



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

**FACULTAD DE MEDICINA Y CIRUGÍA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y
GINECOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL

“Patrón de decidualización en mujeres con preeclampsia mediante la aplicación
de métodos de transcriptómica y proteómica”

AUTOR:

Pablo Padilla Iserte
Licenciado en Medicina y Cirugía

DIRECTORES:

Prof. Carlos Antonio Simón Vallés
Prof. Alfredo Perales Marín

Valencia, Abril 2014

Prof. Carlos Antonio Simón Vallés, Catedrático del Departamento 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: **“PATRÓN DE DECIDUALIZACIÓN EN MUJERES CON PREECLAMPSIA MEDIANTE LA APLICACIÓN DE MÉTODOS DE TRANSCRIPTÓMICA Y PROTEÓMICA”** ha sido realizado íntegramente por D. Pablo Padilla Iserte bajo mi dirección. Dicha memoria esta concluida y reúne todos los requisitos necesarios 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, Abril de 2014.

Fdo. Prof. Carlos Antonio Simón Vallés

Prof. Alfredo Perales Marín, Jefe de Servicio de Obstetricia del Hospital Universitario y Politécnico La Fe y Profesor Titular del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“PATRÓN DE DECIDUALIZACIÓN EN MUJERES CON PREECLAMPSIA MEDIANTE LA APLICACIÓN DE MÉTODOS DE TRANSCRIPTÓMICA Y PROTEÓMICA”** ha sido realizado íntegramente por D. Pablo Padilla Iserte bajo mi dirección. Dicha memoria esta concluida y reúne todos los requisitos necesarios 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, Abril de 2014.

Fdo. Prof. Alfredo Perales Marín

La naturaleza es la mejor maestra de la verdad

S. Agustín, siglo V d.C.

AGRADECIMIENTOS

Difícil es expresar en estas líneas, mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible con su apoyo que este proyecto de investigación vea la luz.

Lo primero agradecer a mis dos directores de tesis su gran ayuda, al Dr. Carlos Simón por haber orquestado todo este maravilloso trabajo y ser capaz de hacerme entender la importante relación entre la clínica y el papel de la investigación. Al Dr. Alfredo Perales, por su ayuda inestimable, por haber confiado en mí desde el principio, por estar siempre dispuesto a echar una mano y por ver una salida en los malos momentos.

No hay palabras suficientes para mostrar mi gran cariño, afecto y la gran valía profesional de Tamara Garrido y Alicia Quiñero. Gracias a las dos por haber hecho tan fácil y cómodo el trabajar juntos. Gracias a las dos, por enseñarme el mundo de la investigación.

Gracias tanto a la Fundación IVI como al Hospital La Fe, por permitir que haya sido posible.

Mi más sincero reconocimiento a todas esas mujeres, que de forma totalmente altruista y desinteresada, han participado en este proyecto. En especial a las pacientes preeclámpicas por haber respondido siempre de una manera tan amable y sensibilizada con la enfermedad. Aun con el recuerdo bien presente de su diagnóstico, han puesto su valiosa participación para intentar ayudarnos a desentrañar este misterio que hasta día de hoy, es la preeclampsia.

A mis compañeros y amigos de la Facultad de Medicina, que bien lo pasamos en eso de comenzar a ser médicos. A mis compañeros de fatiga del Hospital, en especial a mi guardia, que han sido mi familia en la Fe enseñándome todo lo que sé.

A Álvaro, Gorka, Gabriel e Iván por ser tan geniales y tan buenos amigos.

A mi familia se lo debo todo. Primero a mis abuelos, por haber hecho de mi la persona que soy, sin ti Abuelo nada esto podría haber pasado. A mi madre, por ser ese apoyo constante, por ver lo mejor de mi y ser la brújula que guía mis pasos. A Silvia, por siempre mostrar una sonrisa aún en los peores momentos. A María, aun desde la distancia, te sentimos cerca. A mis sobrinos, por agrandar y hacer más divertida esta familia. Me siento orgulloso de ser parte de vosotros.

De nuevo, gracias a todos

El presente proyecto de tesis doctoral ha sido realizado gracias a la mutua colaboración entre el Hospital Universitario y Politécnico La Fe y la Fundación del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI).

ÍNDICE DE SIGLAS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

Ac	anticuerpos
ANXA 2	anexina A2
ASS	ácido acetilsalicílico
AUt	arteria uterina
BSA	albúmina de suero bovino
C	controles
CEE	células del estroma endometrial
CI	coeficiente intelectual
CID	coagulación intravascular diseminada
CIR	crecimiento intrauterino restringido
DIU	dispositivo intrauterino
D-PBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DMEM	medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco
DMEM/F12	medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco con Mixtur F-12
E	eclampsia
E2	estrógenos
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EHE	estados hipertensivos del embarazo
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FG	filtrado glomerular
FM	fórmula menstrual
FOXO1	forkhead transcription factor 1
FR	factor riesgo
HBPM	heparina de bajo peso molecular
hCG	gonadotropina coriónica humana
HG	hipertensión gestacional
HGF	hepatocyte growth factor
HLA	complejo mayor de histocompatibilidad
HTA	hipertensión arterial
HTAC	hipertensión arterial crónica
ICSI	inyección intracitoplasmática de espermatozoide
IGFBP-1	proteína de unión al factor de crecimiento de insulina
IMC	índice de masa corporal
IP	índice de pulsatibilidad
IVE	interrupción voluntaria del embarazo

LES	lupus eritematoso sistémico
LH	hormona luteínica
mmHg	milímetros de mercurio
MMPs	metaloproteinasas de matriz
NK	natural Killer
NO	óxido nítrico
NV	nacidos vivos
OMS	organización mundial de salud
P	progesterona
PAI	inhibidor del activador del plasminógeno
PE	preeclampsia
PECAM	molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria
PIGF	placental growth factor
PRL	prolactina
RPMP	rotura prematura de membranas pretérmino
RR	riesgo relativo
RT-PCR	real time PCR
S	sensibilidad
SBF	suero bovino fetal
SDS	dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
sFlt-1	soluble fms-like tyrosine kinase-1
SH	síndrome de Hellp
SI	sistema inmune
siRNA	small interfering RNA
SNC	sistema nervioso central
SP	sangre periférica
sPE	preeclampsia severa
T	trimestre
TAD	tensión arterial diastólica
TAS	tensión arterial sistólica
TBM	tetrametil-bencidina
TFPI	inhibidor del factor tisular
TRA	técnica reproducción asistida
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
VEGF	vascular endotelial growth factor
VEGFR	vascular endotelial growth factor receptor

ÍNDICE

▪ INTRODUCCIÓN	1
▪ JUSTIFICACIÓN DEL TEMA	31
▪ HIPÓTESIS	34
▪ OBJETIVOS	36
▪ MATERIAL Y MÉTODO	38
▪ RESULTADOS	74
▪ DISCUSIÓN	105
▪ CONCLUSIONES	119
▪ BIBLIOGRAFÍA	121
▪ ANEXOS	138

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.- Decidualización humana 3

- 1.1 Fisiología de la Implantación
- 1.2 Definición de Decidualización
- 1.3 Regulación del proceso
- 1.4 Investigación actual células estroma endometrial

2.- Estados hipertensivos del embarazo: Preeclampsia 7

- 2.1 Definición de Preeclampsia
- 2.2 Prevalencia
- 2.3 Pronóstico
- 2.4 Etiopatogenia
- 2.5 Alteraciones en la coagulación y función plaquetar
- 2.6 Factores de riesgo
- 2.7 Manifestaciones clínicas
- 2.8 Diagnóstico precoz de la Preeclampsia
- 2.9 Prevención

3.- Anexina 2 26

- 3.1 Participación en la dinámica celular
- 3.2 Participación en la receptividad endometrial
- 3.3 Otras funciones ANXA2

4.- Las ómicas en estudio del endometrio humano 29

1.- Decidualización humana

La implantación es un proceso complejo, basado en el asentamiento del embrión en la decidua materna. En cada ciclo fértil en la especie humana, tan solo el 35% de los embriones, consiguen implantar, debido a mayoritariamente a una defectuosa interacción entre embrión – endometrio.

1.1 Fisiología de la Implantación

La implantación embrionaria consiste en la fijación del blastocito al endometrio materno. Es un proceso complejo, tratándose de 3 fases consecutivas: aposición (orientación hacia la zona luminal), adhesión (contacto) e invasión (penetración del trofoblasto hacia el endometrio materno). Este fenómeno exige un adecuado diálogo embrión – endometrio, siendo un proceso activo, regulable y bidireccional.

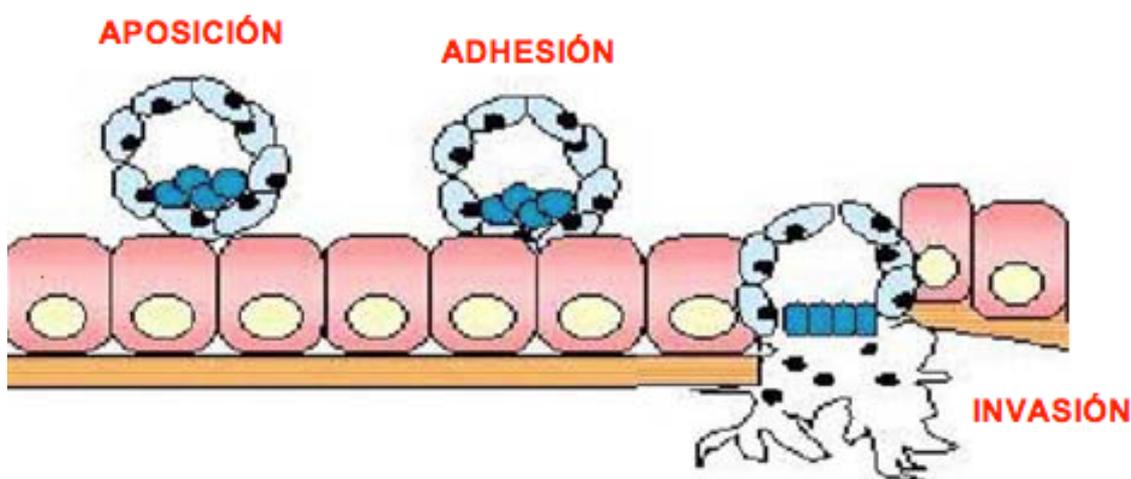


Figura 1. Esquema secuencial de las fases de la implantación embrionaria humana.

Del punto de vista embrionario, alrededor del 6º día post-fecundación, el blastocisto se implanta en la superficie uterina. A medida que invade, conlleva la extravasación sanguínea generando estructuras lagunares, convirtiéndose en el futuro espacio intervelloso. El citotrofoblasto se diferenciará en dos estructuras, por un lado, el sincitiotrofoblasto (génesis de las vellosidades coriales para el intercambio gaseoso, esteroidogénesis y síntesis de péptidos de origen placentario) y el trofoblasto extraveloso (implicado en la invasión decidual y endovascular de las arterias espirales) (Burton, 2011).

La participación endometrial se inicia con el proceso de la decidualización.

1.2 Definición de Decidualización

La implantación embrionaria exige la presencia de un endometrio receptivo, esta receptividad delimita un periodo único en el ciclo menstrual conocido como *ventana de implantación*, permitiendo la adhesión del blastocito al endometrio materno (Dey, 2004).

Se conoce como decidualización al proceso de maduración del endometrio materno, transformándolo en tejido materno diferenciado o decidua, proceso que implica cambios morfológicos, genético y bioquímicos, dirigidos por estímulo hormonal esteroideo: estrógenos y progesterona, determinando así la receptividad endometrial. Independiente de la señal del blastocito en la especie humana (Garrido-Gómez, 2011).

1.3 Regulación del proceso

Las hormonas esteroides Estrógenos (E2) y Progesterona (P), son fundamentales para los eventos cíclicos que ocurren en el endometrio humano (Maruyama, 2008).

Durante la primera fase de ciclo (fase proliferativa), gracias a la dominancia de los E2, se produce una proliferación tanto de las células epiteliales como estromales.

En la segunda fase de ciclo (fase secretora), la dominancia de la P, inducirá la diferenciación de las células estromales endometriales (CEE) transformándolas morfológicamente de células fibroblásticas fusiformes en células redondeadas de aspecto polipoide, cargadas de gránulos de glucógeno en citoplasma. Localizándose en la proximidad de las arterias espirales terminales y posteriormente extendiéndose al resto del compartimiento estromal.

Presentan capacidad de liberar diferentes citoquinas y factores de crecimiento como la prolactina (PRL) y proteína de unión al factor de crecimiento de insulina (IGFBP-1), también componentes de matriz extracelular como colágeno IV.

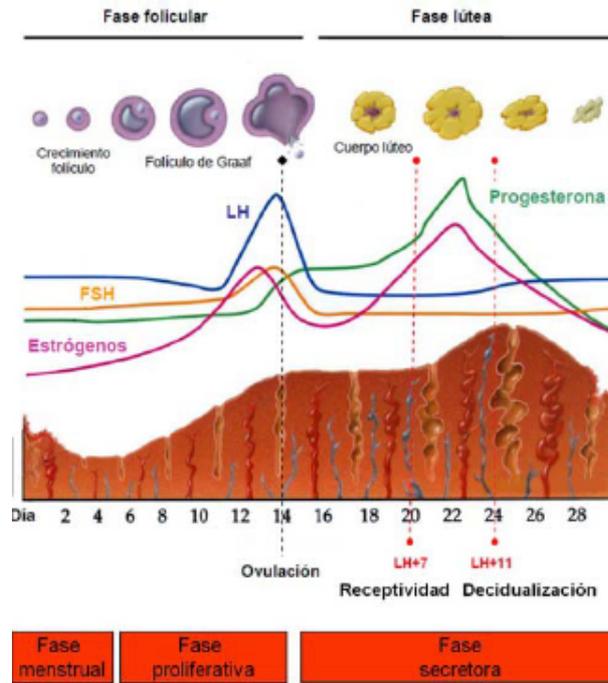


Figura 2. Ciclo menstrual fisiológico: día 14 (ovulación tras pico LH) marcando el inicio de fase secretora, comenzando 7 días después, la ventana implantación.

A nivel del epitelio endometrial luminal (monocapa de células cuboides polarizadas), la acción esteroidea favorece el desarrollo de microambiente para la atracción del blastocito y cambios histológicos (transformación de la membrana plasmática, desarrollo de pinópodos, pérdida de la polarización), favoreciendo la invasión hacia el estroma y vasos endometriales.

Regulación bioquímica

El proceso de decidualización se realiza gracias al estímulo de la P, independiente de la señal de blastocisto (Gellersen, 2010), mediante el estímulo del PR (progesterona receptor ligando) con la expresión de sus dos isoformas (PR-A, PR-B), con la consiguiente regulación transcripcional mediada por aumento de AMPc intracelular, activando la ruta de la PKA (proteína quinasa A), con el objetivo del mantenimiento del fenotipo decidual de las CEE (Maruyama, 2008).

Se puede reproducir la decidualización in vitro, con la administración de P y E2, también con gran variedad de moléculas reguladoras como AMPc, Prostaglandina E2 o relaxina (Gellersen, 2010).

Existen diferentes factores de transcripción implicados en la decidualización, como FOXO1 (regula la expresión de IGFBP-1), STAT-5 (regulación expresión de PRL) y HOXA10.

