



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Bioquímica clínico-médica e inmunología.

TESIS DOCTORAL
“ESTUDIO PROTEÓMICO
DEL ENDOMETRIO HUMANO”

Autora:

Tamara Garrido Gómez

Licenciada en Biología

Directores:

Prof. Carlos Antonio Simón Vallés

Dr. Francisco Domínguez Hernández

Valencia 2012



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Prof. Carlos Antonio Simón Vallés, Catedrático de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Valencia y Director Científico del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI).

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“ESTUDIO PROTEÓMICO DEL ENDOMETRIO HUMANO”** ha sido realizado íntegramente por Dña. Tamara Garrido Gómez bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 29 de Febrero de 2012.

Fdo. Prof. Carlos Antonio Simón Valles



Dr. Francisco Domínguez Hernández, Doctor en Biología e Investigador de la Fundación IVI.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“ESTUDIO PROTEÓMICO DEL ENDOMETRIO HUMANO”** ha sido realizado íntegramente por Dña. Tamara Garrido Gómez bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 29 de Febrero de 2012.

Fdo. Dr. Francisco Domínguez Hernández

AGRADECIMIENTOS

En estas primeras líneas quiero intentar transmitir mi enorme agradecimiento (aunque sé que no van a ser suficiente para reflejar todo lo que me gustaría decir) a todas a aquellas personas que me rodean en los diferentes ámbitos de mi vida y que estando a mi lado de una manera u otra han contribuido a que salga adelante esta tesis.

En primer lugar mi director de tesis, el doctor Carlos Simón. Mi guía y punto de referencia, del que he aprendido y aprendo muchísimo día a día. Gracias por apoyarme, por la confianza que has depositado en mí desde el inicio y por dejar un espacio para que me desarrolle como investigadora.

A mi codirector Paco, sin tí esta aventura no hubiera sido lo mismo, una gran parte del mérito de esta tesis te la debo a tí. Eres mi gran compañero, amigo y una gran persona, de la que he aprendido muchísimo y no solo a nivel científico. Gracias por enseñarme a andar por estos mundos y sobre todo por seguir andando a mi lado día tras día.

A los doctores Pellicer y Remohí por permitir la realización de la tesis en los laboratorios de la Fundación IVI.

Gracias a aquellos miembros del IVI que han ayudado en la ejecución de este trabajo proporcionando muestras o apoyo técnico. A los proteómicos Juan Antonio y Emilio, que desde el CNIC me ha permitido formar en el mundo de las "ómicas". A Ana Conesa, por el toque bioinformático que permitió dar sentido a todos nuestros datos.

A todos mis compis del labo, Paco, Ali, Sebas, Claudia, Horten, Aymara, Isa, Leslie, Irene, Amparo, Carmen, Mercedes, Juanma, Felip, y a los recién incorporados Jose Vicente y Ana. Mi segunda familia, que adoro y han hecho que la realización de esta tesis sea algo fantástico. Gracias por vuestro cariño, ayuda, apoyo en el día a día, y sobre todo por vuestras risas y todo lo que hemos disfrutado juntos. Especialmente a mis chicas whatsapperas, gracias por vuestra espontaneidad, por quererme tanto y hacerme sentir tan feliz a vuestro lado.

Gracias a los que han estado con nosotros dejando una enorme huella y a los que deseo todo lo mejor, Carlos Estella, Isabel Galarza, Laura, Federica, Oscar, Paquillo, Josón, y especialmente mi gran amiga Patri, llenas mi vida con tu espiritualidad y amor. Gracias por todos los momentos, por tus sabios consejos y sobre todo por coexistir a mi lado.

A todos los miembros del grupo de investigación de Carlos Simón del CIPF con los que hemos compartido buenos momentos y a los que deseo mucha suerte. Gracias a: Diana, Maria Eugenia, Cristóbal, Amparo Galán, Anabel, Eva Gómez, Eva Sánchez, Sonia, Marcia, y Vero.

Desde otros departamentos pero tan cercanos a nuestro labo gracias a nuestro querido Jaime, a Marcos, Leo, Carmen, Mari carmen, Raquel y Loreto. Nuestros Igenómicos David y nuestra alegre María. Y a nuestros vecinos durante gran parte de esta tesis, y ahora aunque viven en el otro edificio pronto volveremos a estar juntitos, Ana, Julio, Pere, Jose Antonio, Vicente, Mila, Mariaje, y desde la distancia, nuestra turca Aylin. Y a nuestros recientes vecinos, amigos y compañeros del FISH con el que espero compartir muy buenos momentos.

Un hueco gigante es para mi gran amiga, compañera y confidente, Alicia. Sin ti nada hubiera sido posible, trabajar codo con codo es lo mejor que me ha podido pasar, te debo esta tesis y muchísimo más. Gracias por guiarme y apoyarme tanto en los buenos como en los malos momentos de mi vida. Solo por haber cruzado mi camino con el tuyo, vale la pena todo esto.

A mi cari por siempre, Claudia. Eres increíble, y conocerte ha sido sin duda lo mejor de mi etapa universitaria y nada podía hacerme más feliz que hacer esta tesis a tu lado. Gracias por tu amistad incondicional, por tu apoyo, por tu cariño, por quererme tanto y seguir a mi lado siempre.

A mis caris de la Uni, un pequeño gran grupo. Marta, Jessica y Claudia os adoro desde el día uno de universidad, hemos compartido todo y me hace muy feliz compartir también esta etapa. Gracias por estar siempre cercanas aunque haya distancia entre nosotras.

A mis amigos de la Uni, Montse, Borja, Carlos, Mari Carmen, Carles, Mariam y Jose. Cada uno me aportáis algo maravilloso y compartir con vosotros los buenos momentos como este, me hace estar tremendamente agradecida de haberos encontrado en este camino bioloco.

A Carlos, Marta, Quique y Amparo, mis amigos de siempre y por siempre, no tengo palabras para describir lo que me alegro de teneros siempre cerca, sois increíbles y os agradezco lo tantísimo que me queréis y apoyáis. A Teresa, gracias por compartir todo este camino juntas. Jaime, gracias por tu energía positiva con la que enriqueces mi vida desde que éramos nanos. A mi Noelia y Jose, agradezco muchísimo que las casualidades hayan juntado nuestras vidas y que ocupéis un hueco indispensable y tan especial. Y a tí

Noelia, te agradezco muchísimo que siempre estés ahí y que nos una esta amistad tan intensa. Finalmente, mis queridos Ali y Ruben, sois más que unos mejores amigos, gracias por todo lo que me daís y por los momentos increíbles que compartimos, como vuestros encantadores amigos Raúl y Vanessa y sobre todo a vuestro precioso Daniel. Os quiero a todos.

A toda mi familia, a la que me hace tan feliz y orgullosa pertenecer y que siempre ha valorado todo mi esfuerzo, animándome a seguir. En especial a mis tíos Paco, Manolo y Antonio, a los que agradezco muchísimo todo su apoyo. No me puedo olvidar de mis primos, sobre todo de mi prima Laura y Bea. Y quiero destacar muchísimo la enorme parte de mi corazón que siempre estará contigo, te quiero tía.

Quiero resaltar el enorme agradecimiento hacia mi abuela Carmela, te adoro. Tener una abuela como tú me hace ser la nieta más orgullosa del mundo. Te quiero muchísimo.

A mi familia adoptativa que me conoce desde que era una jovencita y habéis contribuido tantísimo a mi felicidad durante todo este tiempo. Gracias a todos, en especial a Salva y Marisol, Sole, Salvita y a la recién incorporada y que me alegro muchísimo de haber conocido y compartir tanto, Mari Angels. A Elda, Jose y Eldita, y destacando especialmente mi enorme agradecimiento a Rafa y Mari Carmen, mi cuñao Rafa y a Marisa.

También gracias a los que sin ser familia ocupáis un espacio muy importante en esta, Pili, Lumi, Nerea, Sheila, Aitor, Pablo y Bego.

A mi padre por el amor incondicional hacía tus tres chicas, por quererme tanto, protegerme, guiarme y servirme como ejemplo de superación y lucha durante toda mi vida. Te quiero.

A mi teta Naila, mi pequeña. Gracias por ser como eres, por esta relación tan maravillosa que compartimos, por tu ayuda, por hacerme sentir un modelo a seguir y sobre todo por quererme tanto. Vivir la vida sin una hermana como tú no sería lo mismo. Te quiero.

A mi madre, no sé como agradecerte todo lo que has hecho y haces por mí siempre, desde el esfuerzo enorme al tenerme hasta los increíbles valores que me has transmitido como el esfuerzo, el cariño, la superación, el respeto... Me encanta ser un reflejo tuyo porque te admiro y te quiero con locura.

Y para finalizar, por encima de todo quiero destacar a la persona que ilumina todos los días de mi vida desde hace 12 añazos, mi cari PABLO. Gracias por comprenderme, ayudarme, mimarme, protegerme y sobre todo por amarme como lo haces. Eres el pilar fundamental de mi vida y sin ti no podría conseguir todo esto. No tengo palabras para expresar la felicidad que me aporta compartir nuestras vidas. Te quiero. Gracias, gracias y más gracias.

Gracias a todos.

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en los laboratorios de la Fundación IVI, gracias a la infraestructura del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) y a la beca de Formación de Personal Universitario concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AP2007-04066).

SIGLAS, ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS

ADN: **Á**cido **D**esoxiribo**N**ucleico

AMPc: **A**denosine **M**ono**P**hosphate cyclic (Adenosín Monofosfato cíclico)

ARN: **Á**cido **R**ibo**N**ucleico

ARNm: **Á**cido **R**ibo**N**ucleico **m**ensajero

ARNi: **Á**cido **R**ibo**N**ucleico **i**nterferencia

BRCA1: **B**Reast **C**Ancer 1 (Cáncer de mama 1)

BSA: **B**ovine **S**erum **A**lbumin (albúmina de suero bovino)

CCL7 y CCL23: Chemokine (**C-C** motif) ligand **7** y **23** (Ligando 7 y 23 de quimoquinas)

CCR1 y CCR2: Chemokine (**C-C** motif) **R**eceptor 1 y 2 (Receptor de quimoquina 1 y 2)

CD80: Cluster of **D**ifferentiation 80 (Grupo de diferenciación)

CHAPS: 3-[(3-Colamidopropil) dimetil**A**monio]-1-**P**ropano**S**ulfonato

CID: **C**ollision **I**nduced **D**ecomposition (descomposición inducida por colisión)

COX-2: **C**iclo**O**xigenasa-2

2-DE: **T**wo- **D**imensional **E**lectrophoresis (Electroforesis bidimensional)

2D-DIGE: **B**i**D**imensional-**D**iferential **I**n **G**el **E**lectrophoresis (electroforésis bidimensional diferencial en gel)

DEPC: **D**i**E**til **P**iro**C**arbonato

DIU: **D**ispositivo **I**ntra**U**terino

DMEM: **D**ulbecco's **M**odified **E**agle's **M**edium (Medio de cultivo)

dNTP: **D**eoxyribo**N**ucleotide **T**ri**P**hosphate (Dexoxiribonucleótido trifosfato)

DTT: **D**i**T**io**T**reitol

E2: Estradiol 2 (beta estradiol)

ELISA: **E**nzyme-**L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima)

EMEM: **E**agle's **M**inimal **E**ssential **M**edium (Medio de cultivo)

ESC: **E**ndometrial **S**tromal **C**ell (Célula estromales endometriales)

ESI: **E**lectro**S**pray **I**onization (ionización mediante electronebulización)

ESR1: **E**Stradiol **R**eceptor 1

ESR2: **E**Stradiol **R**eceptor 2

F-ACTINA: **F**ilamentosa-**A**ctina

FRAT1: **F**requently **R**earranged in **A**dvanced **T**-cell lymphomas (frecuentemente reorganizado en linfomas avanzados de células T)

FT: **F**actor **T**ranscripción

G-ACTINA: **G**lobular-**A**ctina

GAP: **G**TPasas **A**ctiving **P**roteins (proteínas activadoras de GTPasas)

GAPDH: **G**lycer**A**ldheyde-3 **P**hosphate **D**e**H**ydrogenase (Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa)

GDI: **G**uanine **D**issociation **I**nhibitor (Inhibidor de la disociación de guanina)

GDP: **G**uanosine **D**i**P**hosphate (Guanosín Difosfato)

GEF: **G**uanin **E**xchange **F**actor (factor de intercambio de guanina)

GFP: **G**reen **F**luorescence **P**rotein (Proteína verde fluorescente)

G-LISA: Small **G** protein- **L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay (Ensayo inmunoabsorbente ligado a protein G)

GST: **G**lutation **S** **T**ransferasa

GTP: **G**uanosine **T**ri**P**hosphate (Guanosín Trifosfato)

GTPasas: **G**uanosine **T**ri**P**hosphatase (Guanosín Trifosfatasa)

hCG: **h**uman **C**horionic **G**onadotrophin (gonadotropina coriónica humana)

HEC-1-A: **H**uman **E**ndometrial **C**ancer-1-**A**denocarcinome (Cáncer endometrial humano tipo adenocarcinoma)

hEEC: **h**uman **E**ndometrial **E**pithelial **C**ells (Células endometriales epiteliales humanas)

HOXA10: **H**omeobox **A**10

HPLC: **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography (Cromatografía líquida de alto rendimiento)

HRP: **H**orser**R**adish **P**eroxidase (Peroxidasa de rábano)

HUVEC: **H**uman **U**mbilical **V**ein **E**ndothelial **C**ells (Células endoteliales de cordón umbilical humano)

ICAT: **I**sotope-**C**oded **A**ffinity **T**ags (marcaje isotópico diferencial)

IGFBP-1: **I**nsulin-like **G**rowth **F**actor-**B**inding **P**rotein-1 (Proteína 1 de unión al factor de crecimiento similar a insulina)

IL-1, IL-6, IL-10, IL-21: **InterLeuquina-1, -6, -10 y -21**

IL1R-II: **Receptor-II** de la **InterLeuquina-1**

IMC: **Índice de Masa Corporal**

IPG: **Inmobilized PH Gradient** (gradiente de pH inmovilizado)

LH: **Luteinizing Hormone** (Hormona luteinizante)

LIF: **Leucemia Inhibitor Factor** (Factor inhibidor de leucemia)

MALDI: **Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization** (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz)

MALDI-TOF/TOF: **Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight/ Time Of Flight** (espectrometría de masas en tándem)

MCP-1: **Monocyte Chemoattractant Protein-1** (Proteína quimioatrayente de monocito)

MEC: **Matriz ExtraCelular**

Min: **Minuto**

MMLV: **Moloney- Murine Leucemia Virus** (Virus de la leucemia murina)

MMP2, MMP3 y MMP14: **Matriz MetaloProteinasas 2, 3 y 14**

MPIF-1: **Myeloid Progenitor Inhibitory Factor-1** (Factor 1 inhibidor del progenitor mielóide)

MS: **Mass Spectrometry** (Espectrometría de masas)

MS/MS: **Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry** (Espectrometría de masas en tándem)

MUC1: **Mucina 1**

N: **Número de muestras**

NFKB1: **Nuclear Factor-Kappa-B** (Factor nuclear *kappa B*)

NgR1: **Nogo-66 Receptor 1**

NL: **No Lineal**

NKu: **Natural Killer uterine** (Asesina natural uterina)

NMDA: **N-Metil-D-Aspartato**

NR4A: **Nuclear Receptor subtype 4A** (Receptor nuclear subtipo 4A)

P: **Progesterona**

2D-PAGE: **2 Dimensional- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis** (Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida)

PBS: **Phosphate Buffered Saline** (tampon fosfato salino)

PC6: **Pro**teína **Con**vertasa 6

PCR: **P**olymerase **C**hain **R**eaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

PECAM-1: **P**latelet **E**ndothelial **C**ell **A**dhesion **M**olecule- 1 (Molécula de adhesión de células de plaquetas endoteliales)

PGR: **Pro**Gesterone **R**eceptor (receptor de progesterona)

pI: **p**unto **I**soeléctrico

PMSG: **P**regnant **M**are **S**erum **G**onadotropin (Gonadotropina sérica de yegua preñada)

PVDF: Polifluoruro de Vinilideno ()

Rac1: **R**as-related **C**3 botulinum toxin substrate **1** (substrato 1 de la toxina botulínica C3 relacionada con Ras)

RANTES: **R**egulated upon **A**ctivation, **N**ormal **T**-cell **E**xpressed, and **S**ecreted (Células T expresión y secreción tras su activación regulada)

RBD: **R**ho **B**inding **D**omain (Dominio de unión a Rho)

ROCK: **Rh**O-associated, **C**oiled-coil **K**inase (quinasa asociada a Rho)

rpm: revoluciones **por** **min**uto

RT: **R**everse **T**ranscription (Transcripción reversa)

RT-PCR: **R**everse **T**ime- **P**olymerase **C**hain **R**eaction (Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real)

SDS: **S**odium **D**odecyl **S**ulfate (dodecilsulfato sódico)

SDS-PAGE: **S**odium **D**odecyl **S**ulfate-**P**oly**A**crylamide **G**el **E**lectrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

SELDI: **S**urface **E**nhanced **L**aser **D**esorption **I**onization (Superficie de ionización/desorción inducida por láser)

SEM: **S**tandard **E**rror **M**edia (error estándar de la media)

Ser: **S**erina

SM22: **S**mooth **M**uscle 22 (proteína 22 músculo liso)

TIMP1: **T**issue **I**nhibitor of **M**etallo**P**roteinases (Inhibidor de metaloproteinasas en tejido)

TMB: **T**etra**M**etil**B**enzidina

TOF: **T**ime **O**f **F**light (Tiempo de vuelo)

TOF/TOF: **T**ime **O**f **F**light (Tiempo de vuelo en tandem)

UI: **Unidades Internacionales**

WA: **Witaferina A**

WOI: **Window Of Implantation** (Ventana de implantación)

ANGLICISMOS:

Fold change (FC): tasa de cambio.

Forward: secuencia del primer 5'-3' que se une en la cadena que va en dirección 3'-5' del ADN.

In vivo: En el cuerpo. Conjunto de experimentos y de fenómenos observados que se efectúan directamente sobre el organismo vivo.

In vitro: Conjunto de fenómenos observados en el laboratorio, investigando y manipulando fuera del organismo vivo.

Microarray de proteínas: micro matriz. Matriz bidimensional de soporte sólido en las que están unidos anticuerpos que detectan específicamente determinadas proteínas.

Pull-down: ensayo de unión de proteínas mediante soporte (por ejemplo bolas de sefarosa).

Reverse: secuencia del primer 3'-5' que se une en la cadena que va dirección 5'-3' del ADN.

Software: programa informático.

Spot: cada uno de los puntos de luz del *microarray* que se corresponde a la medida de expresión de una proteína. También se llama *spot* a cada una de las manchas que aparece en un gel de poliacrilamida.

Window of implantation (WOI): ventana de implantación. Días del ciclo menstrual en los que el endometrio posee un fenotipo receptivo que le permite que el blastocisto implante.

Upstream: Flujo ascendente referido a una ruta biológica.

Wild-Type: tipo silvestre

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El endometrio	3
1.1.1 Definición	3
1.1.2 Anatomía	3
1.1.3 Ciclo menstrual	9
1.2 Receptividad endometrial	11
1.2.1 Definición	11
1.2.2 Marcadores de receptividad endometrial	12
1.3 Implantación embrionaria	16
1.3.1 Fase de aposición	18
1.3.2 Fase de adhesión	19
1.3.3 Fase de invasión	21
1.4 El proceso de deciduización	22
1.5 Annexin A2, RhoA y el citoesqueleto de actina	24
1.5.1 Annexin A2	24
1.5.2 RhoA	27
1.5.3 Citoesqueleto de actina	30
1.6 Proteómica del endometrio	34
1.6.1 Metodologías de separación	37
1.6.2 Técnicas analíticas: espectrometría de masas	40
1.6.3 Bioinformática	41
1.6.4 <i>Arrays</i> de proteínas	42
2. HIPÓTESIS	47
3. OBJETIVOS	51
3.1 Objetivos generales	53
3.2 Objetivos específicos	53

4. MATERIAL Y MÉTODOS	55
4.1 Muestras biológicas	57
4.1.1 Criterios de inclusión	57
4.1.2 Obtención de las muestras	60
4.1.3 Separación de la fracción estromal y epitelial	60
4.1.4 Decidualización <i>in vitro</i>	62
4.2 Líneas celulares	63
4.3 Estudio proteómico	64
4.3.1 Preparación de las muestras	64
4.3.2 Separación por 2D-DIGE	65
4.3.3 Adquisición de imágenes y análisis	67
4.3.4 Digestión del gel con tripsina	68
4.3.5 Espectrometría de masas	69
4.3.6 Bases de datos	70
4.4 Análisis de secretómica: Array de proteínas	71
4.5 Bioinformática	72
4.6 Tratamientos para Anexina A2 y RhoA	75
4.6.1 Inhibición de Annexin A2	75
4.6.2 Activación/inactivación de RhoA	76
4.7 Ensayo de adhesión en cocultivo	77
4.7.1 Obtención de los embriones de ratón	77
4.7.2 Cultivo de los esferoides JEG-3	78
4.7.3 Ensayos de adhesión	79
4.8 Ensayo de expansión de trofoblasto	79
4.9 Ensayo migración/proliferación celular: "Cierre del surco"	80
4.10 PCR cuantitativa	81
4.10.1 Aislamiento de ARN	81
4.10.2 Retrotranscripción	82
4.10.3 RT-PCR	83
4.11 Análisis de proteínas	85
4.11.1 Extracción de proteínas	85

4.11.2 Cuantificación	85
4.11.3 Western blot	86
4.12 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	88
4.13 Análisis ELISA	89
4.14 Ensayo de medir actividad de RhoA: Pull-down y G-LISA	90
4.14.1 Ensayo Pull-down de RhoA-GTP	90
4.14.2 Detección de RhoA activo por G-LISA	91
4.15 Ensayo para medir F-actin/G-actin <i>in vivo</i>	92
4.16 Estadística	93
5. RESULTADOS	95
5.1. Proteómica receptividad endometrial	97
5.1.1. Análisis proteómico del endometrio receptivo comparado con pre-receptivo mediante DIGE e identificación por MALDI-MS	97
5.1.2. Validación análisis proteómico del endometrio receptivo comparado con el pre-receptivo mediante DIGE e identificación por MALDI-MS	103
5.1.3. Inmunolocalización de estatmina 1 y anexina A2 en el endometria pre-receptivo y receptivo	105
5.1.4. Modelo de endometrio humano refractario para testar la relevancia funcional de estatmina 1 y anexina A2	106
5.2. Proteómica del proceso de decidualización	108
5.2.1. Evaluación de la decidualización <i>in vitro</i>	108
5.2.2. Análisis proteómico de las células decidualizadas respecto a las control	110
5.2.3. Validación de la tecnología proteómica por western blot	113
5.2.4. Análisis secretómico de las células decidualizadas respecto a las control	114
5.2.5. Validación del análisis secretómico mediante ELISA	116
5.2.6. Generación del interactoma de la decidualización	118
5.3. Análisis de Anexina A2 y RhoA en la receptividad endometrial	121
5.3.1. Análisis de Anexina A2 en el endometrio humano total a lo largo del ciclo menstrual	121

5.3.2. Efecto de la inhibición de ANXA2 endometrial sobre adhesividad_____	124
5.3.3. Estudio del fenómeno de expansión del trofoblasto cuando ANXA2 es inhibida_____	127
5.3.4. Análisis de la migración/proliferación de las células epiteliales endometriales (hEEC) tras inhibir ANXA2_____	129
5.3.5. Efecto de inhibir ANXA2 sobre la proteína RhoA_____	131
5.3.6. Efecto de inactivar RhoA sobre los niveles de ANXA2_____	132
5.3.7. Análisis de RhoA en el endometrio humano total a lo largo del ciclo menstrual_____	133
5.3.8. Efecto de la activación/inactivación de RhoA sobre la capacidad de adhesión de embriones sobre las células HEC-1-A_____	136
5.3.9. Función de ANXA2 y RhoA en la regulación de la adhesividad de las células hEEC al embrión_____	139
5.3.10. Regulación de la reorganización de las fibras de F-actina del citoesqueleto por ANXA2 y RhoA_____	141
6. DISCUSIÓN_____	145
7. CONCLUSIONES_____	171
8. BIBLIOGRAFÍA_____	175
9. ANEXOS_____	199

1. INTRODUCCION

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El endometrio

1.1.1. Definición

El endometrio humano es la mucosa que tapiza la cavidad uterina. Es un órgano especializado que se regula hormonalmente sufriendo una serie de cambios periódicos que son la base del ciclo menstrual, exclusivo de seres humanos y primates superiores. El endometrio se ha considerado tradicionalmente como la membrana de un receptáculo inerte que constituye la parte pasiva del proceso de gestación. Sin embargo, el endometrio es un órgano activo y dinámico entre cuyas funciones básicas se encuentra la de desarrollar temporalmente un estado en el que se permite la adhesión del blastocisto después de la fecundación, para posibilitar la implantación. Este tejido además, permite que se produzca la posterior invasión controlada del trofoblasto que dará lugar a la placentación, que resulta imprescindible para el desarrollo fetal en los mamíferos. Es, por tanto, un tejido clave en la vida reproductiva de la mujer (Simón y Valbuena, 1999; Simón y cols., 2009).

1.1.2. Anatomía

El endometrio humano se encuentra constituido por los compartimentos epitelial, estromal y vascular, con la existencia, además, de una población de células inmunes residentes. Todo ello se distribuye en dos regiones denominadas *funcionalis* y *basalis*. La *funcionalis* se transforma y regenera cada mes durante la menstruación, mientras que la *basalis* permanece formando la base para regenerar cíclicamente la capa *funcionalis* (Fig. 1).

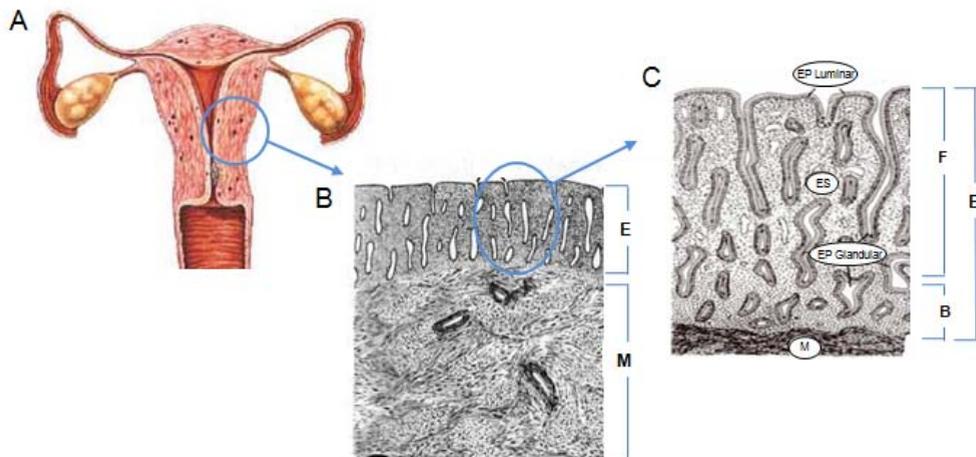


Figura 1. Endometrio Humano. (A) Localización del endometrio en la cavidad uterina. (B) Esquema histológico del endometrio dentro del contexto del útero. E: endometrio; M: miometrio. (C) Detalle del esquema histológico del endometrio. EP Luminal: Epitelio endometrial luminal; EP Glandular: Epitelio endometrial glandular; ES: estroma endometrial; B: capa *basalis*; F: capa *funcionalis* (Simón, 2009).

Compartimento epitelial

El epitelio endometrial es una monocapa de células cuboidales polarizadas que tapizan el interior de la cavidad uterina. Está constituido por un componente luminal y otro glandular (Martín y cols., 2002). Esta monocapa, como el resto de las mucosas, actúa como barrera para proporcionar protección contra los patógenos que logran acceder hasta la cavidad endometrial, pero también debe permitir la adhesión del embrión humano que es, en esencia, la función primordial del endometrio.

El epitelio endometrial está regulado por las hormonas esteroideas ováricas que, directamente o a través del estroma (Cooke y cols., 1995),

inducen cambios morfológicos y bioquímicos cíclicos. Estos cambios ayudan a preparar el microambiente adecuado para la adhesión del embrión, dónde el epitelio actúa también como primer mediador del diálogo entre el embrión y el endometrio materno (Simón y cols., 1998).

La morfología del epitelio luminal varía según la fase del ciclo menstrual, inducido por un programa transcripcional específico (Horcajadas y cols., 2008), en un proceso denominado “transformación de la membrana plasmática” (Murphy y cols., 1994). Estos cambios estructurales incluyen modificaciones en la membrana plasmática (Murphy y cols., 1994; 1995) y la disrupción del citoesqueleto (Martin y cols., 2000). Además, se produce un remodelado de la polarización epitelial para preparar el polo apical para la adhesión embrionaria (Thie y cols., 1995). Existen evidencias que muestran la enorme relevancia de la interacción entre la membrana y el citoesqueleto en el desarrollo del estado de receptividad endometrial (Hitt y cols., 1994; Thie y cols., 1997; Murphy y cols., 1995).

La célula epitelial, en respuesta a los estrógenos, desarrolla unas microvellosidades largas y unas cortas uniones estrechas en la membrana lateral más apical. El cinturón de actina es prominente y los desmosomas son comparativamente más numerosos. Durante la fase secretora, los *microvillis* disminuyen y las protuberancias apicales se hacen más prominentes en el lumen uterino (Fig. 2). Mediante microscopía electrónica de barrido se observan unas proyecciones ectoplásmicas denominadas pinópodos (Martel y cols., 1981; Murphy, 2000) que parecen actuar en la modulación del ambiente uterino, absorbiendo por endocitosis de forma activa líquido endometrial (Fig. 3). Estas estructuras se consideran marcadores morfológicos de la receptividad endometrial (Nikas y Makrigiannakis., 2003).

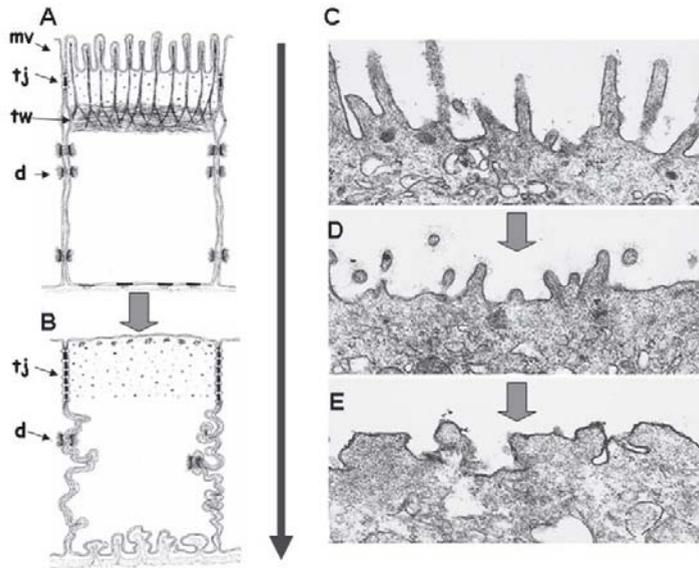


Figura 2. Transformación de la membrana plasmática del epitelio endometrial. Diagrama (A, B) y Microscopía Electrónica de Transmisión (Transmission Electron Microscopy, TEM) (C, D, E). Parte izquierda: se muestra el esquema de la transformación de la membrana plasmática y del citoesqueleto, de la situación no receptiva (A) a la receptiva (B). Parte derecha: observamos el proceso de cambio en la superficie de la membrana plasmática, desde la situación no receptiva (C) a la receptiva (E), mostrándose la transición (D) (Murphy, 2004). Microvellosidades (mv); uniones estrechas (tj); cinturón de actina (tw); desmosomas (d).

El epitelio también forma glándulas endometriales, las cuales proliferan durante la fase secretora temprana formando estructuras largas y sinuosas, que van aumentando a medida que la fase secretora avanza. La función del epitelio glandular es la producción y secreción de moléculas necesarias para la nutrición e implantación del blastocisto.

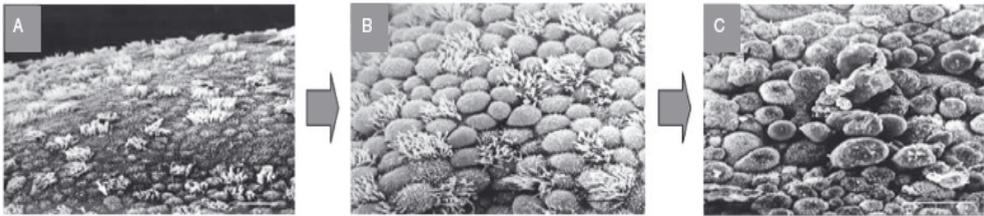


Figura. 3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) del epitelio endometrial durante la ventana de implantación. (A) LH+2 donde las células ciliadas simples están separadas por células epiteliales con superficies lisas y no hay pinópodos aún. (B) LH+5, la superficie endometrial presenta células recubiertas por pinópodos, entre las que se intercalan células ciliadas simples. (C) LH+7, algunos pinópodos están en pleno desarrollo con superficie lisa arrugada, otros están en desarrollo con superficie lisa.

Compartimento estromal

El estroma endometrial es un tejido conectivo compuesto por células y matriz extracelular (MEC). El tipo celular que compone mayoritariamente el estroma es el fibroblasto, y está implicado en la remodelación de la matriz extracelular a lo largo del ciclo menstrual. Esta remodelación ocurre principalmente en la fase lútea mediante el proceso de decidualización. Se denomina así a una serie de cambios morfológicos, bioquímicos y génicos de los fibroblastos en respuesta a la exposición a los estrógenos y progesterona. Dichos cambios van dirigidos a regular la implantación mediante el control de la invasión del trofoblasto en el útero materno. Este proceso lo trataremos en profundidad posteriormente.

Compartimento vascular

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vascularización preexistente (Folkam y Shing, 1992; Klagsburn y

Moses, 1999). En los tejidos adultos, este proceso fisiológico tiene lugar solamente durante los mecanismos de cicatrización en heridas y fracturas. Sin embargo, el aparato reproductor femenino es una excepción debido a su comportamiento cíclico. La angiogénesis se induce durante el desarrollo del folículo ovárico hasta la formación del cuerpo lúteo, en el desarrollo endometrial, en la implantación y placentación durante la gestación, así como en el tejido mamario durante la lactancia (Findlay, 1986; Augustin, 2000). La arquitectura vascular intrauterina está compuesta por una intrincada red que comienza en el miometrio. Además, el crecimiento vascular inapropiado está asociado con estados patológicos como el crecimiento de tumores, algunas retinopatías, endometriosis, hemangiomas, fibrosis y artritis reumatoide (Klagsburn y D'Amore, 1991; Augustin, 2000).

Células inmunes residentes

El endometrio humano contiene células del sistema inmunológico que son relevantes para la fisiología endometrial, especialmente en la regulación de la respuesta inmune local. La población leucocitaria encontrada en el endometrio normal supone entre un 10-15% de la población celular del estroma, fluctúa cíclicamente y es máxima en la fase secretora tardía y premenstrual (Bulmer y Johnson, 1985). El conjunto de células inmunes residentes está formado fundamentalmente por células *natural killer* uterinas (NKu), macrófagos y linfocitos T. Su función primordial es la de proteger el tracto genital frente a infecciones y evitar el rechazo inmunológico durante la implantación embrionaria.

1.1.3. El ciclo menstrual

El ciclo menstrual es exclusivo de primates, el resto de mamíferos poseen un ciclo estral que se caracteriza por la reabsorción de su endometrio. En cambio, durante el ciclo menstrual, el endometrio es destruido y expulsado en lo que conocemos como menstruación (Jolivet y Gautray, 1978; Jabbour y cols., 2006). El endometrio humano posee un ciclo menstrual, cuyo aspecto cíclico es debido a la exposición periódica de ambas hormonas esteroideas ováricas, los estrógenos y la progesterona (Critchey y cols., 2000).

El ciclo menstrual se divide en dos fases: proliferativa y secretora (Fig. 4). En la fase proliferativa el endometrio pasa de un grosor de 2 hasta 12 milímetros que puede llegar a alcanzar en la fase secretora. En la fase proliferativa dominan los estrógenos, que regulan la proliferación de las células endometriales y su vascularización (Critchey y cols., 2000). Por el contrario, en la fase secretora, aparece la progesterona, aunque también siguen existiendo niveles elevados de estrógenos. Los progestágenos contrarrestan esas acciones proliferativas de los estrógenos por varias vías. Una de estas vías es la reducción del nivel de sus receptores, otra el aumento de la tasa del metabolismo del estradiol (E2) a compuestos inactivos (estrona y metabolitos sulfatados), y otra es la interferencia en sus acciones transcripcionales (Strauss III y Gurpide, 1993). Por ello, en la fase secretora los componentes celulares sufren diferenciación, produciéndose la secreción glandular. La fase secretora se divide a su vez en secretora temprana, media y tardía.

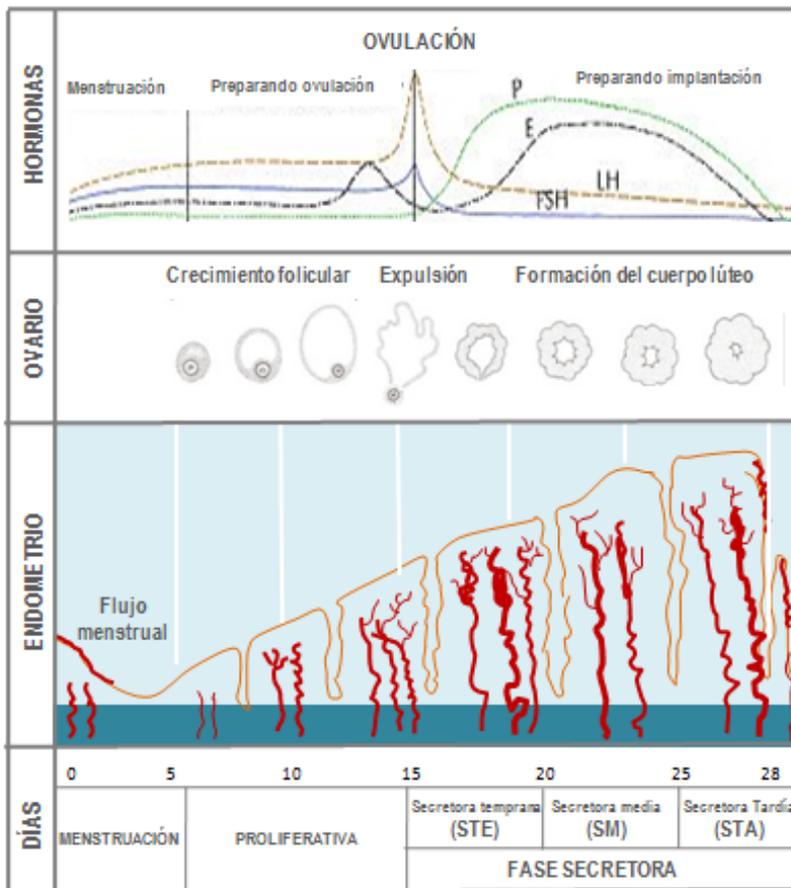


Figura 4. Ciclo menstrual y ovárico. En la parte superior de esta figura se muestran los niveles hormonales que acoplan el ciclo ovárico con el ciclo menstrual (P, progesterona; E, estradiol; LH, hormona luteinizante; FSH, hormona folículo estimulante). En la parte intermedia se pueden observar los cambios que suceden en el ciclo ovárico en función de los niveles hormonales. En la zona inferior se indican los cambios que acontecen en el endometrio en cuanto al grosor, desarrollo glandular y vascular. En la parte de debajo del endometrio se marcan los días del ciclo y se muestran las fases del ciclo menstrual: proliferativa y secretora, dentro de la cual podemos distinguir un periodo secretor temprano (STE), medio (SM), y tardía (STA) que culmina con la menstruación.

El ciclo menstrual y el ciclo ovárico se encuentran acoplados por la acción cíclica de las hormonas esteroideas (Fig. 4). De modo que, atendiendo a las fases del ciclo ovárico, la fase proliferativa del endometrio se corresponde con la folicular ovárica, y la fase secretora del endometrio con la lútea.

1.2. Receptividad endometrial

1.2.1. Definición

En humanos así como en otros mamíferos, el endometrio humano no es adhesivo al embrión en la mayor parte del ciclo menstrual. Conocemos como receptividad endometrial al proceso biológico en el que, de forma única y exclusiva, es posible la adhesión del blastocisto al endometrio (Finn y Martin, 1974). La receptividad endometrial se produce con cada ciclo menstrual, independientemente de que haya posibilidad de implantación. Dicha receptividad acontece durante un periodo concreto de tiempo de la fase secretora media que es conocido como ventana de implantación (Wilcox y cols., 1999). Esta ventana en humanos se abre entorno al día 19 y se cierra en el 21 de un ciclo menstrual ideal (Bergh y Navot, 1992; Psychoyos, 1993).

En torno al día 13 del ciclo se produce un pico de la hormona luteinizante (LH) y 36 horas después ocurre la ovulación (Fig. 4). De este modo, se denomina día LH 0 al día en que se produce el pico, y siguiendo con esta nomenclatura, el endometrio pre-receptivo correspondería al intervalo de LH+1 a LH+5 (días 14 al 18 del ciclo menstrual); el endometrio receptivo, correspondiente a la ventana de implantación, al intervalo de LH+6 a LH+8

(días 19 al 21 del ciclo); y el endometrio post-receptivo al intervalo de LH+9 a LH+13 (días 22 al 26 del ciclo).

Durante este periodo se producen una serie de cambios que se materializan a nivel histológico, celular y molecular, de modo que el endometrio adopta un fenotipo receptivo. Las células endometriales epiteliales experimentan una serie de cambios morfológicos y bioquímicos conocidos como “transformación de la membrana plasmática” (Murphy y Shaw, 1994), en el que se originan cambios estructurales que modifican dicha membrana celular (Murphy y Shaw, 1994; Murphy, 2004) y el citoesqueleto (Murphy, 1995; Thie y cols., 1995; Martin y cols., 2002). La zona apical de la membrana plasmática desarrolla propiedades adhesivas, aparecen microvillis largos que se transforman poco a poco en proyecciones aplanadas (Murphy, 2000). Estos cambios ocurren junto con cambios en el compartimento estromal (Irwin y cols., 1989) y la vasculatura endometrial.

1.2.2. Marcadores de receptividad endometrial

Los marcadores de receptividad endometrial son aquellos parámetros que nos permiten caracterizar a un endometrio como receptivo (Achache y Revel, 2006). Es por ello que los marcadores pueden ser utilizados para datar el endometrio en fase receptiva y evaluar el estatus de receptividad endometrial.

Existen distintos tipos de marcadores atendiendo al nivel de estudio en el que se obtiene información. De este modo, se habla de marcadores de receptividad endometrial morfológicos cuando es la morfología la que nos informa; de marcadores de receptividad moleculares clásicos cuando son las moléculas de forma aislada las que nos caracterizan el endometrio; y de

marcadores moleculares “ómicos” cuando son las moléculas en su conjunto las que nos permiten caracterizar dicho proceso biológico (Aghajanova y cols., 2008a).

Marcadores morfológicos

Los cambios cíclicos en la morfología del tejido endometrial han sido descritos mediante la observación por microscopía óptica de cortes histológicos de endometrio. Durante la fase lútea del ciclo natural pueden observarse cambios morfológicos en el endometrio que, día a día, permiten su dataje. Actualmente la anatomía patológica rutinaria data el endometrio según los criterios de Noyes que fueron obtenidos a partir de 8.000 biopsias de endometrio de pacientes estériles (Noyes y cols., 1950 y 1975). Los criterios de Noyes consideran ocho características histológicas básicas del endometrio: grado de mitosis glandular, pseudoestratificación de los núcleos, vacuolas basales, secreción, edema del estroma, reacción pseudodecidual, mitosis del estroma e infiltración leucocitaria (Noyes y cols., 1950 y 1975). La precisión del dataje endometrial depende de múltiples factores. Estos factores son el método de determinación del día de la ovulación; el momento de toma de la biopsia; el estado de la biopsia; las técnicas de fijación y la interpretación del patólogo.

Se han intentado buscar otros marcadores morfológicos que permitan determinar el estado receptivo tal como, la presencia de proyecciones ectoplásmicas, denominadas pinópodos. 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 periodo de receptividad uterina (Nikas, 1999). Una limitación

de su uso como marcador es que se ha visto que los pinópodos permanecen en el endometrio post-receptivo no siendo representativos únicamente del estatus de receptividad (Quinn y Casper., 2009).

Marcadores moleculares clásicos

Existen multitud de publicaciones en las que se documenta la expresión de determinadas moléculas en el endometrio humano en los distintos compartimentos celulares y durante las diferentes fases del ciclo menstrual (Aghajanova y cols., 2008b), tales como las integrinas (Lessey y cols., 1992), la mucina MUC1 (Meseguer y cols., 1998), calcitonina (Kumar y cols., 1998), LIF (Stewart, 1992), COX-2 (Davis y cols., 1999) y HOXA10 (Taylor y cols., 1999). Como consecuencia de estos estudios, se han intentado aplicar como marcadores bioquímicos de la receptividad endometrial pero no siempre han dado resultados concluyentes. De hecho, aunque ha habido intentos para proponerlos como métodos de diagnóstico, su uso nunca se ha consolidado.

