaxis of T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 25:3482-8. 1995
- Runesson E, Boström EK, Janson P, Brannström M. The human preovulatory follicle is a source of the chemotactic cytokine interleukin-8. *Mol. Hum. Reprod.* 2:245-250. 1996
- Sanchez-Madrid F, del Pozo MA. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.* 18:501-11. 1999
- Sappino AP, Huarte J, Belin D, Vassalli JD. Plasminogen activators in tissue remodeling and invasion: mRNA localization in mouse ovaries and implanting embryos. *J. Cell. Biol.* 109: 2471-2479. 1989
- Schall T, Bacon K. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 6:865-873. 1994
- Segerer S, Cui Y, Eitner F, Goodpaster T, Hudkins KL, Mack M, Cartron JP, Colin Y, Schlondorff D, Alpers CE. Expression of chemokines and chemokine receptors during human renal transplant rejection. *Am. J. Kidney. Dis.* 37:518-31. 2001
- Seiko Y, Ikeda U, Sekiguchi H, Morito M, Korishi K, Kasahara T, Shimada K. Expression of leukocyte chemotactic cytokines in myocardial tissue. *Cytokine.* 7:301-304. 1995
- Shatz F, Aigner S, Papp C, Toth-Pal E, Hansknecht V, Lockwood CJ. Plasminogen activator activity during decidualization of human endometrial stromal cells is regulated by plasminogen activator inhibitor. *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 2504-2510. 1995
- Sief CA. Hematopoietic growth factors. *J. Clin. Invest.* 79:1549-1557. 1987
- Sim TC, Reece LM, Hilsmeier KA, Grant JA, Alam R. Secretion of chemokines and others cytokines in allergen-induced nasal responses: inhibition by topical steroid treatment. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 152:927-933. 1995

- Simón C, Francés A, Piquette GN, El Danasouri Y, Zurawski G, Dang W, Poland ML. Embryonic Implantation in Mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinology*. 134:521-527. 1994a
- Simón C, Francés A, Piquette GN, Polan ML. Immunohistochemical localization of the Interleukin-1 system in the mouse ovary during follicular growth, ovulation and luteinization. *Biol. Reprod.* 50:449-457. 1994b
- Simón C, Piquette GN, Francés A, El-Danasouri Y, Irwin JC, Polan ML. The effect of interleukin-1 $\beta$  on the regulation of IL-1 receptor type 1 messenger ribonucleic acid and protein levels in cultured human endometrial stromal and glandular cells. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 78:675-682. 1994c
- Simón C, Gimeno MJ, Mercader A, Francés A, García-Velasco JA, Remohí J, Polan ML, Pellicer A. Cytokines-adhesion molecules-invasive proteinase. The missing paracrine/autocrine link in embryonic implantation? *Mol. Hum. Reprod.* 2:405-424. 1996
- Simón C, Gimeno MJ, Mercader A, O'Connor JE, Remohí J, Polan ML, Pellicer A. Embryonic regulation of integrins  $\beta$ 3,  $\alpha$ 4 and  $\alpha$ 1 in human endometrial epithelial cells *in vitro*. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 82:2607-2616. 1997a
- Simón C, García-Velasco JA, Caballero-Campo P, Polan ML. Cytokines and reproductive function. *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes.* 4:377-386. 1997b
- Simón C, Caballero-Campo P, García-Velasco JA, Pellicer A. Potential implications of chemokines in reproductive function: an attractive idea. *J. Reprod. Immunol.* 38: 169-193. 1998a
- Simón C, Moreno C, Remohí J, Pellicer A. Molecular interactions between embryo and uterus in the adhesion phase of human implantation. *Hum. Reprod.* 13: 219-232. 1998b
- Simón C, Moreno C, Remohí J, Pellicer A. Cytokines and embryo implantation. *J. Reprod. Immunol.* 39:117-131. 1998c
- Simón C, Mercader A, García-Velasco JA, Nikas G, Moreno C, Remohí J, Pellicer A. Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84:2638-2646. 1999
- Smith KA. Interleukin-1. *Annu. Rev. Immunol.* 2:319-333. 1984
- Society for assisted reproductive Technology and the American Society for Reproductive Medicine. Assisted reproductive technology in the United States:1999 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril.* 78:918-931.
- Sozzani S, Zhou D, Locati M, Riei M, Proost P, Magazín M. Receptors and transduction pathways for monocyte chemoattractant protein-2 and monocyte chemoattractant protein-3: Similarities and differences with MCP-1. *J. Immunol.* 152:3615-3622. 1994
- Standaert FE, Chew BP, Avila D, Reeves JJ. Presence of luteinizing hormone-releasing hormone binding sites by lymphocytes. *Biol. Reprod.* 46:997-1000. 1992
- Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, *et cols*. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature* 359: 76-79. 1992
- Swisshelm K, Ryan K, Tsuchiya K, Sager R. Enhanced expression of an insulin growth factor-like binding protein (mac25) in senescent human mammary epithelial cells and induced expression with retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 92:4472-4476. 1995
- Tabibzadeh S, Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Mol. Hum. Reprod.* 10:1579-1602. 1995