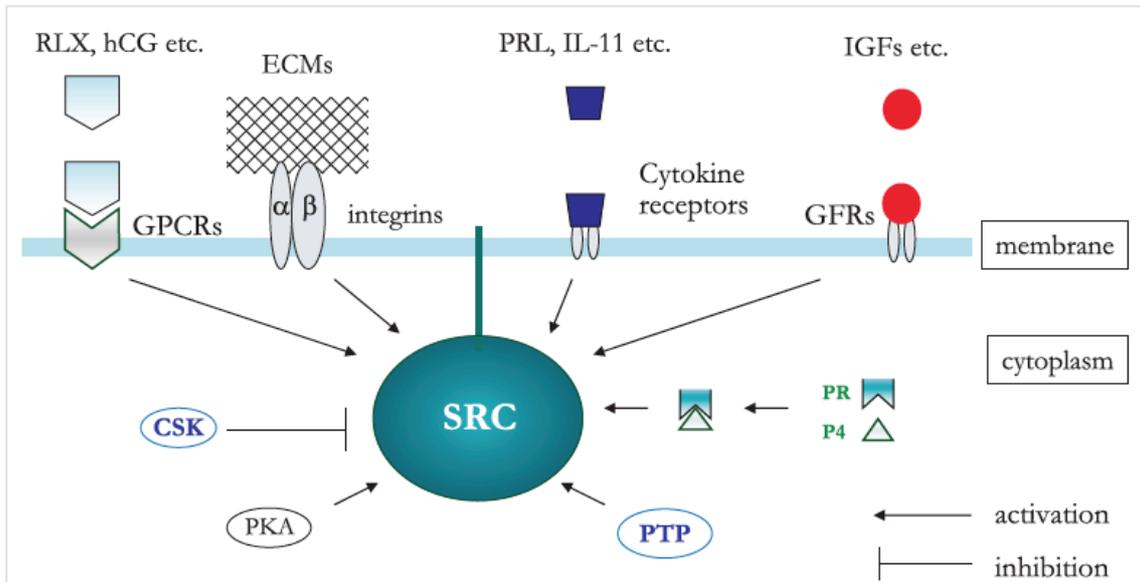


Figura 3. Esquema en la regulación compleja del proceso de decidualización. Mediado por la activación del complejo SRC- kinasa. Mediado por la Relaxina (RLX), hCG, proteínas de matriz extracelular (ECMs), IGFs, Prolactina (PRL) e Inteleukina 11 (IL-11), progesterona (PR) o proteína tirosina fosfatasa (Maruyama, 2008).

1.4 Investigación actual CEE

Es conocido el potencial migratorio de las CEE en su aproximación hacia las arterias espirales terminales, pero nuevos estudios in vitro procedentes de muestras humanas (Gellersen, 2010; Grewal, 2008), evidencian un potencial invasivo intrínseco de las CEE, respaldando la teoría de una participación cada vez más importante en el proceso de la implantación, al rodear el trofoblasto durante la invasión, favoreciendo el proceso.

Así defectos durante la decidualización puede predisponer a complicaciones relacionadas con la gestación, tales como, aborto, CIR, PE y parto prematuro (Brosens, 2011).

2.- Estados hipertensivos del embarazo: Preeclampsia

Los estados hipertensivos del embarazo (EHE) es un grupo amplio de patología obstétrica que generan una importante repercusión en la salud materno-fetal. Definidos por la presencia de una TAS ≥ 140 mmHg y/o TAD ≥ 90 (en al menos 2 ocasiones diferentes, separadas 4 horas) en una mujer previamente normotensa ≥ 20 semana de gestación.

Los EHE pueden ser clasificados en 4 grandes grupos (ACOG, 2013):

- Hipertensión Crónica (HTAC): presencia de HTA previa a la gestación o diagnosticada antes de la semana 20 o persiste ≥ 12 semana postparto. Pudiendo ser primaria (denominada HTA esencial) o secundaria.
- Hipertensión Gestacional (HG): HTA en ausencia de proteinuria y/o síntomas multisistémicos, y resolución antes de la 12 semana postparto.
- Preeclampsia/Eclampsia: aparición de proteinuria ≥ 300 mg/dL en orina 24h o alteraciones a nivel multisistémico (trombocitopenia, hipertransaminasemia, edema pulmonar...) en ausencia de proteinuria. La eclampsia cumple criterios de HG con aparición de convulsiones/coma.
- Preeclampsia sobreañadida a HTAC: criterios de HTAC con aparición de proteinuria o aparición de afectación multiorgánica ≥ 20 semana de gestación.

2.1 Definición de Preeclampsia

La preeclampsia (PE) es una enfermedad multisistémica caracterizada por la aparición de HTA junto con proteinuria y/o disfunción orgánica, pudiendo aparecer de novo o superponiéndose a otros trastornos hipertensivos.

Clásicamente se define como el desarrollo de HTA: TAS ≥ 140 mmHg y/o TAD ≥ 90 mmHg (en al menos 2 ocasiones diferentes separadas 4 horas, aunque si aparece cifras de TAS ≥ 160 mmHg o TAD ≥ 110 , dada su gravedad se acepta su repetición a los minutos) en una mujer previamente normotensa más allá de su 20 semana de gestación (salvo en gestación gemelar, hidrops fetal o enfermedad trofoblástica). Junto con proteinuria ≥ 300 mg/dL en orina 24h, ratio proteinuria (mg/dL) / creatinina (mg/dL) ≥ 0.3 o en su defecto ≥ 1 + en Labstix en dos mediciones repetidas (con 4 horas de

diferencia, solo usándose cuando no se disponga de métodos cuantitativos o se precise la toma rápida de decisión, debido a su baja fiabilidad diagnóstica).

En la actualidad es aceptado el diagnóstico de preeclampsia en ausencia de proteinuria (Homer, 2008; Sibai 2009) cuando cumple criterios de HTA anteriormente descritos en asociación a síntomas de afectación sistémica, como son:

- Trombocitopenia (recuento <100.000 plaquetas)
- Alteración hepática (enzimas hepáticas 2 veces su valor referencia)
- Aparición de insuficiencia renal (Creatinina sérica $> 1,1$ mg/d)
- Edema pulmonar
- Manifestaciones clínicas derivadas de alteración cerebral y/o visual.

La PE puede ser clasificada como precoz (≤ 34 semanas) o tardía (> 34 semanas). La gran mayoría del diagnóstico corresponden a PE tardías, aprox. 10% se diagnosticarán por debajo de la semana 34 (Trogstad, 2011; Lisonkova, 2013).

2.2 Prevalencia

La PE es una enfermedad con una amplia repercusión en Salud Pública, tanto obstétrica como perinatal, por su elevada morbi-mortalidad. Se estima una prevalencia mundial del 7,5 % del total de las gestaciones (Wallis, 2008), constituyendo uno de los grandes síndromes obstétricos.

Su prevalencia en EEUU se encuentra en el 3.4 %, siendo 1.5 a 2 veces más frecuente en primigestas (Ananth, 2013; Villar, 2006). En la Comunidad Europea la prevalencia es semejante, con una tasa de 2,4 millones de nacimientos vivos anuales, estimándose un riesgo de desarrollo de PE en 1 de cada 20 embarazos. Siendo en nuestro país tasas similares (Eurostat, 2009).

La prevalencia de PE sobreañadida en pacientes con HTAC y en aquellas que han desarrollado una HG, es diferente. En el primer caso, la incidencia es de 4 a 5 veces mayor respecto a las normotensas (Caritis, 1998). Existiendo además, una relación entre la TA en la primera visita prenatal y el riesgo, así cuanto mayor sean los valores de TAD (≥ 100 mmHg) mayor será el riesgo de desarrollo de PE con el curso de la gestación (Duckitt, 2005).

Respecto a las pacientes con HG estas desarrollarán PE sobreañadida en 15-25 % de las ocasiones. Se conoce que cuanto más precoz sea el diagnóstico de HG más riesgo existirá de añadirse una PE, así del 40-50% de las mujeres que lo desarrollarán habían sido diagnosticadas de HG \leq 30 semana (Barton, 2001).

Desde punto de vista obstétrico, las pacientes diagnosticadas de PE presentan un incremento en las mortalidad y en las tasas de complicaciones, respecto a gestantes sanas. Representado por una mayor frecuencia en el desarrollo de: desprendimiento prematuro de placenta, fallo renal agudo, hemorragia cerebral, fallo o rotura hepática, edema pulmonar, desarrollo de coagulación intravascular diseminada (CID) y desarrollo de estatus convulsivo. Estimándose una tasa mundial anual de 50-60.000 muertes relacionadas con esta enfermedad, estando presente en el 10-15% de la mortalidad materna a nivel mundial (Duley, 2009; Conde-Agudelo, 2004).

En EEUU se encuentra como 4ª causa mortalidad (Mackay, 2011) con un incremento del 25% en las dos últimas décadas (Wallis, 2008). En cambio en Europa es la primera causa de mortalidad materna, representando el 17-24 % del total (Navaratnam, 2013).

Desde el punto de vista neonatal, es una de las principales causas de prematuridad tanto en Occidente como países en vía de desarrollo. El 25% de los neonatos nacidos de madres con PE presentan CIR, y una tercera parte son prematuros. Se estima que la PE está vinculada en 500.000 muertes infantiles anuales (Navaratnam, 2013).

2.3 Pronóstico

La PE es una enfermedad multisistémica y seria. Aunque la mayoría de las pacientes desarrollan síntomas progresivos en el final del embarazo, en el 25% de las ocasiones, sobre todo en PE precoces, la enfermedad avanza en un periodo de días a semanas en un daño multiorgánico, representado por crisis HTA y síntomas específicos de daño vascular, renal y cerebral (Sibai, 2004). Con el parto de la placenta, se resuelven la mayoría de síntomas de la enfermedad, normalizando las cifras tensionales dentro de las primeras 4 semanas postparto.

En términos de salud a largo plazo, la PE también representa, tanto a nivel materno como perinatal, una importante repercusión.

Nivel Materno

Diferentes estudios epidemiológicos han demostrado que la mujer diagnosticada de PE asocian un mayor riesgo, respecto a población general, de enfermedades cardio y cerebrovasculares a lo largo de su vida (Valdés, 2009; Vikse, 2008).

Comparando con mujeres sin historia de PE, mujeres con PE tiene incrementado el riesgo de desarrollo de HTA (RR 3.70, IC 95% [2,70-5,05]), isquemia miocárdica (RR 2,16, IC 95% [1,86-2,52]), accidente cerebro vascular (RR 1,81- IC 95% [1,45-2,27] y tromboembolismo venoso (RR 1,79, IC 95% [1,37-2,33]).

En términos de riesgo absoluto, mujeres entre 50-59 años, que no presentan antecedente de PE, tienen un riesgo de desarrollo de patología cardiovascular del 8,3%, en cambio, con historia previa de PE asciende al 17,8% (Bellamy, 2007; Mc Donald, 2008).

De todas las pacientes, aquellas diagnosticadas de PE precoz y/o severa con parto prematuro (<37 semanas), son las que más riesgo cardiovascular presentan a largo plazo, incluyendo durante la etapa premenopáusica. Estando a su vez la mortalidad por causas cardiovasculares incrementada en 8 veces, respecto a la población general (Hermes, 2013).

Múltiples estudios demuestran que pacientes diagnosticadas de EHE, presentan mayores glucemias e hiperinsulinemia con tendencia a hiperlipidemia, respecto a gestantes normotensas (Hermes, 2012), ayudando así a incrementar la morbilidad cardiovascular, con mayor tendencia de desarrollo de síndrome metabólico y diabetes mellitus a lo largo de su vida (Lykke, 2012).

Con todo ello la *American Heart Association* en el año 2011 añadió la PE como factor de riesgo de patología cardiovascular, dado que se entienden que muestran FR comunes y el daño vascular acontecido durante la gestación PE.

Nivel Neonatal

Por otro lado, los recién nacidos de madres con diagnóstico de PE, tiene incrementada su morbilidad en neonato precoz con extensión a largo plazo (Infancia y edad adulta),

representado por alteraciones cardiovasculares, SNC y renales todo ello derivado de la hipoperfusión placentaria (Barker, 2012):

- SNC: alteraciones neurocognitivas, menor CI, aprendizaje alterado desde leve hasta graves discapacidades. Representado por menor cantidad de sustancia gris con incremento de sustancia blanca, disminución volumen hipocampo, menor sinaptogénesis cortical frontal, microestructura cerebral especial.
- Cardiovascular: incremento de HTA, ictus, IAM, dislipemias, DM tipo II, menor esperanza de vida. Representado por alteración función cardíaca, péptido natriurético aumentado, remodelado vascular y desarrollo de síndrome metabólico.
- Renal: menor nº nefronas, nefrosclerosis acelerada, alteración eje Renina-Aldosterona.

Además el bajo peso al nacimiento (< 2000 gr) predispone a un incremento de la patología cardiovascular (IAM, ictus, obesidad, dislipemia...) en la edad adulta (Barker 1995; Figueras, 2011).

2.4 Etiopatogenia

La PE es una enfermedad multisistémica y multifactorial caracterizada por la presencia de daño endotelial que precede al diagnóstico clínico (Roberts, 1989). La fisiopatogenia de esta enfermedad envuelve tanto factores maternos como fetales, representados en un desarrollo placentario inadecuado (*teoría placentación anómala*), con una circulación útero-placentaria insuficiente y deteriorada, que en pacientes con susceptibilidad individual justifican el desarrollo de la enfermedad (Brosens, 2011).

Estas alteraciones generarán un desarrollo anómalo en la vascularización placentaria de forma precoz, generando una hipoperfusión con hipoxia e isquemia en el lecho placentario; provocando una liberación a circulación materna de factores antiangiogénicos, generando un daño endotelial materno sistémico (causa de la HTA y de las otras manifestaciones clínicas de la enfermedad).

Actualmente, tras estudios epidemiológicos y experimentales, se sabe que es causa necesaria y obligatoria la presencia de la placenta para el desarrollo de la PE, no así el feto (Moore-Maxwell, 2004).

En condiciones normales, el citotrofoblasto migra a través de la decidua alcanzando el lecho miometrial, necesario para la invasión vascular. Atravesando el endotelio, remodelando la pared de las arterias espirales maternas, haciendo desaparecer la capa muscular y adventicia, sustituyendo el endotelio vascular por células citotrofoblásticas.

Transformando en vasos de baja resistencia y alta capacitancia, tortuosos y elásticos facilitando el aporte sanguíneo a la placenta, siendo independientes del control vasomotor materno, con lo que permite el incremento de aporte sanguíneo a lo largo de la gestación. Todo este proceso se conoce como remodelado de las arterias espirales, comenzando desde finales del 1er T y finalizando sobre la semana 18-20 de gestación (Zhou, 1993; Redman, 2005).

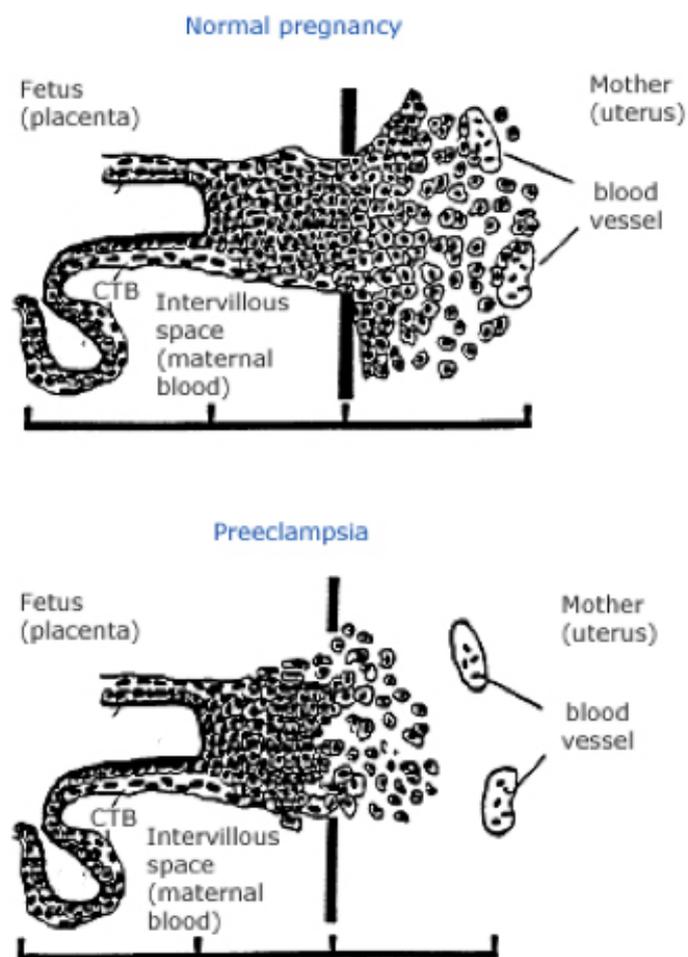


Figura 4. Comparación entre la invasión trofoblástica en gestantes sanas respecto a PE (Kee-Hak Lim, 2009). CTB: citotrofoblasto

En la PE, la migración del citotrofoblasto es incompleta e insuficiente, infiltra la porción decidual de las arterias espirales, pero no así en la porción miométrial (Roberts, 1993), con lo que permanecen siendo vasos rígidos no distensibles sensibles a la regulación de la circulación sistémica materna, generando una hipoperfusión placentaria. Se conoce en mujeres con PE existe una deficiente diferenciación del trofoblasto durante la invasión, con una disminución en la producción de diferentes citoquinas y moléculas de adhesión (Huppertz, 2008).