Marcadores moleculares “ómicos”

Con la secuenciación del genoma humano y el desarrollo de nuevas tecnologías, se han desarrollado lo que se ha denominado ciencias “ómicas” (Quackenbush, 2006a). Esto ha supuesto un cambio drástico en el enfoque de las investigaciones, ya que se ha pasado del análisis molécula a molécula a estudiar todo el conjunto de genes/proteínas de un organismo en sólo un experimento. El patrón transcriptómico ha sido investigado en múltiples estudios empleando técnicas basadas en la tecnología de los *microarrays* para examinar los niveles de expresión de mRNAs en las diferentes fases del ciclo menstrual del endometrio (Tabla 1). Todos estos estudios han demostrado la

existencia de diferentes patrones de expresión génica según la fase del ciclo menstrual (Horcajadas y cols., 2007). Estos hallazgos abren la posibilidad de clasificar el estado molecular del endometrio según la firma transcriptómica (Haouzi y cols., 2009; Aghajanova, 2008; Tapia y cols., 2011), en un intento de sustituir el empleo de otros marcadores morfológicos o bioquímicos cuya efectividad ha sido cuestionada (Horcajadas y cols., 2004; Martín y cols., 2002; Coutifaris y cols., 2004).

Proceso estudiado	Microarray	Compañía	Número de genes	Estudio
Decidualización	Clontech	Atlas array Stanford University	588	Popovici <i>et al.</i> (2000)
Decidualización	Incyte human GEM-V	Incye Genomics	6918	Brar <i>et al.</i> (2001)
Cáncer Endometrial	Hu6800	Affymetrix	6000	Mutter <i>et al.</i> (2001)
WOI	HG-U95A	Affymetrix	12686	Carson <i>et al.</i> (2002)
Endometriosis	Human gene genefilter GF211	Research Genetics	4133	Eyster <i>et al.</i> (2002)
WOI	HG-U95A	Affymetrix	12686	Kao <i>et al.</i> (2002)
Endometriosis	Atlas human cDNA expression Array	Clontech	597	Lebovic <i>et al.</i> (2002)
Endometriosis	Home-made	University of Tokio	23040	Arimoto <i>et al.</i> (2003)
WOI	HG-U95A-E	Affymetrix	>60000	Borthwick <i>et al.</i> (2003)
RU486	Home-made	University of Cambridge	~1000	Catalano <i>et al.</i> (2003)
WOI	Human cytokine expression array	R&D Systems	375	Domínguez <i>et al.</i> (2003)
Endometriosis	HG-U95A	Affymetrix	12686	Kao <i>et al.</i> (2003)
Cáncer Endometrial	Oncochip	CNIO	6386	Moreno-Bueno <i>et al.</i>
Efecto progesterona	Human Chip 1K set 1	Takara Shuzo	1000	Okada <i>et al.</i> (2003)
WOI	HG-U95A	Affymetrix	12686	Riesewijk <i>et al.</i> (2003)
Cáncer Endometrial	Home-made	National Cancer Institute	9984	Risinger <i>et al.</i> (2003)
Decidualization	HG-U95A	Affymetrix	12686	Tierney <i>et al.</i> (2003)
Cáncer Endometrial	GEMarray clones	Incye Genomics	18098	Cao <i>et al.</i> (2004)
Cáncer Endometrial	HG-U133A	Affymetrix	>22000	Ferguson <i>et al.</i> (2004)
Endometriosis	Atlas human 1.2 cDNA expression array	Clontech	1172	Matsuzaki <i>et al.</i> (2004)
Ciclos estimulados	HG-U95Av2	Affymetrix	12686	Mirkin <i>et al.</i> (2004)
Ciclo menstrual	Home-made	Peter MacCallum Cancer Institute	1000	Ponnampalam <i>et al.</i>
Cáncer Endometrial	Home-made	University of Cambridge	1056	Saidi <i>et al.</i> (2004)
Modelos in vitro	1-cDNA Array	Agilent	12814	Barbier <i>et al.</i> (2005)
Cáncer Endometrial	HG-U133A	Affymetrix	>22000	Ferguson <i>et al.</i> (2005)
Ciclos estimulados	HG-U133A	Affymetrix	>22000	Horcajadas <i>et al.</i> (2005)
Modelos in vitro	HG-U133A 2.0	Affymetrix	14500	Krikun <i>et al.</i> (2005)
Endometriosis	Atlas human 1.2 cDNA expression array	Clontech	1176	Matsuzaki <i>et al.</i> (2005)
Cáncer Endometrial	HG-U133A – U133B	Affymetrix	>22 000	Maxwell <i>et al.</i> (2005)
WOI	HG-U95Av2	Affymetrix	12686	Mirkin <i>et al.</i> (2005)
Ciclo menstrual	HG-U133A	Affymetrix	>22000	Punyadeera <i>et al.</i> (2005)
Modelos in vitro	Home-made	University of Cambridge	>15000	Rossi <i>et al.</i> (2005)
RU486	Home-made	University of Cambridge	>15000	Sharkey <i>et al.</i> (2005)
Ciclos estimulados	HG-U133A	Affymetrix	>22000	Simón <i>et al.</i> (2005)
Ciclo menstrual	HG-U133 Plus 2.0	Affymetrix	> 47000	Talbi <i>et al.</i> (2005)
Modelos in vitro	Home-made	University of Cambridge	>15000	White <i>et al.</i> (2005)
Fase proliferativa	BD Atlas nylon cDNA expression array	BD Biosciences Clontech	588	Yanahara <i>et al.</i> (2005)
Cáncer Endometrial	Human Unigen1	Incye Genomics	9600	Gielen <i>et al.</i> (2006)
Endometriosis	HG-U133 Plus 2.0	Affymetrix	> 47000	Hever <i>et al.</i> (2006)
DIU	Home-made	University of Cambridge	>16000	Horcajadas <i>et al.</i> (2006)
Modelos in vitro	HG-U133 Plus 2.0	Affymetrix	> 47000	Huang <i>et al.</i> (2006)
Cáncer Endometrial	UniGEM V cDNA microarray	Incye Genomics	7800	Matsumura <i>et al.</i> (2006)
Modelos in vitro	HG-U133 Plus 2.0	Affymetrix	> 47000	Sarno <i>et al.</i> (2006)
Endometriosis	Home-made	Medical College of Wisconsin	9600	Wu <i>et al.</i> (2006)
Cáncer Endometrial	HG-U133A – U133B	Affymetrix	>22000	Dainty <i>et al.</i> (2007)
Endometriosis	CodeLink Whole Human Genome	GE-Amersham Biosciences	45674	Eyster <i>et al.</i> (2007)
WOI	Home-made	University of Cambridge	>16000	Feroze-Zaidi <i>et al.</i>
Modelos in vitro	HG-U133 Plus 2.0	Affymetrix	> 47000	Gielen <i>et al.</i> (2007)
Endometriosis	Atlas human 1.2 Array	Clontech	1176	Mettler <i>et al.</i> (2007)
Endometriosis	miRNA Bioarray	Ambion	287	Pan <i>et al.</i> (2007)
Cáncer Endometrial	35K Human oligo microarray	Norwegian Microarray Consortium	24650	Paulssen <i>et al.</i> (2007)
Endometriosis	HG-U133A 2.0	Affymetrix	14500	Van Langendonck <i>et al.</i>
Cáncer Endometrial	HG-U133 Plus 2.0	Affymetrix	> 47000	Wong <i>et al.</i> (2007)
Embarazo	HG-U133A 2.0	Affymetrix	14500	Bersinger <i>et al.</i> (2008)
Ciclo menstrual	Sentrix Human Illumina 6V1 Expression	Illumina	> 47000	Cloke <i>et al.</i> (2008)

Proceso estudiado	Microarray	Compañía	Número de genes	Estudio
Embarazo	HG-U133 Plus 2.0	Affymetrix	> 47000	Evans <i>et al.</i> (2008)
Señalización	HG-U133 Plus 2.0	Affymetrix	> 47000	Gielen <i>et al.</i> (2008)
Cáncer Endometrial	Cancer profiling array	Clontech	241	Hamm <i>et al.</i> (2008)
Ciclos estimulados	HG-U133A	Affymetrix	> 22000	Horcajadas <i>et al.</i>
Decidualización	HG-U133 Plus 2.0	Affymetrix	> 47000	Horne <i>et al.</i> (2008)
Endometriosis	HG-U95Av2	Affymetrix	12686	Hull <i>et al.</i> (2008)
Ciclos estimulados	HG-U133A	Affymetrix	> 22000	Liu <i>et al.</i> (2008)
Ciclo menstrual	HG-U133 Plus 2.0	Affymetrix	> 47000	Lu <i>et al.</i> (2008)
Ciclo menstrual	HG-U133 Plus 2.0	Affymetrix	> 47000	Macklon <i>et al.</i> (2008)
Embarazo	HG-U133 Plus 2.0	Affymetrix	> 47000	Savaris <i>et al.</i> (2008)
Endometriosis	Home-made	University of Cambridge	22000	Sherwin <i>et al.</i> (2008)
WOI	Home-made	National Cancer Institute	9128	Tapia <i>et al.</i> (2008)
Ciclos estimulados	HG-U133 Plus 2.0	Affymetrix	> 47000	Zhou <i>et al.</i> (2008)
Ciclo menstrual	HG-U133A	Affymetrix	> 22000	Ball <i>et al.</i> (2009)
Efectos paracrinos	Home-made	University of Cambridge	>15000	Germeyer <i>et al.</i> (2005)
WOI	HG-U133 Plus 2.0	Affymetrix	> 47000	Haouzi <i>et al.</i> (2009)
Ciclos estimulados	HG-U133 Plus 2.0	Affymetrix	> 47000	Van Vaerenbergh <i>et al.</i>
Adenomiosis	HG-U133 Plus 2.0	Affymetrix	> 47000	Chen <i>et al.</i> (2010)
WOI	Whole Human Genome Oligo Microarray	Agilent	> 40000	Labarta <i>et al.</i> (2011)

Tabla 1. Estudios de transcriptómica realizados en el endometrio humano. Toda la información génica se encuentra disponible en la base de datos: <http://www.endometrialdatabase.com>.

Otras tecnologías “ómicas” tales como la Proteómica, que estudia la colección de proteínas y su expresión, o la Metabólica, que estudia todos aquellos metabolitos no incluidos en la categoría de genes, ARNm o proteínas, han comenzado a ser empleadas con el fin de identificar marcadores del proceso de receptividad endometrial.

1.3. Implantación embrionaria

La implantación del embrión en el útero comienza entre el sexto y séptimo día después de la fecundación del óvulo por el espermatozoide y se extiende hasta 14 días después de la fecundación en un ciclo natural. Este proceso es clave en el establecimiento de un embarazo exitoso. En la especie humana, en condiciones naturales sólo el 35% de los embriones consiguen implantar, es decir, fisiológicamente sólo 1/3 de los ciclos considerados fértiles acaban en embarazo. Las causas de esta baja tasa de éxito se comparten entre el

embrión (ya que *in vivo* el 30% de los blastocistos son morfológicamente anómalos) y un diálogo defectuoso entre el embrión y el endometrio materno, que se puede objetivar por la existencia de un 30% de pérdidas gestacionales precoces antes del momento de la menstruación. Este porcentaje de pérdidas es aún mayor en pacientes sometidas a tratamientos de reproducción asistida (Simón y cols., 1999). Se comprobó que en fecundación *in vitro* (FIV) y donación de ovocitos las pérdidas embrionarias precoces suponían un 43% y 38%, respectivamente (Simón y cols., 1999). Lo que supone que la alteración endometrial propia de los tratamientos farmacológicos utilizados, junto con la mayor incidencia de alteraciones cromosómicas embrionarias altera el diálogo inicial entre embrión y endometrio.

La implantación embrionaria no es un hecho puntual, sino que se trata de un proceso que consta de tres fases consecutivas y diferenciadas. En la fase de aposición, el blastocisto se orienta hacia una zona determinada de la superficie luminal de la cavidad endometrial donde posteriormente se fijará. En la fase de adhesión, el trofoectodermo del blastocisto contacta directamente con el epitelio endometrial y, en la invasión, el embrión induce la rotura de la membrana epitelial y penetra en el estroma endometrial decidualizado (Fig. 5). 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. De hecho, el proceso de implantación embrionaria presenta muchas similitudes con el proceso de migración leucocitaria (Domínguez y cols., 2005), ya que el leucocito en su migración a través del endotelio presenta unas fases similares a las del embrión cuando atraviesa el epitelio endometrial e incluso comparten la funcionalidad de determinados grupos de moléculas como integrinas, selectinas y tetraspaninas (Domínguez y cols., 2005).

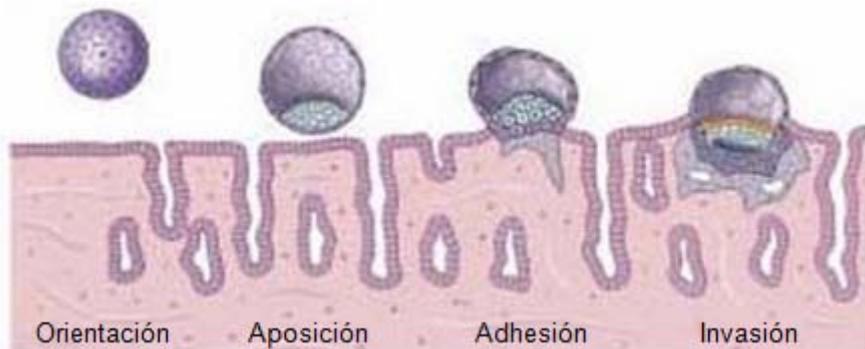


Figura 5. Esquema de las diferentes fases del proceso de implantación. En primer lugar el embrión se orienta, se aposiciona, se adhiere al epitelio luminal y finalmente experimenta un proceso de invasión a través del estroma endometrial.

1.3.1. Fase de aposición

La fase de aposición u orientación es la menos estudiada y tiene lugar entre los días 5 y 6 postovulación, cuando el blastocisto tiene un tamaño aproximado de 100 μm 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 seres humanos, es el *fundus* uterino y el tercio superior de la cara posterior uterina. 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, también se posiciona en un lugar específico según la especie. En nuestra especie, se encuentra en la región donde el trofoblasto se vuelve invasor, al contrario que ocurre en roedores.

La salida del embrión de la zona pelúcida o “eclosión”, es un requisito necesario para la implantación. El embrión es capaz de salir de la zona pelúcida *in vitro* (o fuera del endometrio) en lugares ectópicos, lo que indica que no necesita la interacción con el endometrio para este proceso. Sin embargo, cabe destacar que en condiciones *in vitro*, la salida de la zona pelúcida se retrasa al menos un 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. Se desconoce todavía cómo el blastocisto llega a su lugar final de implantación, pero se cree que puede estar relacionado con la presencia de receptores de quimoquinas en su superficie como el CCR2 (receptor de MCP-1) o CCR5 (receptor de RANTES) (Domínguez y cols., 2003) y puesto que el endometrio secreta multitud de quimoquinas en el momento de la implantación (Paria y cols., 2002), se piensa que el blastocisto podría ser atraído por estas quimoquinas hacia el sitio de implantación (Domínguez y cols., 2005).

1.3.2. Fase de adhesión

En el proceso de implantación, la fase de adhesión es el resultado de los cambios morfológicos y moleculares en la superficie del trofoblasto y del endometrio. Es particularmente interesante porque están implicadas la unión de dos organismos que son genética e inmunológicamente distintos, concretamente de las superficies apicales de sus epitelios (endometrial y trofoectodermo) (Enders, 1994). Dicha adhesión está mediada por la inducción esteroidea (Aplin, 1997) y/o embrionaria (Simón y cols., 1998) de moléculas de adhesión en la superficie celular del epitelio luminal durante la ventana de implantación.

Las moléculas de adhesión implicadas en la adhesión célula-célula y en la adhesión célula-matriz extracelular son cruciales para la unión del blastocisto al endometrio materno. Así pues, estas primeras interacciones que mencionábamos anteriormente podrían venir seguidas de eventos de adhesión mediados por integrinas, cadherinas y selectinas (Domínguez y cols., 2005; Genbacev, 2003). La expresión de las cadherinas y selectinas también ha sido descrita en el epitelio endometrial y en el trofoblasto (MacMalman y cols., 1996). Una de las selectinas descritas como fundamentales para el proceso de implantación es la L-selectina. La existencia de sus ligandos en el endometrio ha sido demostrada, así como la existencia de L-selectina en células trofoblásticas del embrión humano (Genbacev, 2003). Entre las moléculas de adhesión más relevantes en el proceso de implantación se encuentran las integrinas implicadas en la fase de adhesión, como la integrina $\beta 3$, cuya expresión se ve reducida en mujeres infértiles (Lessey y cols., 1994; González y cols., 2000). Además, el blastocisto es capaz de aumentar selectivamente la expresión de esta molécula a través del sistema de la IL-1 (Simón y cols., 1994).

Existen modelos *in vitro* ampliamente extendidos para estudiar la base molecular de las interacciones iniciales entre el trofoblasto y el epitelio endometrial durante la adhesión embrionaria. Estos ensayos consisten en el co-cultivo de una monocapa celular confluyente de células epiteliales endometriales humanas con embriones, ya bien sean humanos, de ratón (en un modelo heterólogo), o con esferoides de la línea celular trofoblástica humana JEG-3. La adhesión se mide mediante un ensayo mecánico y aquellos embriones flotantes son clasificados como no adheridos mientras que los no flotantes se consideran adheridos (Shiotani y cols., 1993).

1.3.3. Fase de invasión

El siguiente paso es la penetración del blastocisto a través del epitelio endometrial y la invasión del estroma por parte del trofoblasto. En la especie humana, el blastocisto se adhiere a la capa del epitelio endometrial comenzando un proceso llamado expansión del trofoblasto que es inducido por una reacción apoptótica paracrina mediada por el sistema Fas-Fas ligando (Galán y cols., 2000) que permite al blastocisto atravesar la barrera epitelial. Posteriormente, 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 inician un proceso de cierre mediante migración/proliferación celular con el fin de sellar la superficie epitelial (Aplin, 2007). Este mecanismo es clave para proteger al endometrio de la entrada de patógenos, así como para que comience la invasión a través del estroma y tenga lugar una placentación adecuada.

En la especie humana, la placentación es hemocorial, para ello el trofoblasto invadirá el estroma y formará las vellosidades coriales en contacto con las lagunas de sangre maternas, garantizándose la supervivencia fetal. Este proceso necesita una regulación muy precisa para prevenir posibles invasiones patológicas por exceso, como ocurre en los casos de placenta ácreta o, por defecto, como es el caso de la preeclampsia. El control de este proceso invasivo es mediado por diversas proteasas que degradan matriz extracelular (MEC), entre ellas las serinproteasas, metaloproteasas y colagenasas.

1.4. El proceso de decidualización

La decidualización es un proceso que experimenta el estroma endometrial durante la fase secretora media, inmediatamente después del cierre de la ventana de implantación (King, 2000). Se trata de un proceso esencial para controlar la invasión del trofoblasto y la formación de la placenta de forma coordinada. Defectos en este proceso están relacionados con complicaciones del embarazo, incluyendo aborto, preeclampsia, restricción del crecimiento fetal y parto prematuro. A diferencia de los roedores, en humanos la reacción decidual ocurre independientemente de la presencia de un blastocisto en la cavidad uterina.

Dicho proceso comprende cambios morfogénicos, bioquímicos y modificaciones vasculares iniciadas por la presencia de progesterona (P) seguido de un pico de estrógeno (E2) (Ramathal y cols., 2010). Estudios previos han establecido que la P juega un papel central en regular la decidualización (Lydon, 1995), el papel del E2 en este proceso parece más secundario. Un estudio mostró que la administración de P de forma aislada a ratones ovariectomizados induce la respuesta decidual, indicando que no es necesaria la presencia de E2 para regular este proceso (Paria y cols., 1998). No obstante otros estudios han demostrado que la administración de un antagonista del receptor de E2, severamente dificulta la formación del tejido decidual en ratón, concluyendo que el E2 actuando vía su receptor regula este proceso (Curtis y Korach., 2000).

Morfológicamente, las células experimentan una transformación desde una estructura fibroblástica alargada a células redondeadas y de mayor tamaño con modificaciones ultraestructurales específicas (Fig. 6). Estos cambios son

acompañados con la secreción de proteínas específicas de forma local, tales como prolactina, IGFBP-1 (proteína-1 de unión al factor de crecimiento similar a insulina), relaxina y factor de tejido celular (Goldsmith y cols., 1993; Daly y cols., 1983; Giudice y cols., 1992; Lockwood y cols., 2009), además de moléculas de matriz extracelular como laminina, colágeno tipo IV, fibronectina y proteoglicano heparin sulfato (Dunn y cols., 2003; Tabanelli y cols., 1992; Irwin y cols., 1991) (Fig. 7). El inicio de este proceso tiene lugar en las células estromales que rodean las terminaciones de las arterias espirales.

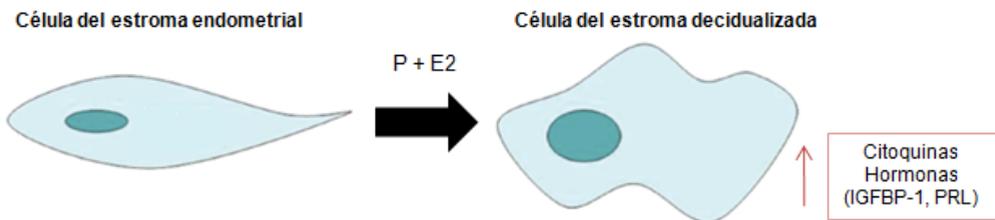


Figura 6. Esquema de la transformación decidual de los fibroblastos endometriales. La célula del estroma endometrial fibroblástica experimenta un cambio morfológico y un incremento en la secreción de citoquinas y hormonas tales como IGFBP-1 y PRL, por acción de progesterona (P) y estradiol (E2).

La mayor parte del conocimiento sobre los mecanismos de regulación de la decidualización humana ha sido generado a partir de los sistemas modelo *in vitro*. La exposición de los cultivos de células estromales endometriales ESC (*Endometrial Stromal Cells*) a progesterona durante 7-9 días, sola o en combinación con E2, induce el aumento de expresión de marcadores deciduales (Simón y cols., 1994; Irwin y cols., 1989; Gellersen y Brosens., 2003), así como un cambio morfológico observable. Esta respuesta es mediada por un aumento gradual de los niveles intracelulares de AMPc, el cual también es empleado

como estímulo no-hormonal de la decidualización (Tang y cols., 1993; Brar y cols., 1997).

Estudios de microarrays con ESC decidualizadas han mostrado una regulación de muchos genes asociados fundamentalmente con la matriz extracelular y la integridad del tejido, lo que sugiere que estos cambios son característicos de este proceso (Popovici y cols., 2000; Brar y cols., 2001). La regulación génica es solo una parte de la compleja regulación que permite a las células responder a estos estímulos, tanto a nivel intracelular y como extracelular. Existen trabajos recientes que usan las tecnologías proteómicas para entender la decidualización mediante modelos *in vitro* (Oh y cols., 2008). En estos trabajos, se detectaron seis picos mediante chips de proteínas H4 y CM10 con una expresión diferencial entre células ESC no decidualizadas y decidualizadas inducidas con 8-Br-cAMP (Oh y cols., 2008). Trabajos como el citado anteriormente no resultaron muy informativos para mejorar el conocimiento de este proceso biológico. Por ello, un análisis proteómico más amplio es necesario para entender los mecanismos implicados en el proceso de decidualización.

1.5. Anexina A2, RhoA y el citoesqueleto de actina

1.5.1. Anexina A2

Las anexinas son una familia de proteínas caracterizadas por su capacidad para unirse a las membranas biológicas en presencia del ión calcio. Las anexinas humanas pertenecen a la subfamilia A de las anexinas de los vertebrados, habiéndose identificado hasta el momento 12 miembros. Se

designan con el símbolo ANX seguido de un subfijo que indica el número de anexina, designada de la A1 a la A11 y luego la A13, pues no hay anexina A12 (Morgan y cols., 1999). Desde el punto de vista estructural se caracterizan por un núcleo formado por cuatro dominios repetitivos homólogos de 68-69 aminoácidos cada uno altamente conservados, precedido de una secuencia amino-terminal única (Gerke y Moss, 2002) (Fig. 7). Las diversas funciones de los miembros de la familia vienen conferidas por las divergencias en la secuencia del núcleo central y por el dominio amino-terminal único.

Las anexinas se han implicado en un amplio espectro de procesos celulares y moleculares, que incluyen la transducción de señales a través de la tirosina quinasa, el mantenimiento de la integridad del citoesqueleto y la matriz extracelular, procesos de exocitosis y endocitosis, el crecimiento y la diferenciación tisulares, la inflamación y la coagulación sanguínea (Gerke y Moss, 2002). Aunque *in vitro* se les han asignado una gran variedad de funciones, todavía se desconoce cuál es el papel fisiológico concreto de cada anexina.

Anexina A2 (ANXA2), proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio, ha sido asociada con los filamentos de actina, participando en el mantenimiento de la dinámica de las interacciones membrana-membrana y membrana-citoesqueleto (Hayes y cols., 2006). ANXA2, reclutada en los sitios de unión de actina a la membrana celular, es capaz de unirse a actina globular (G-actina) o filamentosa (F-actina) inhibiendo la elongación de los filamentos a nivel de los extremos terminales (Filipenko y Waisman, 2001; Rescher y Gerke, 2004). Por lo tanto, esta proteína ha sido ligada a procesos donde se produce un remodelado de la actina a nivel de las membranas celulares, tal y como ocurre durante el reclutamiento de ciertos receptores de membrana o durante la

formación de los tallos de actina en los macropinosomas móviles (Merrifield y cols., 2001; Oliferenko y cols., 1999). Estas funciones se encuentran probablemente ligadas a la organización dinámica de los microdominios de membrana ricos en colesterol donde ANXA2 puede ser reclutada mediante interacción directa con fosfatidilinosil (4,5)-bifosfato (Hayes y cols., 2006; Rescher y cols., 2004).

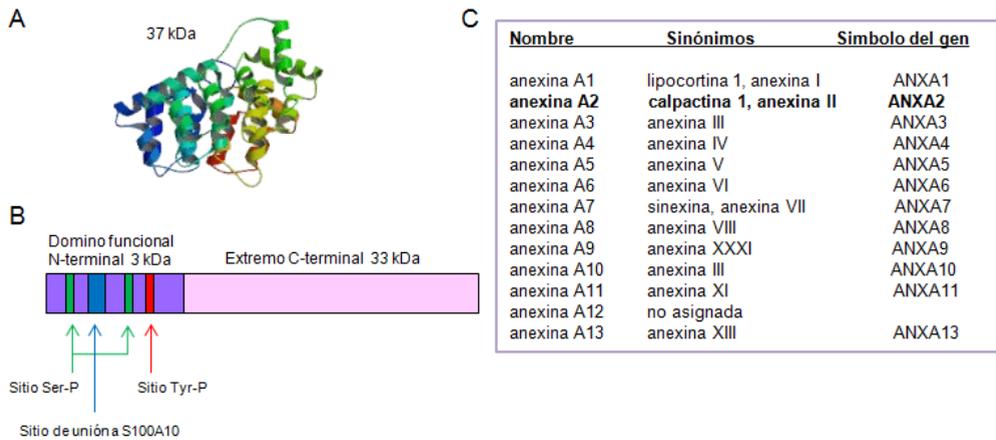


Figura 7. Anexina A2. (A) Estructura tridimensional de la proteína anexina A2. (B) Esquema de la estructura primaria formada por un extremo N-terminal donde se localizan los sitios de fosforilación y de unión a otras proteínas, y su extremo C-terminal que es altamente conservado en las diferentes anexinas. (C) Tabla donde se recogen las diferentes anexinas que constituyen la familia.

Un estudio reciente ha demostrado que ANXA2 es fosforilada a partir de la acción tirosin quinasa del receptor de la insulina y se haya ligado a un reordenamiento en la actina, implicados en cambios que se producen a nivel de adhesión celular (Rescher y cols., 2008). ANXA2 mediante la regulación del citoesqueleto de actina, también se encuentra implicada en la regulación de la

migración celular (Hansen y cols., 2002). Existen estudios que han sugerido que esta proteína afecta a la motilidad celular, mediante el trabajo con líneas celulares de carcinoma (Balch y Dedman., 1997; Barwe y cols., 2005). Otros estudios sugieren que la ANXA2 superficial regula la migración a través de interacciones con proteínas de la matriz extracelular tipo tenascina C (Chung y cols., 1996; Matsuda y cols., 1999). Además, se observó que al inhibir ANXA2 en células epiteliales Caco-2 se producen reducciones significativas en la migración celular asociados con una disminución en la formación de filamentos de actina en la base de estas células (Babbin y cols., 2007).

1.5.2. RhoA

Las proteínas Rho son miembros de una gran familia de pequeñas proteínas de unión al GTP que comparten aproximadamente el 30% de homología en la secuencia con la proteína Ras. Las proteínas GTPasas pueden encontrarse en dos conformaciones: unidas a GTP o a GDP, el estado unido a GTP es el activo y el capaz de realizar una función determinada o de señalar hacia una ruta concreta. La proteína tiene capacidad GTPásica, es decir, de hidrolizar el GTP a GDP, quedando en este caso en estado inactivo. La unión a cada tipo de guanínucleótido o la actividad GTPásica están modulados por otras proteínas reguladoras (Fig. 8), que se pueden clasificar en GEFs (*guanine-nucleotide-exchange-factors*), que promueven el intercambio de GDP por GTP, estabilizan la forma unida a este último y activan, por tanto, a la GTPasa; GAPs (*GTPase-activating proteins*), que estimulan la actividad GTPásica intrínseca de la proteína, de forma que ésta hidroliza su GTP a GDP y queda inactiva; y GDIs (*guaninenucleotide-dissociation-inhibitors*), que al impedir la separación de la proteína de la molécula de GDP, estabilizan su forma inactiva. Las GTPasas tipo Ras se anclan en la membrana mediante un grupo farnesilo o isoprenilo que se

añade posttraduccionalmente por enzimas prenil- o farnesil-transferasas. Las proteínas GDIs, además de estabilizar la forma unida a GDP de la GTPasa, son capaces de extraerla de la membrana en la que se encuentra anclada mediante unión con el grupo isoprenoide C-terminal, con lo que la GTPasa, separada de su lugar de acción, queda inactivada (LaMarche y Hall, 1994; Feig, 1994; Chant y Stowers, 1995; Gooser y cols., 1997).

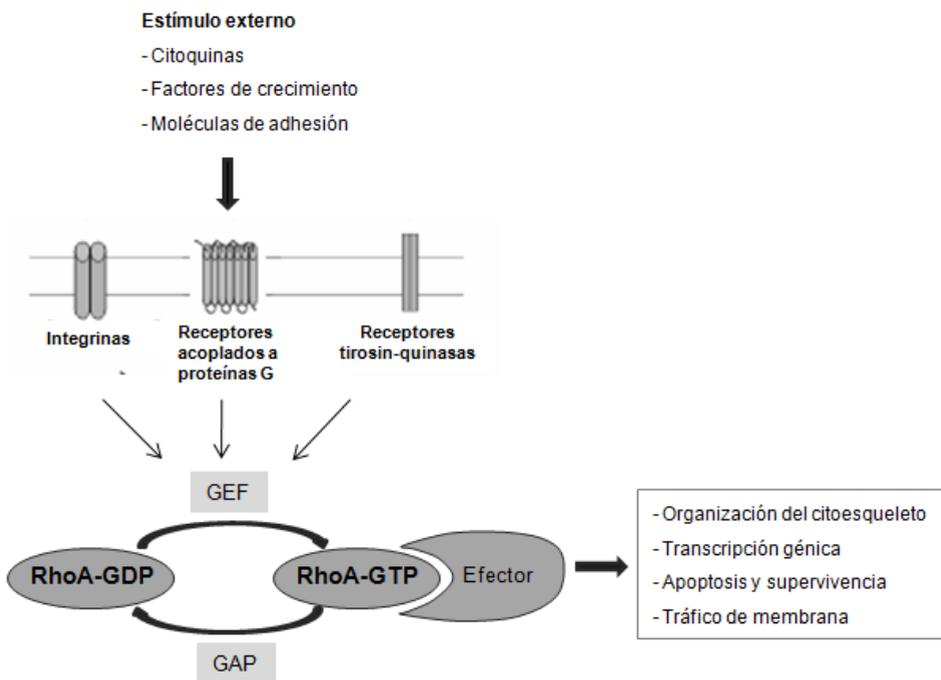


Figura 8. Modelo de regulación de Rho GTPasas. Las proteínas RhoA actúan como transductores de señales, respondiendo a una gran variedad de estímulos externos a través de la activación de diferentes receptores de membrana. Están regulados por GEFs (factor intercambiador de guanin nucleótidos) y GAP (proteínas activadoras de la actividad GTPasa). RhoA unido a GDP constituye la forma inactiva, mientras que, Rho unido a GTP constituye la conformación activa que es capaz de unirse a diversos efectores celulares, regulando así variadas funciones celulares.

Existen moléculas que actúan a través de diferentes receptores, tales como NgR1, LINGO1, p75, TROY provocando la estimulación de RhoA. RhoA activa a ROCK (quinasa RhoA) la cuál estimula a quinasa LIM, que activa a su vez a cofilina, la efectora que actúa reorganizando el citoesqueleto de actina (Kiss y cols., 1997). Los miembros de la familia Rho y sus efectores se han descrito controlando procesos tan variados como la proliferación, migración, adhesión, motilidad celular, los cambios morfológicos, la apoptosis, el transporte de vesículas o el transporte núcleo-citoplasma (Boguski y McCormick, 1993; Hall, 1990; Ridley y Hall, 1992). Estas funciones desarrolladas en las células se encuentran primariamente relacionadas con la regulación de la organización del citoesqueleto. Estudios han demostrado una participación indirecta, a través de factores asociados, en la fosforilación de la miosina y en respuesta al estrés celular, tales como la formación de adhesiones focales y fibras de estrés de actina (Fujita y cols., 1992). También se ha demostrado la existencia de una relación directa con elongación de la cadena de miosina, reorganización de los filamentos de actina y la determinación de la forma celular (Zhang y cols., 1998).

Existen trabajos donde se describe que las Rho GTPasas se encuentran implicadas en cascadas de señalización locales que regulan los primeros pasos del proceso de implantación a nivel de la adhesión (Heneweer y cols., 2002) y la migración celular del trofoblasto (Shiokawa y cols., 2002). Además las Rho GTPasas regulan la invasión del embrión humano sobre el estroma endometrial (Grewal y cols., 2008) a través de la modulación de la dinámica de la actina, miosina y los microtúbulos (Ettiene-Manneville y Hall, 2002). Resulta muy interesante destacar la existencia de trabajos donde se relaciona la ruta de acción de RhoA/ROCK con la expresión de ANXA2, ambos regulando cambios que tienen lugar a nivel del citoesqueleto de actina que se asocia con el control

de la adhesión celular (Rescher y cols., 2008; Babbin y cols., 2007; Babiychuk y cols., 2002).

1.5.3. El citoesqueleto de actina

El citoesqueleto es una red tridimensional de filamentos que contribuye a la integridad de la célula. Define la forma y arquitectura celular, permite el movimiento y transporte intracelular, media procesos de endocitosis y exocitosis, participa activamente en la mitosis y en los procesos de modulación de receptores de superficie, favorece la organización funcional por compartimentos, participa en los procesos de interacciones intercelulares y regula procesos de adhesión, migración y motilidad celular (Small y cols., 1999; Badley y cols., 1980; Wehrle-Haller y Imhof, 2003; Moustakas y cols., 1998).

El citoesqueleto está compuesto por 3 tipos principales de estructuras: microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos (Fig. 9).

Microtúbulos

Los microtúbulos son estructuras tubulares de 25 nm de diámetro que se originan en los centros organizadores de microtúbulos y que se extienden a lo largo de todo el citoplasma. Se hallan en las células eucariotas y están formados por la polimerización de un dímero de dos proteínas globulares, la alfa y la beta tubulina. Cada microtúbulo está compuesto de 13 protofilamentos formados por los dímeros de tubulina. Se pueden polimerizar y despolimerizar según las necesidades de la célula. Intervienen en diversos procesos celulares que involucran desplazamiento de vesículas de secreción, movimiento de orgánulos, transporte intracelular de sustancias, así como en la división celular

(mitosis y meiosis), ya que forman el huso mitótico. Además, constituyen la estructura interna de los cilios y los flagelos. Los microtúbulos son más flexibles pero más duros que la actina.

Filamentos intermedios

Son filamentos que tienen entre 8 a 11 nm y están constituidos por diferentes proteínas, dependiendo del tipo celular donde se encuentren: citoqueratina, vimentina, neurofilamentos, desmina y la proteína fibrilar ácida de la glia. Son los componentes del citoesqueleto más estables, ya que dan soporte a los orgánulos a través de sus fuertes enlaces, y heterogéneos. Su función principal es la organización de la estructura tridimensional interna de la célula, por ejemplo, forman parte de la envuelta nuclear y de los sarcómeros. También participan en algunas uniones intercelulares, formando los desmosomas.

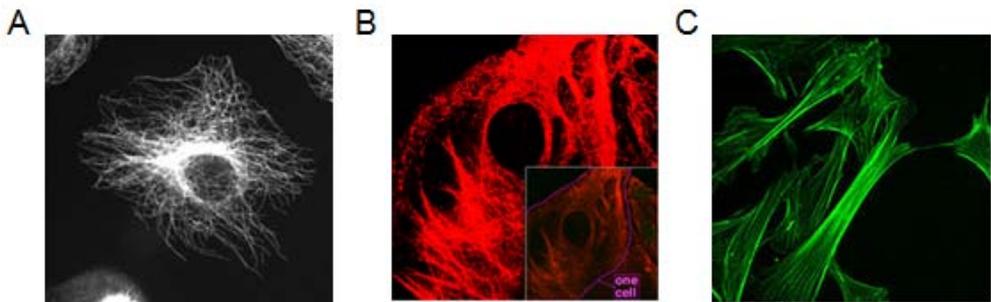


Figura 9. Inmunofluorescencia mostrando la ubicación y disposición de los elementos que constituyen el citoesqueleto de una célula eucariota. (A) Microtúbulos. (B) Filamentos de queratina. (C) Microfilamentos de actina.

Microfilamentos

Los microfilamentos tienen un diámetro de unos 5 ó 7 nanómetros y están formadas por polímeros de actina que junto con un gran número de proteínas asociadas y proteínas de unión a la actina constituyen el citoesqueleto de actina. La actina puede presentarse en dos formas, por un lado la actina no polimerizada en forma globular (G-actina) que se encuentra asociada a la profilina para evitar su polimerización. Esta forma representa aproximadamente la mitad de la actina de la célula y es utilizada para la polimerización de microfilamentos cuando es necesario. Y por otro lado, la actina polimerizada en forma filamentosa (F- actina), se trata de una doble hélice dextrógira de dos hebras de actina no polimerizada. Esta actina se puede encontrar asociada a otras proteínas, tal como estructurales, que permiten la unión de los filamentos de actina; o a proteínas reguladoras, siendo la más importante la miosina que permite la contracción muscular al permitir que la actina se desplace sobre ella.

Los monómeros de G-actina se polimerizan en un proceso dependiente de ATP, para formar el polímero de F-actina. Los microfilamentos son estructuras altamente dinámicas, cuyo ensamblaje está regulado a múltiples niveles, incluida la organización monomérica de la actina dentro del polímero y la superorganización de los polímeros de actina en una red de filamentos. Un gran número de proteínas de unión a la actina regulan el ensamblaje y controlan la formación de los filamentos y el entrecruzamiento de la red de actina. Las funciones de estas proteínas son moduladas por moléculas señalizadoras como el calcio o los fosfoinosítidos fosforilados (Schmit y Hall, 1998; Janmey, 1994; Martín, 1998).

Los filamentos de actina poseen gran importancia en todos los procesos de migración y adhesión celular (Badley y cols., 1980; Wehrle-Haller y Imhof, 2003). También juegan un papel importante en la división celular, pues forman el anillo de contracción que permite el estrangulamiento celular durante la citocinesis (Schmidt, 1980). Otra función importante tiene lugar en el tejido muscular, donde los filamentos de actina se hayan asociados a proteínas motoras denominadas "miosinas", provocando la contracción del músculo en un proceso mediado por calcio (Strzelecka-Golaszewska y cols., 1984).

Las funciones del citoesqueleto de actina están moduladas por vías de señalización que responden a estímulos que inciden sobre la membrana plasmática (Schmit y Hall, 1998). En este sentido, el estudio de las moléculas que son componentes de las vías de señalización celular tales como la superfamilia de proteínas Ras, dentro de las cuales se incluye la familia de proteínas Rho, resulta de particular interés. Las Rho-GTPasas participan en la regulación de la organización del citoesqueleto de actina, están envueltas en vías de señalización que activan cascadas de quinasas que regulan la expresión génica y controlan la progresión del ciclo celular y la proliferación celular (Khorravi-Far y cols., 1998; Nobes y cols., 1995). Por otro lado también resulta interesante, estudiar proteínas como anexina A2 que también participan en la modulación de la dinámica el citoesqueleto de actina, mediante el anclaje de los filamentos entre sí o a la membrana plásmatica (Merrifield y cols., 2001; Oliferenko y cols., 1999).

El citoesqueleto de actina, y su remodelación tiene un papel fundamental en muchos procesos que tienen lugar en el endometrio. Como hemos citado anteriormente, el endometrio es un órgano activo y dinámico, que desarrolla temporalmente un estado en el que se permite la adhesión del cigoto o

blastocisto, para posibilitar la implantación. En este proceso se producen toda una serie de cambios que se materializan a nivel morfológico y molecular. Las células endometriales epiteliales experimentan cambios estructurales que modifican su membrana celular, desencadenados por la reestructuración del citoesqueleto (Thie y cols., 1995; Martin y cols., 2002). Existen muchas evidencias que indican la relevancia de la interacción de los elementos del citoesqueleto y la membrana plasmática en el desarrollo del estado de receptividad (Hitt y Luna, 1994; Murphy, 1995; Thie y cols., 1997). Estos estudios han empleado agentes despolimerizantes de actina, como citocalasina D, determinando que una reorganización del citoesqueleto es necesaria para generar una despolarización en las células epiteliales endometriales, y por tanto, para permitir la adhesividad del trofoblasto (Thie y cols., 1997). La reorganización del citoesqueleto de actina también resulta clave para que tenga lugar el proceso de decidualización que sufren las células estromales endometriales. La manipulación de la dinámica de la actina mediante el empleo de drogas tales como jasplakinolida o latrunculina B, alteran de forma llamativa este proceso (Ihnatovych y cols., 2009). Estudios de este tipo corroboran la importancia de una remodelación activa del citoesqueleto de actina para inducir la decidualización.

1.6. Proteómica del endometrio

Recientemente, se han producido grandes avances en la genómica del endometrio mediante el uso de la tecnología de *microarrays* y la bioinformática, que proporciona una amplia cantidad de información sobre la expresión génica (Horcajadas y cols., 2007). Pero la expresión génica es solo un aspecto de la compleja regulación que permite a las células responder a señales

intracelulares y extracelulares. La proteómica es considerada como el siguiente paso en el estudio de los sistemas biológicos.

La proteómica estudia y caracteriza todo el conjunto de proteínas expresadas desde el transcriptoma. El término proteómica fue acuñado en 1997 como una analogía con la genómica, el estudio de los genes (James, 1997). La palabra "proteoma" es la fusión de "proteína" y "genoma", y fue acuñada por Marc Wilkins (Wilkins y cols., 1994). El proteoma es la dotación completa de proteínas producidas por un organismo o sistema. La descripción del proteoma permite tener una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas, en un momento dado y bajo determinadas condiciones concretas de tiempo y ambiente. El estudio y comparación del proteoma en diferentes situaciones biológicas, permite identificar aquellas proteínas cuya presencia, ausencia o alteración se correlaciona con determinados estados fisiológicos y/o patológicos. Uno de los objetivos clave es emplear esta estrategia con el fin de identificar nuevos marcadores para el diagnóstico de estados fisiológicos o patológicos, y en la identificación de nuevos fármacos.

La proteómica es una ciencia relativamente reciente ya que para su consolidación definitiva, ha sido necesario el desarrollo de la espectrometría de masas como método de identificación de proteínas gracias a los métodos de ionización suaves como la electronebulización (ESI) y la desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI). También fue fundamental el crecimiento exponencial en el número de entradas correspondientes a genes y/o proteínas en las bases de datos (Siuzdak, 1994). Esto, combinado con el empleo de potentes métodos de fraccionamiento y separación de péptidos y proteínas como el electroforesis de poliacrilamida de dos dimensiones (2D-PAGE) (Weiss y Görg, 2009) y la cromatografía líquida de alta resolución HPLC

(Berkowitz, 1989), ha permitido consolidar la proteómica, desde mediados de los años 90 del siglo pasado, como ciencia para el análisis masivo de proteínas.

Podemos distinguir tres disciplinas que constituyen la proteómica: metodologías de separación, técnicas analíticas de espectrometría de masas y la bioinformática (Fig. 10).

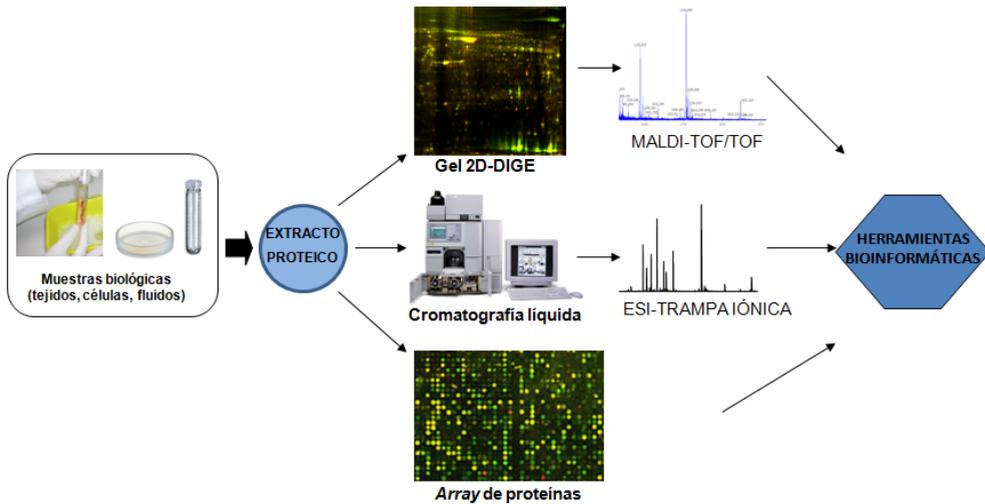


Figura 10. Estrategias de análisis proteómico. Los extractos proteícos obtenidos a partir de muestras biológicas, pueden ser separados mediante electroforesis (2D-DIGE) o cromatografía líquida (HPLC) y analizados mediante espectrometría de masas: MALDI-TOF/TOF o ESI-Trampa iónica. Alternativamente también se puede llevar a cabo un análisis proteómico parcial mediante *array* de proteínas. Finalmente todos los datos fruto de estos análisis se interpretan con el uso de herramientas bioinformáticas.