- Tabibzadeh S. Human endometrium: An active site of the cytokine production and action. *Endoc. Reviews.* 12:272-290. 1991
- Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature.* 393:591. 1998
- Taub DD, Oppenheim JJ. Chemokines, inflammation and the immune system. *Ther. Immunol.* 1:229-46. 1994
- Taylor H, Igarashi P, Olive D and Arici A. Sex steroids mediate Hoxa11 expression in the human peri-implantation endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84: 1129-1135. 1999
- Thie M, Harrach-Ruprecht B, Sauer H, Fuchs P, Albers A, Denker HW. Cell adhesion to the apical pole of epithelium: a function of cell polarity. *Eur J Cell Biol* 66: 180-191. 1995
- Trinchieri G. Biology of natural killers cells. *Adv. Immunol.* 47:187-376. 1989
- Valbuena D, Simón C. Etiopatogenia de la endometriosis. *Cuad. Med. Reprod.* 1:189-211. 1995
- Van Damme J, Proost P, Lenaerts J, Opdenakker G. Structural and functional identification of two human tumor-derived monocyte chemotactic protein (MCP-2 and MCP-1) belonging to the chemokine family. *J. Exp. Med.* 176:59-65. 1992
- Van Ewick W. T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu. Chem.* 9:591-615. 1991
- Vanrell JA. Esterilidad, subfertilidad e infertilidad: definición frecuencia y etiología. En Vanrell JA, Calaf J, Balash J, Viscasillas P, editores. *Fertilidad y esterilidad humanas.* Ed Masson-Salvat. Barcelona. 1992
- Wang J, Sherry B, Fivash M, Kelvin D, Oppenheim J. Human recombinant macrophage inflammatory protein-1 alpha and -beta and monocyte chemotactic and activating factor utilize common and unique receptors on human monocytes. *J. Immunol.* 150:3022-3029. 1993;
- Wiedermann CJ, Kowald E, Reinisch N, Bellman R, Schratzberger P, Kahler CM. Monocyte haptotaxis induced by the RANTES chemokine. *Curr. Biol.* 3-735-739. 1993
- Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, Armstrong EG, Nisula BC. Incidence of early loss of pregnancy. *N. Engl. J. Med.* 319: 189-194. 1988
- Yoshimura T, Yuhki N, Moore S. Human monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1): full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS. Lett.* 244:487-493. 1989;
- Yoshioka K, Matsuda F, Takakura K *et cols.* Determination of genes involved in the process of implantation: application of GeneChip to scan 6500 genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272: 531-538. 2000
- Zachariae F. Studies on the mechanism of ovulation. Permeability of the blood-liquor barrier. *Acta. Endocrinol.* 1958;27:339-342
- Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, Roberts JM, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J.Clin. Invest.* 91: 950-960. 1993
- Zini JM, Murray SC, Graham CH, Lala PK, Kariko K, Barnathan ES, Mazari A, Henkin J, Cines DB, McRae KR. Cytokines involvement in oocytes and early embryos. *Fertil. Steril.* 56: 265-272. 1991

Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*. 383:595. 1998