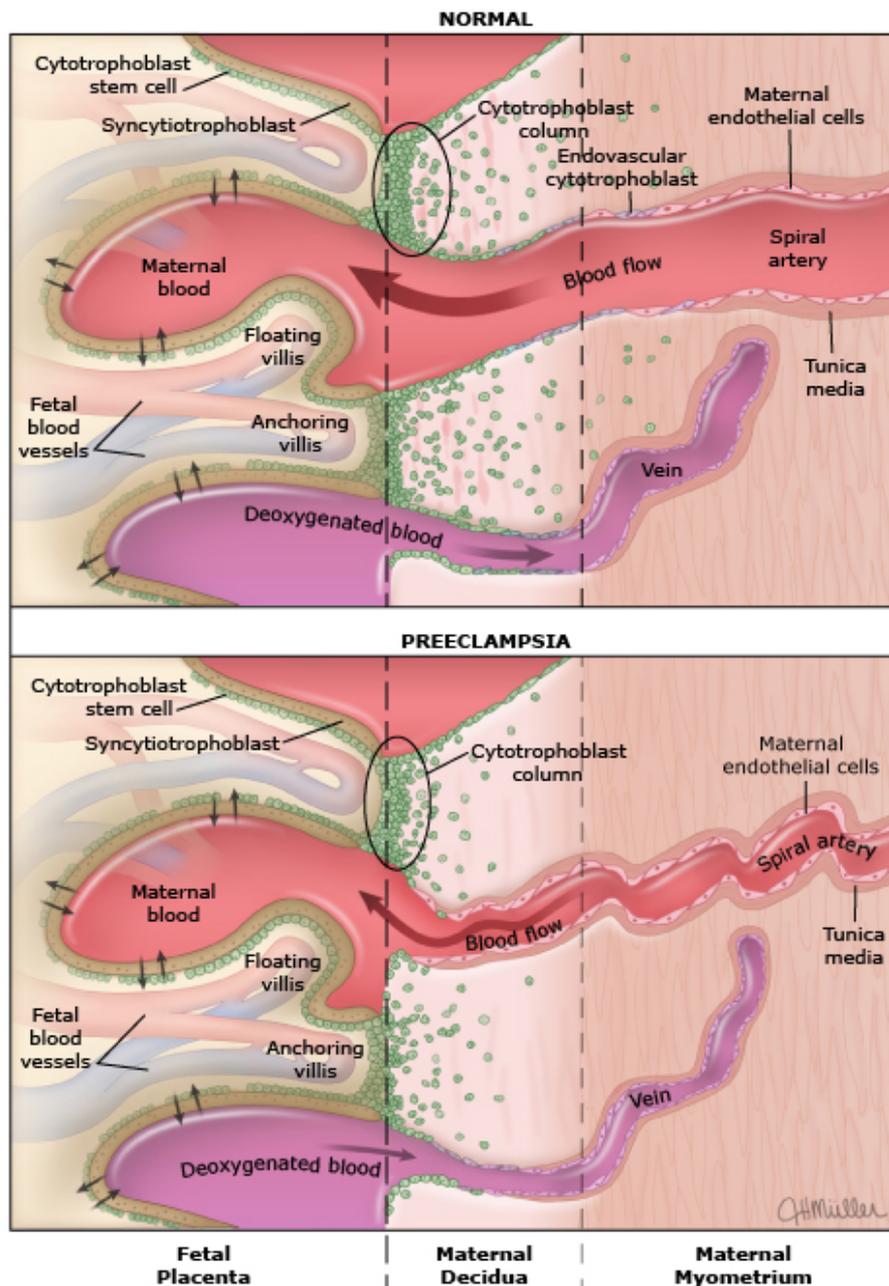


Figura 5. Durante la invasión, el citotrofoblasto se diferencia a células endoteliales, similares a células endoteliales (pseudovasculogénesis) consiguiendo una circulación arterial a baja presión, hecho que no se produce en la PE, además presentan una apoptosis acelerada, respecto a gestantes sanas.

La presencia de la hipoperfusión placentaria es la causa de la PE. Existen diferentes estudios en modelo animal, que reproducen la enfermedad en una gestación sana si reduces el flujo útero-placentario (Makris, 2007). A su vez se conoce que existe un riesgo incrementado en aquellas mujeres que tienen insuficiencia vascular previa al embarazo (HTA, diabetes, LES, enfermedad renal...).

Existen varios factores involucrados en la desarrollo de la placentación anómala y en el desarrollo del daño endotelial:

- Factores Ambientales

- Factores Inmunológicos (Safllas, 2005): derivados de la hipótesis de una mala tolerancia materna a los antígenos paternos/fetales. El SI participa en el proceso de anidamiento e invasión citotrofoblástica, mediado por células NK, productoras de VEGF y PIGF (angiogénesis), con una inmunotolerancia por la expresión correcta del trofoblasto de HLA- 1. Entendiendo en la actualidad, más la interacción en conjunto, que responsabilizando a la expresión de un subtipo específico de HLA.

- Factores Genéticos (Lachmeijer, 2002): se encuentra en investigación la participación de diferentes genes (Flt-1 en crom13, locus 12q...). Se postula la participación génica en la enfermedad, dado existen casos de historia familiar, el riesgo de recurrencia en gestaciones posteriores, el antecedente materno de PE en su gestación incrementa el riesgo.

- Incremento en la Sensibilidad a la Angiotensina II (Granger, 2001): existe un aumento de sensibilidad a la angiotensina II en la PE, presentando Ac agonistas para el receptor de la angiotensina AT-1 aumentados. La angiotensina II es el ligando endógeno para el receptor AT-1, por lo tanto aumento de la activación de este receptor por auto-anticuerpos podría inducir HTA y daño vascular.

Disfunción endotelial sistémica

Todas las manifestaciones clínicas de la PE derivan del daño endotelial (Roberts, 1989). Consecuencia de la hipoperfusión placentaria se genera un estrés oxidativo con respuesta inflamatoria sistémica, dañando el sistema endotelial vascular materno,

representado por un vasoespasmo generalizado y activación plaquetar (desarrollo de microtrombos).

Existen diferentes evidencias en pruebas de laboratorio confirman la mala función endotelial, como pueda ser:

- Incremento sérico en mujeres con PE de Ag factor VIII, trombomodulina y fibronectina celular (Friedman, 1995)
- Disminución endotelial de producción de sustancias vasodilatadoras (óxido nítrico y prostaciclina) con aumento de liberación de vasoconstrictores (endotelinas y tromboxanos) , junto con aumento en la sensibilidad Angiotensina II.

La disfunción endotelial representa un reacción inflamatoria vascular, con la activación del complemento y cascada de coagulación. Un endotelio dañado disminuye la liberación de agentes vasodilatadores (prostaciclina, NO), no es capaz de activarse el sistema renina-angiotensina a pesar de la hipovolemia que existe en la PE, además existe una hipersensibilidad a la Angiotensina II, aumentando la vasoconstricción y aumento de la permeabilidad vascular.

Con todo ello tenemos a nivel sistémico un aumento de las resistencias vasculares, mayor agregabilidad plaquetaria y activación del sistema de coagulación. Con depósitos de fibrina y agregación plaquetaria a nivel endotelial sistémico y placentario, perpetuando la enfermedad. Ya que ocasiona trombosis e infartos placentarios, con lo que se crea un círculo vicioso incrementando radicales libres, isquemia y disfunción endotelial.

Patogénesis de la disfunción endotelial sistémica

La formación de la placenta precisa una importante angiogénesis para asegurar un adecuado suministro sanguíneo. Se conoce que la placenta es capaz de sintetizar y liberar factores proangiogénico (VEGF , PIGF) y factores antiangiogénicos (sFlt- 1, endoglina), con lo que genera un equilibrio que asegura el aporte e intercambio sanguíneo materno-fetal.

En la PE existe una mala regulación, consecuencia de la mala invasión vascular trofoblástica, con lo que existe un incremento antiangiogénico, generando consecuentemente un daño endotelial placentario y materno.

- VEGF (Levine, 2009): promotor angiogénico mediante la interacción con dos receptores VEGFR (subtipo 1 y 2) expresados selectivamente en el endotelio vascular.
- sFlt-1 (Maynard, 2003): antagoniza la función del VEGF y PlGF al impedir la unión con receptor.

En comparación con los gestantes sanas controles, los niveles circulantes de sFlt-1 en PE están elevados y su vez VEGF y PlGF disminuidos previos a la aparición de manifestaciones clínicas (Levine, 2004).

Esta confirmada la participación de sFlt-1 en la génesis de la PE, no se conoce claramente si, su liberación es de forma primaria o secundaria a la isquemia placentaria, más aceptada esta última por el comportamiento del citotrofoblasto in vitro a situaciones de hipoxia (Widmer, 2007).

Se conoce que el sFlt-1 aumenta en todas las mujeres gestantes al final del embarazo, pero en comparación con los controles normotensos, las mujeres que luego desarrollaron PE, este aumento es precoz (21 a 24 semanas en comparación con 33 a 36 semanas) alcanzando niveles más elevados. A su vez en PE niveles séricos de PlGF y VEGF disminuyen al mismo tiempo que el aumento de sFlt-1 (Tsatsaris, 2003).

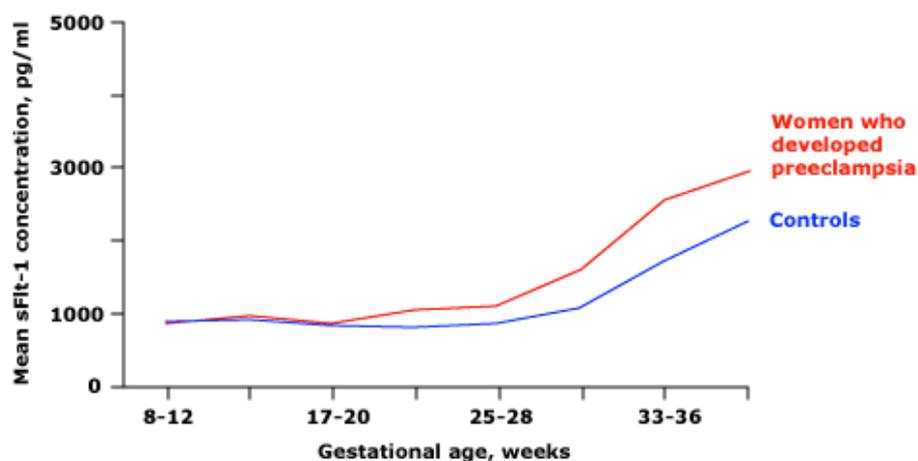


Tabla 1. Concentración de sFlt-1, en comparación de C y PE a lo largo de semanas gestación (Levine, 2004). En rojo, pacientes que desarrollan PE, en azul grupo control.

La presencia de estos marcadores cada vez están cobrando mayor importancia, su estudio actual se centra en poder usarlos como marcadores predictivos de evolución de la enfermedad incluso añadirlos en los criterios diagnósticos de la PE (Staff, 2013).

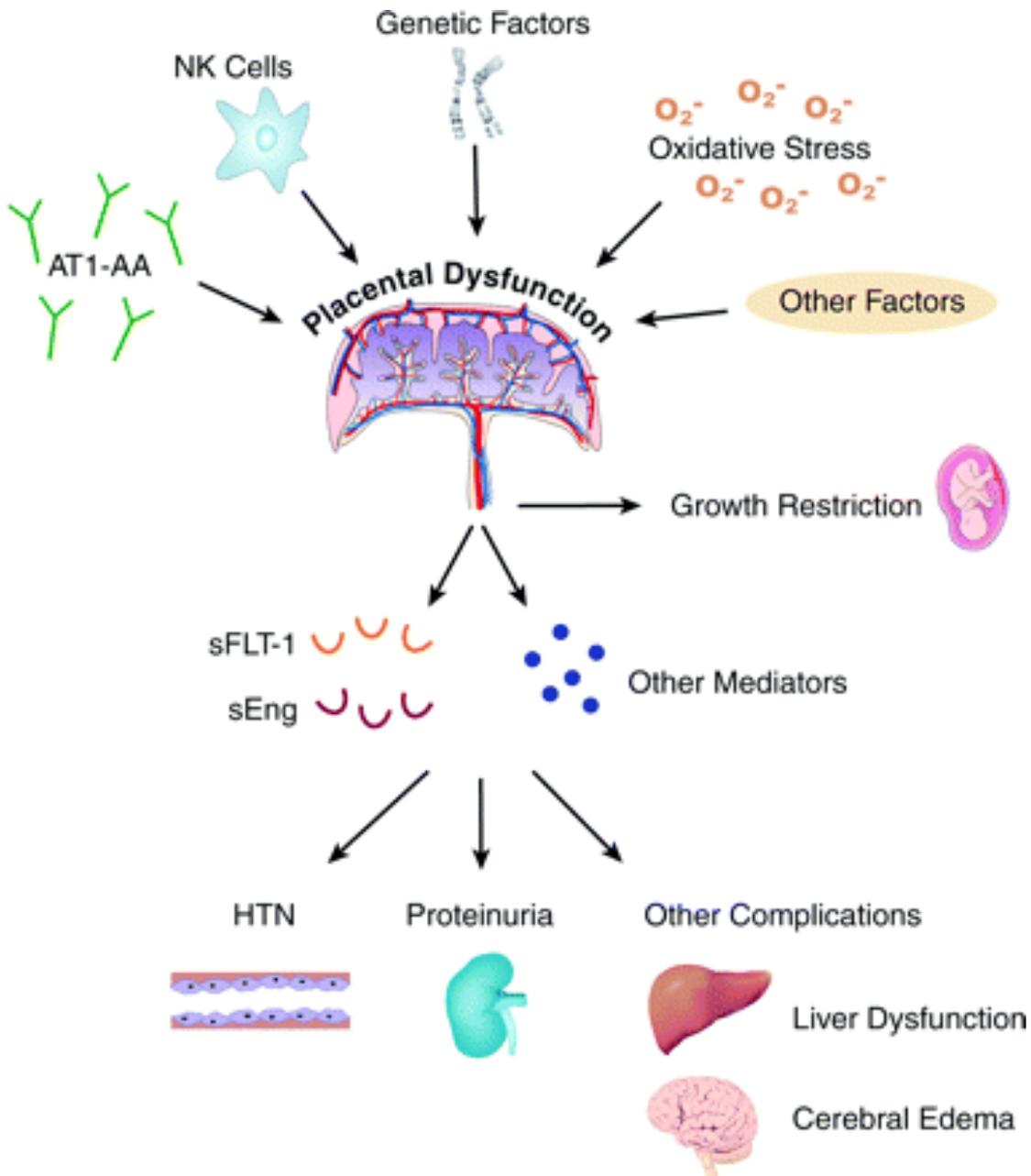


Figura 6. Resumen de la patogénesis de la enfermedad: la angiotensina II activador de los receptores tipo I (AT1-AA), factores inmunológicos, estrés oxidativo y otros factores, pueden causar disfunción placentaria, lo que a su vez conduce a la liberación de factores angiogénicos, como sFlt1 y endoglina soluble (Seng) y otros mediadores inflamatorios que inducen preeclampsia. HTN: hipertensión (Powe, 2011).

2.5 Alteraciones en la coagulación y función plaquetar

El embarazo es una situación fisiológica de hipercoagulabilidad transitoria (se postula como medida protectora frente a la hemorragia postparto). Dicho estado protrombótico se equilibra con las adaptaciones en la vía fibrinolítica. En la PE este equilibrio se rompe, apareciendo un exceso en la activación plaquetar con gran tendencia a la trombosis, sobre todo a nivel placentario. Dado que esta enfermedad se vincula a trastornos angiogénicos, la presencia de alteraciones de la coagulación podría contribuir a su fisiopatología.