1.6.1. Metodologías de separación

Las proteínas celulares deben extraerse de las muestras (tejido, células, fluidos biológicos, etc.), previo a la aplicación de cualquier metodología separativa. El proceso de extracción contempla aspectos como la homogenización de células y tejidos; la solubilización de las proteínas mediante detergentes como 3-[[3-colamidopropil] dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS), Tween y dodecilsulfato sódico (SDS) y agentes reductores como ditioneitol (DTT); la desnaturalización de las proteínas mediante urea/tiourea, compuestos que rompen los enlaces responsables de las estructuras secundaria y terciaria, y la adición de enzimas que degraden los ácidos nucleicos co-extraídos (DNAsas y RNAsas).

Las compleja mezcla de proteínas, o la de sus correspondientes péptidos, debe ser separada en sus componentes para que éstos puedan ser identificados y caracterizados. Para este fin se emplean fundamentalmente dos abordajes: electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE) y la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Electroforesis bidimensional: 2D-DIGE

Mediante la electroforesis bidimensional (2-DE) es posible separar extractos proteicos complejos en sus componentes en función de su punto isoeléctrico (pI) y su masa molecular (Görg y cols., 2004). A pesar de las limitaciones de la técnica, fundamentalmente en lo que respecta a la solubilización de proteínas integrales de membrana y la exclusión de proteínas con valores extremos de pI y masa molecular, esta metodología posibilita la

separación de miles de proteínas partiendo de mezclas proteínicas (Görg y cols., 2004).

Debido a la escasa reproducibilidad de la técnica 2-DE que dificulta su adaptación al trabajo cuantitativo, esta técnica se ha perfeccionado mediante el marcaje con agentes fluorescentes de las proteínas que van a ser separadas. Esta metodología, llamada 2D-DIGE (electroforesis diferencial bidimensional en gel) permite el análisis cuantitativo de varios extractos en un mismo gel (Unlü y cols., 1997). Para ello, los extractos a comparar son marcados con diversos agentes fluorescentes, mezclados y separados mediante 2-DE (Fig. 11). La utilización de las frecuencias de excitación apropiadas permite la obtención de las correspondientes imágenes, que son procesadas mediante un software específico capaz de revelar diferencias correspondientes a expresión diferencial con una determinada significación estadística. El marcaje con agentes fluorescentes posee una linealidad analítica de 5 órdenes de magnitud y su límite de detección se sitúa por debajo del nanogramo de proteína, además, resulta totalmente compatible con el posterior análisis mediante MS.

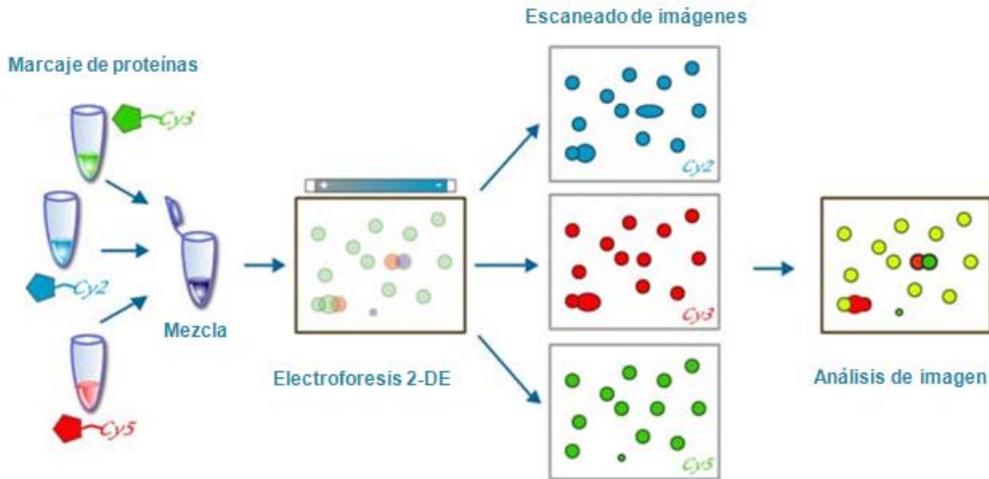


Figura 11. Esquema de la aplicación de la tecnología 2D-DIGE. Los extractos proteicos se marcan con los diferentes fluoróforos: Cy3, Cy2 y Cy5, se mezclan y se someten a la separación por electroforesis bidimensional (2-DE). Tras ello, las imágenes de los gels son escaneadas y se hace un análisis usando un software informático.

Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) posibilita la separación de proteínas y péptidos en función de su afinidad por una fase estacionaria contenida en una conducción capilar cuando se fuerza el paso de una fase móvil a través del sistema. Para la separación de péptidos o proteínas mediante HPLC se emplean diversas fases estacionarias (por ejemplo inversa, de intercambio iónico y de afinidad). El acoplamiento de distintos sistemas de separación de péptidos o proteínas en lo que se denominan sistemas de cromatografía multidimensional proporciona una metodología especialmente poderosa; en concreto, la cromatografía bidimensional basada en la

combinación del intercambio iónico y fase inversa a mostrado una inigualable capacidad de separación de mezclas complejas de péptidos de forma completamente automática y con gran resolución (Josic y Clifton, 2007).

1.6.2. Técnicas analíticas: espectrometría de masas

Las manchas de proteínas separadas mediante electroforesis o las proteínas en solución separadas mediante cromatografía líquida, son sometidas a un análisis posterior mediante espectrometría de masas (MS) y la identificación de las correspondientes proteínas mediante búsqueda en las bases de datos. El análisis de proteínas mediante espectrometría de masas ha sido posible gracias al desarrollo de varios métodos de ionización suaves para convertir biomoléculas grandes, polares y no volátiles en iones en fase gaseosa. Los espectrómetros de masa están formados por una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector que mide la relación masa/carga de los iones en fase gaseosa. La mayor parte de los dispositivos se basan en el acoplamiento de la ionización tipo desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI) a un analizador de tiempo de vuelo (TOF) en tándem o en la ionización mediante electronebulización (ESI) acoplada a trampas iónicas lineales o cuadrupolares (Aebersold y Mann, 2003).

El abordaje más empleado consiste en la conversión de los péptidos en iones en fase gaseosa mediante técnicas de ionización suave: MALDI o ESI, y a continuación se lleva a cabo el análisis de los iones según su relación masa/carga en un analizador de masas: tipo TOF o trampa iónica. Tras ello, se emplean algoritmos específicos para identificar las proteínas de las que provienen los péptidos analizados mediante MS a través de la búsqueda en bases de datos de proteínas (Henzel y cols., 1993). Se usa la posibilidad de

fragmentar los iones peptídicos seleccionados mediante descomposición metaestable o mediante disociación inducida por colisión (CID) llevado a cabo por un espectrómetro de masas en tándem combinando dos analizadores diferentes (MS/MS). Dado que esta fragmentación es específica de cada secuencia peptídica, los datos provenientes de MS/MS no sólo mejoran notablemente la búsqueda en las bases de datos, sino que también permiten la secuenciación *de novo* y la caracterización de modificaciones post-traduccionales.

1.6.3. Bioinformática

Estas nuevas disciplinas se caracterizan por la ingente cantidad de información que producen, por ello, la bioinformática hace que los datos obtenidos por la proteómica puedan ser analizados e interpretados (Quackenbush, 2006b). La bioinformática trata de un instrumento en continua evolución, con creación de buscadores, bancos de datos y métodos de búsqueda cada vez más avanzados en la identificación de proteínas de cualquier origen.

Los datos obtenidos se combinan a través de herramientas bioinformáticas para la búsqueda de proteínas no redundantes en las bases de datos. Existe una amplia variedad de plataformas informáticas que usan los datos de espectrometría de masas para identificar proteínas a partir de la secuencia primaria que se encuentra en las bases de datos.

Algunas de estas herramientas bioinformáticas son:

Mass Search (ETH) (cbrg.inf.eth.ch);
PeptideSearch (EMBO) (www.mann.embl-heidelberg.de);
Mascot (Matrix Science) www.matrixscience.com ;
PepFrag, ProFound (Rock) (prowl.rockefeller.edu);
Mowse (Hum. Gen. Res. Cent.) (www.seqnet.dl.ac.uk);
SEQUEST (UW, Seattle) (fields.scripps.edu/sequet).

Para llevar a cabo una búsqueda en las bases de datos se escogen los parámetros más relevantes como el tipo de enzima proteasa utilizada o el error que permitimos para dicha búsqueda. La base de datos identifica a las proteínas, ya sea empleando la masa de péptidos intactos registrados en la correspondiente huella peptídica de masa, o la de sus fragmentos, medidas mediante MS en tándem (MS/MS). Se otorga una puntuación a la búsqueda y se determina con que fiabilidad se ha determinado la proteína en cuestión (puntuaciones mayores a 80 se suelen considerar significativas ($P \leq 0.05$)).

1.6.4. Arrays de proteínas

Los *arrays* de proteínas constituyen una estrategia novedosa en proteómica, que no se pueden clasificar ni en técnicas separativas ni analíticas. Se fundamentan en la unión específica de las proteínas a diferentes sustratos. Los *arrays* de proteínas consisten en una matriz plana, que puede ser de distintos materiales, en los que los anticuerpos, péptidos, proteínas o complejos extractos proteicos pueden inmovilizarse en diferentes puntos para capturar la presencia de proteínas específicas (Habb y cols., 2001). Mediante el escaneado de estas matrices de puntos, donde cada punto corresponde a una unión específica (por ejemplo, antígeno-anticuerpo) podemos analizar diferencias

cuantitativas en abundancia de cada proteína. Una de las ventajas fundamentales de esta tecnología es su capacidad para medir cientos de proteínas simultáneamente usando pequeños volúmenes tanto de las muestras clínicas o biológicas a analizar, como de los anticuerpos.

Los *arrays* de proteínas representan plataformas proteómicas guiadas, que disponen de ciertas ventajas sobre tecnologías de proteómica no guiadas, basadas en separaciones electroforéticas bidimensionales y de espectrometría de masas. Tales ventajas son principalmente la alta rentabilidad y reproducibilidad, así como la alta precisión y sensibilidad de las mediciones. Sin embargo, el número de mediciones simultáneas que pueden realizarse a nivel práctico depende de la disponibilidad de anticuerpos con alta afinidad y especificidad disponibles para la caracterización de cada una de las proteínas diana a medir (Kingsmore, 2006).

Mediante esta aproximación analizamos un conjunto definido de proteínas expresadas en nuestra muestra biológica, es decir, se hace un estudio proteómico a nivel parcial. Podemos trabajar con *arrays* que contengan proteínas relacionadas funcionalmente. Ello resulta de gran utilidad por ejemplo, para poder evaluar una ruta biológica concreta o analizar el conjunto de proteínas que son secretadas (secretómica parcial). Este abordaje permite diseños experimentales que responden a hipótesis específicas, así como, la interpretación biológica de los resultados obtenidos.

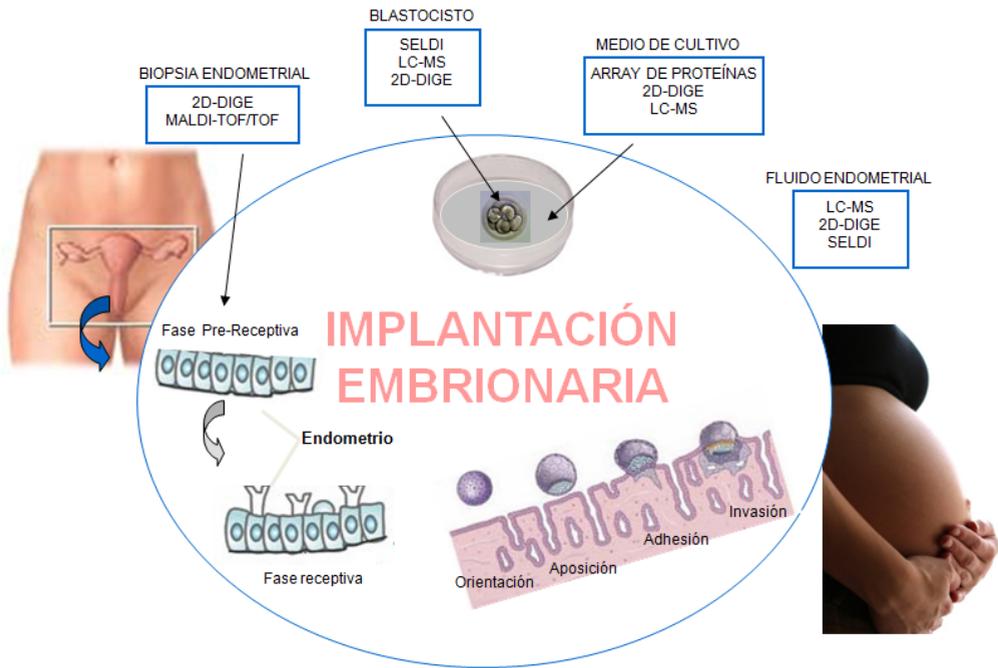


Figura 12. Aplicación de las tecnologías proteómicas en el proceso de implantación embrionaria. El estudio del proteoma a partir de diferentes muestras biológicas (biopsia o fluido endometrial, blastocistos o medio de cultivo de blastocistos) nos permite mejorar el entendimiento de procesos complejos, como la implantación embrionaria. Además las proteínas identificadas con expresión diferencial pueden ser usadas como marcadores de la adquisición de la receptividad endometrial, la viabilidad embrionaria, así como, para identificar causas de enfermedad o posibles interceptivos.

Todo este conjunto de estrategias proteómicas se pueden aplicar en el estudio del proceso de implantación, estudiando tanto el tejido endometrial como el embrión, así como para el análisis del líquido presente en la cavidad uterina (Fig. 12). Se han llevado a cabo un par de intentos iniciales para identificar biomarcadores del proceso de receptividad endometrial, comparando el endometrio proliferativo con el secretor (De Souza y cols., 2005;

Parmar y cols., 2009). Los distintos trabajos realizados sobre el proteoma endometrial se han basado en el análisis de muestras recolectadas en diferentes momentos del ciclo menstrual, han usado técnicas proteómicas distintas y con tamaños muestrales reducidos, estas razones hacen que no sean cruciales para sacar conclusiones. No obstante, con el conocimiento aportado, se deduce que la aplicación de la proteómica parece ser un buen método para obtener biomarcadores de receptividad endometrial que permitan caracterizar dicho proceso y obtener un método objetivo para la evaluación de la receptividad uterina, así como, usar esta información para identificar posibles causas de infertilidad o usar estos marcadores como interceptivos del proceso de implantación.

2. HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

Durante el periodo de receptividad endometrial se producen una serie de cambios a nivel morfológico y molecular, conducentes a la transformación a un fenotipo capaz de permitir la adhesión del embrión al endometrio materno.

La hipótesis de partida de la presente tesis doctoral es que el proteoma, es decir el conjunto de proteínas presentes en el endometrio, es un nuevo campo cuyo conocimiento y caracterización puede ser utilizado para mejorar el entendimiento de este proceso.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos generales

- Comparar el proteoma del endometrio humano en la fase receptiva respecto a la pre-receptiva, identificando y cuantificando el repertorio de proteínas diferencialmente expresadas.
- Determinar el patrón de proteínas expresadas intracelularmente y secretadas durante el proceso de decidualización *in vitro*.
- Investigar la implicación de anexina A2, actuando a través de RhoA, sobre la receptividad endometrial humana.

3.2. Objetivos específicos

- a) Estudiar comparativamente el proteoma del endometrio receptivo respecto al pre-receptivo mediante la técnica separativa DIGE e identificando las proteínas mediante MALDI/TOF.
- b) Usar un modelo de endometrio refractario para caracterizar la importancia funcional de dos proteínas clave: estatmina 1 y anexina A2, en la receptividad endometrial.
- c) Estudiar el proteoma de células estromales decidualizadas *in vitro* mediante DIGE y MALDI/TOF.
- d) Estudiar el secretoma a partir del medio condicionado de células estromales decidualizadas *in vitro* mediante un *array* de proteínas.
- e) Generar el interactoma de la decidualización humana, integrando los datos proteómicos y secretómicos, junto con la información genómica pública disponible.

- f) Localizar la proteína anexina A2 y RhoA en el endometrio humano durante el ciclo menstrual.
- g) Estudiar la expresión a nivel de proteína de anexina A2, RhoA total y la RhoA activo en el endometrio humano durante el ciclo menstrual.
- h) Demostrar la funcionalidad de anexina A2 y RhoA sobre la fase de adhesión de la implantación embrionaria.
- i) Estudiar el papel de anexina A2 sobre la expansión del trofoblasto.
- j) Determinar la función de anexina A2 sobre la capacidad de migración/proliferación de las células epiteliales endometriales.
- k) Estudiar la posible relación entre anexina A2 y RhoA.
- l) Analizar el papel de anexina A2 y RhoA en la remodelación del citoesqueleto de actina.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Muestras biológicas

4.1.1. Criterios de inclusión

El material biológico de origen humano empleado en este estudio esta formado por un total de 79 biopsias endometriales de mujeres diferentes, en distintos días del ciclo menstrual.

Las mujeres reclutadas para los estudios eran de raza caucásica, sanas, con edad comprendida entre 18 y 39 años y con un índice de masa corporal normal (IMC) de entre 19–25 kg/m². Se trataron de mujeres fértiles, asumiéndose como fertilidad probada el haber tenido embarazos previamente. Estas mujeres no presentaban ninguna patología endometrial y presentaban ciclos menstruales regulares entre 25 y 33 días. Ninguna de estas mujeres recibió tratamiento hormonal en los tres meses precedentes a la realización de la biopsia.

- **Muestras para proteómica de la receptividad endometrial.**

Las mujeres que participaron en el primer estudio fueron voluntarias, reclutadas específicamente y compensadas económicamente. A partir del día 10 del ciclo menstrual se realizó el control ecográfico. Con folículos de 16 mm se inició la determinación de LH en suero o en orina diaria. Se asumió un pico de LH según los valores que se obtuvieron durante las distintas determinaciones y se consideró el día del pico como día 0. A partir de entonces

se tomó la biopsia, 2 y 7 días después, siendo considerado ese día como LH+2 o LH+7, respectivamente. Para la medición de la LH urinaria se empleó un kit comercial predictor de la ovulación (Donacheck ovulación, Novalab Ibérica, S.A.L, Coslada, Madrid, España), y para la medición de la LH sérica se utilizó otro kit comercial (LH reactiva abbot laboratorios axsym system).

Se seleccionó un set de muestras para ser analizadas comparativamente mediante técnicas proteómicas. Las biopsias endometriales se obtuvieron a partir de ocho mujeres durante su mismo ciclo menstrual, en fase pre-receptiva (LH+2) y en fase receptiva (LH+7), resultando una n de 16 muestras. Este diseño permitió reducir la variabilidad interpaciente.

Adicionalmente, otras ocho muestras endometriales (4 muestras LH+2 y 4 muestras LH+7) se recogieron a partir de ocho donantes diferentes para confirmar los resultados de la aplicación de las técnicas proteómicas fuera del set de muestras de estudio descrito anteriormente.

Para llevar a cabo el estudio funcional de algunas de las proteínas desreguladas en receptividad endometrial, se seleccionaron tres mujeres con endometrio refractario inducido por la inserción de un dispositivo intrauterino (DIU). Tres biopsias endometriales se tomaron a la misma paciente en fase receptiva LH+7 antes de la inserción del DIU, en su presencia y tres meses después de su retirada (Horcajadas y cols., 2006). La n total fue de 9 muestras.

- **Muestras para proteómica de la decidualización**

Para el segundo objetivo, basado en el análisis proteómico de células estromales endometriales (ESC, *Endometrial stromal cells*) inducidas al proceso de decidualización *in vitro*, se emplearon un total de 16 biopsias endometriales. Las muestras fueron tomadas a partir de donantes en el día de la extracción ovocitaria (día 15 del ciclo menstrual).

- **Muestras para el estudio de Anexina A2 y RhoA en implantación**

Para el tercer objetivo sobre el papel de ANXA2 y RhoA en la implantación embrionaria, se usaron células epiteliales endometriales humanas (hEEC, *Endometrial epithelial cells*) obtenidas a partir de 30 biopsias endometriales. Las muestras procedían de donantes en el día de la extracción ovocitaria (día 15 del ciclo menstrual).

Adicionalmente, se emplearon 12 muestras endometriales recogidas a lo largo del ciclo menstrual y se incluyeron en parafina. Dichas muestras se distribuyeron en cuatro grupos (n=3 en cada grupo) según la fase del ciclo menstrual: proliferativa (P)(días 1-14); secretora temprana (STE)(días 15-18); secretora media (SM)(días 19-22); y secretora tardía (STA)(días 23-28); de acuerdo a los criterios de Noyes (Noyes y cols., 1975).

Consentimiento informado

Antes de la recogida de cualquier tipo de muestra, se obtuvo el consentimiento escrito de la paciente previa aprobación por el comité ético del Instituto Valenciano de la Infertilidad (IVI). Anexo II.

4.1.2. Obtención de las muestras

Todas las biopsias endometriales se tomaron del *fundus* uterino usando una *pipelle de Cornier* (Genetics, Namont-Achel, Belgium) en condiciones de esterilidad. El procedimiento tuvo una duración estimada de 5-10 segundos. Las muestras se lavaron con tampón salino (PBS) para eliminar restos de moco y sangre.

Las biopsias usadas en el estudio de la proteómica de la receptividad endometrial se congelaron directamente a -80°C para su posterior análisis. Mientras que, las muestras empleadas en el estudio de la proteómica de la decidualización y el estudio de ANXA2 y RhoA se sometieron al protocolo de separación de la fracción estromal y epitelial.

Para los posteriores análisis histológicos un pequeño fragmento (1/4 parte) de la biopsia endometrial se separó y se incluyó en parafina.

4.1.3. Separación fracción epitelial y estromal

Todo el procedimiento celular se llevó a cabo en condiciones de esterilidad para evitar cualquier tipo de contaminación por agentes externos. Por lo tanto, se procedió a la recogida y procesamiento de la muestra con material esterilizado y en campana de flujo laminar, dentro de zonas de cultivo celular asépticas.

La disgregación mecánica se realizó con bisturís, limpiando el moco y sangre de la muestra, y troceándola cuidadosamente hasta alcanzar fragmentos menores 1 mm. Tras la disgregación mecánica se llevó a cabo la disgregación

enzimática con la enzima colagenasa tipo IA (Sigma-Aldrich, Madrid, España) diluida en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's médium* (Sigma-Aldrich, Madrid, España)) a concentración 10 mg/mL, y a continuación se dejó la muestra a 4°C durante 24 horas. La colagenasa hidroliza el colágeno en su conformación de triple hélice liberando fragmentos pequeños de tejidos y células aisladas. Transcurrido este tiempo se separaron las dos fracciones celulares en base a su coeficiente de sedimentación. Las células disgregadas se colocaron en posición vertical durante 10 minutos, apareciendo un pellet que se separó del sobrenadante y se pasó a un nuevo tubo, este procedimiento se repitió dos veces más. Las células de mayor tamaño sedimentan más rápido al fondo del tubo y se corresponden con glándulas y fragmentos epiteliales, mientras que las células estromales se encuentran en la fracción superior.

Las suspensiones celulares correspondientes al estroma se filtraron a través de filtros de 30 µm de poro (Partec, Celltrics), se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en medio DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) (Gibco, Barcelona, España) y 0,1% de antibióticos (fungizona y gentamicina).

Por otro lado, las células de la fracción inferior fueron resuspendidas en DMEM y sometidas a dos incubaciones de 15 minutos en flasks de 25 cm² (Falcon, Becton-Dickinson) donde se recogió el sobrenadante. Estas incubaciones permiten eliminar aquellas células estromales que puedan quedar en la fracción epitelial. Finalmente las células fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en medio compuesto por 75% de DMEM y 25% de MCDB-105 (Sigma, Madrid, Spain) complementado con 10% de FBS, 220 µL de insulina y 0,1% de antibióticos (fungizona y gentamicina).

4.1.4. Decidualización *in vitro*

Una vez las células estromales endometriales (ESC) se obtuvieron, a continuación se cultivaron en placas de 24 pocillos (BD Becton and Dickinson) usando el medio DMEM/F12 suplementado con 10% de FBS y 0,1% de antibióticos (fungizona y gentamicina). Una vez alcanzada una confluencia del 80-90% se reemplazó con el mismo medio suplementado con 2% de FBS, 5 ug/mL de ácido ascórbico y 10 ug/mL de transferrina. La decidualización *in vitro* se indujo añadiendo progesterona (1 $\mu\text{mol/L}$) y 17β -estradiol (30 nmol/L) durante 12 días. El medio de crecimiento con hormonas se renovó cada tres días. Las ESC control fueron cultivadas en paralelo sin el tratamiento hormonal.

Se recogió el medio condicionado cada tres días (días 0, 3, 6, 9 y 12), mientras que las células fueron recolectadas en día 9 de cultivo, tanto las ESC control como las deciduales. El medio condicionado se analizó por ELISA para comprobar los niveles de los diferentes biomarcadores que son secretados cuando la decidualización tiene lugar: IGFBP-1 (Raybiotech) y prolactina ((PRL) Abbott AxSYM System). Tanto el aumento de la secreción de estas moléculas como el cambio morfológico que experimentaban las células, permitía comprobar que la decidualización se había producido con éxito.

Las células ESC control y decidualizadas en día 9 de cultivo se sometieron al análisis proteómico mediante separación electroforética 2D-DIGE e identificación de las proteínas con expresión diferencial por espectrometría de masas MALDI-TOF. El medio condicionado procedente de células ESC control y decidualizadas en día 9 de cultivo se analizó mediante un array de proteínas (Fig. 13).

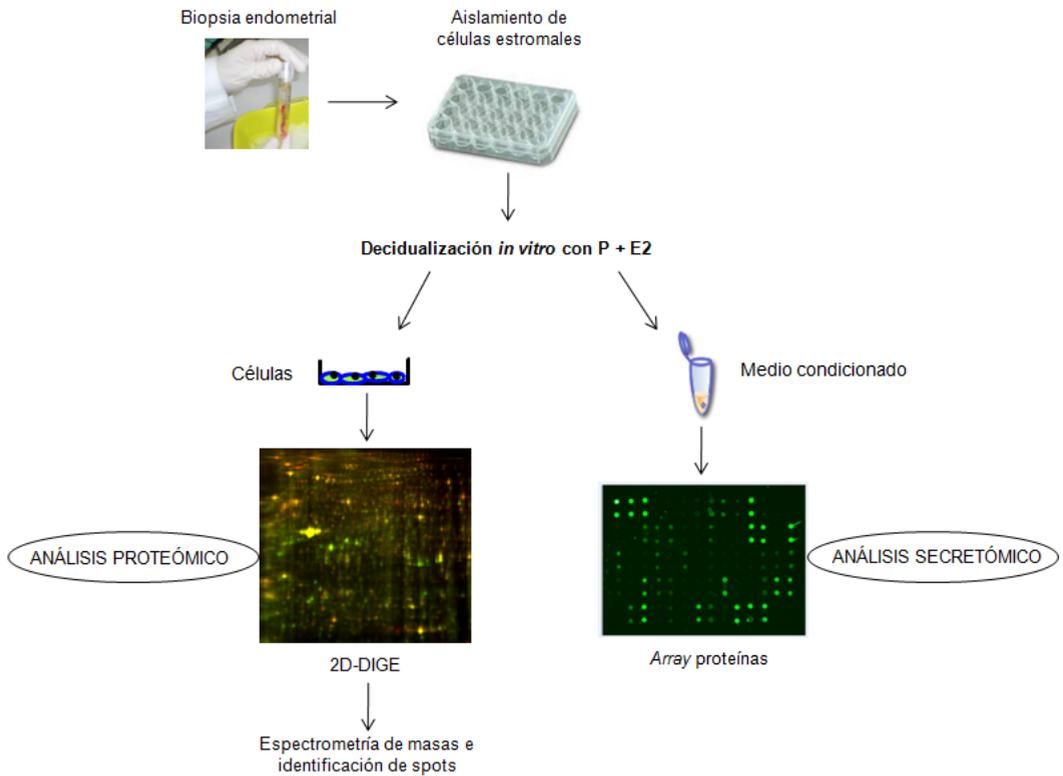


Figura 13. Diseño experimental empleado en el estudio de proteómica de la decidualización. Las células endometriales estromales (ESC) se obtuvieron a partir de biopsia y se cultivaron *in vitro* en presencia/ausencia de progesterona (P) y estradiol (E2) durante 12 días. Las células se analizaron mediante 2D-DIGE y MALDI-TOF/TOF y el medio condicionado se analizó mediante *array* de proteínas.

4.2. Líneas celulares

En el tercer objetivo donde se analizó el papel de ANXA2 y RhoA en el endometrio se emplearon dos líneas celulares procedentes de la Colección Americana de cultivos tipo (ATCC; Rockville, MD) (Tabla 2).

Línea celular	Numero	Origen	Morfología
HEC-1-A	HTB-112	Carcinoma endometrial humano	Epitelial
JEG-3	HTB-36	Células derivada de trofoblasto	Epitelial

Tabla 2. Resumen de las líneas celulares empleadas en nuestros análisis.

Las células HEC-1-A fueron crecidas en medio McCoy 5A y las células JEG-3 en EMEM (*Eagle's minimal essential medium*), ambos suplementados con 10% de FBS y 0,1% de antibióticos (fungizona y gentamicina).

Para todos los experimentos, las células HEC-1-A y JEG-3 se usaron entre los pases de cultivo 2 y 8, sembradas en placas de cultivo (BD Becton and Dickinson).

4.3. Estudio proteómico

4.3.1. Preparación de las muestras

Las proteínas se extrajeron a partir de las biopsias endometriales o bien a partir de las células ESC decidualizadas y control, en tampón de lisis (7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS (ácido 3-((3-cholamidopropil)dimethylammonio)-1-propanesulfónico) y 30 mM Tris-pH 8.5) con un contenido de 50mM DTT y empleando el kit comercial *2D Grinding* (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK). La suspensión se agitó durante 40 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 16000 g durante 15 min. Para eliminar las posibles

sustancias interferentes la muestra se limpió y precipitó usando el kit comercial *2D Clean Up* (GE Healthcare), y las proteínas se resuspendieron en tampón de lisis. La concentración de proteínas se determinó usando el ensayo de proteína RD/DC (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA, USA).

4.3.2. Separación por 2D-DIGE

Las proteínas se marcaron siguiendo las recomendaciones de la casa comercial GE Healthcare. Para el estudio de proteómica de la receptividad endometrial se cogieron 50 µg de extracto proteico de la fase pre-receptiva y 50 µg de la fase receptiva, mientras que para el estudio de proteómica del proceso de la decidualización se cogieron 50 µg del extracto proteico de células ESC control y 50 µg de células ESC decidualizadas. Los extractos se marcaron con 400 pmol de los fluoróforos Cy3 ó Cy5 en hielo y en oscuridad durante 30 min. En ambos estudios se introdujo un estándar interno, que contenía cantidades iguales de cada lisado celular marcado con el fluoróforo Cy2 y se introdujo en todos los experimentos. La reacción de marcaje se paró con 1 µL de lisina 10mM en hielo durante 10 min en oscuridad.

Los extractos proteicos pre-receptivo y receptivo, así como los extractos proteicos control y decidual se combinaron por parejas, junto con el estándar interno de cada estudio y se corrieron en un gel individual (150 µg de proteína total). La tabla 2 muestra como se combinaron en parejas las diferentes muestras correspondientes a los dos estudios. Los extractos proteicos se diluyeron en tampón de rehidratación (7 M urea, 2 M tiourea, 2% CHAPS) y se redujeron con 50 mM de ditioltreitol (DTT), y se aplicaron en unas tiras comerciales IPGs (gradiente de pH inmovilizado) de 24 cm con un rango de pH 3-11 no lineal (NL) para correr la primera dimensión. Estas tiras habían sido

previamente rehidratadas con tampón de rehidratación conteniendo 100 mM de disulfido de hidroxietilo (DeStreak, GE Healthcare), tal como fue descrito por Cortón y cols (2004).

Experimento	Gel	Cy2	Cy3	Cy5
1. PROTEÓMICA RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL	GI-01	Estándar interno-1	(LH+2)1	(LH+7)1
	GI-02	Estándar interno-1	(LH+7)2	(LH+2)2
	GI-03	Estándar interno-1	(LH+2)3	(LH+7)3
	GI-04	Estándar interno-1	(LH+7)4	(LH+2)4
	GI-05	Estándar interno-1	(LH+2)5	(LH+7)5
	GII-01	Estándar interno-2	(LH+7)6	(LH+2)6
	GII-02	Estándar interno-2	(LH+2)7	(LH+7)7
	GII-03	Estándar interno-2	(LH+7)8	(LH+2)8
	2. PROTEÓMICA DECIDUALIZACIÓN	GI-01	Estándar interno-1	(Control)1
GI-02		Estándar interno-1	(Decidual)2	(Control)2
GI-03		Estándar interno-1	(Control)3	(Decidual)3
GI-04		Estándar interno-1	(Decidual)4	(Control)4
GI-05		Estándar interno-1	(Control)5	(Decidual)5
GI-06		Estándar interno-1	(Decidual)6	(Control)6
GI-07		Estándar interno-1	(Control)7	(Decidual)7
GI-08		Estándar interno-1	(Decidual)8	(Control)8
GI-09		Estándar interno-1	(Control)9	(Decidual)9
GI-10		Estándar interno-1	(Decidual)10	(Control)10
GI-11		Estándar interno-1	(Control)11	(Decidual)11

Tabla 3. Diseño experimental para los análisis DIGE realizados en el estudio de la receptividad endometrial y en decidualización. En el primer estudio, se hicieron dos experimentos DIGE (GI y GII), usando 5 y 3 pares de muestras, respectivamente, empleando en cada caso el estándar interno correspondiente. En el segundo experimento, se analizaron 11 pares de muestras en un único experimento (GI) y con un estándar interno común. Las muestras en todos los casos fueron combinadas por parejas dentro de cada gel, realizando un marcaje tal como describe la tabla.

La primera dimensión se corrió a 0.05 mA°/IPGs en el *IPGphor Isoelectric Focusing System* (GE Healthcare) siguiendo un incremento de voltaje en cuatro pasos: 300 V durante 3 h, gradiente lineal de 1000 V en 4 h, gradiente lineal a 8000 V en 2 h y finalmente a 8000 V hasta estabilizarse. Después de la primera dimensión, las tiras fueron equilibradas en tampón de equilibrado con SDS (75 mM Tris pH 8.8, 6 M urea, 30% (v/v) glicerol, 2% (w/v) sodio dodecil sulfato (SDS), y trazas de azul bromofenol) conteniendo 1% (w/v) de DTT durante 15 min y tras ello, las tiras se sumergieron en tampón de equilibrado con SDS conteniendo 4% (w/v) de yodoacetamida durante 15 min adicionales. A continuación las proteínas se separaron por electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida del 10-12% usando el sistema *Ettan Dalt Six device* (GE Healthcare) a 25°C.

4.3.3. Adquisición de imágenes y análisis

Después de la separación en la segunda dimensión mediante electroforesis SDS-PAGE, los geles se escanearon con un escáner tipo *Typhoon 9400* (GE Healthcare) a 100 mm de resolución usando filtros apropiados para las longitudes de onda de los fluoróforos Cy2, Cy3 and Cy5. La cuantificación relativa de las proteínas entre las muestras LH+2 y LH+7, así como entre las muestras control y decidual se llevó a cabo usando el software DeCyder versión 6.5 y el módulo estadístico multivariable de análisis de datos (Extended Data Analysis (EDA)) versión 1.0 (GE Healthcare) en un solo paso. En primer lugar, se empleó el modulo DIA (*Differential In-gel Analysis*) para co-detectar las tres imágenes de un gel (estándar interno marcado en azul, y las dos muestras, marcadas en verde y rojo) para medir la relación exacta entre los volúmenes de la mancha Cy3 y Cy5 referido al volumen de Cy2 en cada gel. Se eliminó automáticamente el ruido de fondo, se normalizó y cuantificó siguiendo el

manual del software con DeCyder Differential Analysis version 6.5 (GE Healthcare, 2005). A continuación, las imágenes procesadas de forma individual con el módulo DIA se compararon entre los geles con el módulo de análisis biológico de variación (Biological Variation Analysis (BVA)), utilizando el estándar interno para la coincidencia de gel a gel. BVA reveló las diferencias entre los grupos experimentales en todos los geles. Cada diferencia se calculó como el ratio medio de cada mancha. Se aplicó un test t-Student para comparar los ratios medios para cada mancha entre las muestras LH+2 y LH+7, y entre las muestras control y decidual. Se consideró significativo un P-valor menor o igual a 0.05. La agrupación de los grupos experimentales se realizó mediante Análisis de Componentes Principales (PCA) empleando un algoritmo incluido en el módulo de EDA del software DeCyder versión 6.5.

4.3.4. Digestión con tripsina

Aquellas manchas de proteínas que mostraron unos niveles de expresión significativamente alterados entre los dos grupos (LH+2 y LH+7, así como entre control y decidual) al ser analizadas con el software DeCyder y EDA, se seleccionaron para escindir del gel. Los geles se tiñeron con plata y las manchas de proteínas se compararon visualmente contra las imágenes DIGE, manualmente escindidas de los geles y transferidas a microplacas de polipropileno de 96 pocillos con agua ultrapura (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). Las muestras se digirieron automáticamente usando una estación de digestión de proteínas *Proteiner DP* (Bruker Daltonik) según el protocolo de Shevchenko y cols (2006) con pequeñas modificaciones. El fragmento del gel se redujo con 15 μ l de 10 nM DTT (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) en 50 mM bicarbonato amónico (99.5% pureza; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) y sometido a alquilación con 15 μ l de una solución de yodoacetamida 55 mM

(Sigma Chemical) en 50 mM de bicarbonato amónico. Los fragmentos se lavaron con una solución 50 mM de bicarbonato amónico y acetonitrilo (en gradiente; Merck, Darmstadt, Germany) y se secaron bajo una corriente de nitrógeno. Posteriormente se añadieron 10 µl de tripsina porcina modificada (Promega, Madison, WI, USA) a una concentración final de 8 ng/ml en 50 mM de bicarbonato amónico y la digestión se realizó a 37°C durante 8 h. Finalmente, para la extracción de los péptidos se añadieron 6 µl de 0.5% de ácido trifluoroacético (TFA) (99.5% pureza; Sigma Chemical), y las soluciones de digestión resultantes se transfirieron por centrifugación al fondo de las microplacas de polipropileno de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany).

4.3.5. Espectrometría de masas

Las muestras para ser sometidas a un análisis MALDI-TOF/TOF (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz- tiempo de vuelo) se prepararon mezclando volúmenes equivalentes de la solución de digestión y una solución matriz compuesta de 0.5 g/l de ácido α -ciano-4 hydroxicinámico (Bruker Daltonik) en 50% de acetonitrilo acuoso y 0.25% TFA. Esta mezcla se depositó en la sonda MALDI de 600 mm AnchorChip (Bruker Daltonik) (Schurenberg y cols., 2000) y se dejó secar a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron automáticamente en un espectrómetro de masas tipo Ultraflex MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonik) (Suckau y cols., 2003) con un análisis automatizado de bucle usando una calibración de masa interna, controlado por el software flexControl 2.2 (Bruker Daltonik). En primer lugar, se calculó la media de 300 espectros individuales en el modo de ion positivo reflector a una frecuencia de láser de 50 Hz y en un rango de masas desde 800 a 4000 Da, para obtener el espectro MALDI-MS.

La calibración interna del espectro MALDI-MS se realizó usando los iones fruto de la autólisis de la tripsina con un valor de masa/carga conocido ($m/z \frac{1}{4} 842.510$ y $m/z \frac{1}{4} 2211.105$). En segundo lugar, aquellos iones precursores que presentaron una señal de ruido de fondo de 20 en el espectro de masas MALDI-MS se sometieron a un análisis de fragmentación de los iones en tándem (MS/MS). Los precursores se aceleraron a 8 kV, mientras que los fragmentos iónicos generados por la descomposición inducida por láser se aceleraron a 19 kV, y sus masas se analizaron tras pasar el ion reflector en un promedio de 1000 espectros. Para las calibraciones MALDI-MS/MS se usaron iones tipo Y, obtenidos a partir de los protones de la mezcla de péptidos del espectro de fragmentación iónico (calibración peptídica estándar, Bruker Daltonik) que cubre la región 800–3200 m/z . El análisis automatizado de los datos de masas se realizó empleando el software flexAnalysis versión 2.2 (Bruker Daltonik). Los espectros MALDI-MS y MS/MS se revisaron manualmente en detalle, se readquirieron y recalibraron usando el protocolo arriba mencionado.

4.3.6. Bases de datos

Los datos obtenidos a partir de MALDI-MS y MS/MS se combinaron a través de la herramienta BioTools versión 3.0 (Bruker Daltonik) para la búsqueda de proteínas no redundantes en las bases de datos (NCBI nr 20080229, _6.5 _ 106 entries, *National Center for Biotechnology Information*, Bethesda US) usando el *software* Mascot versión 2.2.1 (Matrix Science, London, UK; <http://www.matrixscience.com>) (Perkins y cols., 1999). Los parámetros de búsqueda más relevantes fueron: enzima tipo tripsina; modificaciones, carbamidometil (C); permisión de un error; tolerancia de péptido +20 ppm;

MS/MS tolerancia +0.5 Da. Puntaciones de proteínas mayores a 80 se consideraron significativas ($P \leq 0.05$).

4.4. Análisis de secretómica: *Array* de proteínas

Se llevó a cabo un análisis secretómico parcial usando un sistema de *Arrays* de proteínas llamado *Human Cytokine Antibody Array G Series 2000* (Raybiotech). Este sistema está compuesto por un set de tres arrays VI, VII y VIII, los cuales contienen 174 citoquinas humanas que pueden ser comparadas simultáneamente entre dos condiciones y en un experimento único (Dominguez y cols., 2008; Dominguez y cols., 2010). Se comparó el medio condicionado de 7 conjuntos de células ESC control y decidualizadas recogido en día 9 de cultivo, usando estos *arrays* de proteínas.

Los portaobjetos de *arrays* de proteínas se bloquearon durante 30 min a temperatura ambiente antes de la incubación con el medio condicionado. A continuación, los diferentes *arrays* VI, VII y VIII se incubaron 2 horas a temperatura ambiente con 100 μ L del medio de células ESC control, 100 μ L del medio de células ESC deciduales y 100 μ L de medio que había estado sin células (medio de cultivo DMEN/F12 con 2% SBF). Tras la incubación de las muestras y el lavado, se aplicó a cada membrana una solución que contenía anticuerpos anti-citoquinas conjugados con biotina durante 2 horas. A continuación se lavaron los portaobjetos y se incubaron con una dilución de colorante fluorescente conjugado con estreptavidina durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Los portaobjetos se lavaron y las gotas de agua restantes se eliminaron mediante centrifugación a 1000 rpm durante 3 min. Tras ello los portaobjetos se dejaron secar al aire durante al menos 20 min. Finalmente los *arrays* se escanearon en un escáner tipo Axon 4100A (Molecular

Devices, Sunnyvale, CA, USA) y los datos se extrajeron con el software GenePix Pro versión 6.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Para el análisis de cada punto del *array* (*spot*) fue usado el *software* GenePix Pro versión 6.0 y para calcular la intensidad de los *spots* se consideraron los datos en bruto. Se restó el ruido de fondo a la intensidad media de los *spots* y los datos obtenidos se transformaron a escala logarítmica. Antes de la normalización por cuartiles, los datos se representaron mediante un diagrama de cajas para comprobar la distribución de los datos y poder eliminar aquellos datos anormales. Se unificaron los datos de aquellas proteínas que presentaron réplicas en el *array*. El *software* R-estadístico se usó como herramienta para estos propósitos y los análisis posteriores. Comparando el medio condicionado control con el decidual con test paramétricos y no paramétricos, se obtuvo el patrón de expresión de proteínas. Se usaron dos criterios para definir que proteínas tenían una abundancia alterada en las diferentes muestras: un valor absoluto de tasa de cambio de 1.5 o mayor y un *p*-valor ≤ 0.05 .

4.5. Bioinformática: “interactoma” de la decidualización

Se desarrolló un análisis bioinformático para integrar los patrones del proteoma y el secretoma de la decidualización, junto con la información presente en las bases de datos públicas. Mediante el uso de la aplicación *Snow* (<http://snow.bioinfo.cipf.es>) (Minguez y cols., 2009) presente en la herramienta de análisis *Babelomics* (<http://www.babelomics.org>) (Medina y cols., 2010), se creó una red de interacciones entre las proteínas diferencialmente reguladas intra- y extracelularmente.

Aunque los receptores de progesterona y estradiol (PGR, ESR1 y ESR2) no se detectaron como diferencialmente expresados, se incluyeron en el conjunto de proteínas que interactúan, ya que representan la entrada principal de las señales hormonales que desencadenan el proceso de decidualización. La base de datos de interacciones de proteínas humanas disponible en *Snow* se usó para construir la red de interacciones. Se incluyeron aquellas interacciones físicas proteína-proteína detectadas por al menos dos métodos experimentales distintos, y se permitió la incorporación de una proteína de unión (es decir, no presente en los datos experimentales).

El interactoma de la decidualización se complementó incluyendo la información disponible de aquellos factores de transcripción (FT) que regulan la expresión de los genes que codifican a todas las proteínas presentes en la red. Los datos de los factores de transcripción se obtuvieron de la base de datos *Jaspar* (Portales-Casamar y cols., 2010), la cual se encuentra incluida en *Babelomics*. Adicionalmente, todos los datos fruto del estudio de la transcriptómica del proceso de decidualización (Aghajanova y cols., 2010) se recopilaron y cruzaron con los datos proteómicos para identificar los genes cuya expresión diferencial se observó tanto a nivel génico como proteico.

Todas las proteínas que constituyeron la red resultante se revisaron manualmente y se clasificaron en diferentes categorías funcionales, que describían del mejor modo la diversidad de funciones en nuestro conjunto de datos. Finalmente, la red se visualizó usando el *software Cytoscape* (Fig.14) (Shannon y cols., 2003).

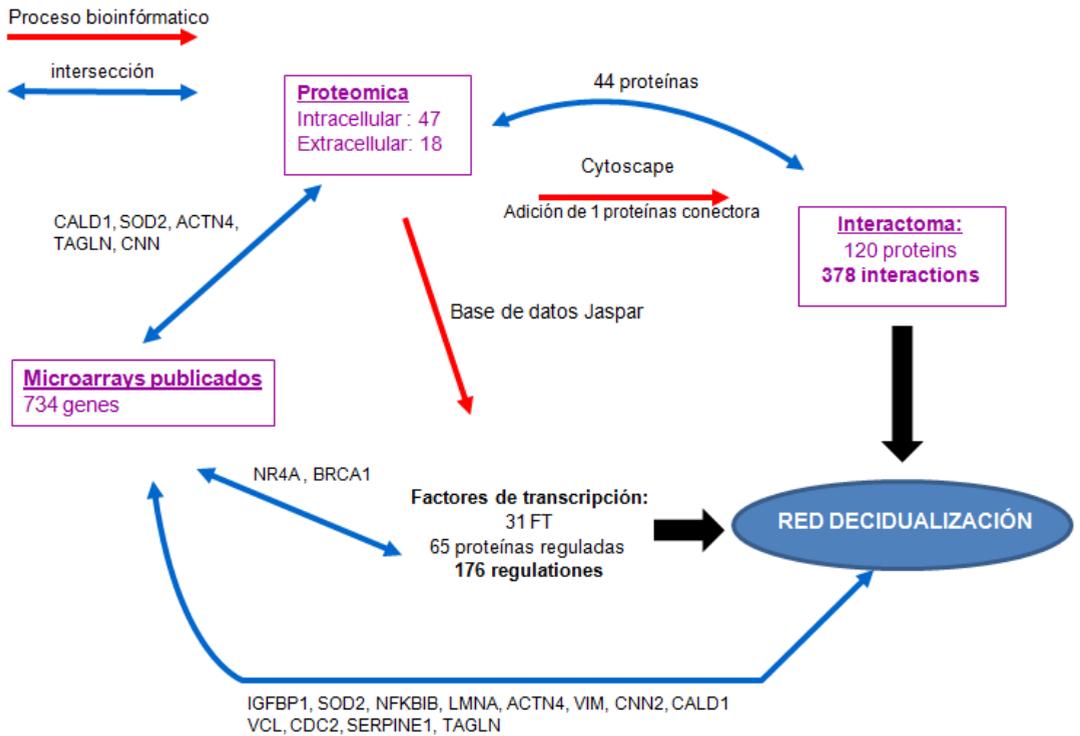


Figura 14. Obtención de la red de decidualización. A partir de los datos proteómicos (intracelular y extracelular) se generó el interactoma empleando el software Cytoscape. Se incorporaron los factores de transcripción que regulan todo este conjunto de proteínas identificados a través de la base de datos Jaspar. Finalmente, los datos de microarrays publicados se cruzaron con los proteómicos dando como resultado un conjunto de genes en los cuales hay intersección.

4.6 Tratamientos para Anexina A2 y RhoA

4.6.1 Inhibición de Annexin A2

Se aplicaron dos tratamientos que implicaban la alteración de ANXA2 a dos niveles:

Silenciamiento de la expresión génica

Se silenció ANXA2 empleando un oligonucleótido ARNi con especificidad para ANXA2 (CGGCCUGAGCGUCCAGAAATT) con una modificación en su extremo 3' que adiciona el fluoróforo AlexaFluor488 (Quiagen CA, USA). El kit de la casa comercial Qiagen también proporcionó un RNA dúplex como control negativo.

Los experimentos de transfección se llevaron a cabo cuando las monocapas de células HEC-1-A y EEC estuvieron al 50-70% de confluencia. Las células HEC-1-A se transfectaron con 25nM de ARNi para ANXA2 o ARNi como control negativo, mientras que las células EEC se transfectaron con 100nM de ARNi para ANXA2 o ARNi como control negativo. La transfección se realizó usando el agente de transfección *Hiperfect* (Qiagen CA, USA). Se diluyó el ARNi en 100 μ L de medio de cultivo sin suero, donde se añadió 3 μ L de *Hiperfect* en el caso de las células HEC-1-A y 4.5 μ L en el caso de las células hEEC. Esta mezcla se vortió y se dejó incubando durante 10 min a temperatura ambiente, para permitir la formación de los complejos de transfección. Finalmente la mezcla se añadió en pequeñas gotas a las células (100 μ L por pocillo de placa de 24). Se movió orbitalmente con suavidad la placa para que los complejos de transfección se distribuyeran homogéneamente. Se incubaron las células con

los complejos de transfección durante 24 horas a 37°C, transcurrido este tiempo se comprobó el silenciamiento mediante RT-PCR y Western Blot.

Alteración a nivel de la actividad

Se empleó la droga Witaferina A (WA) para inhibir la actividad de ANXA2. WA es un componente químico de tipo esteroide que se obtiene a partir de una planta llamada *Withania somnifera* (Lavie y cols., 1965). Para nuestro trabajo empleamos WA ofrecida por la compañía Santa Cruz *Biotechnology* (CA, USA). Se ha reportado que esta droga produce una disrupción en la organización de la F-actina a nivel fisiológico y su acción es dependiente de la expresión de ANXA2 (Falsey y cols., 2006). Las células HEC-1-A y hEEC crecidas en placas de 24 pocillos a una confluencia del 70-80% se trataron con 5µM de Witaferina A durante 24 h a 37°C, y en paralelo se cultivaron células sin el tratamiento como control.

4.6.2 Activación/inactivación de RhoA

Con el fin de activar/inactivar el estado de la proteína RhoA se empleó un set de vectores de expresión pcDNA3-GFP-RhoA proporcionados por la casa comercial *Cell Biolabs* (CA, USA) que incorporaban una copia normal de RhoA como control, y dos mutaciones diferentes, la mutación T19N que produce la inactivación de RhoA y la mutación Q63L que produce la activación de RhoA. Las células HEC-1-A se cultivaron hasta un 50-70% de confluencia y un día antes de la transfección se incubaron en medio de cultivo sin antibióticos. Tras ello, se transfectaron con 0.8 µg de pcDNA3-GFP-RhoA (*Wild-Type*), pcDNA3-GFP-RhoA T19N (mutante dominante negativo) o pcDNA3-GFP-RhoA Q63L (mutante constitutivamente activo) usando como agente de transfección

*Lipofectamine*TM 2000 (Invitrogen, Barcelona, Spain). Siguiendo las indicaciones del fabricante, se adicionaron 2 μ L de *Lipofectamine* para una cantidad de 0.8 μ g de DNA en 100 μ L de medio de cultivo sin antibióticos y se dejaron incubar 15 min para permitir la formación de los complejos de transfección. Finalmente la mezcla se añadió en pequeñas gotas a las células (100 μ L por pocillo de placa de 24). Se movió orbitalmente con suavidad la placa para que los complejos de transfección se distribuyeran homogéneamente. El medio se cambió después de 4-6 horas y transcurridas 24 horas se comprobó la activación/inactivación de RhoA mediante un ensayo *pull-down* y un análisis G-LISA.

La inactivación de la actividad de RhoA también se llevó a cabo empleando la Toxina B de *Clostridium difficile* (Cytoskeleton CO, USA). La Toxina B es una toxina bacteriana que glicosila irreversiblemente a todos los miembros de la familia Rho GTPasa, provocando su inactivación funcional (Genth y cols., 2008). Las células HEC-1-A se trataron con la Toxina B a 500ng/mL durante 1h a 37°C para inactivar la actividad de RhoA.

4.7 Ensayo de adhesión en cocultivo

4.7.1 Obtención de los embriones de ratón

Dichos estudios se llevaron a cabo usando el protocolo aprobado por el Comité de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, en concordancia con las indicaciones para el uso y cuidado de los animales de laboratorio del Instituto Nacional de Salud U.S. La cepa de ratones B6C3F1 se proporcionó por los laboratorios de Charles River (Barcelona, Spain).

Se indujo la ovulación de 40 ratonas con una edad comprendida entre 6-8 semanas mediante la administración de 10 UI de PMSG (gonadotropina de suero de yegua preñada) (Sigma-Aldrich, Irvine, U.K.), 48 horas después se siguió con la administración de 10 UI de hCG (gonadotropina coriónica humana) (Sigma-Aldrich). Las hembras se distribuyeron de dos en dos con un macho semental durante la noche y a la mañana siguiente se examinó la presencia de tapón vaginal (día 1 de embarazo). En día 2 de embarazo, las ratonas se sacrificaron mediante dislocación cervical, y los embriones se extrajeron del oviducto con PBS con ayuda de una aguja de calibre 30 conectada a una jeringa de 2 ml. Los embriones se cultivaron durante 3 días en medio de cultivo CCM-30 (Vitrolife, Lubeck, Germany). Se incluyeron en el estudio sólo aquellos embriones que se habían expandido y con morfología normal (n=400-450 embriones de ratón empleados en total en los diferentes experimentos). Se descartaron aquellos embriones degenerados o con defectos en el fenómeno de expansión. La zona pelúcida en ningún caso se eliminó artificialmente.

4.7.2 Cultivo de los esferoides JEG-3

El uso de embriones humanos está muy restringido debido a los inconvenientes éticos y al alto número de embriones que son necesarios para llevar a cabo los ensayos de adhesión. Como aproximación de un modelo de adhesión embrionaria *in vitro* y debido a los inconvenientes anteriores, se emplean esferoides generados por la línea celular trofoblástica JEG-3, que muestra una morfología y comportamiento similar a un embrión humano.

La línea celular de coriocarcinoma humano JEG-3 fue cultivada en suspensión celular dentro de flasks Erlenmeyer de 25 ml de medio EMEM

suplementado con 10% de FBS y 0,1% de antibiótico, a una concentración de 6×10^5 células/ml en agitación como se describió previamente (Nancy y cols., 1993). El medio se cambió transcurridas 48 h, y los esferoides se recogieron tras 72h después del inicio del cultivo.

4.7.3 Ensayo de adhesión

Mediante un ensayo mecánico se midió la adhesión de los embriones de ratón y los esferoides JEG-3 a las monocapas de células epiteliales endometriales (Shiotani y cols., 1993). Tanto los embriones de ratón como los esferoides JEG-3 se cocultivaron sobre monocapas de células HEC-1-A y hEEC crecidas hasta confluencia (Fig. 15). Transcurridas 24 horas de incubación (37°C, 5% CO₂), se ejerció un movimiento circular sobre las placas de cocultivo de 3 cm de diámetro a una velocidad de rotación de uno por segundo durante aproximadamente 10 segundos. Los embriones que se hallaban flotando en el medio se clasificaron como no adheridos, mientras que aquellos que se mantenían unidos a la monocapa celular se clasificaron como adheridos. Los embriones se examinaron con ayuda de un microscopio invertido (Nikon Diaphot 300; Nikon Corporation, Tokyo, Japan). Se añadieron de 6 a 8 embriones o esferoides JEG-3 en cada pocillo de placas de 24, donde se cultivaron las monocapas confluentes de células HEC-1-A and hEEC. En cada condición dentro de cada experimento teníamos una n de 10-15 embriones de ratón o esferoides JEG-3. Cada experimento de adhesión se repitió tres veces.

4.8 Ensayo de expansión de trofoblasto

Las células HEC-1-A y hEEC se transfectaron con ARNi para ANXA2 o se trataron con WA, como hemos descrito en el apartado 4.6.1. Posteriormente se

co-cultivar en medio fresco con blastocistos de ratón hasta que tuviera lugar la adhesión embrionaria. En aquellos casos donde se habían adherido embriones a las células HEC-1-A y hEEC, se dejaron transcurrir 48 h y se evaluó el área de expansión de 4 trofoblastos sobre células control y 4 trofoblastos sobre células inhibidas para ANXA2. Las imágenes de la expansión se tomaron inmediatamente después de la adhesión y 48 horas después (Fig. 15). El área de expansión medida en pixels, se expresó como valores medios \pm SEM de conjuntos de medidas tomadas por triplicado en tres experimentos independientes.

4.9 Ensayo migración/proliferación celular: “Cierre del surco”

Las células HEC-1-A y hEEC se cultivaron en placas de 24 pocillos crecidas a 70-80% de confluencia y tratadas con inhibidores de ANXA2 (ARNi y Witaferina A) 24 horas antes del ensayo de “cierre del surco”. En cada monocapa se generó un surco o herida con una punta de pipeta estéril de 200 μ L, tras ello se lavó la monocapa con PBS y se incubó con medio fresco. Las placas se marcaron en la parte trasera con ayuda de un rotulador para asegurarnos que las medidas del cierre del surco eran tomadas en los mismos puntos. La anchura del surco se midió inmediatamente tras su realización y transcurridas 24 h mediante un microscopio de contraste de fase (Fig. 15). El cierre del surco se calculó y expresó como el porcentaje respecto a la anchura inicial. Los datos son una representación de la media \pm SEM de diez medidas tomadas a partir de tres experimentos independientes.

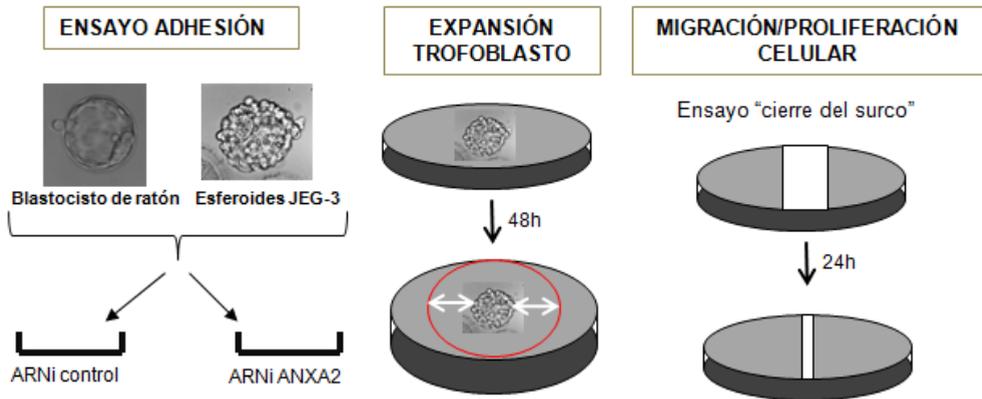


Figura 15. Representación de los ensayos de adhesión, expansión del trofoblasto y migración/proliferación celular. El ensayo de adhesión se realizó usando blastocistos de ratón y esferoides JEG-3 sobre monocapas de células epiteliales HEC-1-A y hEEC. La expansión del trofoblasto se evaluó en aquellos embriones de ratón que se habían adherido, como el área generada una vez transcurrieron 48 h. El ensayo de migración/proliferación celular se realizó midiendo el porcentaje de cierre de surco tras 24 horas de su realización.

4.10 Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa

4.10.1 Aislamiento de ARN

La extracción de ARN total de las muestras se realizó usando el agente Trizol LS (Invitrogen, Barcelona, Spain) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante (protocolo de Chomczynski y Sacchi., 1987). Después del Trizol LS se añadió 0,2 volúmenes de cloroformo por cada volumen de Trizol LS utilizado en origen. Se agitó vigorosamente con ayuda de un vórtex durante 15 segundos y se dejó reposar 2-3 min a temperatura ambiente. Tras

una centrifugación a 12000 r.p.m durante 15 min a 4°C se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se le adicionó 0,5 volúmenes de isopropanol por cada volumen de Trizol LS empleado al inicio. Se dejó precipitar 10 min a temperatura ambiente o durante toda la noche a -20°C y tras otra centrifugación a 12000 r.p.m durante 15 min a 4°C se obtuvo un precipitado de ARN. Este pellet se lavó con etanol al 70% (v/v) en agua DEPC y se volvió a centrifugar por última vez a 7500 r.p.m durante 5 min a 4°C. Finalmente se resuspendió en 15 µL de agua-DEPC.

Terminada la fase de extracción de ARN de cada una de las muestras, se procedió a cuantificar la concentración de ARN total midiendo por espectrofotometría.

4.10.2 Retrotranscripción

Se procedió a retrotranscribir el ARN obtenido a ADN complementario (ADNc) para poder analizarlo por RT-PCR. Para ello se cogió 1 µg de ARN total, y se utilizó el kit *Advantage RT-for-PCR* (Clontech CA, USA) según las instrucciones del fabricante. A cada muestra se le añadió 1 µL de oligo-18-dT y agua-DEPC hasta un volumen final de 13,5 µL y se calentó a 70°C durante 2 min para desnaturalizar las cadenas de ARN y evitar la formación de estructuras secundarias de las mismas. Después de esos 2 min se añadió a cada tubo 6,5 µL de la mezcla de reacción que contenía: 4 µL de tampón de reacción 5X, 1 µL de dNTP mix (10mM cada uno), 0,5 µL de inhibidor recombinante de ARNasa y 1 µL de la transcriptasa reversa MMLV (*Moloney- Murine Leucemia Virus*). Completados los 20 µL de volumen final se procedió a llevar a cabo la reacción de retro-transcripción (RT). Las muestras se incubaron durante 1 hora a 42°C y

al final 5 min a 94°C para detener la reacción y destruir la actividad ADNasa. El producto final se diluyó hasta un volumen total de 100 µL con agua-DEPC y se almacenó a 4°C hasta su análisis por PCR.

4.10.3 RT-PCR

La RT-PCR en tiempo real (*real time PCR*) es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN). Para ello emplea, un molde de ADN, en nuestro caso ADN complementario fruto de la retrotranscripción, un par de cebadores específicos (Tabla 3), Cl₂Mg, y *SYBR Green* para RT-PCR (Roche) que contiene *Taq ADN Polimerasa FastStart* y un fluoróforo *SYBR Green I* específico de DNA de doble cadena para la detección del producto de reacción.

Se utilizó un termociclador *Light Cycler 480* (Roche), que alberga sensores para medir fluorescencia que tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación del productos de PCR.

Para contrarrestar la variabilidad que se introduce en la cuantificación y que conlleva a un error en la estima se han desarrollado numerosos sistemas de estandarización. La forma más común, se orienta a la cuantificación relativa del gen de estudio respecto de otro, denominado “normalizador” (*house-keeping*), que se selecciona debido a su expresión casi constante. Nosotros hemos utilizado GAPDH como gen normalizador. Este gen está involucrado en funciones básicas en la supervivencia celular, lo cual suele implicar una expresión constitutiva. De este modo, efectuando en cada experimento la

medición de los genes de interés y dividiéndolos por la expresión del gen normalizador seleccionado es posible comparar los primeros aún sin conocer en términos absolutos su nivel de expresión.

La PCR cuantitativa se realiza en un termociclador con capacidad de hacer incidir sobre cada muestra un haz de luz de una longitud de onda determinada y de detectar la fluorescencia emitida por el fluorocromo excitado. Este termociclador es un aparato con capacidad para calentar y enfriar rápidamente las muestras, de modo que se aprovechen las cualidades fisicoquímicas de los ácidos nucleicos y las enzimáticas de la ADN polimerasa.

El proceso de PCR consistió en una serie de cambios de temperatura que se repiten 40 veces, llamados ciclos, donde cada uno posee tres etapas: desnaturalización en torno a los 95 °C, permite la separación de los ácidos nucleicos de doble cadena; anidamiento, a una temperatura variable (en nuestro caso 59 °C), que permite el alineamiento de los cebadores al ADN molde; extensión, a 72 °C, que facilita la polimerización por parte de la ADN polimerasa.

Los transcritos se cuantificaron usando su correspondiente curva estándar, usando GAPDH como control interno. Cada experimento se realizó tres veces con cada muestra por triplicado.

Se usaron los siguientes cebadores específicos para cada gen están especificados en la tabla 4:

Gen	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
ANXA2	TGTGCAAGCTCAGCTTGA	AGGTGTCTTCAATAGGCCAA
RhoA	GCTTGCTCATAGTCTCAGCA	TCCTTCTTATCCCAACCAGGA
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC

Tabla 4. Tabla donde se representan los cebadores específicos usados para los genes utilizados en nuestros estudios.

4.11 Análisis de proteínas

4.11.1 Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se hizo directamente partiendo de un fragmento de biopsia de endometrio total y a partir de células epiteliales endometriales (hEEC o HEC-1-A). En ambos casos, biopsia o células se lavaron con PBS frío y tras su disgregación mecánica se adicionó el tampón de lisis entre 20-100 μ l según la cantidad de células (aproximadamente 50 μ l por cada 800.000 células). El tampón de lisis estaba formado por: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL CA 360, 0.5% Na-DOC, 0.1% SDS and 0.5M EDTA. Se dejó actuar durante 20 min en hielo. Transcurrido este tiempo las muestras se centrifugaron a 12000 r.p.m a 4°C durante 15 min. Se tomó el sobrenadante celular donde se hallaba resuspendido el extracto proteico.

4.11.2 Cuantificación

La cuantificación se llevó a cabo usando el método Bradford. Este método se basó en la unión de un colorante, Comassie Blue G-250 (BioRad, UK) a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas, una azul y

otra naranja. Las proteínas se unieron a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Con ayuda de un espectrofotómetro se midió la absorbancia a 280 nm, longitud de onda a la que absorben las proteínas. Para determinar la concentración de proteína total presente en la muestra se preparó una curva de calibrado empleando una proteína patrón, llamada seroalbúmina bovina.

4.11.3 Western blot

En primer lugar, entre 20-60 μ g de cada extracto proteico se mezcló con tampón *Laemmli* (Bio-Rad, UK) con 8% de β -mercaptoetanol y se desnaturalizó a 95°C durante 5 min. La electroforesis que se utilizó es conocida como SDS-PAGE, hace uso de gel de poliacrilamida y de tampón con dodecilsulfato (SDS). En esta técnica las proteínas sufren un tratamiento por agentes reductores que provocan la pérdida de las estructuras secundaria y terciaria (por ejemplo, reduciendo los puentes disulfuro (S-S) a grupos tiol (SH + SH)) y mantiene los polipéptidos en este estado desnaturalizado. De este modo, la estructura tridimensional de las proteínas no influye en la electroforesis, y pueden separarse únicamente en función del tamaño. Los extractos proteicos se separaron por electroforesis discontinua (gel apilamiento de poliacrilamida al 4% y gel resolutivo de poliacrilamida al 10-12%) durante 1 h a 180V.

A continuación, las proteínas se transfirieron desde el gel de poliacrilamida a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Amersham Biosciences, NJ, USA) para que las proteínas sean accesibles a la detección por anticuerpos. Esta transferencia se realizó por acción de un campo eléctrico (electrotransferencia húmeda), usando el tampón de transferencia

Tris/Glicina (Bio-Rad, UK). Las condiciones de transferencia fueron 160 V durante 4 h a 4°C con agitación.

Tras el paso de transferencia, se procedió a bloquear la membrana con leche desnatada en polvo al 5% en PBS y 0,1% de detergente *Tween* para saturar todos los lugares de unión de proteínas de la membrana no ocupados para evitar la unión no específica de anticuerpos. Posteriormente, las membranas se incubaron a 4°C durante la noche con diferentes anticuerpos primarios a concentración adecuada: 4 mg/ml de Anti-Estatmina 1 monoclonal de conejo (Abcam, Cambridge, UK), 1 mg/ml de Anti-Anexina A2 policlonal de cabra (Affinity BioReagents, Golden, CO), 2,5 µg/ml Anti-Transgelina monoclonal de ratón, 2 µg/ml Anti- α -Actinina monoclonal de ratón (Abcam, Cambridge, UK), 2 µg/ml Anti-Transglutaminasa 2 monoclonal de ratón (Abcam, Cambridge, UK), 0.25 µg/ml Anti-Catepsina B monoclonal de ratón (Abcam, Cambridge, UK), 1/1000 Anti-RhoA monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology), 1/1000 Anti-Annexin II policlonal de conejo (Abcam, Cambridge, UK) y 1/2000 GAPDH monoclonal de ratón (Abcam, Cambridge, UK) diluidos en leche desnatada en polvo al 3% en PBS. Luego las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios anti-ratón, anti-conejo y anti-cabra conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) (Santa Cruz, CA, USA) a una dilución de 1:2000 en leche desnatada en polvo al 3%. Los complejos antígeno-anticuerpo se revelaron con el sistema de análisis *ECL Plus reagent* (Amersham Biosciences, CT, USA), fotografiadas usando el aparato Fujifilm LAS-3000 y el subsecuente análisis de las bandas se realizó por densitometría con el programa *Fujifilm Multi Gauge* versión 3.0.

4.12 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Pequeños fragmentos de biopsias endometriales fijados en formol al 4% y embebidos en parafina se seccionaron y se montaron en portaobjetos de cristal recubiertos con *Vectabond TM* (Vector Lab, Burlingame, CA, USA). Tras la desparafinización y rehidratación con etanol, las secciones se lavaron tres veces con PBS durante 5 min. La inmunohistoquímica sobre las secciones endometriales se realizó usando el kit *LSAB Peroxidase* (DAKO, CA, USA). Para la unión no específica de anticuerpos se bloqueó con albumina de suero bovino (BSA) al 5%. Las secciones se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos: 6 mg/ml Anti-Anexina A2 policlonal de cabra (Affinity BioReagents, Golden, CO, USA), 4 mg/ml Anti-Estatmin 1 monoclonal de conejo (Abcam, Cambridge, UK), 1/100 Anti-Anexina II policlonal de conejo (Abcam, Cambridge, UK) y 1/100 Anti-RhoA monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) diluidos en PBS con 3% de BSA. Los controles negativos de la técnica se incubaron únicamente en PBS con 3% de BSA y en ausencia de anticuerpos. También se incluyeron controles de tejido para las proteínas Anexina A2 (piel como control positivo y testículo como control negativo) y para Estatmina 1 (testículo como control positivo e hígado como control negativo). Los anticuerpos secundarios utilizados se aportaron por el kit *LSAB Peroxidase* (DAKO, CA, USA) y eran válidos para ratón, conejo y cabra, especies donde estaban obtenidos nuestros anticuerpos primarios. El marcaje se obtuvo con el cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) aplicado durante 30 segundos. Tras ello, se aplicó una contratinción con hematoxilina durante 10 s y se lavó con agua destilada. Finalmente los portaobjetos se montaron con un cubreobjetos con ayuda de pegamento *entellan* (Merck, Darmstadt Germany) y se visualizaron al microscopio.

Las células epiteliales endometriales, HEC-1-A y hECC, se cultivaron en placas de plástico hasta una confluencia del 30-40%. A continuación, se fijaron con bajas concentraciones de paraformaldehído al 2-3% para minimizar los efectos del enmascaramiento de antígeno y se bloquearon con BSA al 5% en PBS durante 1 h. Seguidamente se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos primarios: 1/100 anti-Anexina II humana policlonal de conejo (Abcam, Cambridge, UK) y 1/100 anti-RhoA humano monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) diluidos al 3% de BSA en PBS. Después, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios: 1/1000 de anti-conejo Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Barcelona, Spain), 1/1000 anti-ratón Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Barcelona, Spain) y 0.1 µg/mL de Faloidina-tetrametilrodamina B isotiocianato conjugado, obtenido a partir de *Amanita Phalloides* (Sigma Aldrich, USA). Esta incubación duró 30 min y se llevó a cabo a temperatura ambiente y en oscuridad. Las imágenes de fluorescencia se tomaron con un microscopio confocal *Nikon microscope* equipado con un objetivo de apertura numérica 100× 1.45 y con un disco rotatorio confocal *Yokogawa* (PerkinElmer).

Se usaron tres preparaciones diferentes de células o tejidos para analizar y valorar las señales por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia.

4.13 Análisis ELISA

El medio condicionado de las células control y deciduizadas se evaluó usando kits comerciales de ELISA para IGFBP-1, MPlF-1, IL-6, MCP-3 (Raybiotech), y IL1R-II (Hycult biotech), siguiendo las indicaciones del fabricante. Este ensayo se basa en la presencia de un anticuerpo específico para

la proteína que queremos detectar, adherido a una placa de 96 pocillos. Tanto el estándar como las muestras se pipetearon en el interior de los pocillos y la proteína a identificar presente en la muestra se unió a los pocillos, gracias a la presencia de los anticuerpos inmovilizados en el plástico. Los pocillos se lavaron y se añadió un anticuerpo biotinilado que reaccionaba frente a la proteína a identificar. Tras el lavado de los anticuerpos no unidos, se añadió estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP). Finalmente los pocillos se incubaron con una solución de sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y se desarrolló color de forma proporcional a la cantidad de la proteína a identificar presente en la muestra. La reacción se detuvo con un tampón de parada produciéndose un viraje del color azul a amarillo, y dicha intensidad de color se midió a 450 nm. Cada muestra se analizó por duplicado y los valores se calcularon en pg/mL, determinados a partir de las curvas estándar proporcionadas por el kit.

4.14 Ensayo para medir la actividad de RhoA

Se usaron dos metodologías a la hora de medir la cantidad de RhoA activo, es decir, RhoA unido a GTP.

4.14.1 Ensayo *Pull-down* de RhoA-GTP

Se utilizó un kit donde se realizaba un ensayo *pull-down* (Cytoskeleton, CO, USA) para la detección de RhoA activo, siguiendo las indicaciones del fabricante. El ensayo *pull-down* es un método usado *in vitro* para determinar la interacción física entre dos proteínas. En este ensayo se empleó un dominio de unión a RhoA (RBD) presente en rhotekin, que es una proteína efectora de RhoA. Se ha demostrado que esta proteína a través del dominio RBD se une

específicamente a RhoA, cuando este se encuentra en estado activo unido a GTP. La proteína Rhotekin-RBD además contiene una secuencia de 7-89 aminoácidos de Glutathion *S*-transferasa (GST) expresada como fusión en *Escherichia coli*. El resultado es una proteína recombinante etiquetada con GST en el extremo N-terminal y unida a bolas de sefarosa glutathion coloreadas.

El protocolo se inició a partir de un extracto de 300-800 µg de proteína al que se le adicionaron 50 µg de bolas rhotekin-RBD y se dejó incubar durante 1 h a 4°C en rotación. Tras centrifugar a 5000 g durante 1 min a 4°C, el pellet se lavó con 500 µL de tampón de lavado y finalmente se resuspendió con 20 µL de tampón *Laemmli*. Tras ello, la cantidad de RhoA-GTP activo unido con las bolas rhotekin-RBD se determinó mediante western blot.

4.14.2 Ensayo para la detección de RhoA activo por G-LISA™

Se utilizó un kit donde se realizaba un ensayo G-LISA (Cytoskeleton, CO, USA) para la detección de RhoA activo siguiendo las indicaciones del fabricante. Este ensayo usaba proteína de unión a Rho-GTP adherida a los pocillos de una placa de 96, de este modo las moléculas de RhoA activo presente en el extracto proteico permanecieron adheridas, mientras que las moléculas de RhoA inactivo unido a GDP se eliminaron en los pasos de lavado.

El protocolo consistió en incubar 25 µg de extracto proteico junto con tampón de unión aportado por el kit (50 µL totales), en los pocillos de la placa G-LISA. Cada muestra se incubó por duplicado durante 30 min a 4°C en agitación. Transcurrido este tiempo, se incubó con 200 µL de tampón para presentación de antígenos durante 2 min a temperatura ambiente. A continuación, se detectó la cantidad de RhoA activo unido añadiendo 50 µL de

anticuerpo primario anti-RhoA a temperatura ambiente durante 45 min. Después de los lavados, se añadió 50 µL de anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano (HRP) a temperatura ambiente durante 45 min. Finalmente, se añadió sustrato de detección de HRP durante 15 min a 37°C, tras ello se detuvo la reacción con solución de parada y se midió la absorbancia a 490 nm.

4.15 Ensayo para medir F-actin/G-actin *in vivo*

Mediante el kit para el ensayo G-actin/F-actin *in vivo* (Cytoskeleton, CO, USA) se midió la cantidad de actina monomérica globular libre (G-actina) respecto a la cantidad de actina filamentosa (F-actina). Las células se homogeneizaron en tampón de estabilización de F-actina, incubadas a 37°C durante 10 min. Tras ello, los lisados celulares se clarificaron para eliminar restos celulares mediante centrifugación a baja velocidad (2000 rpm). El sobrenadante celular se centrifugó a 100.000 g con el fin de separar la G-actina globular soluble de la F-actina filamentosa insoluble. En el sobrenadante resultante se encontraba presente la G-actina, mientras que en el pellet permaneció la actina insoluble. El pellet se resuspendió con agua mili-Q y 1/100 de agente despolimerizante de F-actina, y se dejó a actuar en hielo durante 1 h. Finalmente ambas fracciones: actina globular y filamentosa se analizaron por Western Blot usando el anticuerpo anti-actina a una dilución 1/500 (Cytoskeleton, CO, USA). La cuantificación por densitometría determinó el ratio entre la actina globular hallada libre en el citosol en comparación con la actina filamentosa incorporada en el citosqueleto, todo ello normalizado con la cantidad total de actina.

4.16 Estadística

Los datos se calcularon como valores medios \pm error estándar de la media (Media \pm SEM) con un valor n que denotó el número de experimentos realizados. Los datos se analizaron usando test de la t-student (t-test) o el test de Mann-Whitney (U-test), según los datos presentasen una distribución paramétrica o no paramétrica, para analizar las diferencias globales entre los grupos comparados. La significancia estadística se definió con un p-valor \leq 0.05. (*p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Proteómica de la receptividad endometrial

5.1.1. Análisis proteómico del endometrio receptivo comparado con pre-receptivo mediante DIGE e identificación por MALDI-MS.

Se evaluó la expresión de proteínas entre el endometrio en fase pre-receptiva (LH+2) y receptiva (LH+7) mediante proteómica basada en la tecnología DIGE. Para ello se llevaron a cabo dos experimentos DIGE independientes basados en conjuntos de muestras diferentes. El primer experimento incluyó 10 muestras 5 LH+2 y 5 LH+7 (procedentes de 5 donantes), mientras que el segundo incluyó 6 muestras adicionales, 3 LH+2 y 3 LH+7 (procedentes de 3 donantes). Se marcaron los extractos de proteínas con los fluoróforos Cy3 o Cy5 alternados para evitar el posible sesgo de marcaje debido a las propiedades de fluorescencia de los geles en diferentes longitudes de onda. Cada uno de los 8 geles se corrió con cada pareja de muestras marcadas Cy3/Cy5 y junto con el estándar interno marcado con Cy2. Después de la electroforesis bidimensional (2-DE), se obtuvieron las imágenes individuales de cada gel para los tres canales: Cy3, Cy5 y Cy2.

En el primer experimento DIGE, se seleccionaron tres de los cinco geles, ya que tenían una mayor calidad para evitar la disminución de la potencia estadística. Uno de estos geles se eliminó porque presentaba una baja resolución en la región alcalina y cuando se incluyó en el análisis con el programa informático DeCyder el número de *spots* presentes en los geles

reconocidos por el programa descendía desde 1800 a 600. El otro gel se descartó porque el análisis de componentes principales (PCA) resultó atípico, lo cual se correspondía con una muestra con alto nivel de contaminación sanguínea. En el segundo caso sin embargo, si se incluyeron los tres geles que constituían el experimento.

La detección de los *spots* se llevó a cabo con el módulo DIA del programa informático DeCyder™ permitiendo una detección de 2.500 *spots* en cada gel (Fig. 16).

Se analizó la expresión diferencial de estas proteínas en las dos condiciones: endometrio pre-receptivo y receptivo. Aquellas proteínas que presentaban una expresión diferencial significativa ($p \leq 0.05$) se escindieron a partir de los geles teñidos con plata y se sometieron a digestión con tripsina. Para la identificación de estas proteínas se usó el sistema MALDI-TOF/TOF, del cual se obtuvo la huella peptídica o la huella de fragmentación peptídica, seguido de una búsqueda en la base de datos Mascot (Tabla 5).

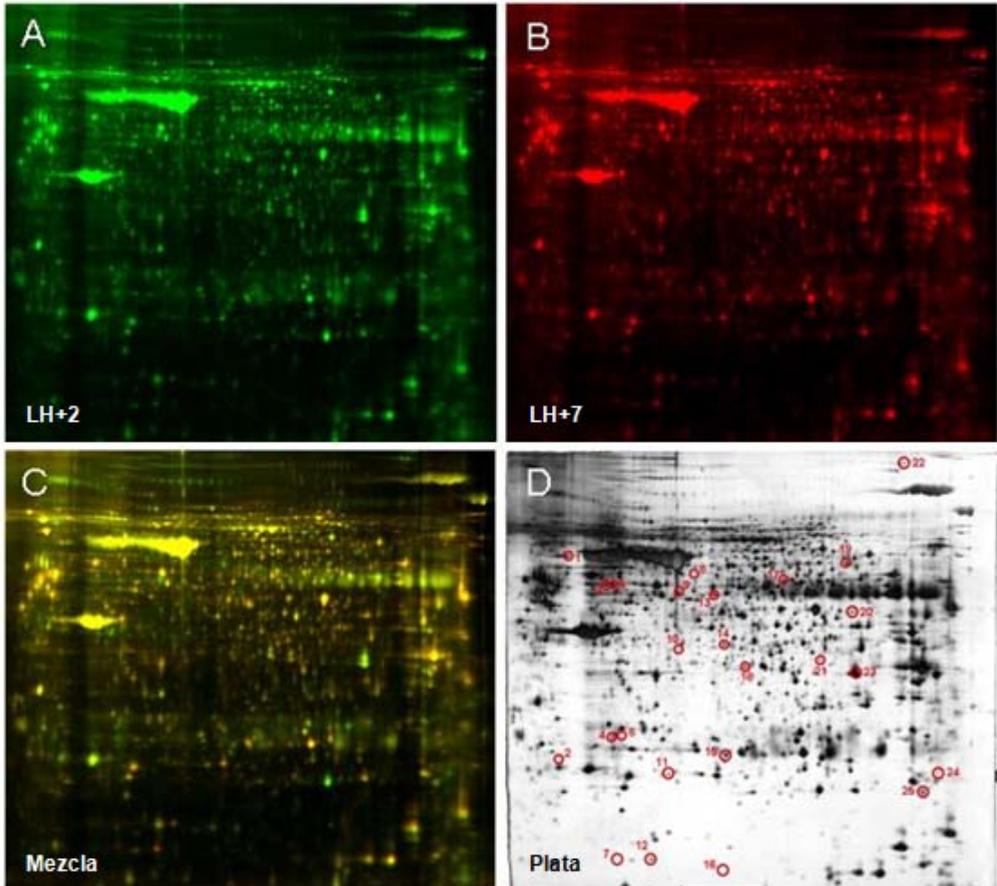


Figura. 16 Geles 2D-DIGE. Extractos proteicos de muestras endometriales LH+2, LH+7 y el estándar interno se marcaron con los fluoróforos Cy3, Cy5 y Cy2, se mezclaron y se separaron mediante electroforesis bidimensional. Para la primera dimensión, se usaron tiras de acrilamida de 24 cm y con un rango de pH de 3-11 NL y para la segunda dimensión se empleó un gel SDS-PAGE de acrilamida al 10%. Los geles se escanearon obteniéndose imágenes para las proteínas (A) LH+7 (Cy3, verde) y (B) LH+2 (Cy5, rojo). (C) Superposición de los dos fluoróforos Cy3 y Cy5. (D) Tinción de plata del gel anterior tras el escaneado de fluorescencia.

Spot ^a	P-valor ^b	Tasa de cambio ^c	Código de acceso ^d	Descripción de la proteína	Puntuación Mascot ^e	MW/pi teórica ^f	Péptido analizados ^g	Cobertura de secuencia % ^h	Función de la proteína ⁱ
1	9.80E-04	-2.5	IBA2_HUMAN	Ionized calcium binding adapter molecule 2 isoform 1	115	17.1/6.6	2	18	Protein binding
2	1.10E-03	-2.6	STMN1_HUMAN	Stathmin (Phosphoprotein p19) (pp19) (Oncoprotein 18)	249	17.3/5.8	7	36	Cytoskeleton, intracellular signaling cascade
3	8.72E-04	-1.6	STMN1_HUMAN	Stathmin (Phosphoprotein p19) (pp19) (Oncoprotein 18)^k	118	17.3/5.8	3	18	Cytoskeleton, intracellular signaling cascade
4	8.72E-04	-1.4	SYDC_HUMAN	Apartyl-tRNA synthetase	424	57.5/6.1	19	41	Translation process
5	1.01E-03	1.5	PARK7_HUMAN	DJ-1 Protein	136	20.1/6.3	2	10	Ras protein signal transduction
6	7.33E-04	1.5	PCOC1_HUMAN	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	213	48.8/7.4	12	30	Cytoskeleton
7	9.80E-04	1.5	ANXA2_HUMAN	Annexin A2	117	38.8/7.6	3	9	Skeletal development
8	6.53E-04	1.6	Q59GX5_HUMAN	L-plastin	137	56.2/5.2	1	3	Cytoskeleton
9	7.33E-04	1.7	CATB_HUMAN	Liver Cathepsin B, Chain B	174	23.0/5.2	3	18	Proteolysis, regulation of apoptosis
10	9.80E-04	1.7	TAGL2_HUMAN	Transgelin 2	155	21.2/7.6	8	44	Protein binding, development
11	8.54E-04	1.7	APOH_HUMAN	Apolipoprotein H	103	36.7/8.3	2	7	Cholesterol metabolism
12	6.53E-04	1.8	ALIA3_HUMAN	Aldehyde dehydrogenase 1A3	82	56.9/7.0	1	2	Metabolic process
13	7.33E-04	2.0	TPIS_HUMAN	Chain A, Triosephosphate isomerase	238	26.8/6.5	12	42	Metabolism of small molecules
14	9.65E-04	2.1	EIQBL_HUMAN	Translation initiation factor eIF-2B	121	39.5/5.9	2	8	Translation initiation
15	1.06E-03	2.5	ALBU_HUMAN	Albumin, isoform 2, fragment	198	23.2/8.2	4	18	Transport
16	8.72E-04	2.8	ANXA2_HUMAN	Annexin A2	388	38.8/7.6	15	43	Skeletal development
17	9.80E-04	3.4	AOFA_HUMAN	Monamine oxidase A	97	60.2/7.9	1	2	Electron transport
18	8.72E-04	3.7	APOL2_HUMAN	Apolipoprotein L2	165	37.1/6.3	4	14	Cholesterol metabolism
19	1.74E-02	-2.4	PGIC1_HUMAN	Membrane-associated progesterone receptor component 1	148	21.8/4.6	2	7	Signaling
20	2.53E-02	-2.2	STMN1_HUMAN	Stathmin (Phosphoprotein p19) (pp19) (Oncoprotein 18)	219	17.3/5.8	4	18	Cytoskeleton, intracellular signaling cascade
21	2.55E-03	-1.8	FI3A_HUMAN	Coagulation factor XIII A	374	83.7/5.8	17	27	Coagulation
22	1.90E-02	-1.7	SERPH_HUMAN	Serpin H1 precursor	156	46.5/8.8	8	32	Response to unfolded protein
23	3.34E-02	-1.5	VIME_HUMAN	Vimentin	766	53.7/5.1	23	52	Cytoskeleton
24	1.05E-02	-1.4	HNR1L1_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1	160	96.3/6.5	11	19	RNA processing, response to virus
25	1.51E-02	-1.3	PPIB_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	475	22.8/9.3	17	56	Protein synthesis
26	1.23E-02	-1.3	RSSA_HUMAN	40S ribosomal protein SA (p40)	280	33.0/4.8	9	35	Cell adhesion
27	6.87E-04	1.5	TPM3_HUMAN	Tropomyosin-alpha 3	132	32.9/4.7	8	33	Cytoskeleton
28	2.10E-03	1.5	RUVB2_HUMAN	RuvB-like 2	253	51.3/5.5	9	20	Regulation of transcription, cell proliferation
29	2.26E-02	1.6	CO6A1_HUMAN	Collagen alpha-1(VI)	255	109.6/5.3	15	15	Skeletal development
	2.26E-02	1.6	HYOU1_HUMAN	Hypoxia up-regulated protein 1	188	111.5/5.2	10	11	Response to stress
30	2.20E-02	1.6	RUXG_HUMAN	Small nuclear ribonucleoprotein G	130	8.5/9.0	2	17	Spliceosome assembly
31	1.52E-03	1.9	ANXA4_HUMAN	Annexin A4	168	36.1/5.8	10	35	Signal transduction
32	1.10E-02	2.1	K1C19_HUMAN	Cytokeratin-19	292	44.1/5	17	43	Response to estrogen stimulus
33	5.10E-03	2.1	ANXA2_HUMAN	Annexin A2	250	38.8/7.6	14	38	Skeletal development
34	2.26E-02	2.2	SSRD_HUMAN	Translocon-associated protein subunit delta	250	19.2/5.8	7	41	Transport
35	2.10E-02	4.8	S10AA_HUMAN	Protein S100-A10	130	11.3/6.8	3	31	Signal transduction

Tabla 5. Proteínas que presentan cambios significativos entre el estado receptivo (LH+7) y pre-receptivo (LH+2), identificadas por MALDI-TOF/TOF. ^aNúmero de spot, que coincide con el que aparece en el gel de plata de la figura 16D (spots del 1-18). ^bP-valor obtenido al aplicar el test de la t. ^cTasa de cambio (LH+7/LH+2) calculado a partir del análisis *DeCyder*. ^dCódigo de acceso de la proteína a partir de la base de datos *SwissProt*. ^ePuntuación Mascot. ^fPeso molecular (MW) y punto isoeléctrico (pI) teórico, ^gnúmero de péptidos analizados, ^hcobertura de secuencia para el candidato de secuencia proporcionado por Mascot. ⁱFunción biológica proporcionada por *SwissProt*. ^kFosforilación demostrada mediante MALDI-TOF/TOF.