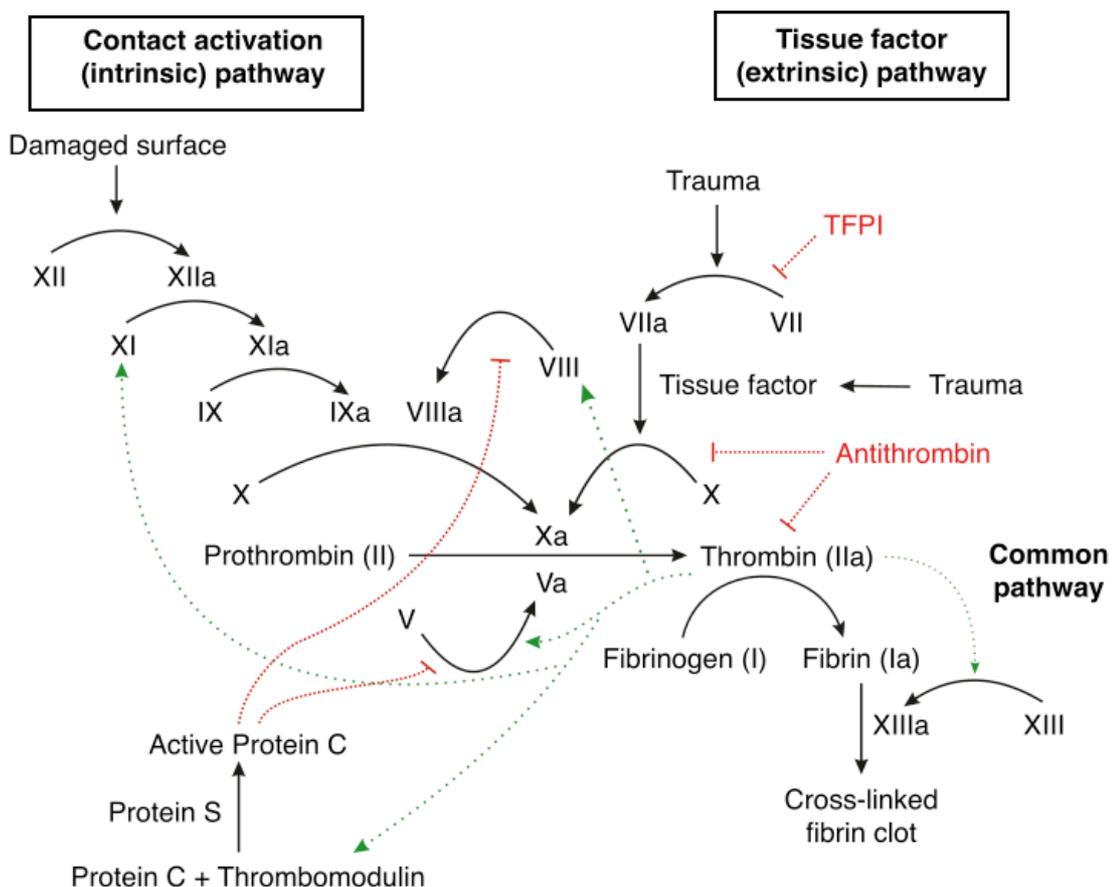


Figura 7. Representación esquemática de la cascada de coagulación tanto la vía intrínseca como extrínseca, con los inhibidores de la coagulación: antitrombina, proteína C activa y TFPI.

El proceso de la hemostasia es complejo, con participación del endotelio, plaquetas y cascada de coagulación. Teniendo el sistema fibrinolítico, un papel fundamental en su regulación.

Cambios en la hemostasia en gestante sana

- Coagulación/fibrinólisis (Halligan, 1994): encontramos niveles elevados fibrinógeno a pesar del aumento del volumen de plasma, junto con incremento del factor de von Willebrand y factores VII , VIII , X, XII. Respecto a la fibrinólisis un aumento progresivo en los inhibidores de la activación del plasminógeno (PAI- 1 y PAI- 2).
- Plaquetas (Gerbasi, 1990): existe una variación amplia en la cifra plaquetar entre muestras de población gestante, observándose una supervivencia plaquetar menor con mayor recambio, con mayor sensibilidad a la activación.
- Endotelio (Van der Weiden, 1996): responsable del tono vascular, hemostasia y función plaquetar, se piensa que existe un aumento de liberación de un potente vasodilatador, la prostaciclina (PGI₂).

Cambios en la hemostasia en gestante PE

- Coagulación/fibrinólisis (Halligan, 1994): existe un aumento en el complejo trombina-antitrombina con incremento D-dímero y disminución de fibrinógeno en SP (fibrinólisis disregulada). A su vez también existe una disminución de anticoagulantes fisiológicos tales como proteína C y disminución ligera de antitrombina. Respecto a la fibrinólisis, existe una alteración en los inhibidores de la activación del plasminógeno, estando globalmente incrementado la fracción de PAI a expensas de un incremento de PAI- 1 (reflejo de daño plaquetar y endotelial) con disminución de PAI- 2 (reflejo de función placentaria dañada).
- Plaquetas (Konijnenberg, 1997): típicamente existe una plaquetopenia reflejo del consumo intravascular de bajo grado por la formación de microtrombos, con una mayor sensibilidad a la activación (incremento en la expresión de P-selectina, CD63 y PECAM), con mayor liberación de Tromboxano.
- Endotelio (Roberts, 1989): el daño endotelial generado en la PE estimula la vasoconstricción, promoviendo la adhesión y agregación de plaquetas , así como la activación de factores de coagulación, con el resultado de mayor daño hipóxico al endotelio.

2.6 Factores de riesgo

Existen varios factores de riesgo (FR) descritos en el desarrollo de preeclampsia:

- Antecedente de PE (Duckitt, 2005): pacientes sanas sin desarrollo de PE en anterior gestación tienen un riesgo de desarrollar una PE en su segunda gestación < 1%. En cambio, si presentan el antecedente de PE en gestación previa, se incrementa por 7 el riesgo de aparición de nuevo de la enfermedad en su gestación (RR: 7,19, IC 95%, [5,85-8,83]).

A su vez la gravedad de la enfermedad y la edad gestacional de aparición, también marcará el riesgo; así pacientes con PE graves y precoces, tendrán entre un 25 a 65% de desarrollar de nuevo PE con un nuevo embarazo (Gaugler-Senden, 2008). En comparación con pacientes diagnosticadas de PE leves y tardías tienen un riesgo de desarrollo menor, estimado entorno al 5 - 7% (Xiong, 2002).

- Primiparidad (Duckitt, 2005): ser primigesta es un FR de desarrollo sin conocer la causa (RR: 2,92, IC 95% [1,28-6,61]). Se postula que podría ser debido a los cambios generados por la reciente exposición a antígenos paternos, involucrado en la patogénesis de la enfermedad. Un periodo intergenésico ≥ 10 años, el riesgo de PE se equipara a la primípara.
- Historia familiar de PE (Nilsson, 2004): se postula en mecanismo hereditario en algunos casos, dado que su presencia en familiares de primer grado incrementa el riesgo (RR 2,90, IC 95% [1,70-4,93]).
- Gestación gemelar (Duckitt, 2005): se incrementa el riesgo conforme lo hace el número de fetos (RR 2,93 IC 95% [2,04-4,21] para gestaciones con 2 fetos).
- Añosidad (Duckitt, 2005): edad materna ≥ 40 años representa un RR 1,96 IC 95% [1,34-2,87] en el caso de multíparas y un RR 1,68, IC 95% [1,23-2,29] para primíparas.
- Condición médica previa a la gestación que conlleve una situación de insuficiencia vascular (Duckitt, 2005):

1.- Diabetes Pregestacional (RR 3,56 IC 95% [2,54-4,99]) _ vinculado a una lesión endotelial en el sistema cardiovascular y/o renal debilitado por la enfermedad de base, la presencia de alteraciones en el metabolismo lipídico o resistencia tisular periférica a la insulina.

2.- Anticuerpos Antifosfolípido positivos (RR: 9,72 IC 95% [4,34-21,75])

3.- IMC \geq 26,1 (RR 2,47 IC 95% [1,66-3,67])

4.- Enfermedad renal crónica _ sus RR varía en función del grado de afectación glomerular representado por el FG y por el desarrollo o no de HTA. Por ejemplo estadios III – IV, tienen un riesgo de desarrollo de PE del 40-60% (Nevis, 2011)

2.7 Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas van a depender de las cifras tensionales, proteinuria y afectación multisistémica. La gran mayoría de las pacientes presentarán cifras tensionales sistólicas entre 140-160 mmHg y diastólicas 90-110 mmHg, con presencia de proteinuria y desarrollo de edemas periféricos (típicamente cara/manos). Toda la clínica deriva del daño del daño endotelial (microangiopatía) en órganos diana: cerebro, hígado, riñón y placenta (Lain, 2002).

Existen síntomas y signos de alarma, exigiendo una actuación inmediata catalogándolos como PE grave (ACOG, 2013):

- HTA severa (TAS \geq 160 y/o TAD \geq 110) en 2 ocasiones al menos con 4h de separación, con la paciente en reposo
- Daño SNC: cefalea severa y/o persistente, anomalías visuales (escotomas, fotofobia, visión borrosa), alteración estado mental.
- Daño hepático: dolor epigástrico y en hipocondrio derecho, náuseas, vómitos
- Edema pulmonar: disnea, dolor retrocostal

Alteraciones típicas en pruebas complementarias, reflejo del daño orgánico:

- Anemia microangiopática hemolítica: descenso de Haptoglobina sérica, elevación de Bilirrubina, frotis SP anormal (esquistocitos, punteado basófilo, microsferocitos, reticulocitosis ...)
- Trombocitopenia (< 100.000/microl)
- Elevación Cr sérica (>1,1 mg/dL) y enzimas hepáticas (GOT – GPT)

Cabe destacar la retirada de la clasificación de la proteinuria masiva (>5 g en orina 24h) y el CIR, como diagnóstico de PE severa (ACOG, 2013). La causa de muerte de estas pacientes, generalmente suelen ser debido a edema pulmonar, hemorragia cerebral, fallo hepático y/o renal.

2.8 Diagnóstico precoz de la PE

Actualmente no existe ninguna prueba clínicamente disponible que sirva como cribado en que pacientes desarrollaran PE y cuales no (ACOG, 2013; Conde - Agudelo, 2004). Una buena prueba predictora de PE debe ser simple, rápida y no invasiva, con bajo coste, fácil de realizar siendo segura para la paciente, con una elevada sensibilidad y especificidad, con el objetivo de mejorar los resultados maternos/perinatales (Levine 2009).

Predicción basada en los FR

La mayoría de los FR no son modificables, en general presentan RR de entre 1,5 a 9,7 en los metaanálisis revisados (Milne, 2005). Se plantea una atención prenatal más estricta en aquellas mujeres que los presenten.

Detección de factores angiogénicos en sangre y orina (VEGF, PlGF, sFlt-1)

Las alteraciones en los niveles absolutos de VEGF, PlGF y sFlt – 1, en sangre materna y la orina preceden al inicio de preeclampsia clínica en varias semanas, correlacionándose con la severidad de la enfermedad, normalizándose postparto. Actualmente no tienen aplicación clínica, dado que permanecen en investigación (Meads, 2008). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha iniciado un amplio estudio prospectivo, observacional, para evaluar la utilidad de la detección de proteínas angiogénicas para la predicción de la PE.

Doppler de Arteria Uterina

El índice de pulsabilidad (IP) en las arterias uterinas generalmente disminuye a medida que avanza el embarazo. Conforme avanza la gestación normal existe un descenso progresivo del IP y del notch protodiastólico bilateral (Gómez, 2005).

El aumento del IP y la persistencia del notch para la edad gestacional es una característica temprana de la PE , y probablemente refleja alta resistencia debido a la diferenciación defectuosa del trofoblasto, generando el fracaso de las arterias espirales en transformarse en vasos de baja resistencia. De las diferentes revisiones, se concluye que existe una mayor rentabilidad diagnóstica en el 2º T de la gestación (Cnossen, 2008), sin existir recomendación en su uso como cribado (Myatt, 2012).

Líneas de Investigación

- Perfil Proteómico (Navaratnam, 2013): el uso de perfiles proteómicos es una nueva línea de investigación como buenos predictores de la PE.
- Perfil genómico (Zhong, 2010): relación entre polimorfismos genéticos y el desarrollo de la enfermedad.

Con todo ello, los nuevos estudios para el cribado de la PE, deben ser capaces no solo de su predicción, si no también de catalogarla como PE leve/severa o de desarrollo precoz/tardía.

2.9 Prevención

Actualmente el único tratamiento definitivo para la resolución de la preeclampsia es la finalización de la gestación (extracción placentaria).

Existen gran cantidad de estudios que intentan valorar, diferentes medidas de prevención en desarrollo de la enfermedad, con más o menos éxito debido a la complejidad de la etiopatogenia de le PE. En la actualidad el único fármaco que ha sido validado con éxito como método preventivo en mujeres con elevado riesgo de desarrollar PE es la administración precoz de aspirina a dosis bajas.

AAS a dosis bajas

La hipótesis deriva del aumento en mujeres PE de un mayor turn-over plaquetar con niveles séricos elevados de Tromboxano (Wallenburg, 1986). Así si administras AAS a dosis bajas (60 a 150 mg/día), consigues disminuir la síntesis de Tromboxano plaquetar, al inhibir de forma irreversible de la actividad de la enzima COX; sin afectar la síntesis endotelial de prostaciclina (McParland, 1990). Con lo que se consigue una

reversión del cociente TXA2/PGI2, a favor, de la acción de las Prostaciclina (vasodilatación y antiagregación plaquetar).

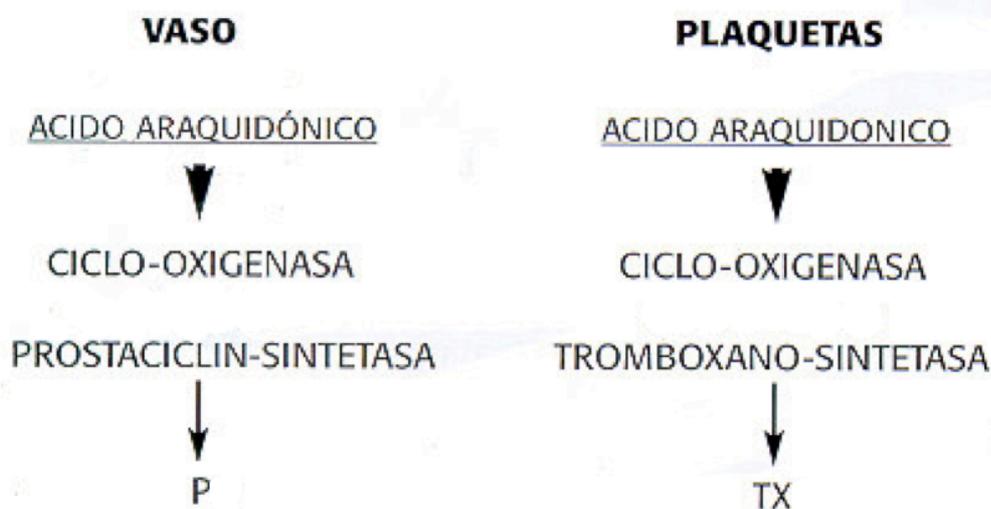


Figura 8. Esquema de la síntesis derivada de la ruta del ácido araquidónico: Prostaciclina (P) endotelial, siendo un potente antiagregante plaquetar y Tromboxano (TX) plaquetar, potente proagregante y vasoconstrictor

Un metaanálisis de 42 ensayos aleatorios publicado en 2013 (Roberge, 2013) de aspirina versus placebo/ningún tratamiento para la prevención de PE en más de 27.000 mujeres de moderado a alto riesgo de preeclampsia descubrió que la ASS a bajas dosis comenzado ≤ 16 semanas de gestación da lugar a una reducción significativa de:

- preeclampsia del 7,6 vs 17,9% RR: 0,47 IC 95% [0,36 - 0,62]
- preeclampsia grave del 1,5 vs 12,3 % RR: 0,18 IC 95% [0,08 - 0,41]
- CIR del 8,0 al 17,6% RR: 0,46 IC 95% [0,33 - 0,64]
- parto prematuro 4,8 vs 13,4 % RR: 0,35 IC 95% [0,22 - 0,57]

Cuando se administra AAS profiláctica en mujeres sin FR de desarrollo de PE, se encuentra escaso beneficio a esta medida. Un ensayo multicéntrico publicado en 2003 (Subtil, 2003) con asignación aleatoria a 3.294 mujeres nulíparas de ASS a 100 mg/día desde la 14-20 semana vs placebo, encontraron una incidencia de PE similar en ambos grupos (1,6 y 1,7% respectivamente).

El problema radica en la selección de mujeres candidatas a la toma de ASS profiláctica. Actualmente se recomienda dosis bajas de aspirina en mujeres con riesgo moderado o alto de PE, ya que existe un potencial de beneficio con el mínimo riesgo.

El uso de Doppler de Arteria Uterina en el 1er T no ha sido validado clínicamente como método de cribado para desarrollo futuro de PE (Subtil, 2003).

No hay consenso en los criterios que confieren riesgo significativo, siendo el embarazo anterior con PE precoz, DM tipo I con afectación vascular, síndrome antifosfolípido y la HTAC mal controlada son las indicaciones más frecuentes (Barton, 2008). Por el contrario sí que existe consenso el que la administración profiláctica debe iniciarse entre la 12-14 semanas de gestación, siendo seguro su uso durante el 2º y 3er T (Bujold, 2010).

- El Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (ACOG, 2013):
 - no recomienda la aspirina a dosis bajas (60 a 80 mg) en mujeres de bajo riesgo
 - si recomienda su uso en pacientes de alto riesgo: antecedentes de PE precoz o PE en más de un embarazo

- Guía NICE (Visintin, 2010) aconseja el uso de dosis bajas (75 mg) de AAS desde la semana 12, para las mujeres con al menos un factor de alto riesgo de preeclampsia (HTAC o enfermedad renal , la diabetes , las enfermedades autoinmunes , HTA en el embarazo anterior) o al menos dos factores de riesgo para la preeclampsia moderada (edad \geq 40 años , primer embarazo , gestación múltiple , > 10 años entre los embarazos , IMC \geq 35 kg/m², antecedentes familiares de preeclampsia).

- La Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología (SEGO, 2007): recomienda el ofrecimiento de ASS a dosis de 100 mg/día en pacientes con riesgo elevado de desarrollar PE (antecedente de PE en gestación anterior, Diabetes pregestacional, antecedentes familiares de PE, HTAC, enfermedad renal, trombofilias, gestación múltiple).

Prevención del síndrome metabólico

Las mujeres que han sufrido PE en su gestación deben ser conocedoras del aumento de riesgo cardiovascular a lo largo de su vida. Por lo que se exige seguimiento estrecho en este grupo poblacional, con una prevención primaria de la patología cardiovascular: modificaciones en la dieta, actividad física regular, control de peso, reducción ingesta de sal y abandono del hábito tabáquico, recomendaciones recogidas ya por sociedad científicas, como por ejemplo la Sociedad Canadiense (Magee, 2008).

3.- Anexina A2

La anexina A2 (ANXA2) es una proteína expresada en gran mayoría de líneas celulares, su función mediada por la activación de canales calcio dependiente, se encarga del mantenimiento de la dinámica de la membrana plasmática, mediada por la interacción con el citoesqueleto intraplasmático, gracias a la función de la actina (Hayes 2006). Se postula su participación en la regulación en la interacción de las membranas plasmática célula-célula, a través de la formación de complejos con Rac1/p21- asociados a quinasa y cadherina (Hansen,2002).

3.1 Participación en la dinámica celular

Diversos estudios in vitro han documentado la capacidad de la ANXA2 en la polimerización de la actina en presencia de calcio. Localizándose con más frecuencia en estructuras dinámicas de membrana - citoesqueleto , tales como fagosomas, pinocitosis o formación de los tallos de actina en los macropinosomas móviles (Hayes, 2006). Estando ausente en aquellas regiones citoplasmáticas quiescentes.

En la mayoría de las células , la ANXA2 está presente en dos formas:

- como monómero en el citosol, participando en la interacción dinámica mediada por microdominios lipídicos (Babiychuk, 2000)
- como complejo heterotetramérico, constituido por dos moléculas de ANXA2 y dos moléculas de S100A10 (Johnsson, 1988) , localizado a nivel de la membrana-citoesqueleto, encargándose del control del citoesqueleto plasmático

Se ha identificado ANXA2 como sustrato del *major insulin receptor*, que se encuentra directamente vinculado en el reordenamiento de actina y la adhesión celular, regulando la migración celular (Domínguez, 2009). Además también se encuentra asociada al complejo Rho / proteína quinasa serina / treonina (ROCK), regulando los cambios de actina asociado al control de la adhesión (Babbin, 2007). Todos ello desempeña un papel en la regulación de la remodelación del citoesqueleto requerida para la migración celular, adhesión, motilidad y cambios en la morfología celular.

3.2 Participación en la receptividad endometrial

Gracias a diversos estudios proteómicos, se ha visto la importante participación del ANXA 2 en la receptividad endometrial humana (Garrido-Gómez, 2013).

La receptividad endometrial es un estado transitorio, complejo de tan solo 2 días de duración, basado en un control endocrino, génico y bioquímico, que dota de las características que permita la adhesión del blastocisto; exclusivamente entre los días 7 a 9 después el pico de LH, correspondiente al día 21-23 del ciclo menstrual.

En diversos estudios se ha observado niveles descendidos de expresión ANXA2, caracterizando un endometrio no receptivo (ANXA2, disminuye dramáticamente en las células epiteliales y está ausente en las células del estroma), con lo que postula la necesidad de esta proteína para la preparación del epitelio endometrial (remodelación de la organización epitelial, sobre todo a nivel del polo apical) para la adhesión del blastocito (Domínguez, 2009).

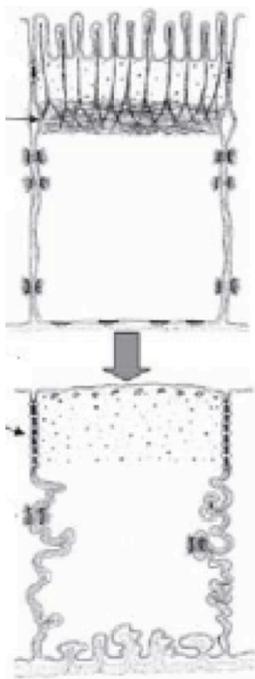


Figura 9. *Trasformación de la membrana plasmática del epitelio endometrial, no receptiva (parte superior) a receptiva (parte inferior), con el objetivo de facilitar la adhesión del blastocito (Murphy, 2004)*

3.3 Otras funciones ANXA2

- Decidualización humana (Ihnatovych, 2009): la liberación de ANXA2 está implicado en la regulación de la decidualización de las CEE, dependiente de la reorganización del citoesqueleto de actina.
- Actividad fibrinolítica (Kwon, 2005): promueve la actividad fibrinolítica en la superficie de las células endoteliales vasculares por unión de plasminógeno y activador del plasminógeno tisular , y mediante la aceleración de la producción de plasmina.
- Cicatriz queloidea (Kim, 2014): niveles menores de ANXA 2 en pieles queloides respecto a pieles sanas, implica su participación en los procesos cicatriciales, al modificar la movilidad de los fibroblastos.
- Hepatocarcinoma (Dong, 2014): se ha observado una mayor agresividad con mayores tasas de metástasis en aquellos hepatocarcinomas con sobreexpresión de ANXA-2, pudiendo llegar a ser una diana terapéutica y como marcador de diagnóstico precoz junto con la alfa-fetoproteína.
- Actividad bronquial (Dassah, 2014): se postula la participación del ANXA2 en la correcta funcionabilidad y permeabilidad bronquial.

4.- Las ómicas en estudio del endometrio humano

Con la secuenciación del genoma humano, alcanzado en el año 2000, se abre la posibilidad de un nuevo conocimiento a nivel molecular sobre la fisiología del funcionamiento del endometrio humano, con su repercusión sobre la esterilidad (receptividad endometrial) y desarrollo de la placentación humana.

Las denominadas *ciencias ómicas* (genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica) han conseguido el desarrollo de nuevas biotecnologías, permitiendo el estudio a nivel molecular. Constituyendo un gran impacto en el conocimiento de la biomedicina y diagnóstico médico (Medina, 2010).

La genómica se encarga del estudio de la función, regulación y transmisión del material genético (genoma). Los microarrays de DNA son herramientas que estudian la amplia respuesta celular a través de los cambios en la transcripción del genoma a nivel del RNAm, definiendo la transcriptómica como el estudio de la expresión del RNA celular. La proteómica se centra en la investigación protéica y la metabolómica el producto de los metabolitos.

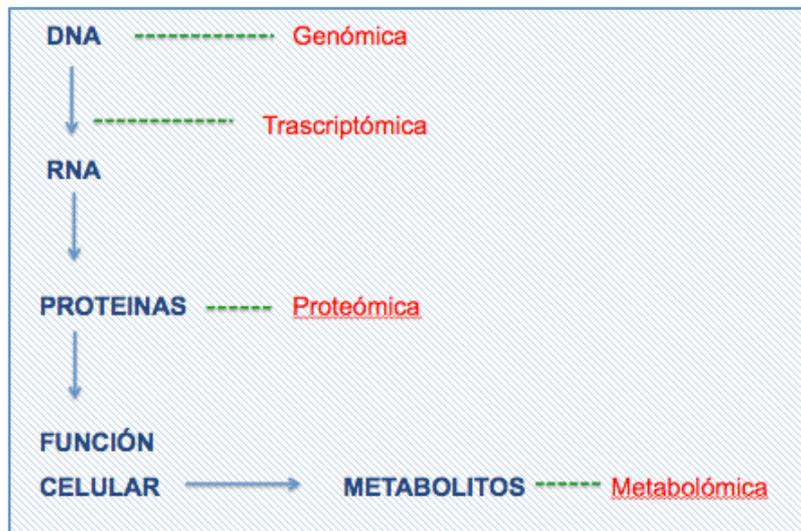


Figura 10. Esquema secuenciado entre la interacción molecular y la ciencia que se encarga de su estudio (en rojo).

El análisis de datos masivos obtenidos requieren de la informática para poder ser analizados e interpretados, de modo que se ha desarrollado toda una bioinformática asociada a estas tecnologías ómicas. Con la transcriptómica es posible caracterizar a nivel molecular las enfermedades y los procesos biológicos según su transcriptoma, es decir, según todo el conjunto de los genes que se están expresando en un momento y un tejido concreto, gracias a la tecnología de arrays y a los programas bioinformáticos asociados (Medina, 2010).

La transcriptómica se ha utilizado en medicina reproductiva para el estudio del endometrio y más concretamente para la evaluación de la receptividad endometrial (Horcajadas, 2007). También existen trabajos que describen de forma extensa sobre la proteómica del endometrio y como varía en las diferentes fases del ciclo, a modo de entender como responde a nivel celular a diferentes señales intra y extracelulares (Garrido-Gómez, 2011).

Los arrays de proteínas consisten en una matriz plana (de diferentes sustratos) en los que los Ac, péptidos, proteínas o complejos extractos proteínas pueden inmovilizarse en diferentes puntos para capturar la presencia de proteínas específicas, gracias a uniones específicas, analizándola de forma cuantitativa (Horcajadas, 2007; Garrido-Gómez, 2011).

Estas herramientas a nivel molecular confieren, por primera vez, un análisis objetivo y en profundidad del endometrio humano, permitiendo evaluar las características propias fisiológicas y su patología.

De esta manera, se abre un amplio abanico en la biomedicina. Se puede realizar por ejemplo en caso de técnicas de reproducción asistida ante la sospecha de baja receptividad, una predicción computacional. De igual forma un diagnóstico precoz en pacientes candidatas a desarrollo de PE, que nos permitiera un control más estricto de la gestante y medidas encaminadas a su prevención (aspirina a dosis bajas precoz).

JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

En la actualidad los grandes síndromes obstétricos, se asocian a defectos en el fenómeno de la placentación. Así se postula que toda la gran patología obstétrica (que justifica la mayor parte de morbi-mortalidad perinatal), representada por: preeclampsia, parto pretérmino con membranas íntegras, rotura prematura de membranas pretérmino, CIR, muerte fetal 2º T y el aborto espontáneo, están condicionadas desde el mismo momento de la invasión trofoblástica en la decidua materna (Brosens, 2011).

Por ello está justificado el estudio de la PE, por varios motivos:

- Elevada prevalencia (Wallis, 2008): se estima una prevalencia mundial del 7,5 %.
- Morbimortalidad materna: según datos publicados por la OMS en Mayo 2012, en países en vías de desarrollo (ratio de mortalidad materna de 240/100.000 NV), se encuentra la PE y desarrollo de E, como primeras causas junto con la infección y hemorragia puerperal. En países Occidentales (ratio de mortalidad materna de 16/100.000 NV), también es catalogada como primera causa de morbi-mortalidad materna.
- Morbimortalidad neonatal (Navaratnam, 2013): una de las primeras causas de prematuridad tanto en Occidente como países en vía de desarrollo.
- Costes sanitarios materno (Navaratnam, 2013): se estima un gasto anual de 31 mil millones de euros en el mundo desarrollado, como gasto sanitario directo en atención y tratamiento prenatal en mujeres diagnosticadas de PE, estimándose en Europa un coste de 9.000 millones de euros (Meads, 2008).
- Coste sanitario neonatal (Navaratnam, 2013): la PE ocasiona el 20% de costes por unidad de cuidados intensivos neonatales, dado que es la primera causa de parto prematuro yatrógeno en países desarrollados (Hauth, 2000).

Con todo ello se estima que el gasto sanitario derivado de la atención básica hospitalaria a una paciente preecláptica y su neonato, será >15.000 euros (sin tener en cuenta la morbilidad neonatal a largo plazo).

Se justifica el estudio de la etiopatogenia de la PE, por varios motivos, por un lado, para aumentar el grado de conocimiento de la enfermedad: si se es capaz de entender su

etiopatogenia, se podrá realizar medidas encaminadas al diagnóstico precoz, evitando el desarrollo y las consecuencias maternas y neonatales de esta grave enfermedad. En la actualidad, si dispusiésemos de un cribado eficaz, podríamos administrar ASS profiláctica en aquellas mujeres con cribados positivos, facilitando la focalización de los recursos sanitarios (Meads, 2008).

Por otro lado, la promoción de la salud, disminuyendo tanto la mortalidad, la morbilidad a largo plazo (aumento de incidencia de patología cardiovascular tanto en pacientes PE como en neonatos nacidos de embarazos preeclámpticos), así como el gran gasto sanitario derivado de ello.

Si somos capaces de entender las causas y los mecanismos genéticos y moleculares de la placentación anómala en la PE, estaremos ayudando al entendimiento de la etiopatogenia de otros grandes síndromes en la atención materno-fetal, con las consecuencias derivadas en el diagnóstico precoz, seguimiento prenatal y tratamiento.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

La hipótesis de este proyecto de tesis doctoral se centra en el estudio del patrón de decidualización en PE versus gestaciones sanas, mediante el papel del ANXA2 en el proceso.

La preeclampsia supone un diálogo erróneo entre la decidua materna y embrión, generando una placentación anómala y deficitaria. Entendiéndose el origen como una diferenciación deficitaria por parte del citotrofoblasto y una alteración en la decidualización de las células del estroma endometrial.

Este proyecto de tesis doctoral intenta estudiar la participación materna en la enfermedad, centrándose en el estudio in vitro de la decidualización de estas células. Presentamos la hipótesis de una resistencia a la decidualización en mujeres con antecedente de preeclampsia pueda contribuir a la invasión incorrecta del citotrofoblasto y a las alteraciones fibrinolíticas características de esta enfermedad.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Objetivos Generales

- Identificar, definir y desarrollar un perfil del patrón de la decidualización en mujeres que hayan padecido preeclampsia en alguno de sus embarazos previos, desde el punto de vista proteómico
- Detectar y evaluar diferentes variables que actuen como predisponentes a padecer dicha patología, valorando si existe la posibilidad de detección precoz
- Valorar la participación de la ANXA2 en la decidualización en mujeres con antecedente de PE.