Comparando a nivel proteómico el endometrio pre-receptivo con el receptivo se identificaron un total de 35 *spots* con niveles de expresión diferencial significativo, de los cuales se identificaron 32 proteínas diferenciales: 12 reguladas al alza y 23 reguladas a la baja. Los conjuntos de proteínas encontrados como diferencialmente expresados en los dos experimentos realizados fueron diferentes probablemente debido a la variabilidad entre experimentos y entre pacientes, a excepción de dos proteínas que se encontraron desreguladas en ambos casos: anexina A2 (*spots* 7, 16 y 33, regulada al alza en el endometrio receptivo) y estatmina 1 (*spots* 2, 3 y 20, regulado a la baja en el endometrio receptivo).

Además, se encontró una isoforma adicional de la proteína estatmina con una fosforilación en la serina 25 también regulada a la baja en el endometrio receptivo. La figura 17 muestra en detalle el espectro de fragmentación MALDI-TOF/TOF de esta proteína fosforilada obtenido a partir del ión parental procedente del *spot* 7 que tenía una masa de 1468,7 (m/z).

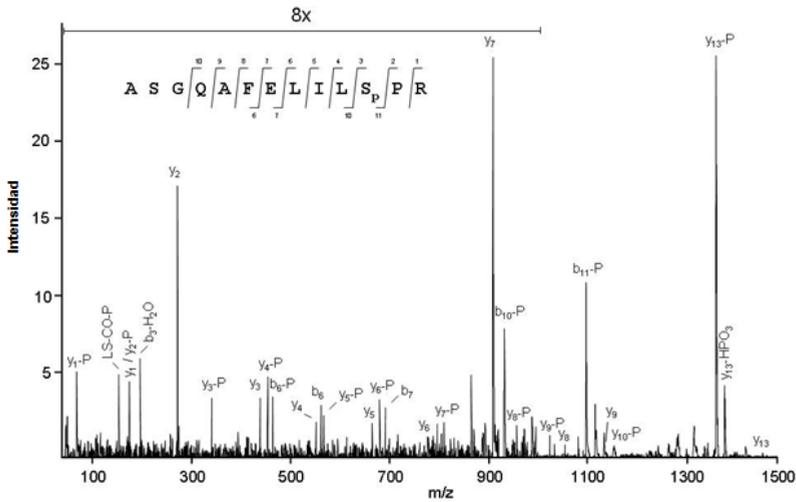


Figura. 17 Espectro MALDI-TOF/TOF obtenido a partir del ión precursor con $m/z = 1468,70$. El ión precursor de $m/z = 1468,70$ se seleccionó a partir del espectro de masa correspondiente al *spot* número 7 para llevar a cabo un análisis de los fragmentos peptídicos. Se muestra la secuencia de las principales series de fragmentación, y (serie C-terminal) y b (serie N-terminal). Los fragmentos iónicos con una pérdida neutral de $H_3 PO_4$ (-98 unidades de masa atómica) producidos a partir de la fosforilación de serina son marcados por "-P", y los fragmentos internos identificados son marcados con su secuencia aminoácida. Otras pérdidas adicionales también se han indicado. Para mayor claridad, la región de intensidad comprendida entre 50-950 m/z se aumentó ocho veces.

5.1.2. Validación del análisis proteómico del endometrio receptivo comparado con pre-receptivo mediante DIGE e identificación por MALDI-MS.

Con el fin de validar los resultados obtenidos al aplicar las técnicas proteómicas se analizó la expresión de estatmina 1 y anexina A2 mediante Western blot en 6 de las 12 muestras usadas en el experimento DIGE (tres donantes). La validación en las tecnologías “ómicas” resulta fundamental, ya que el estudio de las proteínas a gran escala puede incorporar muchos errores y se requiere del uso de técnicas tradicionales para verificar los resultados.

Las bandas que se visualizan como resultado del Western blot presentan una regulación similar a lo obtenido en el análisis DIGE (Figura 18A). Es decir, vemos como estatmina 1 tiene mayor expresión en el endometrio en estado pre-receptivo tal como ocurría en el análisis DIGE, en el cual tenía una tasa de disminución de -2.6 respecto al endometrio receptivo. En contraposición, anexina A2 presenta su mayor expresión en el endometrio en estado receptivo, coincidiendo con su tasa de aumento de 2.8 respecto a esta fase.

Además se analizaron 8 biopsias de ciclo natural adicionales obtenidas a partir de diferentes mujeres (4 biopsias en fase pre-receptiva y 4 en receptiva) y se comprobó por Western blot que la regulación al alza y a la baja de estas proteínas también se daba fuera del conjunto de muestras usadas en el DIGE (Figura 18B). La proteína GAPDH se usó como control para normalizar la abundancia de proteínas en todos los experimentos Western blot realizados.

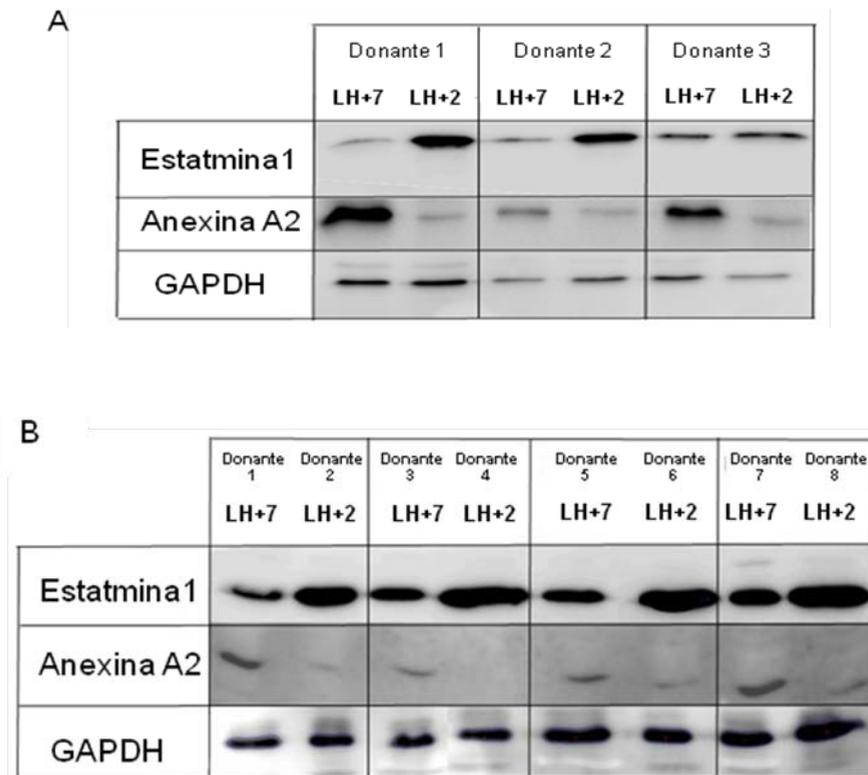


Figura. 18 Validación mediante Western blot de estatmina 1 y anexina A2 en el endometrio humano pre-receptivo y receptivo. (A) Estatmina 1 y anexina A2 se analizaron por Western blot en 6 de las 12 muestras endometriales empleadas en el estudio DIGE (tres donantes). (B) Estatmina 1 y anexina A2 se analizaron por Western blot en ocho muestras endometriales obtenidas a partir de ocho donantes diferentes, para testar la significación biológica fuera del set de muestras analizadas por proteómica.

5.1.3. Inmunolocalización de estatmina 1 y anexina A2 en el endometrio pre-receptivo y receptivo.

Estatmina 1 y anexina A2 son las dos proteínas reguladas de forma consistente en los dos experimentos DIGE realizados entre endometrio pre-receptivo y receptivo. Se trata de dos proteínas importantes en la reorganización del citoesqueleto, y por ello nos planteamos localizarlas en el endometrio humano en fase pre-receptiva (LH+2) y receptiva (LH+7) (Fig. 19).

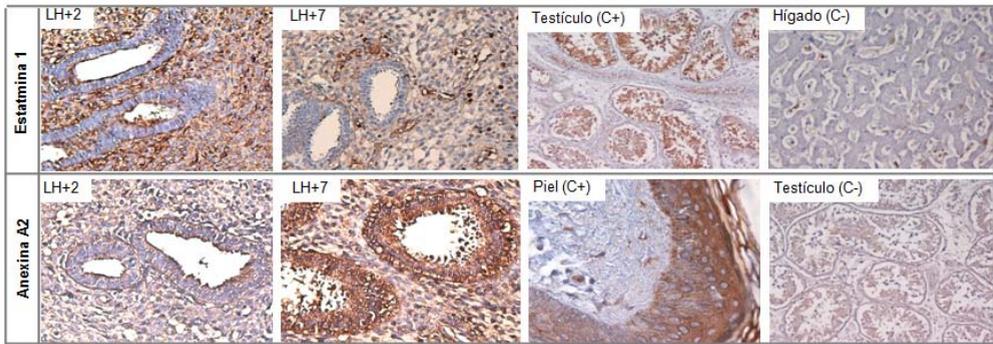


Figura. 19 Inmunohistoquímica de estatmina 1 y anexina A2 en el endometrio humano pre-receptivo y receptivo. El marcaje de estatmina en el endometrio pre-receptivo (LH+2) mostró una elevada intensidad, mientras que resultó prácticamente ausente en el endometrio receptivo (LH+7). El testículo se usó como control positivo (C+), y el hígado se usó como control negativo (C-). Anexina A2 presentó un marcaje muy leve en el endometrio pre-receptivo (LH+2) comparado con el fuerte marcaje observado en el endometrio receptivo (LH+7). La epidermis se empleó como control positivo (C+), mientras el testículo fue el tejido control negativo (C-). Se analizaron 3 muestras de cada condición (n total= 24 muestras).

Anexina A2 presentaba un marcaje muy débil en el endometrio pre-receptivo, únicamente presente en algunas células estromales y en la parte apical de las glándulas endometriales, sin embargo el marcaje fue muy intenso en el endometrio receptivo con mayor intensidad en las glándulas endometriales. Estatmina 1 presentó un patrón de inmunoreactividad opuesto, se localizó mayoritariamente en las células estromales y en la superficie apical de las glándulas endometriales con una intensidad mucho mayor en el endometrio en fase pre-receptiva comparado con el endometrio en fase receptiva.

5.1.4. Modelo de endometrio humano refractario para testar la relevancia funcional de estatmina 1 y anexina A2.

Para evaluar la posible relevancia funcional de estatmina 1 y anexina A2 en la receptividad endometrial, se utilizó un modelo de endometrio refractario inducido por la inserción de un dispositivo intrauterino (DIU). Con este fin se analizaron por inmunohistoquímica tres muestras procedentes de tres pacientes diferentes (n=9) obtenidas en la fase receptiva del endometrio (LH+7) en un ciclo previo a la inserción del DIU, en presencia del DIU, y tres meses después de su retirada (Fig. 20).

Antes de la inserción del DIU, estatmina 1 mostraba el mismo patrón descrito en el endometrio receptivo, con una débil señal únicamente en las glándulas endometriales. Aunque, cuando se introdujo el DIU, el marcaje se observó mucho más intenso a nivel del estroma y las glándulas endometriales, semejante a lo que ocurría en el endometrio en fase pre-receptiva. Tres meses después de la retirada del DIU el endometrio recuperó el patrón de inmunoreactividad característico del endometrio en fase receptiva.

Nuestros resultados para anexina A2 demostraron que se expresaba intensamente en las glándulas endometriales y en las células estromales antes de la inserción del DIU, lo que coincide con los resultados anteriores. Cuando se insertó el DIU en el útero, el marcaje a nivel glandular fue significativamente reducido y desapareció completamente de las células estromales. Tres meses después de la retirada, anexina A2 aun presentaba un patrón de expresión débil, semejante a cuando había un DIU presente. Esto demuestra que transcurrido este tiempo el fenotipo endometrial aun no se había recuperado totalmente.

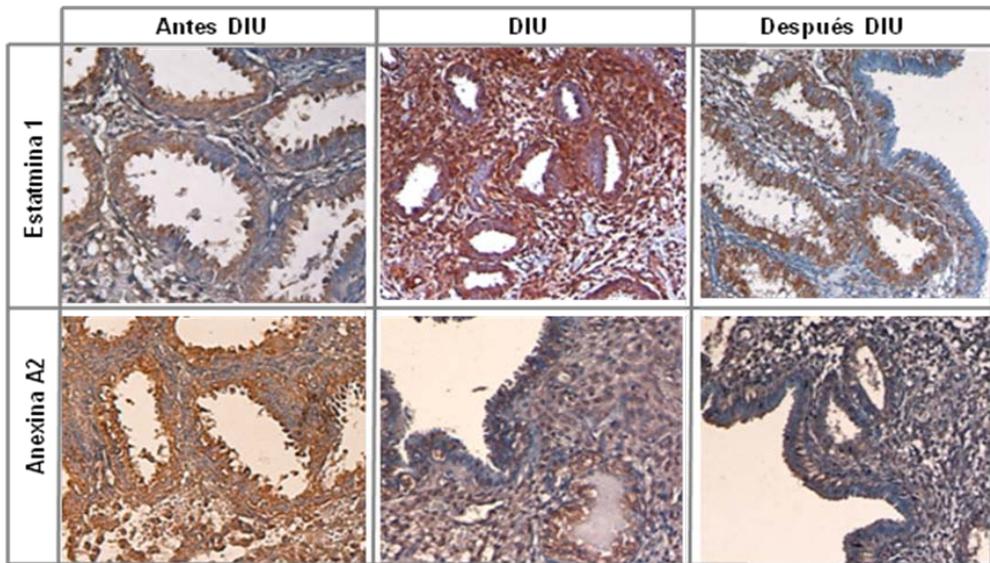


Figura. 20 Inmunohistoquímica de estatmina 1 y anexina A2 en el endometrio humano refractario inducido por la inserción de un DIU. Se evaluó el patrón de expresión de estas moléculas en biopsias de endometrio tomadas en día LH+7 (n total= 9 muestras): antes de la inserción del DIU (n=3), en presencia de este dispositivo (n=3) y transcurridos tres meses de su retirada (n=3). Con ello se evaluó la desregulación de estas proteínas en presencia del DIU y la posible implicación funcional en la receptividad endometrial.

Este modelo de endometrio refractario inducido por la inserción de un DIU, nos mostró una desregulación clara en el patrón de marcaje inmunoreactivo de ambas proteínas, indicando una implicación funcional en la receptividad endometrial.

5.2. Proteómica del proceso de decidualización

5.2.1. Evaluación de la decidualización *in vitro*

Transcurridos 9 días de cultivo *in vitro* en presencia de progesterona y estradiol se estudió la morfología de las células endometriales estromales (ESC), y se vio que mostraban un fenotipo claramente decidual con mayor tamaño respecto a las células control y con forma redondeada (Fig. 21A-B). Además se corroboró mediante ELISA que las células decidualizadas secretaban marcadores característicos de este proceso: prolactina con unos niveles de 60.27 ± 23.71 ng/ml e IGFBP-1 con unos niveles de 98.38 ± 48.07 ng/ml (Fig. 21C-D). Se comprobó que este aumento observado en las células decidualizadas era estadísticamente significativo respecto al control. Para los análisis proteómicos solo se seleccionaron aquellas parejas de células control y decidualizadas (n=16) que mostraron un incremento significativo en los niveles de prolactina e IGFBP-1 ($P < 0.005$).

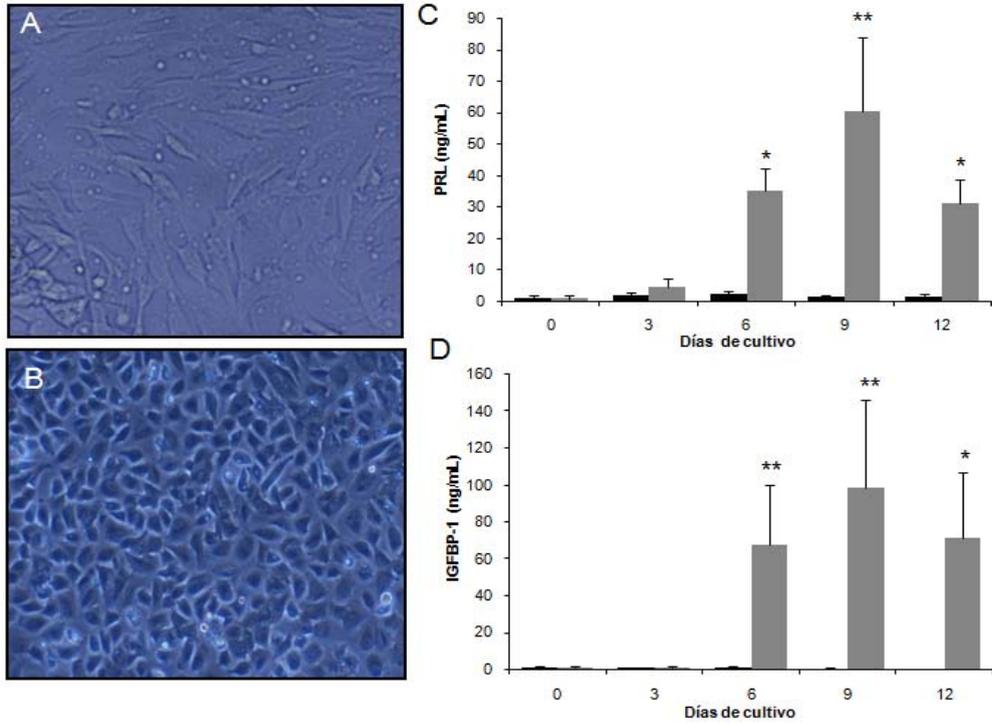


Figura. 21 Decidualización *in vitro*. (A) Morfología de células ESC sin tratamiento hormonal. (B) Morfología de células ESC decidualizadas cultivadas con progesterona y 17 β -estradiol durante 9 días. Secreciones de prolactina (PRL) (C) e IGFBP-1 (D) de células ESC control (barra negra) y decidualizadas (barra gris) en cultivo durante 0, 3, 6, 9 y 12 días. Estas proteínas se midieron por ELISA (n= 20 experimentos de decidualización *in vitro*), cada condición se midió por duplicado y los valores se expresaron en ng/mL (media \pm SEM). * p-valor < 0.05 **p-valor < 0.005.

5.2.2. Análisis proteómico de las células decidualizadas respecto a las células control.

La electroforesis bidimensional 2D-DIGE llevada a cabo a lo largo de un rango de pH de 3 a 11 no lineal, permitió la discriminación de 2500 *spots* con ayuda del programa informático *DeCyder*TM. Aquellas proteínas diferencialmente expresadas se escindieron y analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF y finalmente se identificaron usando la herramienta de búsqueda Mascot (Fig. 22).

Se obtuvo un listado de 60 proteínas con una abundancia diferencial significativa ($p < 0.05$) entre células ESC decidualizadas comparadas con control: 36 reguladas a la alza y 24 reguladas a la baja (Tabla 6). Entre las diferentes proteínas identificadas encontramos algunas relacionadas con el citoesqueleto (actinina alfa, gelsolina y queratina 7), homeostasis del estado de oxidación de la célula (superóxido dismutasa y peroxiredoxina 4), implicadas en metabolismo (isomerasa triosafosfato 1 y lipasa monoglicerido) y relacionadas con la plegamiento/degradación de las proteínas (catepsina B y proteína disulfito isomerasa).

En algunos casos, la misma proteína se identificó en dos *spots* diferentes (por ejemplo, caldesmon, *spot* 13 y 14), lo que sugiere la posibilidad de que se produzcan modificaciones posttraduccionales. En otros casos, se identificaron dos proteínas co-migrando en un mismo *spot* (por ejemplo, en el *spot* 2 aparecen la proteínas isomerasa disulfito y el inhibidor de ribonucleasa).

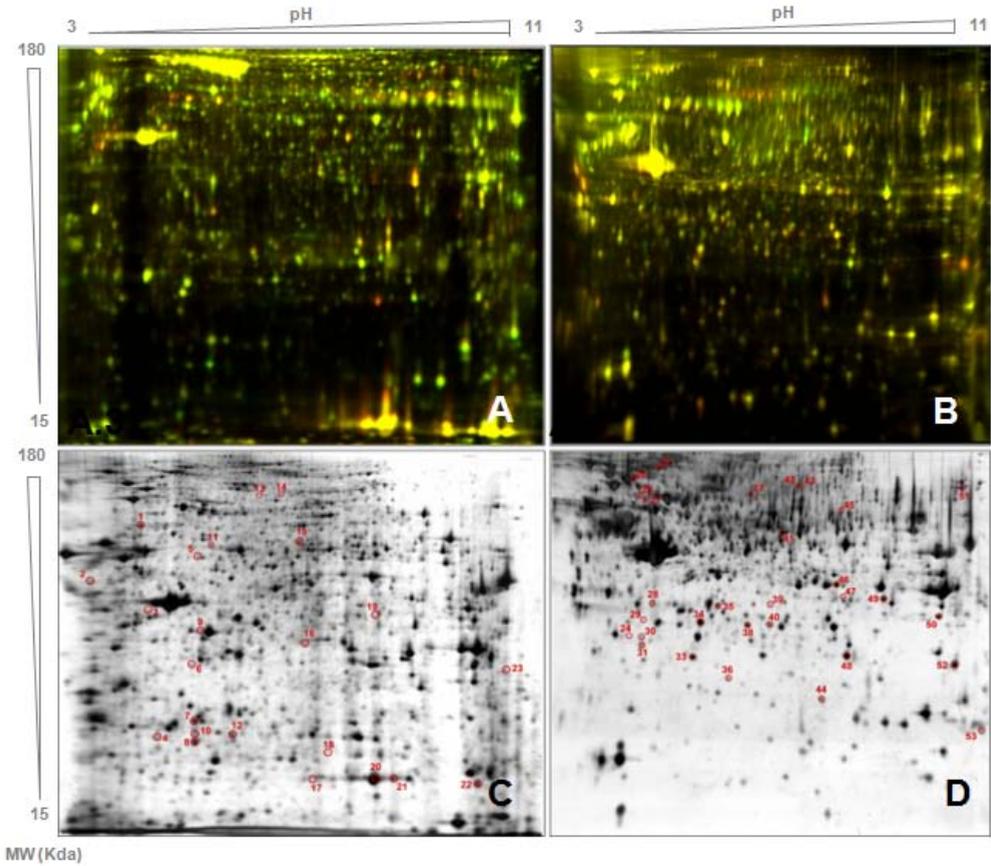


Figura. 22 Experimento DIGE con células ESC decidualizadas comparadas con las control. El extracto de proteínas de células control, decidualizadas y el estándar interno se marcaron con los fluoróforos Cy3, Cy5 y Cy2, respectivamente, se mezclaron y se separaron por electroforesis bidimensional. Para la primera dimensión se usaron tiras de poliacrilamida de 24 cm para un rango de pH de 3 a 11 NL (De izquierda a derecha) y para la segunda dimensión se usaron geles SDS-PAGE de poliacrilamida al 10%. (A-B) Los geles se escanearon y se obtuvieron imágenes con la superposición de los fluoróforos Cy3 y Cy5. (C-D) Estos mismos geles se marcaron con plata y se escanearon. Se identificaron 53 manchas de proteínas (rodeadas en rojo) significativamente desreguladas entre las muestras control y decidualizadas ($p\text{-valor} \leq 0.05$).

5. RESULTADOS

Spot Number	DeCyder		Accession code	Gene name	Protein description	Mascot		MW /Da, theor.	pI theor.	Matched peptides	Cover. %
	Av Ratio	p (F-test)				score	expect				
1	2,35	6,3E-04	gi 39777597	TGM2	transglutaminase 2 isoform a	228	1,4E-16	78420	5,11	6	13
2	1,97	4,6E-02	gi 119610097	P4HB	protein disulfide-isomerase	154	3,5E-09	21410	4,47	4	20
	1,97	4,6E-02	gi 15029922	RNH1	Ribonuclease inhibitor	154	3,5E-09	50104	4,83	4	12
3	-1,78	1,1E-02	gi 28723	ACTN1	alpha-actinin	137	1,8E-07	69061	5,07	8	15
4	3,37	1,1E-02	gi 741376	CTSB	cathepsin B	120	8,8E-06	17428	5,44	1	11
5	-1,99	4,9E-02	gi 67782365	KRT7	keratin 7	179	1,1E-11	51411	5,40	7	18
6	1,84	9,2E-04	gi 39777597	TGM2	transglutaminase 2 isoform a	111	7,0E-05	78420	5,11	4	8
7	1,82	1,6E-02	gi 5453790	NNMT	nicotinamide N-methyltransferase	159	1,1E-09	30011	5,56	4	17
8	2,08	1,9E-03	gi 4185720	UCHL1	ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	183	4,4E-12	23354	5,30	4	25
	2,08	1,9E-03	gi 39777597	TGM2	transglutaminase 2 isoform a	148	1,4E-08	78420	5,11	6	9
	2,08	1,9E-03	gi 4185720	UCHL1	ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	187	1,8E-12	23354	5,3	5	27
9	2,22	4,9E-02	gi 15277503	ACTB	beta actin	170	2,2E-12	40536	5,55	4	15
10	2,02	1,3E-02	gi 178045	ACTG1	gamma-actin	133	1,1E-08	26147	5,65	3	16
11	-1,88	3,8E-02	gi 188619	MMP3	matrix metalloproteinase-3	204	3,5E-14	54229	5,61	4	8
12	1,60	5,8E-03	gi 5453549	PRDX4	peroxiredoxin 4	187	1,8E-12	30749	5,86	5	24
13	-2,34	4,3E-02	gi 15149465	CALD1	caldesmon 1 isoform 5	225	7,0E-18	61233	6,40	9	23
14	-2,45	1,6E-02	gi 179830	CALD1	caldesmon	247	1,8E-18	62715	6,18	5	15
15	-1,56	4,1E-02	gi 3820535	TXNRD1	thioredoxin reductase GRIM-12	295	2,8E-23	55321	6,36	8	20
	-1,56	4,1E-02	gi 38044288	GSN	gelsolin isoform b	109	2,8E-06	80876	5,58	4	5
16	-1,82	3,1E-02	gi 4502101	ANKA1	annexin I	83	1,1E-03	38918	6,57	6	28
	-1,82	3,1E-02	gi 5453710	LASP1	LIM and SH3 protein 1	140	2,2E-09	30097	6,61	7	29
	-1,82	3,1E-02	gi 5668560	PPP1CC	serine/threonine phosphatase 1 gamma	83	1,1E-03	34493	5,09	6	16
17	2,01	6,1E-03	gi 67782309	SOD2	superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	138	3,5E-09	20882	8,36	3	17
18	1,50	4,6E-02	gi 181969	EEF2	elongation factor 2	93	1,2E-04	40264	5,81	1	3
20	2,17	9,5E-03	gi 67782309	SOD2	superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	138	2,2E-21	22290	6,86	6	34
21	2,04	6,8E-03	gi 32454741	SERPINH1	serpin H1	94	7,9E-05	46525	8,75	1	2
22	-1,55	2,0E-02	gi 55960374	TAGLN2	transgelin 2	235	2,8E-17	21244	7,63	8	42
23	-1,56	5,0E-02	gi 75516490	HNRPA1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	144	8,9E-10	16806	9,71	3	27
24	1,70	2,3E-02	gi 226007	MYL1	ventricular myosin L1	91	1,9E-04	22123	4,97	1	6
25	1,78	3,0E-02	gi 39777597	TGM2	transglutaminase 2 isoform a	289	2,9E-24	78420	5,11	11	22
26	-1,52	3,6E-03	gi 5031877	LMNB1	lamin B1	100	2,5E-05	66653	5,11	3	7
27	1,75	2,1E-02	gi 62087548	LCP1	L-plastin variant	129	2,9E-08	56196	5,21	1	3
28	1,57	2,0E-02	gi 741376	CTSB	cathepsin B	192	1,4E-14	28595	5,23	7	25
29	-1,43	8,7E-03	gi 938026	RANBP1	Ran-binding protein 1	92	1,6E-04	23396	5,19	1	6
30	3,20	1,3E-02	gi 741376	CTSB	cathepsin B	137	2,1E-07	17428	5,44	1	11
31	1,76	4,0E-02	gi 741376	CTSB	cathepsin B	173	1,1E-12	28595	5,23	4	20
	1,76	4,0E-02	gi 119620391	CCTB	chaperonin containing TCP1, subunit 4 (CRA_b)	121	1,8E-07	28595	5,23	5	12
32	-1,45	4,3E-02	gi 4501891	ACTN1	actinin, alpha 1 isoform b	387	4,5E-34	1E+05	5,25	25	40
	-1,45	4,3E-02	gi 12025678	ACTN4	actinin, alpha 4	166	5,7E-12	1E+05	5,27	14	22
33	-1,40	2,9E-03	gi 1617118	PRDX2	Peroxioredoxin-2	129	2,9E-09	18486	5,19	3	21
34	1,89	3,2E-02	gi 662841	HSP27	heat shock protein 27	238	3,6E-18	22427	7,83	7	37
35	-1,51	1,6E-02	gi 5453990	PSME1	proteasome activator subunit 1 isoform 1	135	7,2E-09	28876	5,78	8	29
36	-1,42	2,3E-02	gi 35068	NME1	Nucleoside diphosphate kinase A	147	4,5E-10	20740	7,07	4	26
37	-1,81	4,5E-03	gi 116805340	GARS	glycyl-tRNA synthetase	139	2,9E-09	83854	6,61	4	5
38	1,85	4,3E-02	gi 662841	HSP27	heat shock protein 27	157	4,5E-11	22427	7,83	5	33
39	3,97	3,6E-02	gi 37181873	C1QTNF6	Complement C1q TNF-related protein 6	144	9,1E-10	29093	5,81	3	13
40	1,57	1,5E-02	gi 17389815	TP1	Triosephosphate isomerase 1	179	2,9E-13	26910	6,45	5	28
41	2,22	2,2E-02	gi 21361176	ALDH1A1	aldehyde dehydrogenase 1A1	244	9,1E-20	55454	6,30	6	16
42	1,74	2,0E-02	gi 61656609	TRAP1	TNF receptor-associated protein 1	123	5,2E-06	57426	7,21	4	9
43	2,08	2,0E-02	gi 37747855	TF	transferrin	98	4,0E-05	79310	6,97	6	11
44	-2,48	2,5E-02	gi 48255905	TAGLN	transgelin	244	9,1E-20	22653	8,87	9	50
45	2,83	5,3E-04	gi 38202207	MAOB	monoamine oxidase B	170	2,3E-12	59238	7,20	7	16
46	-1,63	9,9E-03	gi 4758018	CNN2	calponin 2 isoform a	116	5,8E-07	34074	6,95	2	8
47	1,55	2,1E-02	gi 51242953	MGLL	monoglyceride lipase isoform 2	149	1,3E-08	33468	6,49	4	16
48	1,97	2,1E-02	gi 67782309	SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial isoform B	178	1,6E-11	20882	8,36	5	30
49	1,47	2,4E-02	gi 55684661	VDAC2	voltage-dependent anion channel 2	220	2,3E-17	30842	8,00	6	26
50	1,55	2,7E-03	gi 115430223	LGALS3	galectin 3	258	3,6E-21	26193	8,57	9	35
51	1,40	1,8E-02	gi 595267	HADHA	Gastrin-binding protein	106	5,7E-06	83730	9,13	2	3
52	-2,22	4,3E-02	gi 48255905	TAGLN	transgelin	298	3,6E-25	22653	8,87	13	65
53	-1,42	2,4E-02	gi 4506631	RPL30	ribosomal protein L30	112	1,4E-06	12947	9,65	2	24

Tabla. 6 Listado de proteínas identificadas por MALDI-TOF/TOF con cambios significativos entre células ESC control y decidualizadas *in vitro*. ^aNúmero de *spot*, que se corresponde con la numeración que aparece en los geles de plata de la figura 22 C-D (spots 1-53). ^bTasa de cambio (células ESC decidualizadas/control) calculada a partir del análisis con el programa DeCyder. ^cP-valor obtenido al aplicar el test de la t. ^dCódigo

de acceso de la proteína a partir de la base de datos *SwissProt*. ^ePuntuación Mascot. ^fValor Mascot esperado. ^gPeso molecular (MW) y ^hpunto isoelectrico (pI) teórico. ⁱNúmero de péptidos analizados y ^jcobertura de secuencia para el candidato de secuencia proporcionado por Mascot.

5.2.3. Validación de la tecnología proteómica mediante *Western blot*.

Se seleccionaron dos proteínas reguladas a la alza: catepsina B y transglutaminasa 2 y dos proteínas reguladas a la baja: transgelina y actinina alfa 1, con el fin de validar los resultados obtenidos tras la aplicación de las técnicas proteómicas. Estas proteínas se analizaron por la técnica Western blot en 4 conjuntos de células ESC decidualizadas y control de los 6 usados en los análisis DIGE. Los resultados obtenidos demostraban una regulación similar a la que se había reportado en el análisis proteómico. Catepsina B y transglutaminasa se encontraba regulada a la alza en las células ESC decidualizadas (tasa de cambio de 1.4 y 1.7, respectivamente), mientras que actinina alfa y transgelina se hallaron significativamente reducidas en las células decidualizadas comparadas con las control (tasa de cambio de -4.5 y -6.1, respectivamente) (Fig. 23A).

Se usaron 4 conjuntos de células ESC decidualizadas frente a control que no habían sido analizadas por técnicas proteómicas, con el fin de extender los resultados obtenidos a la población general. Los resultados coincidieron con lo previamente reportado (Fig. 23B). La proteína GAPDH se usó como control para normalizar la cantidad de proteína total en los experimentos de validación realizados.

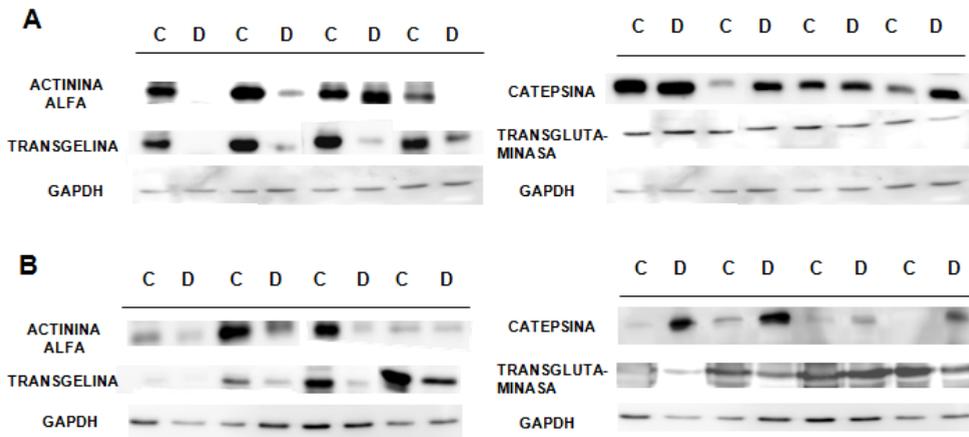


Figura. 23 Validación de los experimentos DIGE para las proteínas actinina alfa, transgelina, cathepsina B y transglutaminasa mediante Western blot. (A) Extractos de proteínas (control = C y decidualizadas = D) obtenidas a partir de las muestras endometriales usadas en los experimentos DIGE (n= 4 experimentos de decidualización *in vitro* usados en el DIGE). (B) Experimentos de validación realizados en un nuevo conjunto de muestras que no habían sido analizados previamente por DIGE (n= 4 experimentos de decidualización *in vitro* no usados en el DIGE). GAPDH se usó como control para normalizar la abundancia de proteína en todos los experimentos realizados.

5.2.4. Análisis secretómico de las células decidualizadas respecto a las células control.

Siete medios condicionados procedentes de células ESC control y decidualizadas se colectaron en día 9 de cultivo y se analizaron comparativamente mediante un *array* de proteínas (Fig. 24). La tabla 7 muestra las proteínas secretadas diferencialmente, la tasa de cambio y los valores de significatividad en forma de p-valor.

Nombre de la proteína ^c	Tasa de cambio ^c	P-valor (%) ^c	Descripción de la proteína ^d
<i>MPIF-1</i>	7.02	0.001	C-C motif chemokine 23
<i>IGFBP-1</i>	6.51	0.001	Insulin-like growth factor-binding protein 1
<i>IL-10Rβ</i>	4.98	0.005	Interleukin-10 receptor subunit β
<i>IL-21R</i>	4.49	0.0002	Interleukin-21 receptor
<i>PECAM-1</i>	4.20	0.0014	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1
<i>IL-1RII</i>	3.39	0.001	Interleukin-1 receptor II
<i>B7-1(CD80)</i>	2.93	0.002	Activation B7-1 antigen
<i>Leptin R</i>	2.74	0.001	Leptin receptor
<i>IL-5Rα</i>	2.73	0.0001	Interleukin-5 receptor α
<i>PRL</i>	2.44	0.0004	Prolactin
<i>IL-1R4/ST2</i>	2.39	0.002	Interleukin-1 receptor 4
<i>IL-13Rα2</i>	1.85	0.00	Interleukin-13 receptor α 2
<i>Fas Ligand</i>	1.81	0.00	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6
<i>L-Selectin</i>	1.80	0.002	Leukocyte-endothelial cell adhesion molecule 1
<i>IL-18BPα</i>	1.64	0.00	Interleukin-18 bind protein α
<i>ICAM-2</i>	1.40	0.003	Intercellular adhesion molecule 2
<i>IL-6</i>	-2.31	0.00	Interleukin-6
<i>MCP-3</i>	-3.17	0.001	Chemokine ligand 7

Tabla. 7 Lista de proteínas secretadas diferencialmente debido al efecto del proceso de decidualización. ^aNombre de la proteína, tal y como aparece en el *array*. ^bTasa de cambio (decidual/control). ^cP-valor obtenido al aplicar el test de la t. ^dDescripción de la proteína.

Tal y como era de esperar, se identificaron marcadores típicos del proceso de decidualización: prolactina e IGFBP-1 con un aumento significativo en el medio de células decidualizadas respecto al medio de células control ($p \leq 0.05$). Sin embargo, también destacan la aparición de otros marcadores con un aumento de secreción en el momento de decidualización, identificados por primera vez en este proceso tal como MPIF-1, receptor beta IL-10, receptor IL-21, PECAM-1, receptor tipo 2 IL-1, CD-80 receptor de leptina (tasa de cambio > 2, p -valor < 0.05). Únicamente dos proteínas, IL-6 y MCP-3 se encontraron significativamente disminuidas en el medio decidual en comparación con el medio de las células control (p -valor < 0.05).

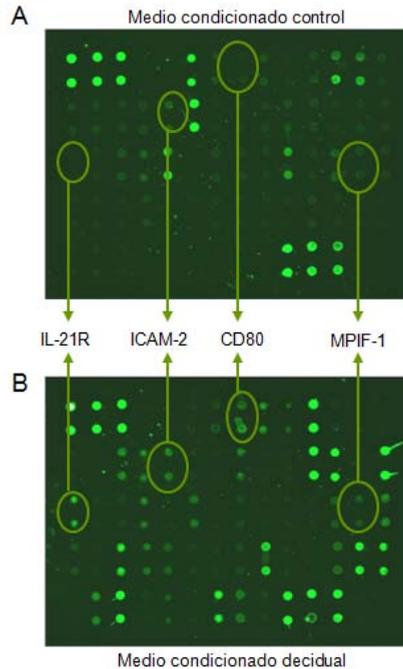


Figura. 24 *Arrays* de proteínas que muestran la abundancia proteica entre el medio condicionado control y decidual. Array de membrana VIII de Raybiotech incubado con medio condicionado de células ESC control (A) y decidualizadas (B). Las proteínas incluidas en el *array* están proporcionadas por duplicado. La intensidad de fluorescencia de cada punto se correlaciona con la abundancia de proteína en el medio de cultivo analizado. Observamos la expresión diferencial de ciertas proteínas como IL-21R, ICAM-2, CD80 y MPIF-1, reguladas a la alza en el medio condicionado decidual respecto al control (flechas y círculos).

5.2.5. Validación del análisis secretómico mediante ELISA

Se llevó a cabo la validación para dos proteínas con aumento de secreción (MPIF-1 y ILR1-RI) y disminuidas en el medio decidual (MCP-3 y IL-6) respecto al medio de células control, mediante la técnica ELISA. Los experimentos se llevaron a cabo en 4 conjuntos de medio condicionado frente a

control recolectados en día 9 de cultivo, los cuales ya habían sido usados previamente en el estudio secretómico. Los resultados de estos análisis demostraron una regulación similar al resultado del *array* de proteínas (Fig. 25A). Por un lado, MPIF-1 y IL1-RI se encontraron significativamente reguladas a la alza en el medio decidualizado comparado con el medio de ESC control. Por otro lado, MCP-3 e IL-6 se hallaron significativamente reguladas la baja en el medio decidualizado comparado con el medio de ESC control, tal y como esperábamos.

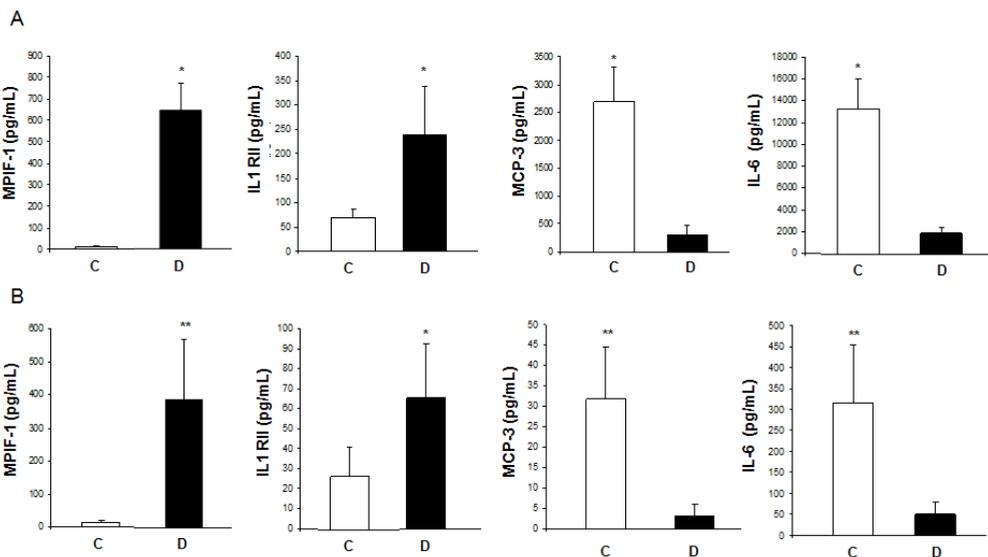


Figura. 25 Validación de algunas proteínas obtenidas en el patrón secretómico, tales como, MPIF-1, IL1 RII, MCP-3 y IL-6. (A) Se analizaron estas cuatro moléculas en medio condicionado procedente de 4 experimentos de decidualización *in vitro* ya usados en el análisis secretómico. (B) Para validar los resultados fuera de población de estudio, se analizaron 5 conjuntos de muestras adicionales control y decidual no usados en los *arrays* de proteínas. Las proteínas se midieron por ELISA en el medio condicionado (control=C y decidual=D) y los resultados en pg/mL se expresaron como media \pm SEM. * p-valor < 0.05, ** p-valor < 0.01

Esta validación también se llevó a cabo analizando cinco muestras adicionales de medio decidual respecto al control, que no habían sido usados en el análisis secretómico para verificar si estos resultados se daban fuera de la población de estudio. El análisis por ELISA corroboró los resultados obtenidos por los *arrays* de proteínas (Fig. 25B). Estos resultados se evaluaron con el test U de Mann-Whitney y mostraron que las diferencias observadas eran estadísticamente significativas.

5.2.6. Generación del interactoma de la decidualización

Fruto del análisis proteómico llevado a cabo, se identificaron un total de 47 proteínas intracelulares y 18 extracelulares, diferencialmente expresadas en ESC decidualizadas comparadas con control. De esas 65 proteínas, 44 se unieron en una gran red proteica altamente interconectada gracias al empleo de la herramienta informática *Snow*. Se permitió que el programa informático añadiese una proteína adicional que uniese parejas de proteínas. La red final contuvo 132 proteínas (44 proteínas nativas y 88 añadidas por el programa *Snow*) y 378 interacciones (Fig. 26). También se incluyó en la red un total de 33 factores de transcripción (FT) que regulaban la expresión de las 65 proteínas, hallados con ayuda de la base de datos *Jaspar*. Curiosamente, la base de datos *Fantom* (Ravasi y cols., 2010) clasificó a cinco de esos FT (GATA2, GATA3, SOX10, SPIB, TFAP2A) como “específicos”, lo que implica que estos factores de transcripción se expresan de forma específica de tejido. Por otro lado, la base de datos determinó que seis FT (USF1, ARID3A, ETS1, BRCA1, NFIC, YY1) se clasificaran como “facilitadores”, o reguladores expresados constitutivamente.

Los 734 genes diferencialmente expresados en el proceso de decidualización publicados en el trabajo de Aghajanova y cols., (2010) se cruzaron con nuestros datos proteómicos, con el fin de identificar los genes cuya expresión diferencial se observase tanto a nivel génico como proteico. Estos genes incluían proteínas nativas (Caldesmon 1, superóxido dismutasa, actinina alfa 4, transgelina, calponina), factores de transcripción (NR4A y BRCA1) y coincidieron con proteínas que constituían nodos adicionales (IGFBP-1, NFkB1, laminina A/C, vimentina, vinculina, quinasa dependiente de ciclina 1, serpina inhibidor de peptidasa E).