2. Objetivos Específicos

- Análisis de la decidualización del endometrio procedentes de mujeres que han padecido una PE grave versus pacientes con gestaciones sanas
- Valorar el papel de la ANXA2 en proceso de la decidualización e invasión embrionaria
- Relación existente entre ANXA2 y la patogenia de la PE
- Implicación de la fibrinólisis en la PE y su relación con la ANXA2.
- Valoración de la respuesta al defecto de fibrinólisis con heparina in vitro

MATERIAL Y MÉTODO

MATERIAL Y MÉTODO

1.- Muestras biológicas 42

- 1.1 Muestras Preeclampsia
- 1.2 Muestras Control
- 1.3 Toma de muestras
- 1.4 Características de muestras obtenidas
 - 1.4.1 Muestras Preeclampsia
 - 1.4.2 Muestras Control
 - 1.4.3 Comparativa entre ambos grupos

2.- Manejo y procesado en Laboratorio 57

- 2.1 Recepción de la muestra
 - 2.1.1 Separación del epitelio y estroma
 - 2.1.2 Separación del estroma
- 2.2 Decidualización in vitro
 - 2.2.1 Decidualización de las células estromales
 - 2.2.2 Comprobación del proceso de decidualización
- 2.3 Análisis proteína ANXA 2 intra / extracelular
 - 2.3.1 Extracción de proteína
 - 2.3.2 Cuantificación de proteína
 - 2.3.3 Wester Blot
- 2.4 Inmunohistoquímica ANXA 2
- 2.5 Inmunofluorescencia ANXA 2
- 2.6 Silenciado ANXA2 siRNA
- 2.7 Ensayo medición in vivo de F-actinina / G-actinina
- 2.8 Ensayo proceso cicatrización (“cierre del surco”)
- 2.9 Ensayo expansión trofoblástica
- 2.10 Ensayo invasión embrionaria
 - 2.10.1 Preparación esferoides JEG-3

2.10.2 Valoración invasión embrionaria

2.11 Estudio fibrinólisis

2.12 Evaluación niveles MMP-2 y MMP-9

2.13 Manejo y evaluación de RNA

2.13.1 Aislamiento de RNA

2.13.2 Retrotranscripción

2.13.3 PCR tiempo real

2.14 Administración Heparina dosis respuesta

3.- *Análisis estadístico* 73

4.- *Análisis bioinformático* 73

Este proyecto de investigación presenta la aprobación por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, en Valencia a día 23 de Agosto de 2011 como estudio investigación propio con número de registro 2011/0383.

La participación fue totalmente voluntaria y altruista, sin compensación económica en ningún caso. Las pacientes fueron reclutadas específicamente para este estudio. Las tomas biológicas fueron recogidas tras explicación del estudio y firma del Consentimiento Informado (Anexo II).

1.- Muestras biológicas

1.1 Muestras Preeclampsias

Las muestras PE, fueron reclutadas en pacientes diagnosticadas de preeclampsia, con recién nacido vivo (parto vaginal o cesárea) en Hospital Universitario y Politécnico La Fe desde Enero de 2009 hasta Enero de 2012, de acuerdo con la Codificación Clínica CIE 9-MC, código 642.5 (*Ministerio Sanidad y Consumo España, 2006*) en las altas hospitalarias informatizadas del registro de la Unidad de Documentación Clínica y Admisión.

Tras la obtención de la base de datos se procedió, por el número de historia clínica, a la revisión, paciente a paciente, del episodio diagnóstico valorando los criterios de inclusión para la participación en este estudio.

▪ CRITERIOS INCLUSIÓN

Mujeres entre 18 - 42 años (ambos inclusive)

Antecedente de preeclampsia severa en algunos de sus embarazos, documentado mediante diagnóstico médico y analítico: obligatorio la presencia de HTA y proteinuria (muestra aislada > 30 mg/dL) en gestaciones \geq 20 sem.

No toma de Anticoncepción hormonal 3 meses previos a la toma de la muestra

▪ CRITERIOS EXCLUSIÓN

Presencia de patología ginecológica (endometriosis, hipermenorreas...) o neoplasia hormonodependiente

Toma de fármacos

Anticoncepción hormonal (orales, trasdérmicos, vaginales e intramusculares)

Usaria de DIU Cobre o DIU Mirena

HTA crónica

Lactancia materna

Siendo PE severa o grave, la presencia de al menos uno de estos criterios para poder incluir en estudio (*Trastornos Hipertensivos del Embarazo, Protocolo SEGO 2006*):

- 1.- Presencia de TAS \geq 160 y/ o TAD \geq 110 mmHg en dos ocasiones al menos 4 horas de diferencia en situación de reposo (al menos que no se pueda demorar el inicio del tratamiento anti-hipertensivo)
- 2.- Trombocitopenia ($<$ 100.000 plaquetas/ mm³).
- 3.- Daño en función hepática (elevación del doble de su valor referencia de GOT y GPT), pudiendo añadir dolor persistente en epigastrio y/o hipocondrio derecho.
- 4.- Progresivo deterioro renal (Creatinina Sérica y/o aparición oliguria).
- 5.- Edema Pulmonar
- 6.- Alteraciones visuales o cerebrales (hiperreflexia con clonus, cefalea severa, escotomas, visión borrosa, amaurosis).

En la revisión de la historia se recogieron antecedentes médico-quirúrgicos y datos ginecológicos generales como fórmula menstrual, controles previos y antecedentes obstétricos en anteriores gestaciones, si las hubiese.

Por otro lado se revisó la gestación PE recogiendo:

- AL INGRESO HOSPITALARIO: semana de gestación con exploración física (TAS y TAD), hallazgos analíticos (Hb, plaquetas, fibrinógeno, GOT, GPT, proteínas totales, LDH y proteinuria muestra aislada).
- FINALIZACIÓN DE LA GESTACIÓN: semanas gestación, vía (parto/cesárea), peso del neonato y de la placenta.

Una vez revisada la historia, cumpliendo con criterios de PE grave en alguna de sus gestaciones, se procedía a llamar telefónicamente a las pacientes. Se les explicaba el estudio y su deseo de participación. Si la paciente accedía, se revisa criterios de exclusión (centrados sobre todo en la toma de anticoncepción hormonal), se preguntaba por FUR y FM, citándose en el hospital entre día 15-19 de ciclo.

Previo a la toma de la muestra, a la paciente se le volvía a explicar el estudio, se le daba la Hoja de Información a la paciente (anexo I), si aceptaba, se firmaba el Consentimiento Informado (anexo II).

1.2 Muestras Control

Las muestras Control, fueron recogidas en pacientes que habian parido en nuestro Hospital con una gestación de curso normal (parto vaginal o cesárea) desde Enero de 2009 hasta Enero de 2012, de acuerdo con la Codificación Clínica CIE 9-MC (*Ministerio Sanidad y Consumo España, 2006*) en las altas hospitalarias informatizadas en el registro de la Unidad de Documentación Clínica y Admisión.

Tras la obtención de la base de datos se procedió a revisar de manera idéntica a las muestras PE. Fueron valorados los criterios de inclusión para la participación en este estudio.

- CRITERIOS INCLUSIÓN

- Mujeres entre 18 - 42 años (ambos inclusive)

- Antecedente de embarazo sano previo (ausencia de PE, CIR, prematuridad).

- No toma de Anticoncepción hormonal 3 meses previos a la toma de la muestra

- CRITERIOS EXCLUSIÓN

- Presencia de patología ginecológica (endometriosis, hipermenorreas...) o neoplasia hormonodependiente

- Toma de fármacos

- Anticoncepción hormonal (orales, trasdérmicos, vaginales e intramusculares)

- Usaria de DIU Cobre o DIU Mirena

- HTA Crónica

- Lactancia Materna

En la revisión de la historia se recogieron antecedentes médico-quirúrgicos y datos ginecológicos generales como fórmula menstrual, controles previos y antecedentes obstétricos en anteriores gestaciones si las hubiese.

Por otro lado se revisó el episodio de la gestación recogiendo, por un lado:

- INGRESO HOSPITALARIO: semana de gestación, exploración física (TAS y TAD), hallazgos analíticos (Hb, plaquetas, fibrinógeno, GOT, GPT, proteínas totales).

- FINALIZACIÓN DE LA GESTACIÓN: semanas gestación, vía (parto/cesárea), peso del neonato y de la placenta.

Una vez revisada la historia, cumpliendo con criterios de inclusión se llamaba a la paciente. Se les explicaba el estudio y su deseo de participación. Si la paciente accedía, se revisa criterios de exclusión (centrados en la toma de anticoncepción hormonal y no lactancia materna), se preguntaba por FUR y FM y se citaba en el hospital entre día 15-19 de ciclo.

Previo a la toma de la muestra, a la paciente se le volvía a explicar el estudio, se le daba la Hoja de Información a la paciente (anexo I), si aceptaba, se firmaba el Consentimiento Informado (anexo II), de forma idéntica a como se realizaba en las muestras PE.

1.3 Toma muestras

La toma de muestra endometrial fue idéntica en ambos grupos, realizada siempre por la misma persona, entre el día 15-19 de ciclo. Tras colocación de espéculo desechable (*Unidix, España*) con visualización de cérvix, se procede a introducción cánula flexible (*Gynetics, Bélgica*) hasta alcanzar fondo uterino realizándose aspirado endometrial. La muestra obtenida se mantenía en recipiente estéril con PBS frío.

1.4 Características Muestras Obtenidas

El material biológico de origen humano empleado en este estudio esta formado por un total de 26 biopsias endometriales, tomadas en el mismo rango de días del ciclo ovárico (días 15-19 de ciclo).

Todas las pacientes fueron sanas, sin patología ginecológica, presentando ciclos menstruales regulares de 25-33 días. Ninguna recibió tratamiento hormonal o lactancia materna en al menos los 3 meses previos a la toma de la muestra.

1.4.1 Muestras Preeclampsia

Un total de 177 historias fueron revisadas, cumpliendo criterios de inclusión 126 pacientes.

De todas ellas se reclutaron a 43 pacientes a las que se intentó realizar la toma de aspirados endometrial, de los cuales, 13 fueron válidos, 8 muestras no válidas (escasa cantidad de tejido edometrial o ausencia de tejido valorable), 8 situaciones no se pueden tomar la muestra (imposibilidad de canalizar OCI), 14 muestras problemas en laboratorio (3 muestras se congelaron directamente, 6 muestras contaminación y 5 no crecimiento en placa tras sembrado).

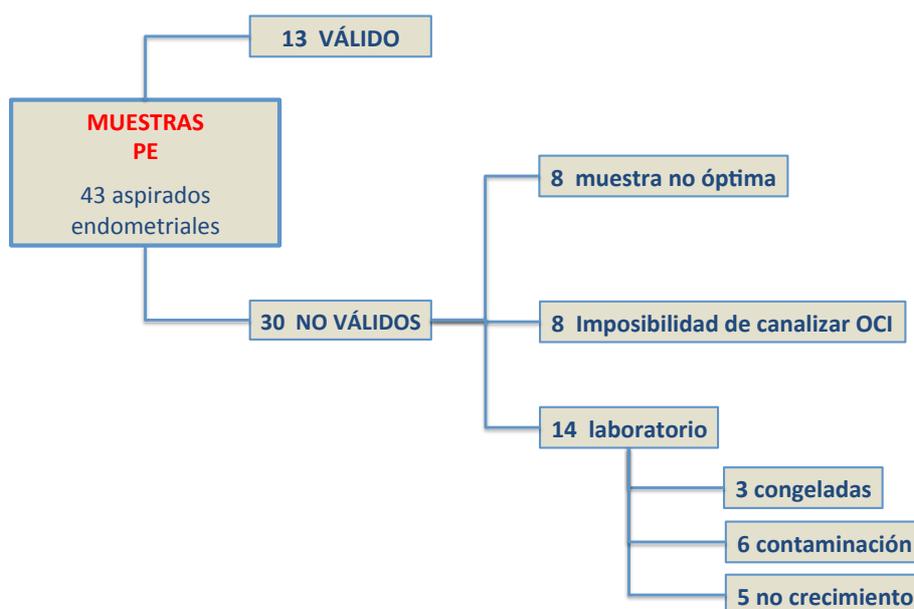


Tabla 2. Algoritmo sobre el total de muestra procedente de sPE recogidas para el estudio.
OCI: orificio cervical interno

De las 13 muestras finales, presentaron una media de edad de 34,5 años [24-31] en el momento de la toma biológica, y una edad de 32,3 años [23-37] en el momento del diagnóstico de la PE. De todas ellas:

- 7 fueron PE precoces (≤ 34 sem) y 6 PE tardías (>34 sem).
- 5 pacientes fueron primigestas, 1 secundigestas nulípara (ectópico previo) y 1 tercigesta nulípara (presencia de un aborto y una IVE previo).
- 2 pacientes con 2 gestaciones afectadas de PE
- 4 pacientes con antecedente de gestación sana y gestación PE (secundigestas secundíparas)

Respecto al uso de técnicas de reproducción asistida, presentaron 2 embarazos gemelares tras ICSI y un embarazo único tras FIV. Una paciente un gemelar espontáneo. Por lo que en total hubieron 3 gestaciones gemelares bicorales biamnióticas, dos tras TRA y una espontánea.

La media de semanas gestacionales en el momento del diagnóstico fue de 32 semanas [26-37], finalizando el embarazo en semana 34 [26-38], con un peso de RN medio de 1844 gramos [640-3000] y placenta de 596 gramos [250-1100].

Respecto al momento del diagnóstico la media de TAS fue 162 mmHg [139-176], TAD 101 mmHg [84-121] y proteinuria de 268 mg/dL [30-500]. De los hallazgos analíticos, una Hb media de 11,9 g/dL [9,4-14,2], plaquetas 161.000 [57000-30600], fibrinógeno calculado de 523 mg/dL [375-673] con proteínas totales de 5,53 g/dL [4,4-6,8]. Respecto al patrón hepático GOT 101 U/L [15-526] y GPT 88 U/L [9-426].

PREECLAMPSIA	Edad	Edad Preeclampsia	Paridad	Día ciclo de toma	Año de última gestación	Año Toma de muestra
PE 1	26	25	G2 C2	15	oct-10	abr-11
PE 2	24	23	G2 E1 C1	15	jul-10	oct-11
PE 3	36	35	G2 P1 C1	15	sep-10	oct-11
PE 4	37	35	G1 C1	17	mar-10	nov-11
PE 5	38	37	G1 P1	17	may-10	nov-11
PE 6	36	33	G1 C1	15	nov-09	mar-12
PE 7	41	37	G3 A1 IVE1 C1	17	dic-09	abr-12
PE 8	32	29	G1 P1	18	ago-10	may-12
PE 9	35	34	G2 C2	22	mar-11	nov-12
PE 10	31	29	G1 C1	18	jul-11	ene-13
PE 11	39	37	G2 C2	17	jul-11	ene-13
PE 12	35	31	G2 C2	16	jul-09	abr-13
PE 13	38	35	G2 C1 P1	16	abr-11	abr-13

Tabla 3. Características de las muestras preeclampsia: edad y día del ciclo en el momento del aspirado endometrial, junto con paridad y año de la última gestación.

* En verde aquellos casos diagnósticos > 34 semanas: PE tardía (muestras nº 4,7,8,10,12,13).

PREECLAMPSIA	Paridad	Antecedentes Obstétricos
PE1	G2 C2	2 gestas afectadas
PE2	G2 E1 C1	PE en única gestación
PE3	G2 P1 C1	PE en 2ª gestación
PE4	G1 C1	FIV gestacion única
PE5	G1 C1	ICSI gemelar
PE6	G1C1	ICSI gemelar
PE7	G3 A1 IVE1 C1	Gemelar espontáneo
PE8	G1 P1	PE en única gestación
PE9	G2 C2	PE en 2ª gestación
PE10	G1 C1	PE en única gestación
PE11	G2 C2	PE en 2ª gestación
PE12	G2 C2	1era gesta PE
PE13	G2 C1 P1	2 gestas afectadas

Tabla 4. Datos obstétricos de las muestras PE con atención a paridad y momento de aparición de PE.

G: gestación, C: cesárea, P: parto, PE: preeclampsia, FIV: fecundación In vitro; ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoide

* En rojo las gestaciones gemelares, dos de ellas por ICSI (muestras nº 5,6) y otra espontánea (muestra nº 7).