En la generación del interactoma de la decidualización resultó interesante incorporar el papel que ejercían las hormonas progesterona y estradiol, actuando a través de sus receptores PR, ES1 y ES2. Por ello, se incorporaron estos receptores y se estudiaron las interacciones con las diferentes proteínas que constituían la red. Destacaba la interacción con diferentes factores de transcripción, que a la vez regulaban la expresión de una gran cantidad de proteínas implicadas en este proceso.

Finalmente todas las proteínas y FT que componían la red se revisaron manualmente y se clasificaron en 19 categorías funcionales que revelaron aspectos interesantes de la biología de este proceso. Gran proporción de las proteínas intracelulares se relacionaron con la organización del citoesqueleto, con la composición de la matriz extracelular, implicadas en rutas de transducción de señales, en procesos de adhesión celular, en el metabolismo del ADN/ARN y en la degradación de proteínas, entre otros procesos.

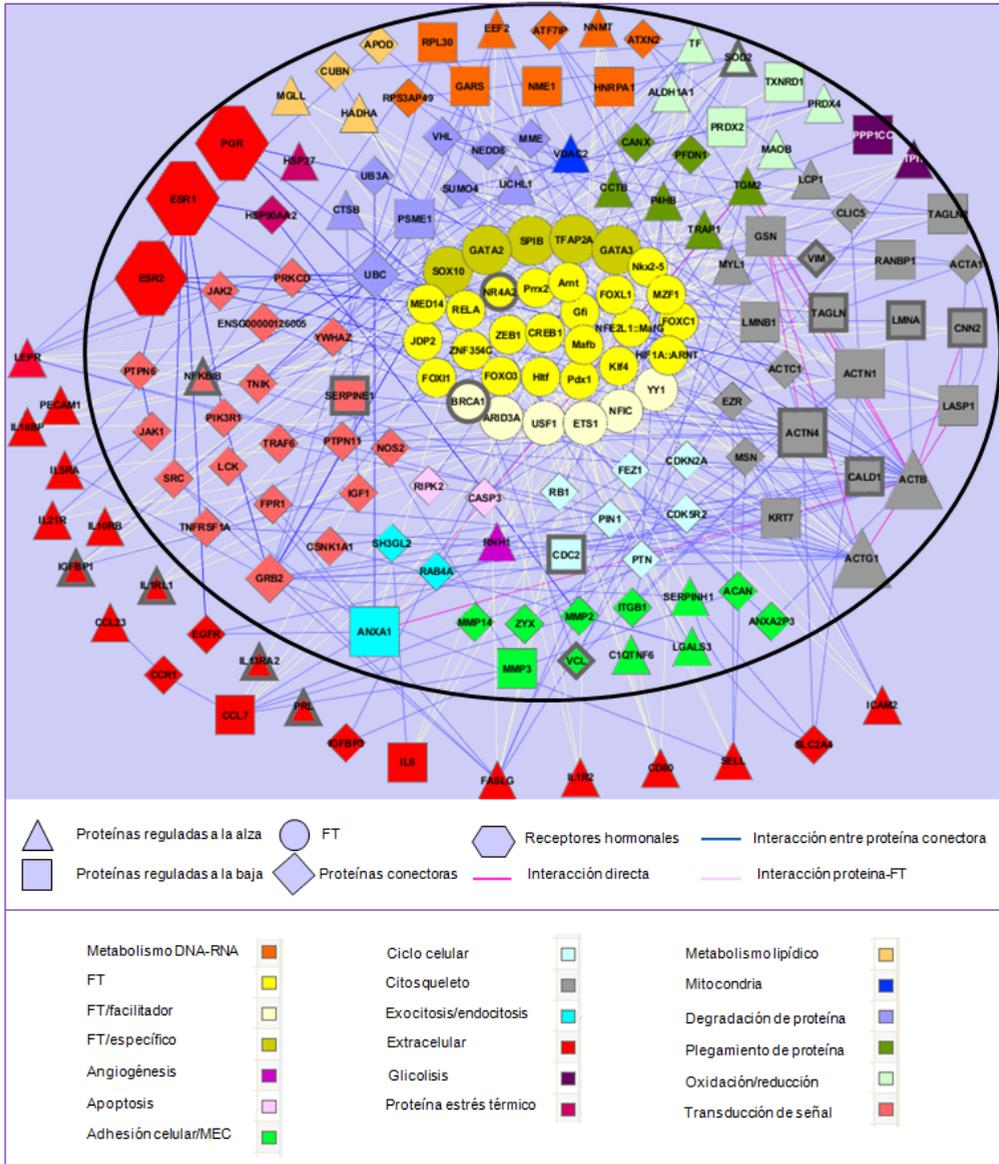


Figura. 26 Interactoma de la deciduación. Red de interacciones entre las proteínas identificadas reguladas diferencialmente a nivel intracelular y extracelular en nuestro análisis proteómico, junto con la información presente en las bases de datos públicas. (Triángulo) Proteínas reguladas a la alza en nuestros análisis proteómicos. (Cuadrado) Proteínas reguladas a la alza en nuestros análisis proteómicos. (Círculo) Factores de transcripción. (Rombo) Proteínas de conexión añadidas para la construcción de la red de interacciones. (Línea rosa) Interacciones directas entre proteínas desreguladas encontradas en nuestros análisis proteómicos. (Línea azul) Interacciones indirectas entre proteínas desreguladas y las conectoras. (Línea blanca) Interacciones entre las proteínas y los factores de transcripción. (Línea roja) Interacciones entre todas las proteínas y los receptores hormonales (PGR, ESR1 y ESR2). Las proteínas se clasificaron en 19 categorías funcionales, indicadas por diferentes colores en la leyenda. Aquellas proteínas que se encuentran remarcadas, corresponden a genes cuya expresión diferencial se ha detectado tanto a nivel de expresión génica como a nivel de proteína.

5.3. Análisis de anexina A2 y RhoA en la receptividad endometrial

5.3.1. Análisis de anexina A2 en el endometrio humano a lo largo del ciclo menstrual.

En el análisis proteómico de la receptividad endometrial se encontró anexina A2 (ANXA2) con un aumento de expresión significativo en el endometrio en estado receptivo comparado con el estado pre-receptivo. Hasta entonces solo habíamos descrito la expresión de esta molécula en fase pre-receptiva y receptiva. Para conocer más acerca de la regulación y la localización de esta molécula en el endometrio, se estudió a lo largo de todo el ciclo menstrual por inmunohistoquímica y Western blot. Se comparó su expresión en

fase proliferativa (P), secretora temprana (STE), secretora media (SM) y secretora tardía (STA) (Fig. 27).

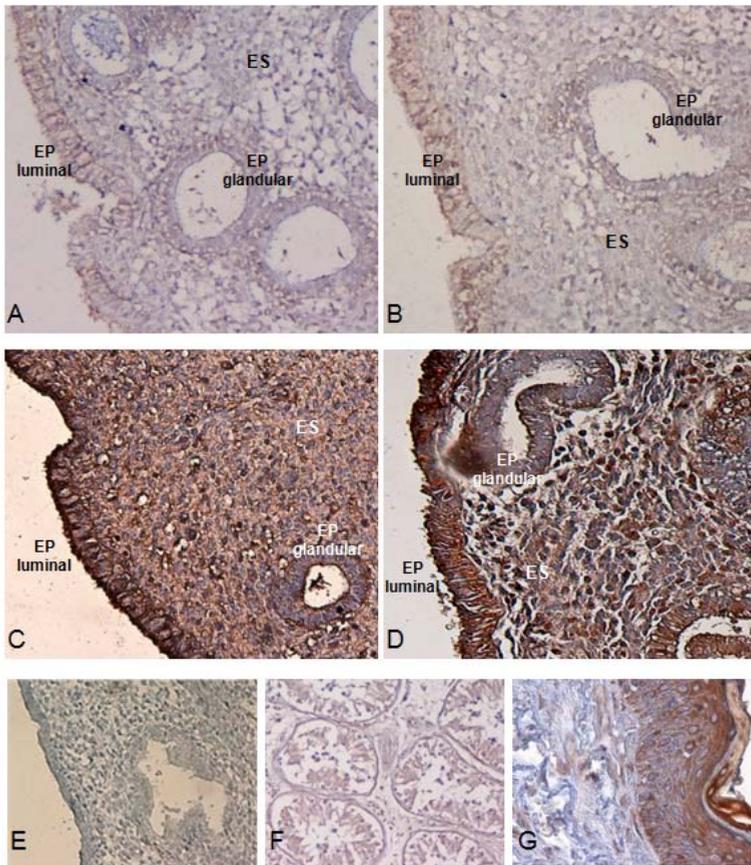


Figura. 27 Análisis de la distribución de ANXA2 a lo largo del ciclo menstrual en el endometrio humano mediante inmunohistoquímica. El patrón de ANXA2 se observó en el endometrio proliferativo (A), secretor temprano (B), secretor medio (C) y secretor tardío (D). Se analizaron cinco muestras de cada fase del ciclo menstrual. (E) El anticuerpo policlonal para ANXA2 no se adicionó y este tejido se usó como control negativo. (F) No se observó señal en el testículo humano (usado como control negativo). (G) Un intenso marcaje se detectó en la capa de epidermis (tejido control positivo). Dentro del tejido podemos observar EP (epitelio) luminal y glandular, así como las células del estroma (ES).

ANXA2 presentó una señal muy débil en el endometrio proliferativo y secretor temprano, restringido solo a algunas células estromales y a la parte más apical del epitelio luminal. El marcaje, sin embargo, fue muy intenso en el endometrio en fase secretora media tanto a nivel de células estromales como epiteliales, con prominencia en el epitelio glándular y luminal. Este marcaje se mantuvo también intenso al visualizar en endometrio en fase secretora tardía (Fig. 27A-D).

No se observó señal en el control negativo de endometrio, y tampoco al visualizar una sección de testículo usado como tejido control negativo. Mientras que se detectó una fuerte señal en la capa epidérmica de una sección de piel, usada como tejido control positivo (Fig. 27G).

El análisis de ANXA2 mediante Western blot a lo largo del ciclo menstrual corroboró el incremento de expresión que habíamos observado, tanto en el endometrio secretor medio como en el tardío, en comparación con la baja expresión vista en el proliferativo y el secretor temprano (Figura 28A). Se realizó una densitometría de las bandas comprobando que este aumento era significativo (Fig. 28B).

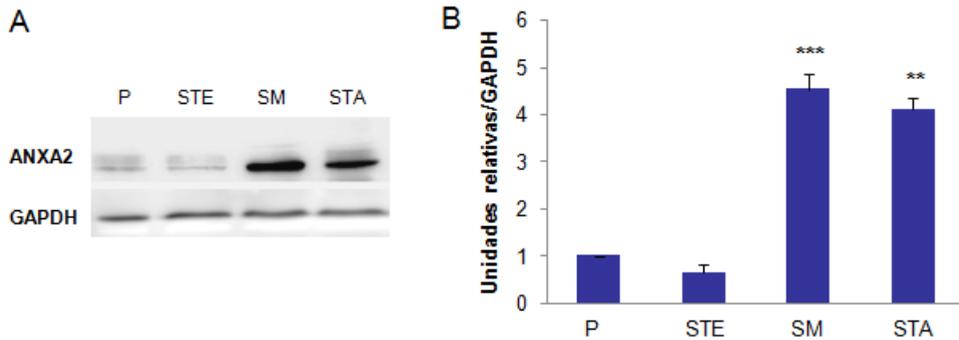


Figura. 28 Análisis de ANXA2 a lo largo del ciclo menstrual en el endometrio humano mediante Western blot. (A) Los extractos proteicos obtenidos a partir de biopsia de endometrio en fase proliferativa (P), secretora temprana (STE), media (SM) o tardía (STA) se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE y se inmunodetectaron mediante la unión del anticuerpo anti-ANXA2. Se realizaron 3 experimentos Western blot con muestras distribuidas a lo largo del ciclo. (B) Se realizó un análisis densitométrico de ANXA2 en fase del endometrio proliferativa comparada con secretor temprana, media y tardía, para los 3 experimentos de Western blot diferentes. La abundancia se expresó en unidades relativas y normalizadas respecto GAPDH.

5.3.2. Efecto de la inhibición de ANXA2 endometrial sobre la adhesividad.

Para estudiar la funcionalidad de ANXA2 sobre la adhesión embrionaria al epitelio endometrial, se usó un modelo *in vitro* donde se analizaron los efectos de inhibir ANXA2 mediante ARN de interferencia (ARNi) o aplicando un tratamiento con la droga Witaferina A (WA). Este ensayo consistió en un cocultivo de una monocapa confluyente de la línea celular endometrial humana HEC-1-A o las células epiteliales endometriales humanas (hEEC, *human Endometrial Epithelial Cells*) primarias con blastocistos de ratón o esferoides JEG-3 (línea celular derivada de trofoblasto humano).

Se llevó a cabo una transfección transitoria en las células epiteliales HEC-1-A y hEEC con una secuencia de ARN de interferencia específica para ANXA2 humana (ARNi ANXA2) o con una secuencia aleatoria como control de transfección (ARNi control). Transcurridas 24 horas después de la transfección, se midieron los niveles de expresión del ARNm por RT-PCR y de proteína mediante Western blot, comprobando que existía una reducción significativa tanto de los niveles de ARNm como de proteína cuando las células eran tratadas con ARNi ANXA2 comparadas con el control (Fig. 29).

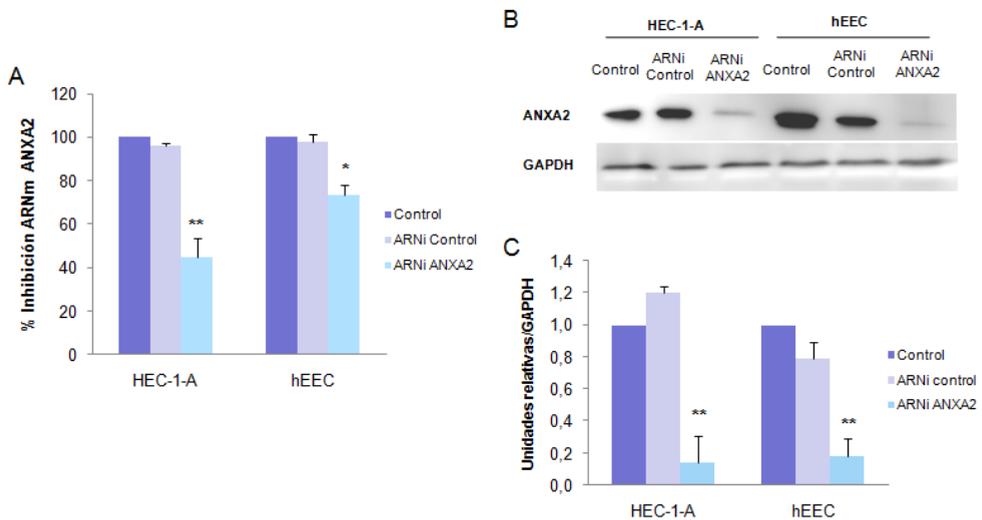


Figura. 29 Efecto de la inhibición de ANXA2 mediante ARNi en las células HEC-1-A y hEEC. (A) Las células se transfectaron con una secuencia control (ARNi control) o ARNi específico para ANXA2 (ARNi ANXA2) y los niveles de ARNm se midieron por RT-PCR. (B) Los niveles de proteína ANXA2 se midieron por Western blot. (C) Análisis densitométrico de ARNi ANXA2 respecto al ARNi control en las células HEC-1-A y hEEC procedentes de tres experimentos Western blot diferentes y expresada en unidades relativas normalizadas con GAPDH.

Las células tratadas con ARNi para ANXA2 experimentaban una reducción significativa de la adhesión a blastocistos de ratón comparado con los niveles de adhesión que mostraban las células control (Fig. 30A). Cuando evaluamos la adhesión a esferoides JEG-3 también comprobamos el mismo efecto de disminución respecto a las células control (Fig. 30B).

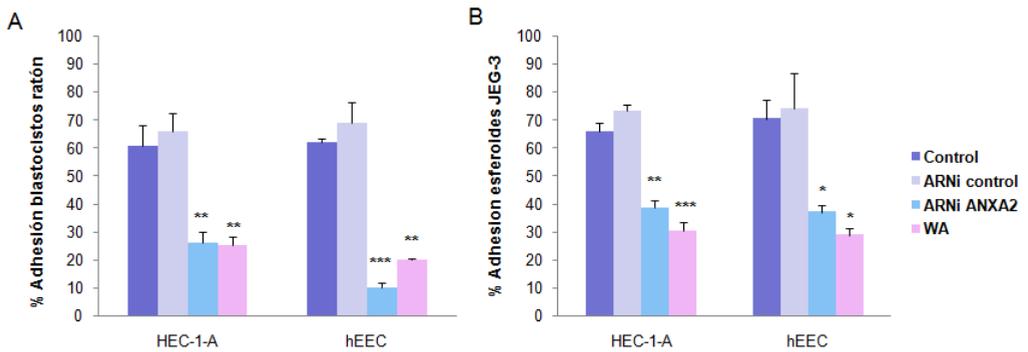


Figura. 30 Efecto de la inhibición de ANXA2 sobre la adhesión de las células HEC-1-A y hEEC a los blastocistos de ratón y esferoides JEG-3. La adhesión de blastocistos de ratón (A) y esferoides JEG-3 (D) sobre células tratadas HEC-1-A y hEEC se expresó como porcentaje. Los valores se representan como la media \pm SEM de tres experimentos diferentes (n= 10-15 blastocistos de ratón o esferoides JEG-3 por condición en cada experimento realizado) * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

En paralelo, realizamos un experimento donde tratamos las células HEC-1-A y hEEC con la droga WA durante 24 horas. Se ha demostrado que esta droga afecta a la funcionalidad de ANXA2 mediante su unión covalente, provocando la alteración del citoesqueleto de actina (Falsey y cols., 2006). Cuando las células se trataron con WA, el porcentaje de adhesión de blastocistos de ratón disminuyó significativamente (Fig. 30A). Las células HEC-

1-A y hEEC tratadas con WA también experimentaron una reducción significativa a la adhesión de esferoides JEG-3 comparado con las células control (Fig. 30B).

Estos experimentos proporcionaron evidencias de que la alteración funcional de ANXA2 usando dos aproximaciones diferentes induce un defecto en la habilidad para adherirse los embriones de ratón o esferoides JEG-3 a las células epiteliales.

5.3.3. Estudio del fenómeno de expansión del trofoblasto cuando ANXA2 es inhibida.

Además de estudiar la inhibición de ANXA2 sobre la adhesión embrionaria, decidimos extender nuestras observaciones para ver el efecto sobre el fenómeno de expansión del trofoblasto. Las células HEC-1-A y hEEC se transfectaron con ARNi ANXA2 o se incubaron con WA, como previamente se ha descrito, y posteriormente se cocultivaron con blastocistos de ratón y algunos de éstos acabaron adheridos sobre la monocapa celular. De aquellos blastocistos adheridos, se hizo un seguimiento observando cómo tenía lugar la expansión del trofoblasto. Se midió el área de expansión tras la adhesión y 48 horas después y se observó que las células con ANXA2 inhibida (transfectadas con ARNi ANXA2 o tratadas con WA) mostraron una marcada disminución de la expansión del trofoblasto comparado con las células control (Fig. 31A). Esta disminución se analizó estadísticamente y se vió que era significativa respecto a las células control (Fig. 31B).

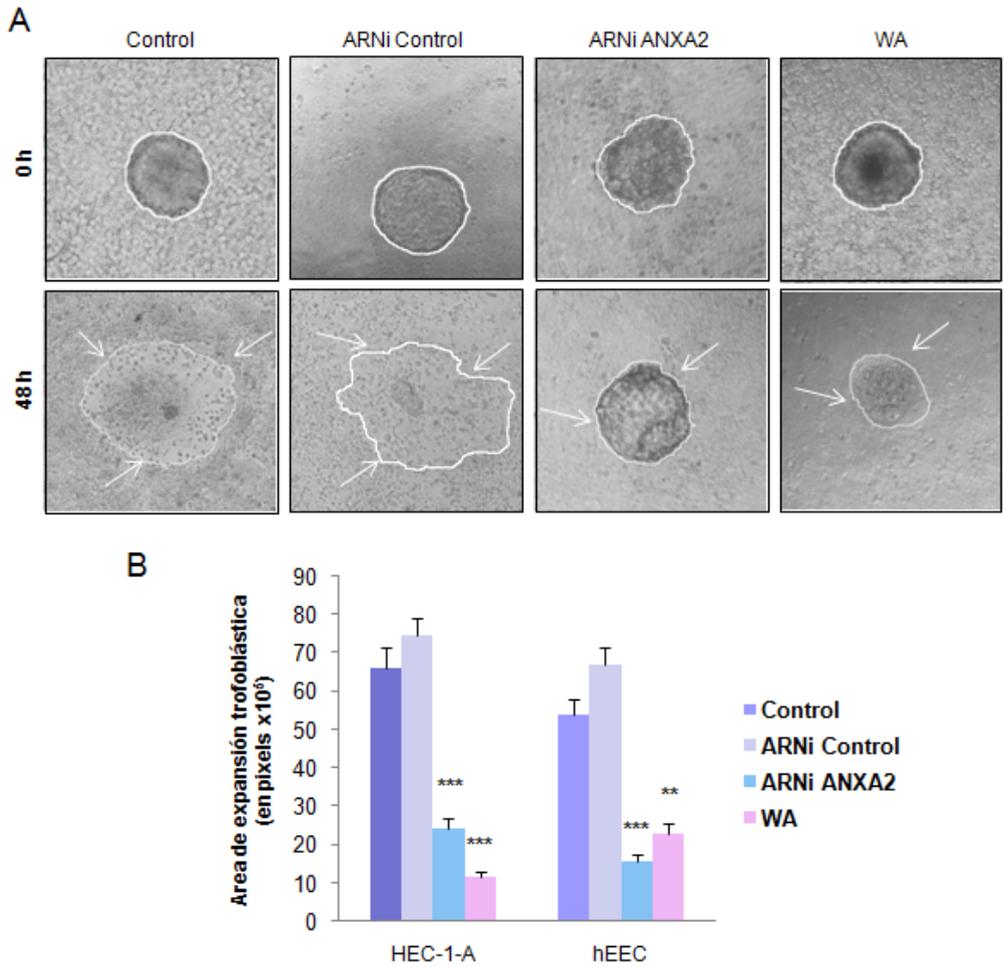


Figura. 31 Fenómeno de expansión del trofoblasto de ratón sobre las células epiteliales tratadas para la inhibición de ANXA2. (A) Las células hEEC se transfectaron con ARNi para ANXA2 o se trataron con WA, luego se cocultivaron con blastocistos de ratón hasta que se produjera la adhesión embrionaria. Transcurridas 48 horas, se observó la expansión de los blastocistos de ratón sobre las células hEEC y se rodeó usando una línea blanca. (B) El área de expansión del embrión se midió en pixeles y los valores se representaron como la media \pm SEM de tres experimentos diferentes.

5.3.4. Análisis de la migración/proliferación de las células epiteliales endometriales (hEEC) tras inhibir ANXA2.

El blastocisto se adhiere al epitelio endometrial y penetra a través de él, ocasionando un daño en la superficie que será reconstituida mediante la habilidad de las células epiteliales endometriales *in vivo* de migrar y/o proliferar (Aplin., 2007) para cerrar de nuevo la superficie epitelial. Nosotros realizamos un ensayo *in vitro* de “cierre del surco” para analizar la habilidad de las células para sellar dicha superficie. Pasadas 24 horas después de la inhibición funcional de ANXA2 mediante ARNi o WA, se realizaron surcos de forma mecánica en las monocapas de células HEC-1-A y hEEC crecidas en confluencia (Fig. 32A). Las anchuras de los surcos se midieron inmediatamente y 24 horas después, y se determinó el porcentaje de cierre del surco (Fig. 32B). La capacidad de cierre del surco en las células inhibidas con ARNi ANXA2 se redujo significativamente en ambos tipos celulares (HEC-1-A y hEEC) comparadas con las células control. El porcentaje de cierre del surco también disminuyó notablemente en el caso de las células tratadas con WA al comparar con las células control.

Por lo tanto, del experimento “cierre del surco” deducimos que la capacidad de reconstitución/migración de las células epiteliales decrece cuando ANXA2 es inhibida.

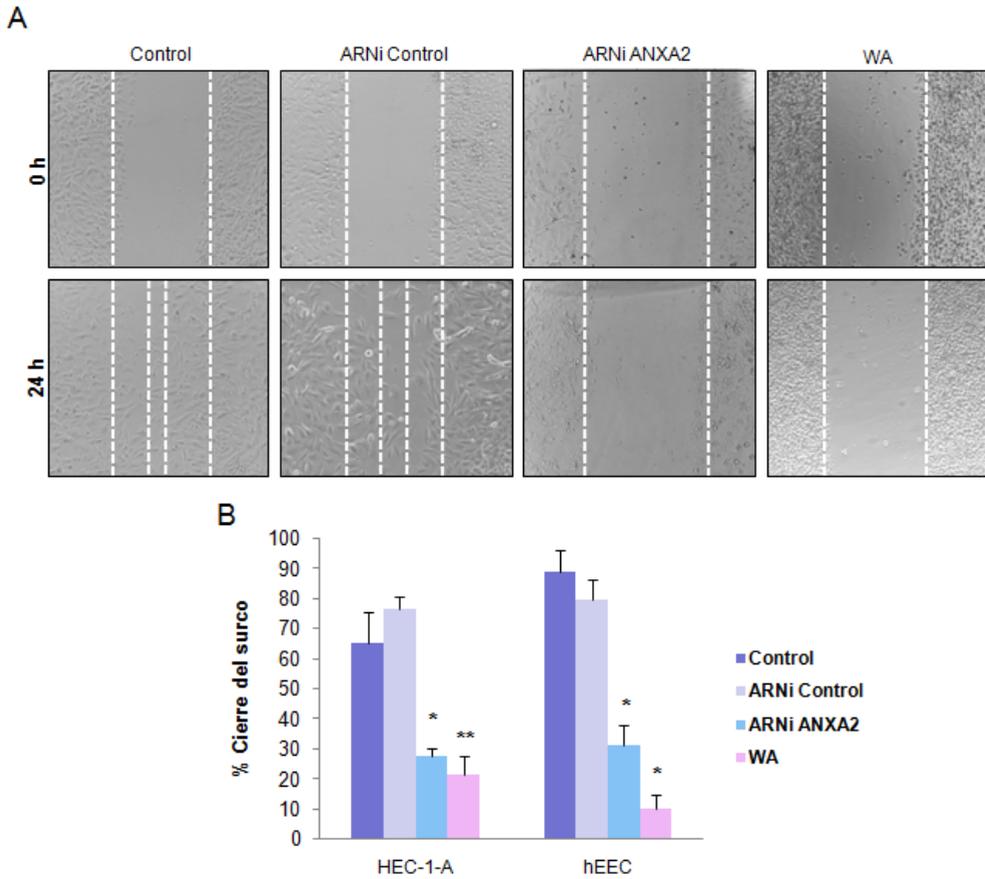


Figura. 32 Migración/proliferación de las células endometriales al inhibir ANXA2.

(A) Se realizó un ensayo de “cierre de surco” sobre células control e inhibidas para ANXA2 y se midió la anchura de la herida en el momento inicial y una vez transcurridas 24 h. (B) El porcentaje de cierre de la herida se determinó mediante el uso de un *software* de análisis de imagen y los valores se representaron como la media \pm SEM de diez medidas tomadas a partir de tres experimentos diferentes. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$

5.3.5. Efecto de la inhibición de ANXA2 sobre la proteína RhoA.

Existen múltiples evidencias que sugieren que ANXA2 está ligada a la vía de acción de RhoA regulando la adhesión celular (Rescher y cols., 2008; Babbín y cols., 2007; Babiychuk y cols., 2002), por ello hemos evaluado los efectos de inhibir ANXA2 sobre los niveles totales o de activación de RhoA (Fig. 33).

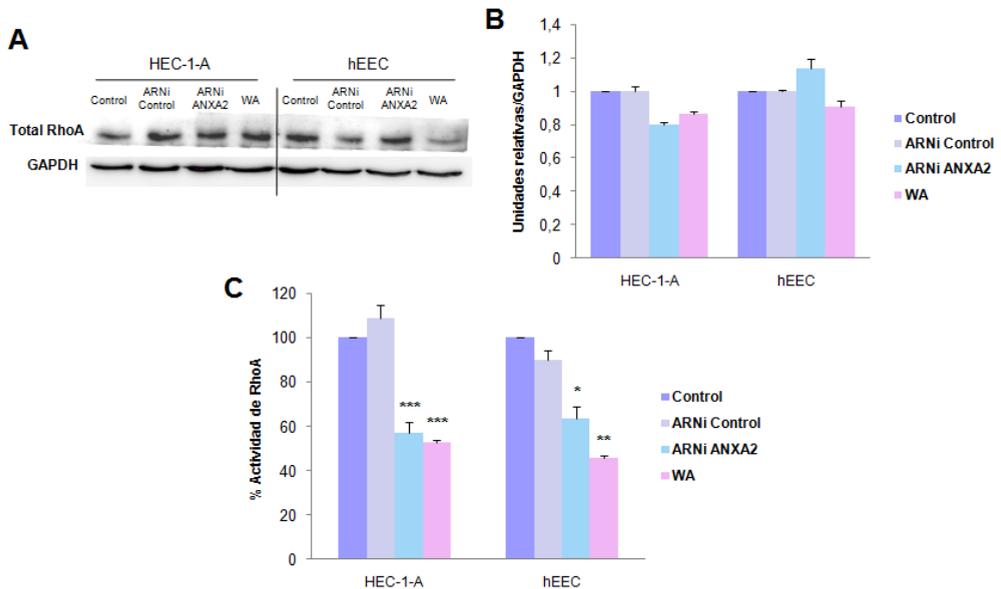


Figura. 33 La inhibición de ANXA2 mediante ARNi o tratamiento con WA sobre la actividad de RhoA. (A) Los niveles de RhoA total en células HEC-1-A y hEEC control e inhibidas para ANXA2 se evaluaron por Western blot. (B) Análisis densitométrico de las bandas obtenidas a partir de tres experimentos diferentes y expresado como unidades relativas normalizadas con GAPDH. (C) Los niveles de RhoA en forma activa (RhoA-GTP) se analizaron por G-LISA. Se realizaron tres experimentos diferentes y los valores se representaron como la media \pm SEM del porcentaje de actividad de RhoA. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Se analizaron los niveles totales de RhoA mediante Western blot en las células HEC-1-A y hEEC tratadas con ARNi ANXA2 o WA (Fig. 33A). No se encontró ningún cambio significativo en la banda de RhoA total al comparar entre las células transfectadas con ARNi ANXA2 o tratadas con WA y las células control (Fig. 33B).

También se examinó el estado de activación de RhoA en ambos tipos celulares mediante un ensayo G-LISA. A diferencia del experimento anterior, aquellas células transfectadas con ARNi ANXA2 o tratadas con WA presentaban una reducción significativa en los niveles de RhoA activo comparadas con las células control (Fig. 33C).

5.3.6. Efecto de la inactivación de RhoA sobre los niveles de ANXA2.

En el siguiente experimento tratamos de comprobar que ocurría en los niveles totales de la proteína ANXA2 cuando RhoA se inactivó (Fig. 34A). Para inactivar esta molécula se llevó a cabo una transfección de las células HEC-1-A con un mutante dominante negativo (RhoA T19N). Evaluando los niveles de ANXA2 por Western blot, comprobamos que no se producían cambios significativos al comparar las células control, las transfectadas con plásmido control (*Wild-Type*) y las transfectadas con RhoA T19N (Fig. 34B).

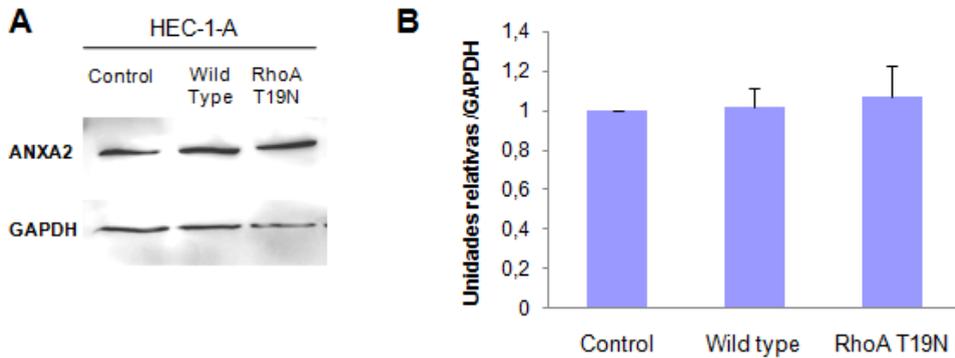


Figura. 34 Efecto de la inactivación de RhoA sobre los niveles de ANXA2 de las células HEC-1-A. (A) El extracto proteico de las células HEC-1-A control, transfectadas con un plásmido control (*Wild type*) y un mutante dominante negativo RhoA (RhoA T19N) se sometieron a un análisis Western blot para ANXA2 y GAPDH. (B) Análisis densitométrico de ANXA2 en células transfectadas con el mutante RhoA T19N respecto al control, realizado a partir de tres experimentos diferentes y expresado como unidades relativas normalizada con GAPDH. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Se concluye pues que la inhibición de ANXA2 reduce significativamente la actividad de RhoA, mientras que la inactivación de RhoA no produce efectos en la expresión de ANXA2.

5.3.7. Análisis de RhoA en el endometrio humano a lo largo del ciclo menstrual.

Hemos comprobado que la inhibición de ANXA2 ocasiona una disminución en la actividad de RhoA, ello sugiere la posibilidad de que esta molécula también se vea implicada en la capacidad de adhesión del embrión al epitelio endometrial.

En primer lugar nos planteamos examinar la localización y regulación de la proteína RhoA a lo largo del ciclo menstrual (Fig. 35), tal y como llevamos a cabo anteriormente para ANXA2.

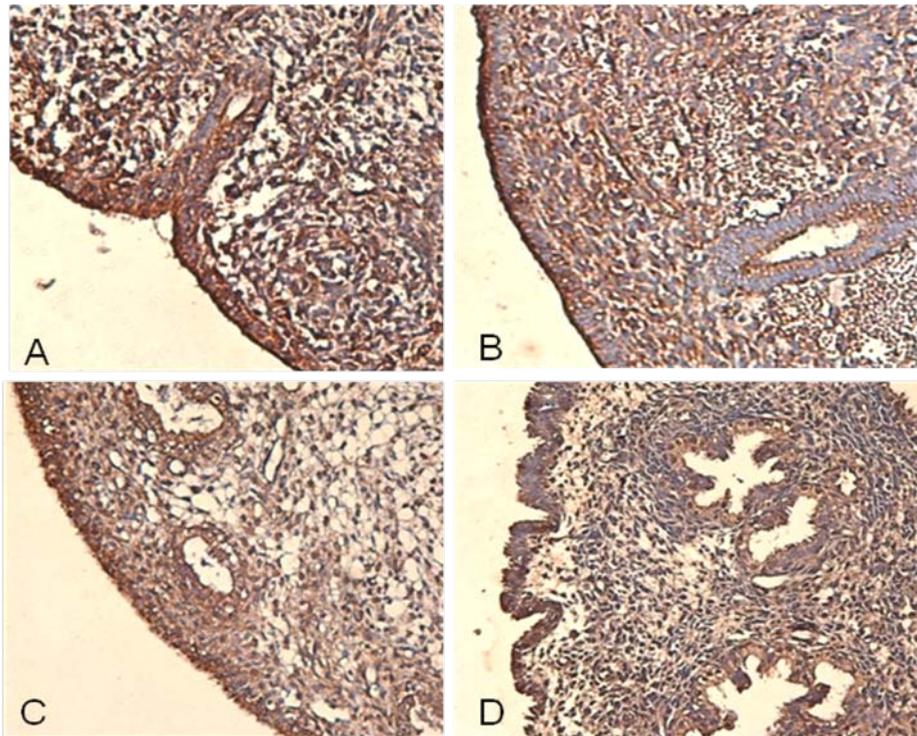


Figura. 35 Análisis de la distribución de RhoA total a lo largo del ciclo menstrual en el endometrio humano mediante inmunohistoquímica. El patrón de RhoA total se observó en el endometrio proliferativo (A), secretor temprano (B), secretor medio (C) y secretor tardío (D). Se analizaron cinco muestras de cada fase del ciclo menstrual.

La intensidad de marcaje de la proteína RhoA total presentó un patrón semejante en todas las fases del ciclo menstrual: proliferativo, secretor temprano, medio y tardío (Fig. 35). Los niveles totales de proteína RhoA

también se evaluaron mediante Western blotting, comprobando que las bandas no mostraban cambios diferenciales entre las diferentes fases del ciclo (Fig. 36A-B).

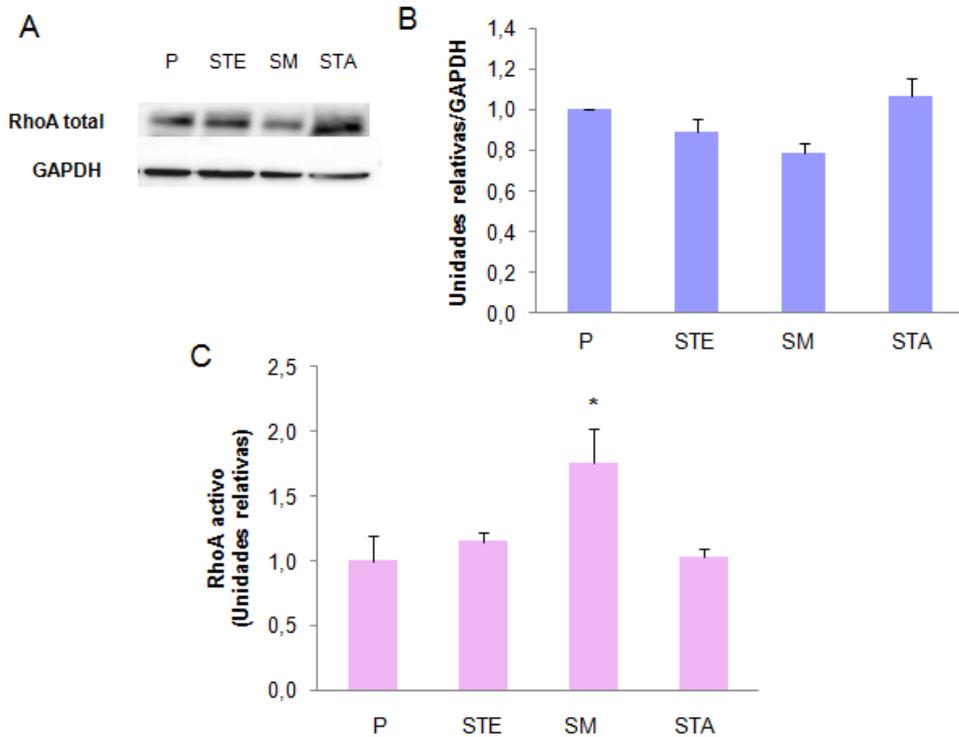


Figura. 36 Análisis de RhoA total y activo en el endometrio humano a lo largo del ciclo menstrual. (A) El extracto proteico obtenido a partir de biopsia de endometrio en fase proliferativa (P), secretora temprana (STE), media (SM) y tardía (STA) se sometió a Western blot SDS-PAGE para RhoA total y GAPDH. (B) Análisis densitométrico realizado a partir de tres experimentos diferentes y expresado como unidades relativas normalizadas con GAPDH. (C) Actividad de RhoA obtenida a partir de análisis G-LISA en el endometrio proliferativo, secretor temprano, medio y tardío. Se midió la absorbancia a 490 nm. Los valores se representan como el porcentaje de actividad (media \pm SEM) de las diferentes fases dentro del estado secretor respecto a la fase proliferativa en tres experimentos realizados.

Por el contrario, cuando se analizaron los niveles de la forma activa de RhoA mediante un ensayo G-LISA se observó un aumento significativo de los niveles durante la fase secretora media comparada con la fase proliferativa, la secretora temprana y la tardía (Fig. 36C). Esto constituye un fenotipo compatible con la ventana de receptividad endometrial.

5.3.8. Efecto de la activación/inactivación de RhoA sobre la adhesión embrionaria sobre las células HEC-1-A

En el experimento anterior vimos que en la fase secretora media, cuando se abre la ventana de implantación, se produce un aumento de la actividad de RhoA lo cual puede implicar una función sobre la adhesividad embrionaria. Se analizó el efecto de activar e inactivar funcionalmente RhoA en la línea celular de epitelio endometrial HEC-1-A mediante el uso de plásmidos. Las células primarias hEEC no se transfectaron de forma adecuada con los plásmidos utilizados, por tanto los siguientes estudios se desarrollaron usando únicamente la nombrada línea celular. La transfección se llevó a cabo usando plásmidos pcDNA3-GFP que contenían un mutante dominante negativo para RhoA (RhoA T19N) o constitutivamente activo (RhoA Q63L), también se transfectó con el plásmido control (*Wild type*). La inactivación de RhoA también se llevó a cabo tratando las células HEC-1-A con Toxina B obtenida a partir de *Clostridium difficile*, la cual glicosila irreversiblemente a la proteína RhoA, provocando una inactivación funcional de la molécula (Genth y cols., 2008).

Se realizó un ensayo *pulldown* para confirmar que se había producido una correcta activación/inactivación de RhoA. Aquellas células transfectadas con el plásmido constitutivamente activo RhoA Q63L presentaban un aumento en los niveles de RhoA activo, mientras que las transfectadas con el mutante

dominante negativo RhoA T19N o la Toxina B presentaban menor nivel de actividad. Los niveles totales de la proteína RhoA permanecieron sin variación en todos los casos (Fig. 37A).

Los niveles de RhoA activo también se analizaron mediante un ensayo G-LISA, donde se cuantificó el porcentaje de actividad de RhoA respecto al control. Este ensayo permitió corroborar los resultados anteriores, comprobando que el aumento o la disminución de RhoA activo en los diferentes casos (RhoA Q63L, RhoA T19N y Toxina B) eran estadísticamente significativos (Fig. 37B).

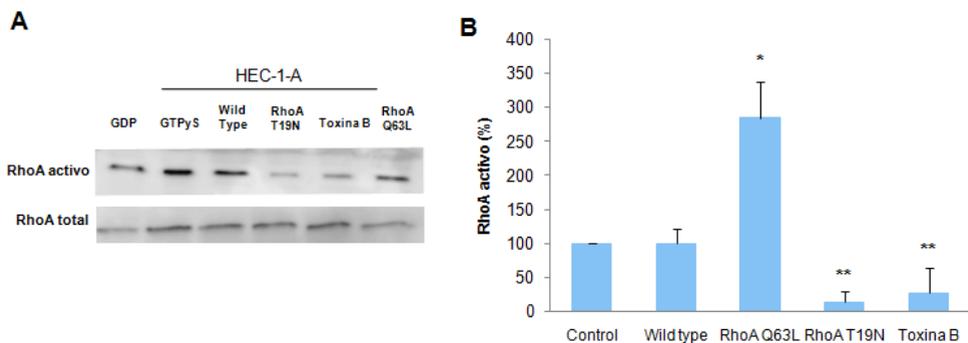


Figura. 37 Activación/inactivación de RhoA. (A) La forma de RhoA activa en las células HEC-1-A control y tratadas con los plásmidos (*Wild type*, RhoA Q63L, RhoA T19N) y con la toxina B se evaluó mediante un ensayo *pull-down* y los resultados se observaron mediante *Western blot*. Los extractos proteicos obtenidos a partir de células HEC-1-A se marcaron con GTP γ S o GDP para generar un control positivo y negativo. (B) Los lisados celulares de células HEC-1-A control y tratados se sometieron a análisis mediante ensayo G-LISA, midiendo la absorbancia a 490 nm. Los valores se representaron como porcentaje de actividad (media \pm SEM) respecto a las células control en tres experimentos realizados.

La adhesión de blastocistos de ratón a las células HEC-1-A se redujo significativamente cuando RhoA se inactivó con el mutante dominante negativo RhoA T19N o mediante el tratamiento con Toxina B (Fig. 38A). Una observación interesante fue que la adhesión embrionaria a las células HEC-1-A mejoraba notablemente cuando eran transfectadas con el mutante constitutivamente activo RhoA Q63L. También se observó una disminución dramática de la adhesión de esferoides JEG-3 cuando se inactivaba RhoA en las células HEC-1-A mediante transfección con RhoA T19N o tratándolas con toxina B, pero no se consiguió mejorar la adhesión de éstos al transfectar las células con el mutante constitutivamente activo RhoA Q63L (Fig. 38B). Estos resultados indican que el estado de activación de RhoA se encuentra directamente implicado en la adhesión embrionaria al epitelio endometrial.

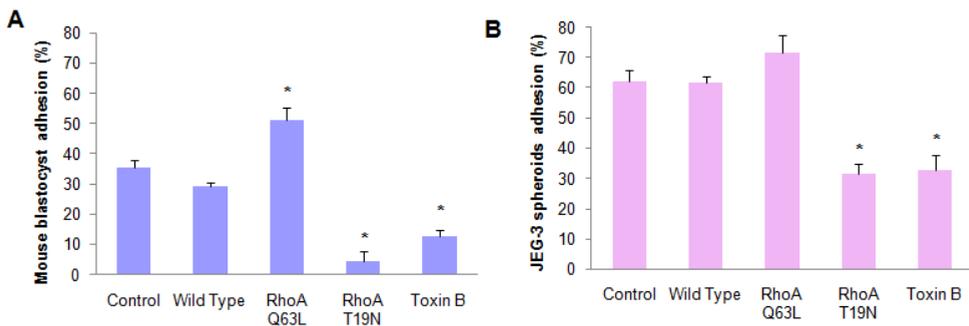


Figura. 38 Efectos de la activación/inactivación de RhoA en la adhesión de blastocistos de ratón o esferoides JEG-3 a células HEC-1-A. Se evaluó el porcentaje de adhesión de embriones de ratón (A) y esferoides JEG-3 (B) a las células HEC-1-A control. Los valores se representan como la media \pm SEM de tres experimentos diferentes (n= 10-15 blastocistos de ratón o esferoides JEG-3 por condición en cada experimento realizado) *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001.

5.3.9. Papel de ANXA2 y RhoA regulando la adhesividad de las células hEEC al embrión.

Nos planteamos examinar la posible relación entre ANXA2 y la actividad de RhoA, investigando el efecto sobre la adhesión embrionaria de inhibir ANXA2 combinado con la activación/inactivación de RhoA sobre las células HEC-1-A (Fig. 39A). Se comprobó que la inhibición de ANXA2 (ARNi ANXA2) junto con la inactivación de RhoA (RhoA T19N) disminuye significativamente la adhesión de esferoides JEG-3 sobre las células HEC-1-A comparadas con las células control, aunque no existían diferencias significativas al comparar la aplicación de estos tratamientos de forma individual. Por lo tanto, la doble inhibición/inactivación no potenciaba un defecto mayor sobre la adhesión embrionaria a células epiteliales.

Sin embargo, cuando se inhibió ANXA2 (ARNi ANXA2) y se activó RhoA (RhoA Q63L) el porcentaje de adhesión de esferoides JEG-3 sobre las células HEC-1-A no descendió, sino que fue similar al de las células control. Ello indicaba que la expresión de RhoA constitutivamente activo revertía parcialmente los defectos en adhesión embrionaria provocados por la inhibición de ANXA2.

Para tratar de entender la posible vinculación entre ANXA2 y RhoA en las células endometriales epiteliales, llevamos a cabo un estudio de localización, mediante inmunocitoquímica doble sobre células HEC-1-A (Fig. 39).

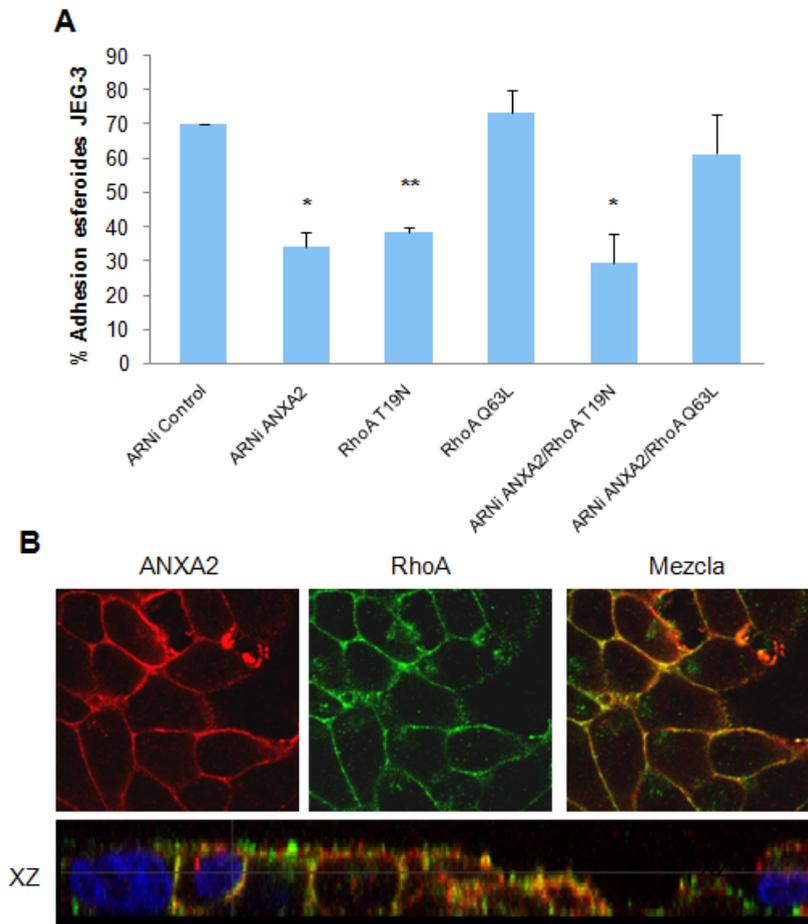


Figura 39. Efecto de la inhibición de ANXA2 combinado con la activación/inactivación de RhoA sobre la dhesión de esferoides JEG-3 a las células HEC-1-A. (A) Análisis de la adhesión de esferoides JEG-3 sobre células HEC-1-A transfectadas con ARNi ANXA2, plásmidos RhoA T19N, RhoA Q63L o una combinación de ARNi ANXA2/ RhoA T19N y ARNi ANXA2/RhoA Q63L. (B) Las células epiteliales HEC-1-A se sometieron a un marcaje doble para ANXA2 (rojo) y RhoA (verde) y se visualizó una clara colocalización a la largo de la membrana (mezcla). La sección XZ muestra la colocalización de las proteínas ANXA2 y RhoA a lo largo de la membrana lateral y apical con más detalle.

Se observó una señal intensa de ANXA2 fundamentalmente a nivel de la membrana plasmática, donde mayoritariamente colocalizó con RhoA (Fig. 39B). RhoA también presentaba señal en el compartimento citoplasmático, coincidente con un patrón de localización que ya ha sido reportado en otros tipos de células epiteliales (Yonemura y cols., 2006). Por lo tanto, se comprobó que ambas proteínas tenían una distribución celular similares, presentando un patrón claro de colocalización a nivel de la membrana plasmática de las células epiteliales.

5.3.10. Regulación de la reorganización del citoesqueleto por ANXA2 y RhoA.

Existen trabajos donde se detalla que tanto ANXA2 como RhoA son proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto de actina en células epiteliales (Hayes y cols., 2006; Heneweer y cols., 2003). Se ha demostrado que ANXA2 y RhoA tienen una función en la restructuración dinámica de la F-actina, proceso que resulta fundamental para la adhesión del trofoblasto y la reconstitución de las células epiteliales (Thie y cols., 1997). Por tanto, se llevó a cabo un análisis de la localización subcelular de ANXA2 y RhoA respecto a la distribución de F-actina, que constituye una diana importante sobre la que actúan estas moléculas. Después de la doble inmunocitoquímica de ANXA2/F-actina y RhoA/F-actina, se observó de nuevo que la señal tanto de ANXA2 como RhoA aparecía distribuida mayoritariamente a lo largo de la membrana plasmática de las células epiteliales endometriales donde colocalizaba con la red de filamentos de actina (Fig. 40A).

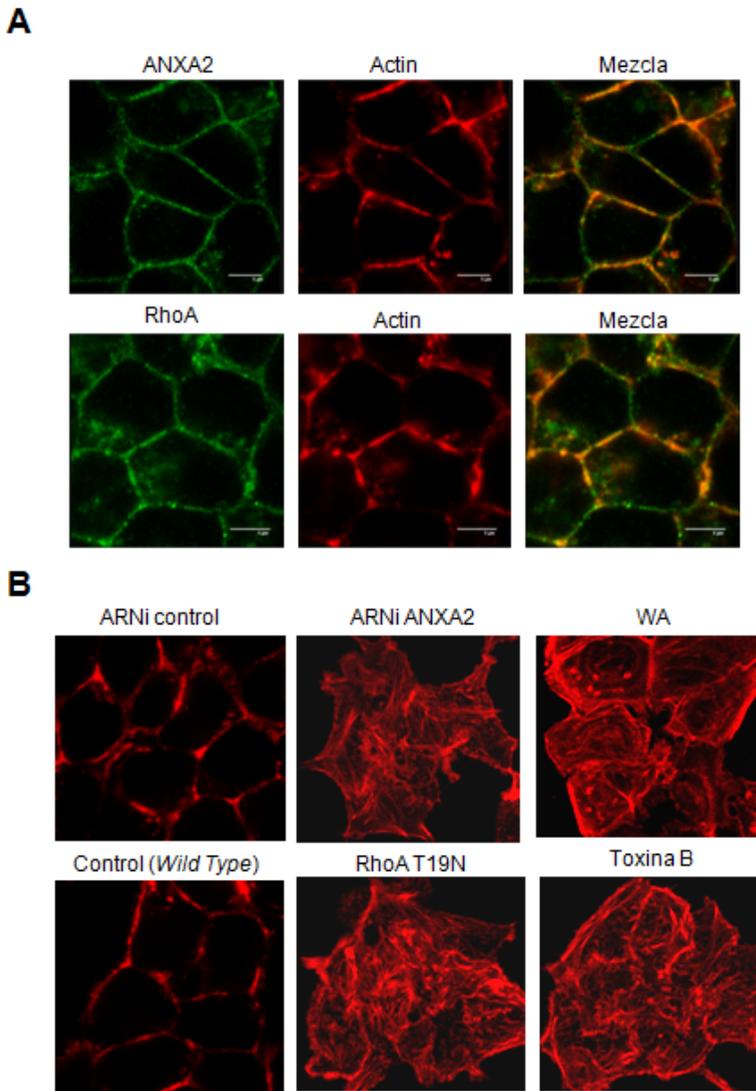


Figura. 40 Análisis del remodelado de F-actina que se produce cuando ANXA2 es inhibida o RhoA es inactivada. (A) ANXA2 (verde) y RhoA (verde) se colocalizaron con las fibras F-actina (rojo) en las células epiteliales. (B) La arquitectura de F-actina en las células HEC-1-A control, inhibidas para ANXA2 e inactivadas para RhoA se visualizó con un marcaje con rodamina-faloidina.

El siguiente objetivo, fue analizar los efectos de la inhibición de ANXA2 y de la inactivación de RhoA sobre la arquitectura de F-actina en las células HEC-1-A, aplicando una tinción con Faloidina marcada con rodamina B. Se comprobó que la inhibición de los niveles de ANXA2 y la inactivación de RhoA inducen modificaciones significativas en la distribución de las fibras de F-actina (Fig. 40B).

Las células control presentaban una morfología redondeada con una red de filamentos de actina distribuidas a lo largo de la periferia celular. Por el contrario, aquellas células con ANXA2 inhibida o con RhoA inactivo presentaban agrupaciones de fibras extendidas por todo el compartimento citoplásmico, con un fenotipo celular alargado. Los agregados de actina presentaban tamaños variables y una distribución muy irregular a lo largo de toda la superficie celular.

Este análisis de la arquitectura de actina después de la inhibición de ANXA2 o la inactivación de RhoA, no sólo se llevo a cabo a nivel morfológico sino que se completó con un ensayo a nivel bioquímico. Se estudió la proporción de actina globular (G-actina) en forma monómerica, que se hallaba libre en el citosol de la célula, comparado con la actina filamentosa (F-actina), incorporada en las fibras que constituyen el citoesqueleto (Fig. 41A). Este ensayo se llevó a cabo en células control, en células donde ANXA2 estaba inhibida (mediante ARNi ANXA2 o WA) y en células con RhoA inactivado (mediante RhoA T19N o Toxina B). La relación entre G/F-actina en el caso de las células control fue 1:1, mientras que cuando la ANXA2 se inhibió la relación se modificó notablemente con un aumento significativo del contenido de G-actina respecto a F-actina (una relación de 6:1 en el caso de células

transfectadas con ARNi ANXA2 y de 3:1 en las células tratadas con WA) (Fig. 41B). Los resultados cuando RhoA se inactivó a nivel celular fueron similares, con un incremento significativo en la cantidad de G-actina comparada con la F-actina (una relación de 3:1 en el caso de células transfectadas con RhoA T19N y de 4:1 en las células tratadas con Toxina B) (Figura 41B). Este experimento corroboró que tanto la inhibición de ANXA2 como la inactivación de RhoA provocan una despolimerización de los filamentos de actina y por tanto, un incremento en la fracción de actina monómerica libre en el citosol. Ambos estudios, a nivel morfológico y bioquímico, demuestran que se produce una significativa desorganización de las fibras de F-actina cuando se inhibe ANXA2 o se inactiva RhoA.

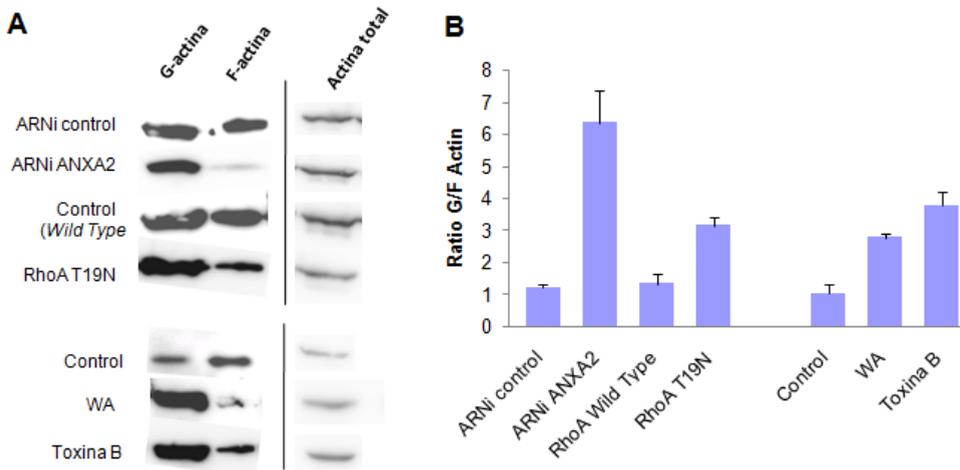


Figura. 41 Análisis bioquímico de la proporción de G/F-actina de las células HEC-1-A cuando ANXA2 es inhibida o RhoA es inactivada. (A) La actina G (soluble), actina F (filamentosa) y la fracción total de las células HEC-1-A inhibidas para ANXA2 e inactivadas para RhoA se analizaron mediante un ensayo *in vivo* y los resultados se observaron por Western blot. (B) Se realizó un análisis densitométrico a partir de tres experimentos diferentes, y se expresó como ratio de G/F actina normalizados con la proporción de actina total.

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

El conocimiento científico acerca del proceso de receptividad endometrial resulta fundamental para entender los mecanismos moleculares que regulan el proceso de implantación embrionaria y por tanto, la reproducción humana. La expresión diferencial de genes en el sistema embrión-endometrio regula la expresión de proteínas, preparando a las células del sistema para todos los procesos asociados a la implantación del blastocisto en las fases de colocalización, adhesión e invasión. El hallazgo de biomarcadores durante la ventana de implantación endometrial permitiría el diseño de nuevos elementos diagnósticos de utilidad clínica en la determinación de la receptividad endometrial, así como la identificación de posibles dianas terapéuticas, en procesos de infertilidad, endometriosis, preeclampsia o en carcinomas endometriales. Por el contrario, este conocimiento también podría ser empleado para diseñar interceptivos con el fin de prevenir la implantación embrionaria (Simón y cols., 1992).

- **La proteómica aplicada a la receptividad endometrial**

La primera parte de la tesis consistió en estudiar en profundidad la implicación activa del endometrio en la reproducción humana, mediante la adquisición del estado de receptividad, imprescindible para la implantación embrionaria y el desarrollo de la gestación.

El endometrio es un órgano activo y dinámico cuya función principal es hacer posible la implantación del embrión y el desarrollo fetal y su existencia

constituye la condición *sine qua non* para la continuidad de la especie en mamíferos.

La mejora de nuestro conocimiento en otras áreas de la reproducción humana contrasta con el bajo desarrollo de la investigación en el endometrio. En la actualidad, aun se sigue empleando para el dataje endometrial criterios diagnósticos exclusivamente morfológicos que se crearon hace más de 50 años por Noyes (Noyes y cols., 1950) y desconocemos la etiología de la endometriosis que se descubrió hace 146 años (Von Rokitasnski, 1860). El enorme desarrollo de la biología molecular ha permitido profundizar en el estudio de los procesos biológicos, tanto fisiológicos como patológicos. Clásicamente, los estudios llevados a cabo analizaban la expresión de un único gen y/o proteína, o un conjunto muy reducido de éstos en los distintos tejidos. Con la secuenciación del genoma humano y el desarrollo de nuevas tecnologías se ha entrado de lleno en la era genómica. En esta era han surgido las denominadas ciencias “ómicas” (genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica), que han supuesto una auténtica revolución en la biología molecular clásica. Mediante la transcriptómica, se ha conseguido establecer que genes son esenciales en el desarrollo del estatus receptivo del endometrio (Kao y cols., 2002; Carson y cols., 2002; Borthwick y cols., 2003; Riesewijk y cols., 2003; Mirkin y cols., 2005; Horcajadas y cols., 2004; Horcajadas y cols., 2007).

A diferencia del genoma, el proteoma es altamente complejo, dinámico y variable, dependiente no sólo del grado de desarrollo de la célula, tejido u organismo implicado, sino también de su interacción con el ambiente que lo rodea. A pesar de algunos retos técnicos que imponen ciertas limitaciones a la aplicación de las tecnologías proteómicas al estudio de la receptividad endometrial, este abordaje puede proporcionar un tipo de información sin

precedentes. Por todo ello, se hizo necesaria la investigación proteómica del endometrio humano mediante la utilización de las nuevas tecnologías existentes, que nos puedan dar nuevas posibilidades para mejorar nuestra capacidad diagnóstica y terapéutica.

Desde esta nueva perspectiva “ómica”, se llevó a cabo un intento inicial con el fin de identificar biomarcadores del proceso de receptividad endometrial comparando el endometrio proliferativo con el secretor mediante tecnología proteómica (De Souza y cols., 2005). Este grupo llevó a cabo una primera aproximación para estudiar el repertorio proteico usando técnicas de marcaje isotópico (ICAT), purificación por afinidad y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en línea (LC-MS). Solo cinco proteínas mostraban alteración clara en sus niveles de expresión entre el endometrio proliferativo y secretor, siendo el proto-oncogen FRAT1 y el precursor de la subunidad zeta 1 del receptor del glutamato NMDA las proteínas de mayor interés.

Unos años después, Parmar y cols publicaron un estudio prospectivo identificando proteínas con expresión diferencial a lo largo del ciclo menstrual (Parmar y cols., 2009). Compararon el endometrio en fase proliferativa con la fase secretora media mediante 2D-DIGE (electroforesis bidimensional diferencial en gel). El posterior análisis mediante espectrometría de masas reveló una sobreexpresión de calreticulina, la cadena beta de fibrinógeno, isoenzima adenilato ciclasa 5 y la transferrina en el endometrio proliferativo; y anexina A5, antitripsina alfa 1, creatinin quinasa y peroxidoxina 6 en la fase media secretora si se compara con la otra fase.

Estos trabajos obtuvieron un repertorio proteico muy restringido y ninguna de estas proteínas han sido identificadas en nuestro estudio,

probablemente sea debido a la diferente naturaleza de las muestras utilizadas para el análisis (endometrio proliferativo y secretor usado por estos grupos *versus* LH+2 y LH+7 usado en nuestro estudio) y debido a las diferentes técnicas proteómicas empleadas.

Nuestro estudio de proteómica de la receptividad endometrial se basó en la separación y cuantificación de proteínas mediante la técnica DIGE, la identificación de aquellas proteínas diferencialmente expresadas en el estado de receptividad endometrial (LH+7) respecto al pre-receptivo (LH+2), seguido de un análisis mediante espectrometría de masas tipo MALDI-MS y finalmente una búsqueda en la base de datos *Mascot*.

El listado de proteínas diferencialmente expresadas se comparó con la información disponible en la base de datos de endometrio (www.endometrialdatabase.com), donde se encuentran recopilados los patrones de expresión génica del endometrio receptivo comparado con el pre-receptivo, aportado por diferentes grupos de investigación. Aunque algunas de las proteínas identificadas en nuestro estudio reguladas a la alza o a la baja coincidieron con los patrones de expresión génica, tales como estatmina 1, anexina A2, oxidasa monoamina A, componente 1 del receptor de progesterona asociado a membrana, colágeno alfa 1, anexina 4 y la proteína S100-A10 (Riesewijk y cols., 2003; Mirkin y cols., 2005), en otros estudios transcriptómicos se obtuvieron muchos otros genes desregulados que no se correlacionaron con las proteínas con expresión diferencial halladas en nuestro trabajo. Se sabe que en ocasiones la identificación de una alteración a nivel de la expresión génica no siempre se correlaciona con cambios a nivel de proteína (Chen y cols., 2002) y ello es explicado en gran parte a la existencia de las modificaciones post-transcripcionales.

Ello demuestra que existen diferentes aproximaciones para estudiar la complejidad de los procesos biológicos que aportan información complementaria, y resulta evidente que lo más efectivo es un análisis integral a diferentes niveles, tanto expresión génica como proteica (Nie y cols., 2006). Un análisis integrado a escala global de los datos transcriptómicos y proteómicos podría proporcionar un gran conocimiento acerca de los mecanismos subyacentes a los procesos biológicos complejos, tales como la receptividad endometrial y la implantación embrionaria. Sin embargo, en la mayor parte de procesos fisiológicos la relación entre la abundancia de una proteína y su nivel de expresión de ARNm es complicada, debido a ello se requieren sofisticados modelos estadísticos para captar esta relación.

Además, resulta llamativo que los estudios transcriptómicos en receptividad endometrial den como resultado un conjunto muy elevado de genes alterados comparado con el escaso número de proteínas alteradas que se identifican en nuestro estudio proteómico. Por un lado, esto se podría explicar debido a las limitaciones de la tecnología 2D-DIGE. En dichas técnicas, no se pueden analizar proteínas fuera del rango de pH que hemos seleccionado (en nuestro caso, pH entre 3 y 11), además se pierden aquellas proteínas de gran tamaño o tamaño muy pequeño, y también se encuentra dificultad analizando proteínas muy hidrofóbicas o aquellas que son menos abundantes. Por otro lado, existen proteínas implicadas en receptividad que son secretadas al exterior celular y por tanto, no se encuentran en una biopsia endometrial.

- **Proteínas relevantes en receptividad endometrial**

En este trabajo resulta interesante destacar que se encontraron dos proteínas, estatmina 1 y anexina A2, ambas relacionadas con el citoesqueleto, que presentan una regulación opuesta de forma consistente entre el

endometrio pre-receptivo y receptivo. Además cuando se analizaron sobre un endometrio en estado refractario inducido por la inserción de un DIU, se observó una notable reversión del patrón de expresión de estas dos proteínas. El hecho de que estas dos proteínas implicadas en el citoesqueleto se encuentren desreguladas, no resulta sorprendente, ya que para la consecución del fenotipo de receptividad endometrial se requiere un remodelado de la organización epitelial que tiene lugar como resultado de una disrupción del citoesqueleto.

La proteína estatmina 1, conocida como Oncoproteína 18 o p19, es una fosfoproteína altamente conservada de 19 kDa que tiene cuatro residuos de serina en su extremo N-terminal (Irwin y cols., 1989; Thie y cols., 1995) y actúa como reguladora de la dinámica de los microtúbulos durante la progresión del ciclo celular. La estatmina interactúa con dos moléculas de tubulina dimérica para formar un complejo ternario muy apretado, llamado complejo T2S (Sobel, 1991). Cuando la estatmina secuestra a la tubulina en el complejo T2S, la tubulina se hace no polimerizable y sin esta polimerización no se pueden ensamblar los microtúbulos. A través de este mecanismo, la estatmina estimula el desensamblaje de los microtúbulos (Larsson y cols., 1997), sin actuar directamente en el extremo de los mismos.

La regulación de la estatmina es dependiente del ciclo celular y está controlada por las proteínas quinasas en respuesta a señales específicas (Doye y cols., 1992). La fosforilación de la estatmina 1 en alguno de sus cuatro residuos de serina: Ser16, Ser25, Ser38 y Ser63, por la acción de diferentes quinasas provoca una unión más débil a la tubulina. Ello incrementa la concentración de tubulina disponible en el citoplasma para el ensamblaje de los

microtúbulos. Por tanto, impide su acción en la desestabilización de los microtúbulos, y por contra, se promueve la polimerización.

Se ha descrito que los niveles de estatmina 1 se regulan específicamente en el sitio de implantación del embrión, y se encuentran regulados a la baja durante el proceso de decidualización en roedores (Tamura y cols., 2003; Yoshie y cols., 2004). En la especie humana, estatmina 1 se asocia con procesos de proliferación y/o diferenciación endometrial. Cuando las células estromales se decidualizan, se observa una disminución en los niveles de estatmina 1 y cuando se interfiere su expresión mediante ARNi se inhibe la decidualización (Tamura y cols., 2006). Nuestros resultados indican que estatmina 1 se encuentra regulada a la baja en el endometrio receptivo, lo cual apoya a la hipótesis de que bajos niveles de esta molécula promueven o apoyan al proceso de decidualización, y los altos niveles de estatmina 1 durante la fase pre-receptiva podría estimular la proliferación de las células estromales, así como se ha mostrado en otros tipos celulares (Rowlands et al., 1995). La reducción en los niveles de estatmina 1 en el endometrio receptivo no resulta sorprendente debido al alto contenido en células estromales y al masivo proceso de decidualización que tiene lugar.

La fosforilación de estatmina 1 podría regular la cantidad de proteína activa que se encuentra presente en el estroma, generándose un gradiente de proteína fosforilada/desfosforilada. Concretamente, la fosforilación a nivel de la Ser16 y Ser63 provoca una disminución de la actividad desestabilizadora de microtúbulos, y la fosforilación en múltiples sitios de la estatmina 1 es necesaria para que tenga lugar la progresión del ciclo celular (Rubin y Atweh, 2004). De hecho, en el análisis proteómico se detectó que una de las formas de proteína estatmina 1 fosforilada en al menos la Ser25 se encontraba regulada a

la baja en el endometrio receptivo, sugiriendo que el sistema de funcionamiento de esta molécula, implicada en cambios a nivel endometrial, es complejo y requiere de más investigación para comprenderlo. Además, se comprobó que el patrón de expresión de estatmina 1 en un endometrio refractario inducido con un DIU se revierte completamente, observándose un marcaje muy elevado en estroma, tal y como ocurre en la fase pre-receptiva. De acuerdo con el mecanismo que hemos descrito anteriormente esta desregulación, podría estar inhibiendo la decidualización, y por lo tanto, interferir en el proceso de invasión del embrión.

Como hemos nombrado, hay estudios que sugieren que la estatmina está implicada en la proliferación de células endometriales humanas promoviendo la desestabilización de los microtúbulos y permitiendo la formación de nuevas redes (Tamura y cols., 2006). Nuestra hipótesis es que esta proteína está implicada en la proliferación de las células estromales (regulada a la alza en la fase pre-receptiva) que son la capa funcional del endometrio y por tanto, es clave en la preparación para la implantación embrionaria. Se requiere un descenso en los niveles de esta molécula para que tenga lugar el proceso de decidualización, como otros estudios han mostrado.

Anexina A2 es una proteína relacionada con el mantenimiento de la dinámica del citoesqueleto (Hayes y cols., 2006). Extrapolando a la situación *in vivo*, conocemos que una modulación activa del citoesqueleto de actina debe producirse cuando el epitelio endometrial adquiere un estado de receptividad. Así que, ANXA2 a través de su ruta biológica podría estar relacionada con los mecanismos de señalización y efectores que específicamente controlan la reordenación del citoesqueleto de actina en las células epiteliales endometriales. Por este motivo, nos resultó muy interesante extender nuestra

investigación analizando el posible papel de anexina A2 durante la implantación embrionaria. Posteriormente profundizaremos más sobre esta molécula.

- **La proteómica aplicada al proceso de decidualización**

En nuestro primer objetivo encontramos algunas proteínas, tales como estatmina, que desarrollan su función principal a nivel de las células estromales endometriales, y por tanto, posiblemente se encuentren implicadas en el proceso de decidualización. Este proceso resulta crítico para que tenga lugar el establecimiento y mantenimiento de un embarazo exitoso. Consiste en una compleja transformación que requiere cambios morfológicos y funcionales en la estructura y la fisiología celular. De ello se deduce que se trata de un proceso donde están implicadas un número elevado de proteínas tanto a nivel intracelular como secretadas. Por tanto, en esta segunda parte de la tesis nos planteamos llevar a cabo el estudio del proceso de decidualización desde el punto de vista proteómico. La información resultante es de gran utilidad para conocer más acerca de la fisiología de este proceso, así como para detectar anomalías a nivel endometrial que podrían ser causantes de esterilidad o de aborto.

Además, hasta la fecha, se habían desarrollado pocos estudios para estudiar el proteoma de células decidualizadas *in vitro*. Encontramos un estudio donde se indujo la decidualización de las células estromales endometriales y se trataron con la proproteína convertasa 6 (PC6). Tras ello, se llevó a cabo un análisis proteómico para ver la implicación de esta proteína sobre el proceso de decidualización (Kilpatrick y cols., 2009). En otro estudio más reciente, se estudiaban células estromales decidualizadas con AMPc, mediante DIGE e

identificación por espectrometría de masas. Pero resultó muy deficiente, ya que de las 88 proteínas que se detectaron como diferencialmente expresadas, finalmente solo se identificaron 18 (Paule y cols., 2010).

Nosotros analizamos el repertorio a nivel proteómico y secretómico de células del estroma procedentes de biopsias endometriales que se decidularon *in vitro*. El modelo de decidualización *in vitro* es una herramienta ampliamente extendida y establecida para el estudio de este proceso. Una vez aisladas y cultivadas las células estromales, podemos inducir su decidualización mediante la aplicación de progesterona y -estradiol, así como también se puede inducir mediante la administración de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), segundo mensajero de este proceso. En este trabajo nos hemos decantado por la aplicación de la terapia hormonal, para acercarnos de forma más estrecha a la situación fisiológica que tiene lugar *in vivo*.

El análisis proteómico del proceso de decidualización fue similar al aplicado en el caso del estudio de la receptividad endometrial, basado en la separación de proteínas mediante la técnica DIGE, la identificación de aquellas proteínas diferencialmente expresadas en las células decidualizadas respecto a las no decidualizadas, seguido de un análisis mediante espectrometría de masas tipo MALDI-MS y finalmente una búsqueda en la base de datos *Mascot*. En este análisis se encontraron 60 proteínas diferencialmente expresadas, que incluían marcadores ya conocidos como catepsina B (Afonso y cols., 1997) y nuevos biomarcadores como transglutaminasa 2 y peroxiredoxina 4.

Por otro lado, se estudió el patrón de proteínas consumidas o secretadas en el medio de cultivo mediante el uso de un *array* de citoquinas llamado *Human*

Cytokine Antibody Array G Series 2000 (Raybiotech). Con esta estrategia conseguimos un análisis secretómico parcial, ya que se estudiaron un conjunto de las 174 citoquinas humanas incluidas en el *array*, mientras que aquellas proteínas que no fueron incluidas no se detectaron. No obstante, el modelo de *array* escogido para realizar este análisis recoge las proteínas más relevantes secretadas en gran parte de proceso biológicos.

Fruto de estos análisis hemos identificado proteínas importantes implicadas en el proceso de decidualización, tanto expresadas intracelularmente, como secretadas al espacio extracelular. Todo este conjunto de proteínas se han categorizado funcionalmente y ello nos revela aspectos muy interesantes de la biología de este proceso.

- **Proteínas relevantes a nivel intracelular**

En primer lugar vimos que una gran proporción de proteínas reguladas intracelularmente se encontraban relacionadas con la organización del citoesqueleto. Dado la importancia de la reestructuración del citoesqueleto durante la decidualización, no resulta sorprendente que el 28% de proteínas encontradas en este trabajo estén relacionadas con el citoesqueleto, y por tanto, sufren una estrecha regulación durante este proceso. Este hallazgo se corroboró por un trabajo anterior, donde también se identificaron muchas proteínas implicadas en la estructura celular y en la remodelación del citoesqueleto (Paule y cols., 2010). Recientemente se ha demostrado que la desestabilización del citoesqueleto acelera la decidualización, mientras que un aumento en los niveles de fosforilación de la cadena ligera de miosina impide la decidualización (Ihnatowch y cols., 2007). Algunas de ellas, como transgelina, conocida como proteína 22 del músculo liso (SM22) (Nair y cols., 2006), no

habían sido descritas anteriormente en decidualización humana, y por lo tanto constituye un biomarcador intracelular novedoso.

Además, se vió que la iniciación de la decidualización estaba acompañada con un aumento significativo de actina (tanto actina beta como gamma) y una disminución de actinina alfa. La regulación de componentes del citoesqueleto parece clave para este fenómeno, además existen estudios que demuestran que una disrupción de los filamentos de actina por acción de drogas específicas como jasplaquinolida, alteran el curso de la decidualización (Ihnatowch y cols., 2009).

En segundo lugar, vimos modificaciones importantes en moléculas implicadas en la composición y degradación de la matriz extracelular, como la disminución de las metaloproteasas (MMP2, MMP3 y MMP14) e incremento de los inhibidores de proteasas como TIMP1. El balance entre estas proteínas resulta fundamental para controlar la invasión del trofoblasto en las células deciduales (Osteen y cols., 1994).

- **Proteínas secretadas/consumidas relevantes durante el proceso de decidualización**

Las células deciduales actúan como una fuente de factores de crecimiento y citoquinas que ejercen control y apoyo sobre la invasión del trofoblasto (Finn, 1997; Glasser y cols., 1991). En nuestro análisis de secretómica parcial se encontraron 13 proteínas diferencialmente secretadas al comparar el medio de células ESC decidualizadas con aquellas sin decidualizar (11 reguladas a la alza y 2 a la baja). Además de marcadores bien conocidos

como IGFBP-1 y prolactina, se encontraron por primera vez otras proteínas implicadas en este proceso como MPIF-1.

MPIF-1, proteína también conocida como CCL23 muestra actividad quimiotáctica para monocitos, linfocitos T inactivos y neutrófilos, pero no para linfocitos T cuando están activados. Esta quimioquina participa en la señalización celular, quimiotaxis, respuesta inflamatoria e inmune (Patel y cols., 1997). Se ha visto que en cultivo tridimensional en matrigel la proteína MPIF-1 humana induce la migración de células endoteliales y la formación de vasos sanguíneos a través de la unión al receptor CCR1 (Son y cols., 2006). La neutralización de esta molécula con los anticuerpos anti-MPIF-1 y anti-CCR1, produce un bloqueo de la invasión de las células HUVECs con MPIF-1 activada. Estos resultados nos indican que MPIF-1 podría tener un papel en la angiogénesis que tiene lugar en el tejido decidual.

Por otro lado, se encontraron moléculas como IL-6 y MCP-3 que estaban reguladas a la baja en el medio de células ESC decidualizadas comparadas con el medio de células control. Se ha descrito que la proteína interleuquina 6 (IL-6) tiene un efecto en estimular la invasión del citotrofoblasto durante el primer trimestre de embarazo, mientras que anti-IL-6 inhibe este efecto (Jovanovic y Vicovac., 2009). MCP-3, también conocida como CCL7, es un factor quimiotáctico que se une a diferentes receptores CCR1, CCR2 y CCR3. Existen ensayos de migración que han utilizado la línea celular del trofoblasto que más se asemeja el citotrofoblasto extraveloso (AC1M-88), y muestran que la migración del trofoblasto no se produce en respuesta a MCP-3 (Hannan y cols., 2006).

- **Integración de la información proteómica y secretómica del proceso de decidualización**

Concluyendo este segundo estudio, se generó por primera vez un modelo de la decidualización humana usando herramientas bioinformáticas complejas. Se combinaron nuestros datos proteómicos y secretómicos en una gran red proteica altamente interconectados, a la cual denominamos interactoma. Además se integró con la información transcriptómica del proceso de decidualización, ya publicada en otros estudios (Aghajanova y cols., 2010). Resultó llamativo que el número de genes cuya expresión diferencial fuese observada tanto a nivel génico como proteico fue muy reducido, únicamente cuatro: caldesmon 1, superoxido dismutasa, actinina alfa 4, transgelina, calponina. Al igual que en nuestro primer trabajo, de nuevo se muestra la baja correlación existente entre los análisis transcriptómicos y proteómicos, y que no siempre variaciones a nivel de expresión génica se plasman a nivel proteico. Podría deberse a la existencia de modificaciones postranscripcionales, así como las limitaciones de las tecnologías proteómicas. Por ello, resulta muy útil estudiar procesos biológicos complejos como la decidualización desde diferentes perspectivas: transcriptómica, proteómica y secretómica, e integrar toda esta información, tal y como hemos desarrollado en este trabajo.

Este sistema se complementó con la incorporación de aquellos factores de transcripción que controlaban la expresión de las diferentes proteínas que constituyen el interactoma. Gracias a este modelo pudimos ver como interaccionan entre sí los componentes intracelulares con los secretados, además de observar como tiene lugar la regulación génica de todas estas proteínas por la acción de los factores de transcripción.

También cabe destacar la importancia de las hormonas esteroideas para desencadenar la cascada de señalización que induce el proceso de decidualización. Por esta razón, los receptores hormonales de progesterona (PGR) y estradiol (ESR1 y ESR2) se incorporan en el interactoma, con el fin de observar como tenía lugar la interacción con el resto de moléculas de esta red proteica.

Los resultados de este trabajo revelan que existen conjuntos amplios de proteínas implicadas en este proceso biológico, y para la mejora del entendimiento se incluyeron diferentes categorías. Se pudo observar que principalmente estaban relacionadas con la regulación del citoesqueleto, adhesión celular, plegamiento y degradación de proteínas, homeostasis del estado oxido-reductor de la célula, metabolismo lipídico y transducción de señales. Este interactoma constituye una herramienta valiosa para interpretar este fenómeno biológico, así como para diagnosticar posibles patologías donde la decidualización podría estar afectada, tales como la preeclampsia o el aborto de repetición, y poder establecer terapias clínicas.

- **Proteínas relevantes en receptividad endometrial: Anexina A2**

Fruto del primer objetivo donde tratamos de desvelar que proteínas estaban implicadas en la receptividad endometrial (Dominguez y cols., 2009), identificamos a las proteínas: estamina 1 y anexina A2 (ANXA2) como marcadores importantes del endometrio humano receptivo. Resulta interesante comprobar que Fowler y cols., (2007) realizando un estudio proteómico en mujeres con endometriosis, identificó ANXA2 entre un grupo de proteínas disreguladas.

Anexina A2 (ANXA2) es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio, que ha sido asociada con los filamentos de actina, participando en el mantenimiento de la dinámica del citoesqueleto, así como mediando las interacciones membrana-membrana y membrana-citoesqueleto (Hayes y cols., 2006). También se ha descrito que la unión de ANXA2 a la superficie de células endoteliales induce la expresión de moléculas de adhesión (Wolberg and Roubey, 2005). Un trabajo reciente ha identificado a ANXA2 directamente implicada en la adhesión celular, a través de reordenamientos en el citoesqueleto de actina (Rescher y cols., 2008).

En nuestro estudio, los dos experimentos DIGE realizados revelaron la importancia de la proteína ANXA2 en el endometrio. En el modelo de endometrio refractario inducido por la presencia de un DIU, se vió como la expresión de ANXA2 disminuía dramáticamente tanto a nivel de las células epiteliales como estromales, sugiriendo una falta de ANXA2 cuando el endometrio era refractario.

Diferentes estudios han comprobado que durante el proceso de implantación para la formación de uniones estables entre las células epiteliales endometriales y las trofoblásticas se requiere una reordenación del citoesqueleto (Thie y cols., 1997), la desestabilización de la polaridad apico-basal (Simón y cols., 2000) y la redistribución de diferentes moléculas en el epitelio luminal (Linderberg, 1991). Nosotros postulamos que la regulación a la alza de ANXA2 en el endometrio que adquiere el estado de receptividad, podría ser importante para modular los cambios que tienen lugar a nivel epitelial para preparar el polo apical para la adhesión celular.

Por ello, nuestro último objetivo pretendió averiguar el posible papel de ANXA2, así como, su interacción con otras moléculas en la consecución de la receptividad y en las primeras etapas de la implantación embrionaria.

- **Estudio *in vitro* de la funcionalidad de ANXA2 sobre la implantación embrionaria**

Para comenzar el análisis molecular sobre la funcionalidad de ANXA2 en el endometrio receptivo, se extendieron los estudios previos de inmunolocalización a lo largo de todo el ciclo menstrual. Se pudo corroborar que ANXA2 se expresaba predominantemente en el endometrio secretor medio y tardío con una señal muy intensa a nivel del epitelio endometrial, donde podría estar ejerciendo su principal función. También se observó una importante expresión en las células estromales, donde ANXA2 podría estar implicada en la regulación del proceso de decidualización, el cual ha sido reportado que depende de la reorganización del citoesqueleto de actina (Ihnatovych y cols., 2009).

Para testar la relevancia funcional durante la primera fase del proceso de implantación embrionaria, se usó un modelo de adhesión *in vitro*: se cocultivaron blastocistos de ratón y esferoides humanos JEG-3 (son derivados de una línea celular de trofoblasto) sobre monocapas de células epiteliales HEC-1-A y células primarias hEEC. Este sistema ha sido ampliamente utilizado y aceptado para mimetizar el proceso de adhesión embrionaria que tiene lugar *in vivo* (Nancy y cols., 1993). Por un lado, tenemos un modelo interespecie donde cocultivamos embriones de ratón con células epiteliales endometriales humanas. Esta aproximación permite el uso de embriones vivos, que se usan una vez hayan salido de su zona pelúcida y por tanto, una vez estén preparados

para la adhesión. Por otro lado, usamos un modelo intraespecie, donde el cocultivo se hace con esferoides JEG-3 humanos, y de nuevo, sobre células epiteliales endometriales humanas. En este caso, los esferoides JEG-3 muestran una morfología y un comportamiento muy similar a los embriones humanos y por ello pueden ser usados como una aproximación *in vitro*. El mejor sistema sería el cocultivo de embriones humanos sobre células epiteliales primarias, pero su uso se encuentra restringido debido a los aspectos éticos que supone el uso de embriones humanos, así como, debido al alto número de embriones necesarios para este tipo de ensayo.

Para averiguar el papel de ANXA2 en este proceso, procedimos a inhibirla específicamente con el uso de ARN de interferencia, demostrando que afecta negativamente y de forma significativa a la adhesividad embrionaria. Los resultados también se verificaron usando tratamiento con witaferina A (WA), una droga que induce una inactivación funcional sobre ANXA2 (Falsey y cols., 2006). Por lo tanto, la inactivación funcional de ANXA2 tanto a nivel transcripcional como por alteración estructural, induce un defecto en la adhesividad embrionaria al epitelio endometrial en cultivo.

Una vez el blastocisto se adhiere a las células epiteliales, el trofoectodermo empieza a expandirse (Van Blerkom y Chavez., 1981) y comienza la invasión a través de las células estromales. Nuestros resultados demuestran que la expansión del trofoblasto se ve reducida cuando ANXA2 se encuentra inhibida en las células epiteliales endometriales. Este hecho podría reflejar una interacción defectuosa y una falta de flexibilidad entre el trofoblasto y las células epiteliales maternas debido a la incapacidad de reestructuración del citoesqueleto.

El blastocisto, una vez adherido, penetra a través de la superficie epitelial, a continuación las células del epitelio endometrial inician un proceso de cierre para sellar dicha superficie (Aplin, 2007). Mediante un ensayo de cierre de surco, pudimos comprobar cómo la capacidad de migración/proliferación de las células epiteliales en cultivo disminuye significativamente cuando ANXA2 es inhibida. Este fenómeno podría ser atribuido a la formación deficiente de estructuras intracelulares que son requeridas para que se produzca el movimiento celular, típicamente adhesiones focales y fibras de estrés de actina que son reguladas por la proteína ANXA2 (Hayes y cols., 2006).

ANXA2 funciona mediante el ensamblaje con la membrana lipídica y/o reclutando factores para iniciar los eventos de remodelado de actina, tales como miembros de la familia de RhoA (Rescher y cols., 2008). Comenzamos a realizar experimentos para analizar la relación funcional entre estas proteínas en nuestro sistema, demostrando que la inhibición de ANXA2 no afecta a los niveles totales de RhoA, pero significativamente sí se encuentra reducida la actividad de RhoA. También comprobamos que la proteína RhoA se encuentra implicada en la adhesión embrionaria sobre la línea de células epiteliales (Heneweer y cols., 2002; Heneweer y cols., 2005). Nuestros resultados revelan que se requiere RhoA activo para que se produzca una adhesión embrionaria de forma adecuada. La proteína RhoA podría estar actuando como una especie de interruptor de encendido/apagado, con lo cual podría ser un buen candidato para promover las propiedades adhesivas del trofoblasto a la superficie celular de las células epiteliales del endometrio.

Nos planteamos ver el efecto sobre la adhesión embrionaria de la combinación de tratamientos, es decir, la inhibición de ANXA2 combinado con activación/inactivación de RhoA. Este análisis demostró que la inducción de

RhoA de forma constitutivamente activa revierte parcialmente los efectos de la inhibición de ANXA2 sobre la adhesividad endometrial. Mientras que, la inactivación de RhoA no afecta a los niveles de ANXA2. Esto sugiere que ANXA2 actúa en una posición *upstream* en la ruta biológica induciendo a la forma activa de RhoA.

La posible relación existente entre estas dos proteínas se reforzó observando una llamativa co-localización de ANXA2 y RhoA a lo largo de la membrana plasmática de las células epiteliales en cultivo. Esta evidencia resulta consistente con la hipótesis de que exista una posible ruta biológica donde ANXA2 y RhoA ejecuten su acción sobre el reordenamiento del citoesqueleto de actina. Esta idea también se apoya en previos estudios, donde se describía que ANXA2 funciona mediante el reclutamiento de otras proteínas como tirosina fosfatasa SHP-2 y Rac-1 (Burkar y cols., 2003; Hanse y cols., 2002).

También se sabe que ANXA2 y RhoA se asocian con organización de las fibras de F-actina mediante un conjunto de mecanismos diferentes (Gerke y Moss, 2002; Filipenko y Waisman, 2001). Mediante estudios de localización por inmunocitoquímica, observamos que gran proporción de ANXA2 y RhoA colocalizan con la red de F-actina. Además, vimos que los efectos funcionales de inhibir ANXA2 e inactivar RhoA se asociaban con alteraciones significativas en la organización de F-actina y en su consecuente despolimerización. Estos resultados tienen un paralelismo con otro trabajo donde se trataron células endometriales epiteliales con citocalasina D, una droga de origen fúngico que se une a las fibras de actina, produciéndose una alta tasa de despolimerización (Thie y cols., 1997).