PE	Diagnóstico	Peso RN	Placenta	TAS	TAD	Proteinuria	Hb	Plaquetas	Gr	Fibrinógeno	GOT	GPT	Proteínas Totales
PE 1	26+3	640 M	250	165	94	45	10,9	119.000	A +	476	43	62	5,4
PE 2	32+5	1650 V	550	176	121	150	13,2	204.000	0+	673	16	10	5,1
PE 3	30+3	1200 V	600	163	98	55	12,6	220.000	A +	543	15	12	6
PE 4	35+5	2380 M	700	171	111	30	14,2	194.000	A +	607	16	9	6,3
PE 5	29+3	M 1520/1100	750	163	97	30	9,4	306.000	A +	612	348	275	5,6
PE 6	31+1	M 1530/1624	750	160	84	500	10,9	66.000	0 +	507	526	426	5,2
PE 7	35+2	V2650/3000M	1100	160	89	30	11,3	226.000	B +	375	19	22	6,8
PE 8	35+2	1950 M	550	165	98	500	11,4	193.000	A -	417	17	11	4,4
PE 9	32+4	1650 V	400	139	112	500	13,4	57.000	A +	525	132	123	5,1
PE 10	36+6	2730 M	500	173	101	500	13,8	155.000	0 -	427	34	46	5,6
PE 11	31+6	1150 M	450	153	92	150	10,1	65.000	0 +	541	93	90	5,3
PE 12	35+1	2225 M	550	159	110	500	9,8	167.000	A +	470	20	13	5,4
PE 13	35+2	2690 V	600	153	105	500	13,9	122.000	0 +	623	40	45	5,7

Tabla 5. Valores en el momento diagnóstico, con semanas de gestación, peso del recién nacido y sexo (M: mujer/ V: varón), TA (mmHg), proteinuria en muestra orina aislada (mg/dL), Hemoglobina (Hb en g/dL), Fibrinógeno (mg/dL), patrón hepático (GOT y GPT en U/L) y proteínas totales (g/dL).

PE	Criterio Inclusión PE grave	Cifra tensional	Clínica	Trombocitopenia	Analítico
P 1	Cifra tensional, clínica	SÍ	SÍ	NO	NO
P 2	Cifra tensional	SÍ	NO	NO	NO
P 3	Cifra tensional	SÍ	NO	NO	NO
P 4	Cifra tensional, clínica	SÍ	SÍ	NO	NO
P 5	Cifra tensional, criterio analítico	SÍ	NO	NO	SÍ
P 6	Cifra tensional, clínica, trombocitopenia, criterio analítico	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
P 7	Cifra tensional	SÍ	NO	NO	NO
P 8	Cifra tensional, clínica	SÍ	SÍ	NO	NO
P 9	Cifra tensional, trombocitopenia, criterio analítico	SÍ	NO	SÍ	SÍ
P 10	Cifra tensional	SÍ	NO	NO	NO
P 11	Trombocitopenia, clínica	NO	SÍ	SÍ	NO
P 12	Cifra tensional	SÍ	NO	NO	NO
P 13	Clínica	NO	SÍ	NO	NO

Tabla 6. Criterios de inclusión de PE grave según criterio SEGO 2006, al menos debe cumplir uno: cifra tensional (TAS \geq 160 y/ o TAD \geq 110 mmHg) clínica (dolor persistente en epigastrio y/o hipocondrio derecho, cefalea, fotopsias), presencia de trombocitopenia (< 100.000 plaquetas/microL) o alteraciones analítica (elevación del doble de su valor referencia de GOT y GPT).

1.4.2 Muestras Control

Un total de 60 historias fueron revisadas, cumpliendo criterios de inclusión 47 pacientes, las cuales fueron avisadas telefónicamente.

De todas ellas se reclutaron a 38 pacientes a las que se intentó realizar la toma de aspirados endometrial, de los cuales, 13 fueron válidos, 5 fueron muestras no válidas (escasa cantidad de tejido edometrial o ausencia de tejido valorable), 4 no se pudo tomar la muestra (imposibilidad de canalizar OCI), 16 muestras problemas en laboratorio (3 muestras se congelaron directamente, 7 muestras contaminación y 6 no crecimiento en placa tras sembrado).

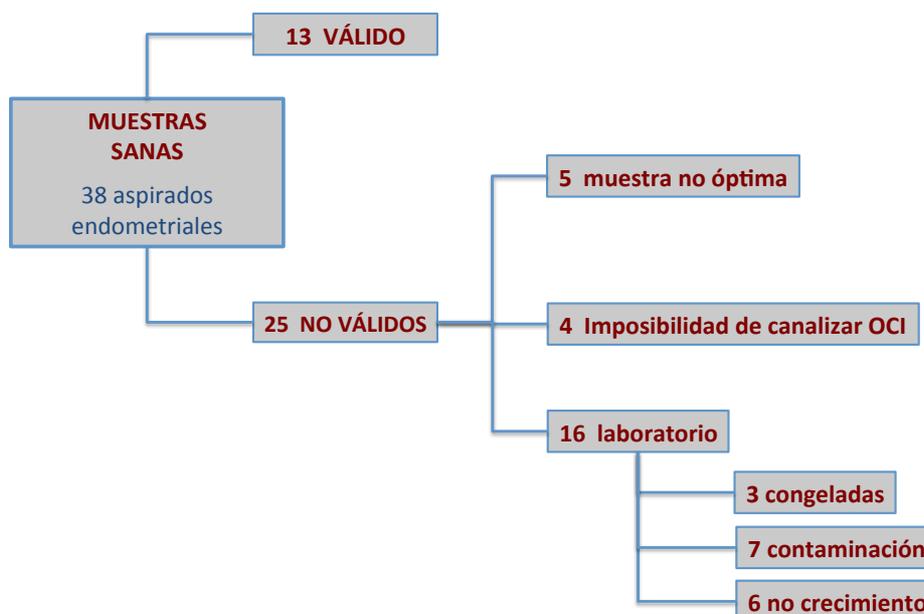


Tabla 7. Algoritmo sobre el total de muestra procedente de pacientes sanas recogidas para el estudio. OCI: orificio cervical interno .

De las 13 muestras finales, presentaron una media de edad de 38 años [32-42] en el momento de la toma biológica. De todas ellas:

- 7 pacientes fueron primigestas, 1 secundigestas nulípara (aborto previo)
- 4 secundíparas secundigestas
- 1 paciente cuartígesta secundípara (con 2 abortos previos)

No hubo ninguna gestación derivada del uso de TRA.

La media de semanas gestacionales en el que se finalizó la gestación fue de 39 semanas [38-41], con un peso de RN medio de 3258 gramos [2140-3.800] y placenta de 712 gramos [650-800].

Respecto al momento del diagnóstico la media de TAS fue 121 mmHg [98-135], TAD 74 mmHg [67-84]. De los hallazgos analíticos, una Hb media de 13,9 g/dL [11,3-14,9], plaquetas 215.000/microL [150.000-312.000], fibrinógeno calculado de 570 mg/dL [476-705] con proteínas totales de 6,9 g/dL [6-7,4]. Respecto al patrón hepático GOT 19 U/L [13-41] y GPT 16 U/L [7-52].

▪ Reclutamiento y recogida de muestras	36 meses
▪ Historias totales revisadas	237 (177 PE + 60 non-PE)
▪ Pacientes reclutadas	81 (43 PE+ 38 non-PE)

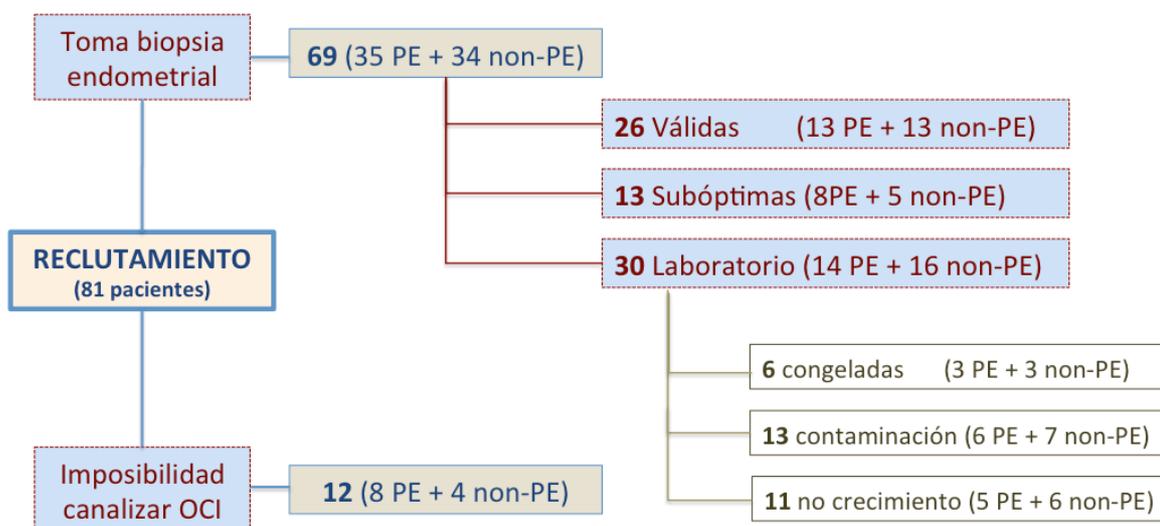


Tabla 7b. Resumen de reclutamiento de paciente y algoritmo sobre el total de muestra procedente de pacientes sanas y preeclámpticas recogidas para el estudio. OCI: orificio cervical interno .

CONTROL	Edad	Edad última Gestación	Paridad	Día ciclo Toma	Año último embarazo	Año toma de muestra
C1	39	35	G1 P1	17	2009	Oct - 2011
C2	36	34	G2 A1 P1	17	2009	Nov - 2011
C3	41	37	G2 P2	18	2009	Ene - 2012
C4	38	36	G2 P2	17	2010	Feb - 2012
C5	37	35	G 1 P1	18	2010	Feb - 2012
C6	41	39	G1 P1	16	2011	Mar - 2012
C7	32	30	G 1 P1	18	2010	Mar - 2012
C8	35	33	G1 P1	18	2011	Abr - 2012
C9	41	38	G2 P2	17	2009	May - 2012
C10	36	35	G2 P2	19	2012	Jul - 2013
C11	38	35	G1 P1	16	2010	Sep - 2013
C12	35	30	G1 P1	19	2009	Oct - 2013
C13	42	40	G4 C2 A2	15	2011	Oct - 2013

Tabla 8. Características de las muestras control: edad y día del ciclo en el momento del aspirado endometrial, junto con paridad y año de la última gestación.

CONTROL	Finalización	Peso RN	Placenta	TAS	TAD	Hb	Plaquetas	Grupo	Fibrinógeno	GOT	GPT	Proteínas Totales
C1	37+5	3285 M	750	122	70	14,1	260.000	A +	705	20	15	7,4
C2	38+2	2140 M	650	135	70	13,6	152.000	O -	519	16	12	6,5
C3	39+6	3150 M	750	126	72	13,7	273.000	B +	585	19	18	6,8
C4	39	3200 v	700	117	76	13	249.000	A +	582	15	13	7
C5	40+3	3330 M	650	126	84	14,9	154.000	B +	574	17	7	7
C6	39	3135 V	725	122	69	11,7	173.000	A -	609	21	11	7,2
C7	38+6	3700 V	800	128	67	11,8	157.000	O -	527	17	17	7,2
C8	39+5	3100 V	700	118	68	13,5	150.000	O -	562	21	16	6,5
C9	39+3	3470 V	750	131	81	12,7	177.000	A +	693	41	52	7,4
C10	40+6	3500 v	700	121	83	13,4	261.000	O +	551	16	10	6
C11	40+4	3340 M	680	120	79	11,6	288.000	O +	540	16	9	7,5
C12	40	3100 V	700	117	77	11,5	312.000	O +	491	13	8	6,6
C13	39	3800 V	700	98	67	11,3	191.000	AB +	476	23	19	6,4

Tabla 9. Valores en el momento de parto, con finalización de la gestación (semanas), con peso del recién nacido y sexo (M: mujer/ V: varón), TA (mmHg), Hemoglobina (Hb en g/dL), Fibrinógeno (mg/dL), patrón hepático (GOT y GPT en U/L), proteínas totales (g/dL).

1.4.3 Comparativa entre ambos grupos

Tanto las pacientes PE (n=13) como las pacientes C (n=13) eran sanas, de raza caucásica, con edades comparables (rango de 24 a 42 años), con IMC comprendido entre 19 – 27,8 kg/m²

Se observó un incremento en el grupo PE de mayores cifras tensionales (TAS/TAD), GOT, GPT y proteinuria. En cambio menor número de plaquetas, fibrinógeno y proteínas totales.

Respecto a grupo sanguíneo fue A Rh + el más frecuente en grupos PE.

Todas las muestras fueron recogidas entre día 15-19 de ciclo, clasificándolas como muestras en fase secretora precoz, según criterios de Noyes (Noyes, 1975).

	Non-PE (n=13)	sPE (n=13)	P valor
TAS (mmHg)	121.6 (8.9)	161.5 (9.7)	< 0.001
TAD (mmHg)	74.1 (6.2)	100.9 (10.5)	< 0.001
Finalización gestación (semanas)	39.46 (0.9)	33.7 (3.5)	< 0.001
Peso RN (gramos)	3250 (400)	1844 (688)	< 0.001
Fibrinógeno (mg/dL)	570.3 (68)	522.8 (89)	NS
GOT (U/L)	19.61 (7.01)	101.5 (157.16)	< 0.05
GPT (U/L)	15.92 (11.5)	88 (125.4)	< 0.05
Plaquetas x 10 ³	215153 (59485)	161076 (73658)	< 0.05

Tabla 10. Características maternas y neonatales, expresadas como media ± DE, usando test T-student. Non-PE: muestras sanas; sPE: muestras preeclampsia severa; NS: No Significativo.

2.- Manejo y procesado en Laboratorio

Todo el proceso en Laboratorio se realizó en condiciones óptimas, para disminuir al máximo cualquier tipo de contaminación por agentes externos, usándose en todo el proceso material estéril y trabajo dentro de recintos asépticos.

2.1 Recepción de la muestra

2.1.1 Separación del epitelio y estroma

- 1.- Lavado de la biopsia con D-PBS (*DPBS Euroclone®*), con eliminación de moco y sangre de la muestra.
- 2.- Trituración con dos hojas de bisturí nº 11 del material obtenido, mediante disgregación mecánica, hasta conseguir consistencia de papilla (fragmentos < 1mm).



Figura 11. Disgregación mecánica mediante hoja cortante



Figura 12 . Aspecto de la muestra tras disgregación (consistencia papilla)

3.- Colocación en tubo cónico junto con 9 mL de Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) y disgregación enzimática con 1 mL Colagenasa tipo IA (*Sigma-Aldrich, EEUU*).

4.- Muestra a 37° C en agitación (velocidad de 80 rpm) durante 90 min, para poder permitir la hidrólisis del colágeno, liberando pequeños fragmentos de tejido y células aisladas.

5.- Reposo durante 10 minutos en posición vertical, se consigue por coeficiente de sedimentación, las células de mayor tamaño sedimentan más rápido correspondiendo a fracción epitelial (glándulas/epitelio), mientras que las células estromales, presentan menor cociente:

Parte superior (sobrenadante): Estroma.

Parte inferior (pellet): Epitelio.

2.1.2 Separación del estroma

1.- Recogida con pipeta automática del sobrenadante (se encuentran las células del estroma)

2.- Paso del contenido por filtros de 50 µm de poro (*Partec Celltrics®*)

3.- Tres lavados consecutivos:

- Añadido 5 mL de DMEN.

- Agitado y dejado reposar 5 min

- Recogido el sobrenadante resultante y filtrado de nuevo.

4.- El líquido obtenido se divide en 2 tubos de 14 mL y se centrifuga a 2000 rpm durante 10 min

5.- Se desecha el sobrenadante y el pellet resultante (contiene células del estroma) se resuspende en 5 mL de medio ESC (medio células estroma).

2.2 Decidualización in vitro

2.2.1 Decidualización de las células estromales

1.- Se plantan entre 500.000-600.000 células del estroma en placas de plástico de 24 pocillos (*BD, España*) en un medio DMEN/F12 con un porcentaje del 10% de SBF (Suero Bovino Fetal), junto con 0,1% de antibióticos (Gentamicina, Amfotericina B)

2.- Se deja crecer durante 24 horas

3.- Al presentar una densidad del 80-90% de confluencia, se comienza la inducción de la decidualización in vitro, con medio de cultivo suplementado con 2% de SBF.