También se testó el efecto de la inhibición de ANXA2 o la inactivación de RhoA sobre la arquitectura de F-actina mediante un ensayo bioquímico, donde observamos que un gran aumento en la proporción de actina globular libre por el citoplasma. Estos resultados sugieren que ambos, ANXA2 y RhoA, tienen un papel funcional en la determinación de la organización de las fibras de actina mediante una interacción directa con la actina polimerizada y monomérica de las células epiteliales endometriales. Podría ocurrir que la proteína ANXA2 por sí misma remodele estas fibras o, alternativamente, que medie la activación de otras proteínas estructurales como RhoA, la cual directamente module este proceso (Fig. 42).

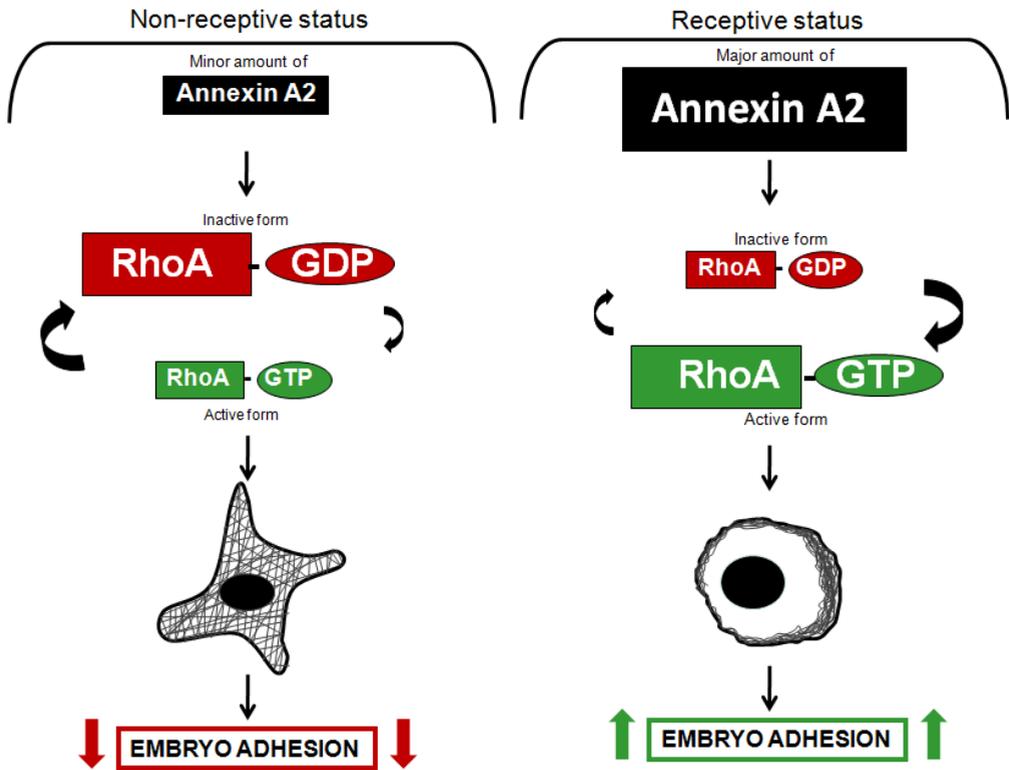


Figura. 42 Modelo hipotético de actuación de ANXA2 y RhoA en el endometrio en estado pre-receptivo y receptivo. En el estado no receptivo, encontramos una baja concentración de ANXA2, los niveles de la proteína RhoA activa se mantienen bajas, produciendo una desestabilización de las fibras de actina, ello conlleva una baja adhesividad del epitelio endometrial. En el endometrio receptivo, la concentración de ANXA2 aumenta, produciéndose un incremento en la proporción de RhoA activo, lo cual promueve la reorganización del citoesqueleto de actina e incrementa la adhesividad.

- **Perspectiva en investigación y en clínica**

En definitiva, la aplicación de las herramientas proteómicas tanto para estudiar la receptividad endometrial como la decidualización, nos aporta gran información acerca de proteínas relevantes que gobiernan estos procesos biológicos.

En el caso de la receptividad endometrial, podríamos usar estos biomarcadores como herramienta diagnóstica para la determinación de cuando un endometrio se halla en fase receptiva. Con ello se incorporaría un sistema de detección objetivo del estatus de receptividad endometrial. También podría servir para comprender procesos patológicos de infertilidad, observando cómo este patrón proteico identificado se encuentra alterado. Por otro lado, estudiando en profundidad algunos de estos biomarcadores podríamos identificar posibles dianas para inducir la intercepción.

En el caso de la decidualización, conocer el interactoma que gobierna este proceso nos permite conocer más acerca de este fenómeno biológico. Así como, podría servirnos para diagnosticar patologías donde este proceso decidualización podría estar afectado, tales como preeclampsia o casos de aborto de repetición, y poder establecer terapias clínicas.

Se requeriría una investigación molecular más extensa sobre cada una de las moléculas identificadas para desenmascarar su posible papel en estos procesos biológicos, y con ello poder testar nuestras hipótesis.

Siguiendo esta idea nos hemos centrado en estudiar a nivel molecular y celular el posible papel de ANXA2 sobre la implantación embrionaria. Nuestros

resultados demuestran que ANXA2 tiene una función importante, actuando *upstream* de la activación de RhoA, regulando el remodelado de la F-actina, siendo un proceso clave para la adhesividad del epitelio endometrial al embrión durante la implantación.

Basándonos en los resultados presentes, sugerimos que la ruta biológica donde actúan ANXA2/RhoA es una diana potencial a explorar con perspectivas a una posible aplicación translacional en medicina reproductiva. Con ello se podrían mejorar las tasas de implantación embrionaria en tratamientos fecundación *in vitro*, así como desarrollar estrategias para interferir este proceso, generando un nuevo fármaco anticonceptivo no-hormonal.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. El proteoma del endometrio receptivo está constituido por 32 proteínas expresadas diferencialmente.

2. Hemos demostrado que estatmina 1 y anexina A2 tienen una relevancia funcional en la receptividad, ya que su patrón de expresión se revierte en un endometrio refractario.

3. El proteoma y el secretoma integrado junto con la información genética, nos permite obtener el interactoma de la decidualización. El modelo de interactoma puede ser usado como herramienta para diagnosticar e interpretar este fenómeno biológico tanto en situación de normalidad como en patologías.

4. ANXA2 presenta una mayor expresión en la fase secretora media y tardía, fundamentalmente a nivel del epitelio luminal.

5. La inhibición funcional de ANXA2 a nivel de expresión de mRNA o sobre su actividad reduce la tasa de adhesión embrionaria, afecta a la expansión del trofoblasto e imposibilita la migración/proliferación de las células epiteliales endometriales.

6. ANXA2 regula *upstream* la activación de RhoA, cuya actividad aumenta en la fase secretora media. ANXA2 y RhoA regulan la reorganización de las fibras de F-actina en el citoesqueleto, afectando a la proporción de actina polimerizada y monomérica, modificando así el fenotipo celular receptivo.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 731-46.

Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 422: 198-207.

Afonso S, Romagnano L, Babiarz B. The expression and function of cystatin C and cathepsin B and cathepsin L during mouse embryo implantation and placentation. *Development* 1997; 124: 3415-25.

Aghajanova L, Hamilton AE, Giudice LC. Uterine Receptivity to Human Embryonic Implantation: Histology, Biomarkers, and Transcriptomics. *Semin Cell Dev Biol* 2008a; 19: 204-11.

Aghajanova L, Simon C, Horcajadas J. Are favorite molecules of endometrial receptivity still in favour? *Expert Rev Obstet Gynecol* 2008b; 3: 487-501.

Aghajanova L, Horcajadas JA, Weeks JL, Esteban FJ, Nezhat CN, Conti M, Giudice LC. The protein kinase A pathway-regulated transcriptome of endometrial stromal fibroblasts reveals compromised differentiation and persistent proliferative potential in endometriosis. *Endocrinology* 2010; 151: 1341-55.

Aplin JD. Adhesion molecules in implantation. *Rev Reprod.* 1997; 2: 84-93.

Aplin JD. Embryo implantation: the molecular mechanism remains elusive. *Reprod Biomed Online* 2007; 1: 49-55.

Augustin HG. Vascular morphogenesis in the ovary. *Baillere's Clin Obstet Gynecol* 2000; 14: 867-882.

Babbin B, Parkos C, Mandell K, Winfree M, Laur O et al. Annexin 2 regulates intestinal epithelial cell spreading and wound closure through Rho-related signaling. *The am J of Phatology* 2007; 170: 951-66.

Babiychuk EB, Monastyrskaya K, Burkhard FC, Wray S, Draeger A. Modulating signaling events in smooth muscle: cleavage of annexin 2 abolishes its binding to lipid rafts. *FASEB J* 2002; 16: 1177-84.

Badley RA, Woods A, Carruthers L, Rees DA. Cytoskeleton changes in fibroblast adhesion and detachment. *J Cell Sci.* 1980; 43: 379-90.

Balch C, Dedman JR: Annexins II and V inhibit cell migration. *Exp Cell Res* 1997; 237:259-263.

Barwe SP, Anilkumar G, Moon SY, Zheng Y, Whitelegge JP, Rajasekaran SA, Rajasekaran AK. Novel role for Na, K-ATPase in PI3-kinase signaling and suppression of cell motility. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 1082-1094.

Bergh PA, Navot D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil Steril* 1992; 58: 537-42.

Berkowitz SA. Protein purification by multidimensional liquid chromatography. *Adv Chromatogr.* 1989; 29: 175-219.

Borthwick JM, Charnock-Jones DS, Tom BD y cols. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 19-33.

Brar AK, Frank GR, Kessler CA, Cedars MI, Handwerger S. Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. *Endocrine* 1997; 6: 301-307.

Brar AK, Handwerger S, Kessler CA, Aronow BJ. Gene induction and categorical reprogramming during in vitro human endometrial fibroblast decidualization. *Physiol Genomics* 2001; 7: 135-148.

Bulmer JN, Johnson PM. Immunohistological characterization of the decidual leucocytic infiltrate related to endometrial gland epithelium in early human pregnancy. *Immunology* 1985; 55: 35-44.

Burkar A, Samii B, Corvera S, Shpetner HS. Regulation of the SHP-2 tyrosine phosphatase by a novel cholesterol and cell confluence dependent mechanism. *J Biol Chem* 2003; 278: 18360-18367.

Carson DD, Lagow E, Thathiah A y 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* 2002; 8: 871-9.

Chant J, Stowers L. GTPase cascades choreographing cellular behavior: movement, morphogenesis, and more. *Cell* 1995; 81: 1-4.

Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, Misek DE, Kardia SL, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM et al. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1: 304-313.

Chmczynski P y Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162: 156-159.

Clark SF, Martin S, Carozzi AJ, Hill MM, James DE. Intracellular localization of phosphatidylinositide 3-kinase and insulin receptor substrate-1 in adipocytes: potential involvement of a membrane skeleton. *J Cell Biol.* 1998; 140: 1211-1225.

Cooke PS, Buchanan DL, Young P, Setiawan T, Brody J, Korach KS, Taylor J, Lubahn DB, Cunha GR. Stromal strogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 6535-6540.

Corton M, Villuendas G, Botella JI, San Millan JL, Escobar-Morreale HF, Peral B. Improved resolution of the human adipose tissue proteome at alkaline and wide range pH by the addition of hydroxyethyl disulfide. *Proteomics* 2004; 4: 438-441.

Coutifaris C, Myers ER, Guzick DS y cols. Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status. *Fertil Steril.* 2004; 82: 1264-72.

Critchey H. Endometrial steroid receptor expression throughout the menstrual cycle. En, O'Brien P y cols. *Disorders of the Menstrual Cycle*. Ed. RCOG Press, London; 2000.

Curtis SH, Korach KS. Steroid receptor knockout models: phenotypes and responses illustrate interactions between receptor signaling pathways in vivo. *Adv Pharmacol* 2000; 47: 357-380.

Daly DC, Maslar IA, Riddick DH. Prolactin production during in vitro decidualization of proliferative endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 145: 672-678.

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

DeSouza L, Diehl G, Yang E, Guo J, Rodrigues MJ, Romaschin AD, Colgan TJ, Siu M. Proteomic analysis of the proliferative and secretory phases of the human endometrium: Protein identification and differential protein expression. *Proteomics* 2005; 5: 270-281.

Dominguez F, Pellicer A y Simon C. The chemokine connection: hormonal and embryonic regulation at the human maternal-embryonic interface a review. *Placenta Suppl* 2003; B: S48-55.

Dominguez F, Yanez-MO M, Sanchez-Madrid F y Simon C. Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players? *FASEB J* 2005; 19: 1056-1060.

Dominguez F, Gadea B, Esteban FJ, Horcajadas JA, Pellicer A, Simón C Comparative protein-profile analysis of implanted versus non-implanted human blastocysts. *Hum Reprod* 2008; 23: 1993-2000.

Dominguez F, Garrido-Gomez T, Lopez JA, Camafeita E, Quinonero A, Pellicer a, Simon C. Proteomic analysis of the human receptive versus non-receptive endometrium using differential in-gel electrophoresis and MALDI-MS unveils stathmin 1 and annexin A2 as differentially regulated. *Human Reproduction* 2009; 24: 2607-2617.

Dominguez F, Gadea B, Mercader A, Esteban FJ, Pellicer A, Simón C 2010 Embryologic outcome and secretome profile of implanted blastocysts obtained after coculture in human endometrial epithelial cells versus the sequential system. *Fertil Steril* 2010; 93: 774-782.

Doye V, Le Gouvello S, Dobransky T, Chneiweiss H, Beretta L, Sobel A. Expression of transfected stathmin cDNA reveals novel phosphorylated forms associated with developmental and functional cell regulation. *Biochem J* 1992; 287: 549-54.

Dunn CL, Kelly RW, Critchley HO. Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod Biomed* 2003; 7: 151-161.

Enders AC. Contributions of comparative studies to understanding mechanism of implantation. En: *Endocrinology of embryo-endometrium interactions*. 1994; 9: 11-16.

Ettiene-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002; 2002: 629-6325.

Falsey R, Marron M, Kamal GM, Gunaherath B, Shirahatti N, Mahadevan D, Gunatilaka AA, Whitesell L. Actin microfilament aggregation induced by withaferin A is mediated by annexin II. *Nat Chem Biol* 2006; 2: 33-38.

Feig L. Guanine-nucleotide exchange factors: a family of positive regulators of Ras and related GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 204-211.

Filipenko NR, Waisman DM. The C terminus of annexin II mediates binding to F-actin. *J Biol Chem* 2001; 277: 45371-45376.

Findlay JK. Angiogenesis in reproductive tissues. *J Endocrinology* 1986; 111: 357-366.

Finn CA y Martin L The control of implantation. *J Reprod Fertil* 1974; 39: 195-206.

Finn CA. The implantation reaction. *Biology of the Uterus* 1997; 77: 246-308.

Folkam J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 10931-10934.

Fowler PA, Tattum J, Bhattacharya S, Klonisch T, Hombach-Klonisch S y cols. An investigation of the effects of endometriosis on the proteome of human eutopic endometrium: a heterogeneous tissue with a complex disease. *Proteomics* 2007; 7: 130-142.

Fujita H, Katoh H, Hasegawa H, Yasui H, Aoki J, Yamaguchi Y, Negishi M. Molecular decipherment of Rho effector pathways regulating tight-junction permeability. *Biochemical Journal* 2000; 346: 617-622.

Galán A, O'connor JE, Valbuena D, Herrer R, Remohí J, Pampfer S, Pellicer A, Simón C. The human blastocyst regulates endometrial epithelial apoptosis in embryonic adhesión. *Biol Reprod* 2000; 63: 430-439.

Gellersen B, Brosens J. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol* 2003; 178: 357-372.

Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Llic D, Singer MS, Yang ZQ, Kiessling LL, Rosen SD, Fisher SJ. Trophoblast L-selectin mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science* 2003; 299: 405-408.

Genth H, Dreger SC, Huelsenbeck J, Just I. Clostridium difficile toxins: more than mere inhibitors of Rho proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 592-597.

Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 2002; 82: 331-371.

Chung CY, Murphy-Ullrich JE, Erickson HP: Mitogenesis, cell migration, and loss of local adhesions induced by tenascin-C interacting with its cell surface receptor, annexin II. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 883-892.

Giudice LC, Dsupin BA, Irwin JC. Steroid and peptide regulation of insulin-like growth factor-binding proteins secreted by human endometrial stromal cells is dependent on stromal differentiation. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1235-1241.

Glasser SR, Mulholland J, Mani SK. Blastocystendometrial relationships: reciprocal interactions between uterine epithelial and stromal cells and blastocysts. *Trophoblast Res* 1991; 5: 229-280.

Goldsmith LT, Weiss G. Relaxin in human pregnancy. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1160: 130-135.

Gonzalez RR, Caballero-Campo P, Jasper M, Mercader A, Devoto L, Pellicer A, Simón C. Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial Leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4883-4888.

Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004; 4: 3665-85.

Gosser Y, Nomanbhoy B, Aghazadeh D, Manor C, Combs R, Cerione A, Rosen M. C-terminal binding domain of Rho GDP dissociation inhibitor directs N-terminal inhibitory peptide to GTPases. *Nature* 1997; 387: 814-819.

Grewal S, Carver J, Ridley A, Mardon H. Implantation of the human embryo requires Rac1-dependent endometrial stromal cell migration. *PNAS* 2008; 105: 16189-16194.

Haab BB, Dunham MJ, Brown PO. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol.* 2001; 2: RESEARCH0004.

Hall A. The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* 1990; 249: 635-640.

Hannan NJ, Jones RL, White CA, Salamonsen LA. The chemokines, CXCL1, CCL14, and CCL4, promote human trophoblast migration at the feto-maternal interface. *Biol Reprod* 2006; 74: 896-904.

Hanse MD, Ehrlich JS, Nelson WJ. Molecular mechanism for orienting membrane and actin dynamics to nascent cell-cell contacts in epithelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 45371-45376.

Haouzi D, Mahmoud K, Fourar M y cols. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum Reprod.* 2009; 24: 198-205.

Hayes MJ, Shao D, Bailly M, Moss SE. Regulation of actin dynamics by annexin 2. *Embo J* 2006; 25: 1816-26.

Heneweer C, Kruse L, Kindhäuser F, Schmidt M, Jakobs KH, Denker HW, Thie M. Adhesiveness of human uterine epithelial RL95-2 cells to trophoblast: Rho protein regulation. *Mol Hum Reprod* 2002; 11: 1014-1022.

Heneweer C, Adelman HG, Kruse LH, Denker HW, Thie M. Human uterine epithelial RL95-2 cells reorganize their cytoplasmic architecture with respect to Rho protein and F-actin in response to trophoblast binding. *Cells Tissues Organs* 2003; 175: 1-8.

Heneweer C, Schmidt M, Denker HW, Thie M. Molecular mechanism in uterine epithelium during trophoblast binding: the role of small GTPase RhoA in human uterine Ishikawa cells. *J Exp Clin Assist Reprod* 2005; 9: 2-4.

Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5011-15.

Hitt AL, Luna EJ. Membrane interactions with the actin cytoskeleton. *Curr Biol* 1994; 6: 120-130.

Horcajadas JA, Riesewijk A, Martín J, Cervero A, Mosselman S, Pellicer A, Simón C. Global gene expression profiling of human endometrial receptivity. *J Reprod Immunol.* 2004; 63: 41-9.

Horcajadas JA, Pellicer A, Simón C. Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. *Hum Reprod Update.* 2007; 13: 77-86.

Horcajadas JA, Mínguez P, Dopazo J, Esteban FJ, Domínguez F, Giudice LC, Pellicer A, Simón C. Controlled ovarian stimulation induces a functional genomic delay of the endometrium with potential clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93: 4500-10.

Ihnatowch I, Hu W, Martin JL, Fazleabas AT, Lanerolle P, Strakova Z. Increased phosphorylation of myosin light chain prevents in vitro decidualization. 2007; 148: 3176-3184.

Ihnatovych I, Livak M, Reed J, de Lanerolle P, Strakova Z. Manipulating actin dynamics affects human in vitro decidualization. Biol Reprod. 2009; 81: 222-30.

Irwin JC, Kirk D, King RJ, Quigley MM, Gwatkin RB. Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an in vitro model for decidualization. Fertil Steril 1989; 52: 761-768.

Irwin JC, Utian WH, Eckert RL. Sex steroids and growth factors differentially regulate the growth and differentiation of cultured human endometrial stromal cells. Endocrinology 1991; 129: 2385-2392.

Irwin J, Kird D, King R, Quigley M, Gwatkin R. Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an in vitro model for decidualization. Fertil Steril 1995; 52: 419-427.

Jabbour HN, Kelly RW, Fraser HM y cols. Endocrine regulation of menstruation. Endocr Rev 2006; 27: 17-46.

James P. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. Q Rev of Biophys. 1997; 30: 279-331.

Janmey PA. Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. Annu Rev Physiol. 1994; 56: 169-91.

Jolivet A, Gautray JP. Clinical investigation of the menstrual cycle. Fertil Steril. 1978; 29: 40-42.

Josic D, Clifton JG. Use of monolithic supports in proteomics technology. J Chromatogr A 2007; 1144: 2-13.

Jovanovic M, Vicovac L. Interleukin-6 stimulates cell migration, invasion and integrin expression in HTR-8/SVneo cell line. *Placenta*. 2009; 30: 320-328.

Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, Osteen K, Taylor RN, Lessey BA, Giudice LC. Global gene profiling in human endometrium during the window implantation. *Endocrinology* 2002; 143: 2119-2138.

Kilpatrick LM, Stephens AN, Hardman BM, Salamonsen LA, Li Y, Stanton PG, Nie G. Proteomic identification of caldesmon as a physiological substrate of proprotein convertase 6 in human uterine decidual cells essential for pregnancy establishment. *J Proteome Res* 2009; 8: 4983-4992.

King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 28-36.

Kingsmore SF. Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 310-320.

Kiss C, Li J, Szeles A, Gizatullin RZ, Kashuba VI, Lushnikova T, Protopopov AI, Kelve M, Kiss H, Kholodnyuk ID, Imreh S, Klein G, Zabarovsky ER. Assignment of the ARHA and GPX1 genes to human chromosome bands 3p21.3 by in situ hybridization and with somatic cell hybrids. *Cytogenet Cell Genet* 1997; 79: 228-230.

Klasburgn M, d' amore PA. Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 1991; 53: 217-239.

Klasburgn M, Moses MA. Molecular angiogenesis. *Chem Biol* 1999; 6: 217-224.

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* 1998; 83: 4443-4450.

Lamarche N, Hall A. GAPs for rho related GTPases. *Trends Genet* 1994; 10: 436-440.

Larsson N, Marklund U, Gradin HM, Brattsand G, Gullberg M. Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis. *Mol Cell Biol.* 1997; 17: 5530-5539.

Lavie D, Glotter E, Shvo Y. "Constituents of *Withania somnifera*. III. The side chain of withaferin A". *Journal of Organic Chemistry* 1965; 30: 1774-1778.

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* 1992; 90: 188-195.

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

Lindenberg S. Experimental studies on the initial trophoblast endometrial interaction. *Dan Med Bull* 1991; 38: 371-80.

Lockwood CJ, Nemerson Y, Guller S, Krikun G, Alvarez M, Hausknecht V, Gurpide E, Schatz F. Progesterone regulation of human endometrial stromal cell tissue factor expression during decidualization. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 231-236.

Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 1995; 9: 2266-2278.

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* 1996; 206: 201-211.

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.

In the endometrium hormonal impacts. Ed. Plenum Press JP, New York. 1981; pp. 15-29.

Martin JC, Jasper MJ, Valbuena D, Meseguer M, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Increased adhesiveness in cultured endometrial-derived cells is related to the absence of moesin expression. *Biol Reprod* 2000; 63: 1370-1376.

Martin J, Dominguez F, Avila S y cols. Human endometrial receptivity: gene regulation. *J Reprod Immunol* 2002; 55: 131-9.

Matsuda A, Tagawa Y, Yamamoto K, Matsuda H, Kusakabe M. Identification and immunohistochemical localization of annexin II in rat cornea. *Curr Eye Res* 1999; 19: 368-375.

Medina I, Carbonell J, Pulido L, Madeira SC, Goetz S, Conesa A, Tárraga J, Pascual-Montano A, Nogales-Cadenas R, Santoyo J, García F, Marbá M, Montaner D, Dopazo J. Babelomics: an integrative platform for the analysis of transcriptomics, proteomic and genomic data with advanced functional profiling. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 210-213.

Merrifield CJ, Rescher , Almers W, Proust J, gerke V, Sechi AS, Moss SE. Annexin 2 has an essential role in actin-based macropinocytic rocketin. *Curr boil* 2001; 11: 1136-1141.

Meseguer M, Pellicer A, Simon C. MUC1 and endometrial receptivity. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 1089-1098.

Minguez P, Götz S, Montaner D, Al-Shahrour F, Dopazo J. SNOW, a web-based tool for the statistical analysis of protein-protein interaction networks. *Nucleic Acids Res* 2009; 1: 109-114.

Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Corica A, Diaz JI, Williams S, Bocca S, Oehninger S. In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod* 2005; 20: 2104-2117.

Miyamoto S, Akiyama SK, Yamada KM. Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science* 1995; 267: 883-885.

Morgan RO, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Balsara BR, Testa JR. Novel human and mouse ANXA10 are linked to the genome duplications during early chordate evolution. *Genomics* 1999; 60: 40-49.

Moustakas A, Theodoropoulos PA, Gravanis A, Häussinger D, Stournaras C. The cytoskeleton in cell volume regulation. *Contrib Nephrol* 1998; 123: 121-34.

Murphy CR, Shaw TJ. Plasma membrane transformation: a common response of uterine epithelial cells during the peri-implantation period. *Cell Biol Int* 1994; 18: 1115-28.

Murphy CR. The cytoskeleton of uterine epithelial cells: a new player in uterine receptivity and the plasma membrane transformation. *Hum Reprod Update* 1995; 1: 567-80.

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

Murphy CR. Uterine receptivity and the plasma membrane transformation. *Cell Res* 2004; 14: 259-267.

Nair RR, Solway J, Boyd DD. Expression cloning identifies transgelin (SM22) as a novel repressor of 92 kDa type IV collagenase (MMP-9) expression. *J Biol Chem* 2006; 281: 26424-26436.

Nancy J, Manuela L, Hans-Werner D. Quantitation of Human choriocarcinoma spheroid attachment to uterine epithelial cell monolayers. *In Vitro Cell Dev Biol* 1993; 29: 461-468.

Nie L, Wu G, Zhang W. Correlation of mRNA expression and protein abundance affected by multiple sequence features related to translational efficiency in *Desulfovibrio vulgaris*: a quantitative analysis. *Genetics* 2006; 174: 2229-2243.

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

Nikas G, Makrigiannakis A. Endometrial pinopodes and uterine receptivity. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 997: 120-123.

Noyes R, Hertig A, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1950; 1: 3-25.

Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 122: 262-263.

Oh KJ, Choi HJ, Yoon MS, Hwang JH, Chang S, Kim YS, Han JS. Rapid analysis of proteomic biomarkers expressed in human endometrial stromal cells during decidualization. *Arch Pharm Res* 2008; 10: 1247-1255.

Oliferenko S, Paiha K, Harder T, Gerke V, Schwarzler C, Schwärzler C, Schwarz H, Beug H, Günthert U, Huber LA. Analysis of CD44-containing lipid rafts: recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 1999; 146: 843-854.

Osteen KG, Rodgers WH, Gaire M, Hargrove JT, Gorstein F, Matrisian LM. Stromal-epithelial interaction mediates steroidal regulation of metalloproteinase expression in human endometrium. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 10129-33.

Paria BC, Das N, Das SK, Zhao X, Dileepan KN, Dey SK. Histidine decarboxylase gene in the mouse uterus is regulated by progesterone and correlates with uterine differentiation for blastocyst implantation. *Endocrinology* 1998; 139: 3958-3966.

Paria BC, Reese J, Das SK, Dey SK. Deciphering the cross-talk of implantation: advantages and challenges. *Science* 2002; 296: 2185-2218.

Parmar T, Gadkar-Sable S, Savardekar L, Katkam R, Dharma S, Meherji P, Puri CP, Sachdeva G. Protein profiling of human endometrial tissues in the midsecretory and proliferative phases of the menstrual cycle. *Fertil Steril* 2009; 92: 1091-103.

Patel VP, Kreider BL, Li Y, Li H, Leung K, Salcedo T, Nardelli B, Pippalla V, Gentz S, Thotakura R, Parmelee D, Gentz R, Garotta G. Molecular and functional characterization of two novel human C-C chemokines as inhibitors of two distinct classes of myeloid progenitors. *J Exp Med* 1997; 185: 1163-1172.

Paule SG, Airey LM, Li Y, Stephens AN, Nie G. Proteomic approach identifies alterations in cytoskeletal remodelling proteins during decidualization of human endometrial stromal cells. *J Proteome Res* 2010; 9: 5739-47.

Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999; 20: 3551-3567.

Popovici RM, Lee-Chuan K, Giudice L. Discovery of new inducible genes in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology* 2000; 143: 3510-3514.

Portales-Casamar E, Thongjuea S, Kwon AT, Arenillas D, Zhao X, Valen E, Yusuf D, Lenhard B, Wasserman WW, Sandelin A. JASPAR 2010: the greatly expanded open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 105-110.

Psychoyos A. From Lataste to the "window of implantation": 100 years of fascinating discoveries. *Contracept Fertil Sex* 1993; 21: 333-338.

Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med* 2006a; 354: 2463-2472.

Quackenbush, Horcajadas JA, Sharkey AM, Catalano RD, Sherwin JR, Dominguez F, Burgos LA, Castro A, Peraza MR, Pellicer A, Simon C. Effect of an intrauterine device on the gene expression profile of the endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2006b; 91: 3199–3207.

Quinn CE, Casper RF. Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity. *Hum Reprod Update* 2009; 15: 229-36.

Ramathal CY, Bagchi IC, Taylor RN, Bagchi MK. Endometrial decidualization of mice and men. *Semen Reprod Med* 2010; 28: 17-26.

Ravasi T, Suzuki H, Cannistraci CV, Katayama S, Bajic VB, Tan K, Akalin A, Schmeier S, Kanamori-Katayama M, Bertin N, Carnicini P, Daub CO y cols. An atlas of combinatorial transcriptional regulation in mouse and man. *Cell* 2010; 140: 744-752.

Rescher U, Gerke V. Annexins-unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci* 2004; 117: 2631-2639.

Rescher U, Ruhe D, Ludwig C, Zobiack N, Gerke V. Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-biphosphato binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes. *J Cell Sci* 2004; 117: 3473-3480.

Rescher U, Ludwig C, Konietzko V, Kharitonov A, Gerke V. Tyrosine phosphorylation of annexin A2 regulates Rho-mediated actin rearrangement and cell adhesion. *Journal of Cell Science* 2008; 121: 2177-2185.

Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992; 70: 389-39.

Riesewijk A, Martín J, Van Os R, Horcajadas JA, Polman J, Pellicer A, Mosselman S, Simon C. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH β 2 versus LH β 7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 253-264.

Rowlands DC, Williams A, Jones NA, Guest SS. Stathmin expression is a feature of proliferating cells of most, if not all, cell lineages. *Lab Invest* 1995; 72: 100–113.

Rubin CI, Atweh GF. The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *J Cell Biochem* 2004; 93: 242–250.

Schmit A, Hall MN. Signalin to the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998; 14: 305-316.

Schmidt BA, Kelly PT, May MC, Davis SE, Conrad GW. Characterization of actin from fertilized eggs of *Ilyanassa obsoleta* during polar lobe formation and cytokinesis. *Dev Biol*. 1980; 76: 126-40.

Schurenberg M, Luebbert C, Eickhoff H, Kalkum M et al. Prestructured MALDI-MS Sample Supports. *Anal Chem* 2000; 72: 3436–3442.

Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research* 2003; 13: 2498-2504.

Shevchenko A, Tomas H, Vorm O, Havlis J, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 2006; 1: 2856–2860.

Shiokawa S, Iwashita M, Akimoto Y, Nagamatsu S, Sakai K, Hanashi H, Kabir-Salmani M, Nakamura Y, Uehata M, Yoshimura Y. Small Guanosine Triphosphatase RhoA and RhoA-Associated Kinase as regulators of Trophoblast migration. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 5808-5816.

Shiotani M, Noda Y, Mori T. Embryo-dependent induction of uterine receptivity assessed by an in vitro model of implantation in mice. *Biol Reprod* 1993; 49: 794–801.

Simón C, Gimeno MJ, Mercader A, Frances A, Garcia J, Remohi J, Polan ML, Pellicer A. Cytokines-adhesion molecules-invasive proteinases. The missing paracrine/autocrine link in embryonic implantation? *Mol Hum Reprod* 1992; 2: 405-424.

Simón C, Piquette GN, Frances A, Danasouri I, Irwin JC, Polan ML. The effect of interleukin-1 beta on the regulation of IL-1 receptor type I messenger ribonucleic acid and protein levels in cultured human endometrial stromal and glandular cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 675-82.

Simón C, Moreno C, Remohí J, Pellicer A. Molecular interactions between embryo and uterus in the adhesion phase of human implantation. *Hum Reprod.* 1998; 3: 219-32.

Simón C, Valbuena D. Embryonic implantation. *Ann Endocrinol.* 1999; 60: 134-6.

Simon C, Landeras J, Zuzuarregui J, Martín JC, Remohí J, Pellicer A. Early embryonic losses after oocyte donation. *Fertil Steril* 1999; 72: 1061-1065.

Simón C, Martin JC, Meseguer M, Caballero-Campo P, Valbuena D, Pellicer A. Embryonic regulation of endometrial molecules in human implantation. *J Reprod Fertil* 2000; 55: 43-53.

Simón C, JA Horcajadas, J Garcia Velasco y cols. El endometrio humano: de la investigación a la clínica. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Madrid. 2009; p. 19-37.

Siuzdak G. The emergence of mass spectrometry in biochemical research. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 11290-7.

Small JV, Rother K, Kaverina I. Functional design in the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 54-60.

Sobel A. Stathmin: a relay phosphoprotein for multiple signal transduction?. *Trends Biochem. Sci.* 1991; 16: 301-5.

Son KN, Hwang J, Kwon BS, Kim J. Human CC chemokine CCL23 enhances expression of matrix metalloproteinase-2 and invasion of vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340: 498-504.

Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 1992; 359: 76-79.

Strauss III JF, Gurskide E. Endometrio: regulación y disfunción. En: Yen/Jaffe. *Endocrinología de la Reproducción*. 3ªedn. Vol. 9: Panamericana; 1993; p. 333-381.

Strzelecka-Gołaszewska H, Hinssen H, Sobieszek A. Influence of an actin-modulating protein from smooth muscle on actin-myosin interaction. *FEBS Lett* 1984; 177: 209-216.

Suckau D, Resemann A, Schuerenberg M, Hufnagel P, Franzen J, Holle A. A Novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem* 2003; 376: 952-965.

Tabanelli S, Tang B, Gurskide E. In vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 42: 337-344.

Tamura K, Hara T, Yoshie M, Irie S, Sobel A, Kogo H. Enhanced expression of uterine stathmin during the process of implantation and decidualization in rats. *Endocrinology* 2003; 144: 1464-1473.

Tamura K, Yoshie M, Nishi H, Osakabe Y, Isaka K, Hara T, Kogo H. Expression of stathmin in human uterus and decidualizing endometrial stromal cells. *Reproduction* 2006; 132: 625-636.

Tang B, Guller S, Gurside E. Cyclic adenosine 3'-monophosphate induces prolactin expression in stromal cells isolated from human proliferative endometrium. *Endocrinology* 1993; 133: 2197-2203.

Tapia A, Vilos C, Marín JC, Croxatto HB, Devoto L. Bioinformatic detection of E47, E2F1 and SREBP1 transcription factors as potential regulators of genes associated to acquisition of endometrial receptivity. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011; 27: 9-14.

Taylor H, Igarashi P, Olive D, Arici a. Sex steroids mediate Hoxa11 expression in the human peri-implantation endometrium. *J Clin Endocrinol metab* 1999; 84: 1129-1135.

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.* 1995; 66: 180-191.

Thie M, Herter P, Pommerenke H, Dürr F, Sieckmann F. Adhesiveness of the free surface of a human endometrial monolayer for trophoblast as related to actin cytoskeleton *Mol Hum reprod* 1997; 3: 275-283.

Unlü M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 1997; 18: 2071-7.

Van Blerkom J, Chavez DJ. Morphodynamics of outgrowths of mouse trophoblast in the presence and absence of a monolayer of uterine epithelium. *Am J Anat* 1981; 162: 143-155.

Von Rokitanski C. Über Uterusdrusen-Neubildung in Uterus and Ovariansarcomen. *Zeitschrift Gesellschaft für Aerzte zu Wien* 1986; 37: 577-581.

Wehrle-Haller B, Imhof BA. Actin, microtubules and focal adhesion dynamics during cell migration. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003; 35: 39-50.

Weiss W, Görg A. High-resolution two-dimensional electrophoresis. *Methods Mol Biol.* 2009; 564: 13-32.

Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *New Engl J Med* 1999; 340: 1796-1799.

Wilkins M, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan J, Gooley A, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams K, Hochstrasser D. From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Arnino Acid Analysis. *Nature Biotechnology* 1996; 14: 61-65.

Yonemura S, Hirao-Minakuchi K, Nishimura Y. Rho localization in cells and tissues. *Exp Cell Res* 2006; 295: 300-314.

Yoshie M, Tamura K, Kogo H. Differential localization of decidual stathmin during pregnancy in rats. *Placenta* 2004; 25: 449-455.

Zhang B, Zheng Yi. Regulation of RhoA GTP Hydrolysis by the GTPase-Activating Proteins p190, p50RhoGAP, Bcr, and 3BP-1. *Biochemistry* 1998; 37: 5249-5257.

9. ANEXOS

9. ANEXOS

Anexo I. Consentimiento informado.

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

TÍTULO DEL ESTUDIO: Proteómica de la receptividad endometrial

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. Carlos Simón Vallés, Médico Ginecólogo y Director Científico.

CENTRO: Fundación IVI (FIVI) - Instituto Universitario IVI (IUIVI)

INTRODUCCION

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en

cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

A pesar de los avances en el conocimiento del endometrio (la mucosa que recubre el interior del útero o matriz) no existe hoy en día una prueba que nos diagnostique de forma objetiva si un endometrio se encuentra receptivo para anidar el embrión.

Para ello hemos diseñado el estudio denominado “PROTEÓMICA DE LA RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL”, mediante el cual vamos a determinar el perfil proteico del endometrio receptivo, aplicando a las muestras la nueva tecnología Proteómica.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

De esta manera, conociendo las proteínas que se expresan diferencialmente cuando el endometrio es receptivo al embrión, se pretende diseñar un predictor que permita evaluar, de forma objetiva y poco invasiva, el estado receptivo de un endometrio (PRE, predictor de receptividad endometrial) a partir de una muestra de secreción uterina.

Solicitamos su permiso para obtener la muestra y así poder analizar dicho material biológico en esta investigación.

Dicha muestra será procesada de forma anónima sin identificarla con usted, únicamente el día del ciclo menstrual en el momento de la recogida de la muestra.

La toma de la biopsia puede ser molesta y posiblemente Vd no podrá beneficiarse de esta investigación por encontrarse en fase experimental.

Se entiende que en cualquier momento usted tiene derecho a cambiar de opinión y no participar en este estudio.

CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo su médico del estudio/colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del

Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

COMPENSACIÓN ECONÓMICA

El promotor del estudio es el responsable de gestionar la financiación del mismo. Para la realización del estudio el promotor del mismo ha firmado un contrato con el centro donde se va a realizar y con el médico del estudio.

OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

También debe saber que puede ser excluido del estudio si el promotor los investigadores del estudio lo consideran oportuno, ya sea por motivos de seguridad, por cualquier acontecimiento adverso que se produzca por la medicación en estudio o porque consideren que no está cumpliendo con los procedimientos establecidos. En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo que ha ocasionado su retirada del estudio

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

CONSENTIMIENTOS INFORMADOS

Código del Estudio:

Yo

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con el Dr. Carlos Simón.

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera.

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

- Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

- Accedo a que las muestras de sangre o tejidos obtenidas para el estudio puedan ser utilizadas en el futuro para nuevos análisis relacionados con la enfermedad o fármacos del estudio no previstos en el protocolo actual (quedando excluidos los análisis genéticos, siempre y cuando no formen parte de los objetivos del estudio):

SI

NO

Firma de la paciente:

Firma del investigador:

Nombre:

Nombre: Dr. Carlos Simón

Fecha:

Fecha:

Anexo II. Publicaciones derivadas de la presente tesis doctoral.

Revista internacionales

Dominguez F, **Garrido-Gomez T**, Lopez JA, Camafeita E, Quinonero A, Pellicer A, Simon C. Proteomic analysis of the human receptive versus non-receptive endometrium using differential in-gel electrophoresis and MALDI-MS unveils stathmin 1 and annexin A2 as differentially regulated. Human Reproduction 2009; 24: 2607-2617.

Garrido-Gómez T, Dominguez T, Lopez JA, Camafeita E, Quiñonero A, Martinez-Conejero JA, Pellicer A, Conesa A, Simón C. Modeling human endometrial decidualization from the interaction between proteome and secretome. J Clin Endocrinol Metab 2011; 96: 706-16.

Berlanga O, Bradshaw HB, Vilella-Mitjana F, **Garrido-Gómez T**, Simón C. How endometrial secretomics can help in predicting implantation. Placenta 2011; 32: 275-281.

Garrido-Gómez T, Dominguez F, Quiñonero A, Estella C, Vilella F, Pellicer A, Simon C. Annexin A2 is critical for endometrial adhesiveness and embryo attachment in humans by activation of RhoA through F-actin regulation. FASEB journal. Pendiente de publicar.

Capítulos de libro

Tamara Garrido-Gómez, Francisco Dominguez, Carlos Simón. Proteomics of embryonic implantation. Volumen: Fertility Control - Today and in the Future. Handbook of Experimental Pharmacology book series. Editorial: Springer. 2010; 198:67-78. Review

Carlos Simón, **Tamara Garrido**. Establecimiento de la gestación: Gametogénesis, fecundación, desarrollo embrionario e implantación. Tratado de Ginecología, Obstetricia y Medicina de la Reproducción de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. Tratado SEGO. Editorial Médica Panamericana. 2010; Pendiente de publicar.

Francisco Domínguez, **Tamara Garrido**, Carlos Simón. Proteomics analysis of the endometrium and embryo. Can we improve IVF outcome?. Volumen: Human Assisted Reproductive Technology- Future trends in Laboratory and Clinical Practice. Editorial: Gardner, Rizk & Falcone 2010; 289-300.

T Garrido-Gomez, F Dominguez, M Ruiz, F Vilella, C Simon. The analysis of endometrial receptivity. Laboratory volume VII Implantation. 2011. Pendiente de publicar.

Congresos

Tamara Garrido, Francisco Dominguez, Juan Antonio López, Emilio Camafeita, Enrique Calvo, Carlos Simón. Proteómica de la receptividad endometrial. VI Jornadas de Jóvenes Investigadores. Granada, España, Febrero 2008. Tipo de participación: Póster.

Tamara Garrido, Francisco Domínguez, Juan A López, Emilio Camafeita, Enrique Calvo, Marco Melo, Carlos Simón. Proteomic analysis of Pre-Receptive vs Receptive Human Endometrium. 24th Annual meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Barcelona. Julio 2008. Tipo de participación: Póster.

Tamara Garrido-Gómez, Francisco Dominguez, Alicia Quiñonero, Juan A. Lopez, Emilio Camafeita, Antonio Pellicer, Carlos Simón. Proteomic analysis of the human receptive vs nonreceptive endometrium unveiled a functional relevance of stathmin 1 and annexin A2. 3rd International IVI Congress. Madrid, España, Mayo 2009. Tipo de participación: Poster.

Emilio Camafeita, **Tamara Garrido-Gómez**, Francisco Dominguez, Alicia Quiñonero, Antonio Pellicer, Juan A. Lopez, Carlos Simón. Proteomic analysis of the human receptive vs non-receptive endometrium unveiled a functional relevance os Stathmin 1 and Annexin A2. Congreso Nacional de Proteómica. Pamplona, 2009. Tipo de participación: Poster.

Tamara Garrido-Gómez. Embryo proteomics: a new tool for screening. ART: experimental bases for improving outcomes for the benefit of patients. Estambul, Turquía, Febrero 2010. Tipo de participación: Charla oral

Tamara Garrido-Gomez, Francisco Dominguez, Alicia Quinonero, Jose A Martinez-Conejero, Juan A Lopez, Emilio Camafeita, Antonio Pellicer, Carlos Simon. Proteomic and Secretomic of Human Endometrial Stromal Cells in Decidualization Process. Society for Gynecologic Investigation (SGI). Orlando. Marzo 2010. Tipo de participación: Poster.

Tamara Garrido, Francisco Dominguez, Alicia Quiñonero, Carlos Simón. Annexin A2 is critical for endometrial receptivity and embryo attachment in women, regulating F-actin and membrane-cytoskeletal interactions. 6th International Conference of Annexins. Barcelona. Agosto 2011. Tipo de participación: Charla oral y póster.

Tamara Garrido-Gómez, Francisco Dominguez, Alicia Quiñonero, Carlos Estella, Felipe Vilella, Carlos Simón. Annexin A2 is critical for endometrial adhesiveness and embryo attachment in humans by activation of RhoA through F-actin regulation. Society for Gynecologic Investigation (SGI). San Diego, Marzo 2012. Tipo de participación: Charla oral