4.- Existen dos protocolos diferentes de inducir el proceso de decidualización:

- **PROTOCOLO A (Irwin, 1991):** Adición al medio de cultivo de Progesterona ($1\mu\text{M}$) junto con β 17-Estradiol (30 nM) durante 9 días como inductor hormonal, renovando los medios de cultivos cada 72 horas.
- **PROTOCOLO B (Brar, 1997):** Adición al medio de cultivo de 8-bromo-cAMP (cAMP, *Sigma-Aldrich, EEUU*) ($0,5\text{ M}$) y medroxiprogesterona acetato (MPA, *Sigma-Aldrich, EEUU*) ($1\text{ }\mu\text{M}$) durante 5 días como estímulo decidual.

En ambos se usa un control procedente de la misma muestra que se cultiva en paralelo sin añadir inducción de la reacción decidual (tratamiento hormonal).

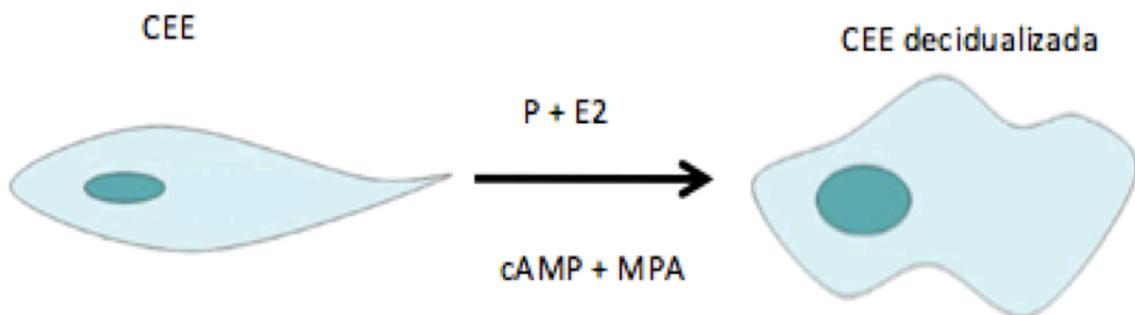


Figura 13. Esquema sobre los efectos sobre la célula estroma endometrial (CEE) al administrar, o bien el protocolo A (P + E2) o protocolo B (cAMP + MPA), como inductores de decidualización

5.- Recogida de células y medio de cultivo

6.- Con el material recogido:

- Medio de cultivo (comprobación bioquímica decidualización):
 - Centrifugado para eliminar posibles células y recoger el sobrenadante.
 - Guardar a -20° C
- Células (comprobación histológica de decidualización):
 - Tripsinizar las células (tras eliminación de todo el medio de cultivo decidual, se añadió 300 uL de tripsina y dejado 5 min a 37° C).
 - Añadir 300 uL de medio ESC + 2% SBF (para inactivar tripsina).
 - Recoger todo el líquido.
 - Centrifugar, eliminar sobrenadante y guardar pellet a -20° C .

2.2.2 Comprobación del proceso de decidualización

Se comprobará si el proceso se ha producido, analizando la producción de los mediadores bioquímicos (prolactina y IGFBP-1) y la morfología de las células.

- **MEDIADORES BIOQUÍMICOS:** se cuantificará la cantidad de proteína: IGFBP-1 (*RayBiotech*) y prolactina (*Abnova System*), secretada en el medio de cultivo empleando Kits de ELISA específicos, expresando los valores calculados en pg/mL, a partir de las curvas estándar proporcionada por el kit.
- **MORFOLOGÍA CELULAR:** inmunohistoquímica de las células crecidas en monocapa utilizando la tinción para F-actina (marcador específico de las fibras de actina). Para ello se fija las células con concentraciones bajas (2-3% de paraformaldehído como fijador), bloqueándolas con BSA (albúmina de suero bovino) al 5%. Se incuban las células con 0,1 g/ml de faloidina-tetrametilrodamina B isotiocianato de conjugado de *Amanita phalloides* (*Sigma-Aldrich, EE.UU*) toxina con fluorescencia que se une y fija la F – actina. Se mantienen durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Las imágenes de fluorescencia se obtienen con microscopio Nikon equipado con un objetivo apertura numérica $100 \times 1,45$ y una unidad confocal de disco giratorio *Yokogawa (PerkinElmer)*.

Si la decidualización se había producido, se comprobaba el incremento de los biomarcadores secretados y los cambios morfológicos de las células decidualizadas.

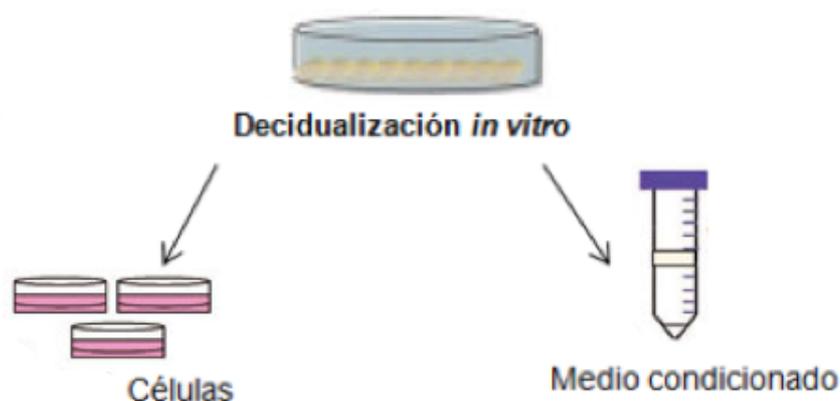


Figura 14. Las células obtenidas sirvieron para la morfología celular, y el medio de cultivo para la determinación de biomarcadores.

2.3. Análisis proteína ANXA2 intra/extracelular

2.3.1 Extracción de proteínas

Se procedió a la lisis de las CEE, mediante solución tampón (50 mM Tris - HCl, pH 8,0 , NaCl 150 mM , 1 % de *Igepal CA 360*® , 0,5 % de Na -DOC , 0,1 % de SDS y EDTA 0,5 M). Aproximadamente 50 µL de tampón por cada 800.000 células.

Se dejó actuar durante 20 minutos en hielo. Tras ello se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm a 4 °C durante 15 minutos, tomándose el sobrenadante celular (donde se encontraba resuspendido el extracto protéico).

2.3.2 Cuantificación de proteínas

Se llevo a cabo la cuantificación protéica usando método Bradford. Se basa en el uso de un colorante hidrofóbico con capacidad de unión a proteínas, Comassie Blue G-250 (*BioRad, Reino Unido*).

Este colorante presenta dos formas, una azul y otra naranja. Al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de la proteínas origina un color azul intenso que puede ser medido fácilmente.

Esta medición se realizó con un espectrofotómetro con absorbancia 280 nm (longitud de onda a la que absorben las proteínas). Para determinar la concentración de proteína total presente en la muestra se requiere una curva calibrado empleando una proteína patrón, siendo la seroalbúmina bovina.

2.3.3 Western Blot

Los extractos de proteína obtenidos (25µg/carril) fueron separados con tampón SDS (docecilsulfato) al 10%, transfiriéndolos a una membrana de poliacrilamida para realizar electroforesis discontinua en gel (gel apilamiento de poliacrilamida al 4% y gel resolutivo de poliacrilamida al 10%) durante 60 minutos a 180 V.

La electroforesis realizada es conocida como SDS-PAGE, buscando la pérdida de la estructura secundaria y terciaria, manteniendo los polipéptidos en estado desnaturalizado, permitiendo la separación únicamente en función del tamaño (la estructura tridimensional de las proteínas no influye así en la electroforesis).

Tras ello, las proteínas se transfieren desde el gel de poliacrilamida a membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) hidrófoba (*Amersham Biosciences, EE.UU*). Esta transferencia se realizó mediante acción de campo eléctrico (electrotransferencia húmeda) durante 4 horas a 160 V a 4°C en agitación.

Tras ello, estas membranas transferidas se añadió solución bloqueo PBS-T-L (PBS, Detergente Tween 0,1%, leche 5%), con el objetivo de saturar todos los lugares de unión de proteínas no ocupados para evitar la unión no específica de anticuerpos.

Fueron incubadas durante la noche (aprox. 12 horas) a 4 °C, en 5ml de PBS-T con un 3% leche junto con Ac policlonales de conejo anti-Anexina II humana a título 1/2500 (*Abcam, UK*) y la otra membrana con Ac monoclonales de ratón anti β - actina humana 1/2000 (*Santa Cruz Biotechnology, EEUU*). Para utilizarlo como control y poder normalizar, dado que la expresión de esta proteína es casi constante.

Tras ello, se incubó con sus anticuerpos secundarios correspondientes, anti-conejo a título 1/2000 para Anexina A2 y anti-ratón a título 1/2000 para β -actina (*Santa Cruz Biotechnology, EEUU*), durante 60 minutos a temperatura ambiente. El revelado se realizó mediante quimioluminiscencia (detección específica de unión Ag-Ac) gracias a reactivo ECL Plus (*GE Healthcare, EEUU*) en equipo LAS3000 Fujifilm.

Tras el revelado, se realizó la densitometría de las muestras normalizadas con la β -actina y con ello su cuantificación utilizando el propio software del equipo LAS3000.

2.4. Inmunohistoquímica ANXA2

Previo a las disgregación mecánica y enzimática de las muestras para el aislamiento de las células estromales, una porción de alrededor de 3 mm se fijó en formol 4% durante 24 horas y se procedió a la deshidratación de la muestra con xilol y porcentajes de alcoholes crecientes (70%, 90%, 100%).

Tras este tiempo las muestras fueron embebidas en parafina, se procedió a sección y montaje en portaobjetos de vidrio superfrost. Tras lo cual, se procedió a desparafinar y rehidratar la muestra con la sucesión de pases por xilol y alcoholes con porcentajes decrecientes (100%, 90%, 70%).

Estas secciones de endometrio fueron incubadas durante 60 minutos a temperatura ambiente con Ac policlonales (origen conejo) anti Anexina 2 humana 1:100 (*Abcam, Reino Unido*) diluido en PBS con 3% de BSA (bloqueando las uniones no específicas).

La inmunohistoquímica se realizó utilizando el kit de peroxidasa LSAB Peroxidase (*Dako, EEUU*), usando como cromóforo la DAB (3,3'-diaminobencidina). Tras la contratinción con Hematoxilina durante 10 segundos y lavado con agua destilada, se montó el portaobjetos con solución hidrófoba Entellan (*Merck, Alemania*) y visualización en microscopio óptico.

Se uso tres preparaciones diferentes de células para analizar y valorar la inmunohistoquímica.

2.5. Inmunofluorescencia ANXA2

Las CEE se cultivaron en placas de plástico hasta confluencia del 30-40%, se fijaron con bajas concentraciones de paraformaldehído al 2-3% durante 20 minutos. Tras 3 lavados con PBS, se bloqueó con BSA al 5% en PBS durante 60 minutos.

Tras ello se incubó durante una hora a temperatura ambiente con Ac anti- Anexina 2 humana policlonal de conejo 1:100 (*Abcam, Reino Unido*) diluido en PBS con 3% de BSA. Después las células se incubaron durante 30 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad con Ac secundarios 1/100 de anti-conejo Alexa Fluor 488 (*Invitrogen, España*) y 0,1 µg/mL de Faloidina-tetrametilrodamina B isotiocianato conjugado (*Sigma Aldrich, EEUU*). Las imágenes de fluorescencia se tomaron con microscopio confocal Nikon microscope con apertura numérica 100 x 1,45 con disco rotatorio confocal Yokogawa (*PerkinElmer*).

Se uso tres preparaciones diferentes de células para analizar y valorar la inmunofluorescencia.

2.6. Silenciado ANXA2 si RNA

Con el objetivo de silenciar la expresión génica de la ANXA2, se usó oligonucleótidos siRNA bicatenario con especificidad para la proteína ANXA2 (CGGCCUGAGCGUCCAGAAATT), con una modificación en su extremo 3' que adiciona el fluoróforo AlexaFluor488 (*Qiagen, EEUU*).

Las células se cultivaron en placa de 24 pocillos hasta una confluencia del 50-70%, utilizando medio DMEM/F12 sin adición de antibióticos y lipofectamina 2000 (*Invitrogen TM, EEUU*), como agente de transfección.

Así las CEE fueron transfectadas con siRNA específico para ANXA2 siRNA (100 nM) y el otro grupo (control negativo) con el scramble siRNA (100 nM), para la valoración de la respuesta celular al silenciado génico. Dicha solución estaba constituida por los oligonucleótidos siRNA junto con la lipofectamina.

Se añadió en pequeñas gotas (100 μ L por pocillo en placa de 24), moviendo orbitalmente con suavidad la placa para que los complejos de transfección se distribuyeran homogéneamente, incubándolas durante 24 horas a 37 °C.

Trascurridas 24 horas, se comprobó el silenciamiento mediante RT-PCR y Western Blot.

2.7. Ensayo medición in vivo de F-actinina/G-actinina

La actina puede encontrarse como monómero globular en forma libre (G-actina) o como parte de polímeros lineales filamentosos (F-actina).

Se basa en valorar la relación en cantidad de la G-actina frente a la F-actina contenida en las células del estroma endometrial, sujetas a inhibición ANXA2 seguido de una inducción decidual (AMPc y MPA), determinadas mediante ensayo específico: G-actin/F-actin In Vivo Assay Biochem Kit (*Cytoskeleton, EEUU*).

Se usó tampón de estabilización de F-actina a 37 °C durante 10 minutos. Tras ello, los lisados celulares se aclararon para eliminar restos celulares mediante centrifugado a baja velocidad (2.000 rpm). El sobrenadante celular se centrifugó a 100.000 rpm, con

el objetivo de separar los fragmentos solubles (G-actina globular) de los insolubles (F-actina filamentosa).

Así tras ello se obtuvo:

- pellet: actina insoluble
- sobrenadante: actina soluble

El pellet se resuspendió con agua mili-Q® (ultrapura) y 1/100 de agente despolimerizante de F-actina, actuando durante 60 minutos en hielo.

Finalmente ambas fracciones tanto globular como filamentosa se analizaron mediante Western Blot. Realizándose electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), transfiriendo posteriormente a membrana de nitrocelulosa para sondeo con Ac anti-actina 1/500 (*Cytoskeleton, EEUU*).

La cuantificación densitométrica del Western blot determinó la ratio de G-actina encontrada en el citosol versus F-actina incorporada en el citoesqueleto, normalizado con la cantidad de actina total.

2.8. Ensayo proceso cicatrización (“ cierre del surco”)

El objetivo es valorar la migración y proliferación celular mediado por ANXA2.

Las CEE fueron sembradas sobre placas de 24 pocillos. Cuando se alcanzó confluencia del 70-80%, se procedió a decidualización (cAMP + MPA), seguido por silenciamiento ANXA2 siRNA durante 24h.

Tras las 24 horas de transfección, se les cambió de medio de cultivo, pasando a un medio de cultivo ESC con un 2% de SBF. Cada pocillo se rascó con la punta de pipeta estéril de 200µL (similar lesión en todas las ocasiones), lavándose posteriormente con PBS y colocando en medio fresco.

La anchura de la herida generada (surco) se midió por microscopia de contraste de fase, de manera inmediata y las 24 horas. El cierre de la herida se calculó como porcentaje de área cerrada en función de la anchura inicial de la herida. Los datos son

una representación de la media \pm SEM de diez medidas tomadas a partir de tres experimentos independientes.

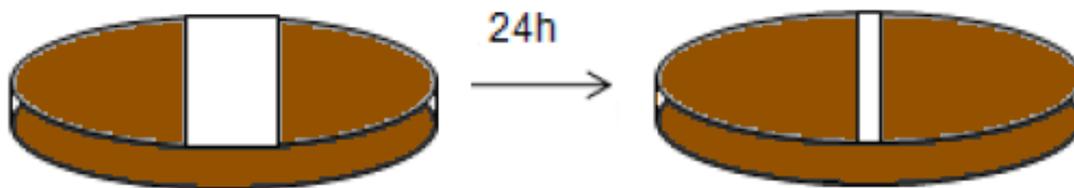


Figura 15. Ensayo valoración del cierre de surco, midiendo el área de surco de manera inicial y a las 24 horas (en blanco).

2.9. Ensayo expansión trofoblástica

Este protocolo sigue las directrices, aprobaciones, normas y obligaciones del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Valencia y del U.S. National Institutes of Health guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

Los ratones cepa B6C3F1 fueron adquiridos a *Charles River Laboratories*, España.

Se indujo la ovulación en ratones hembra con edad comprendida entre 6-8 semanas, mediante la administración de 10 UI de PMSG (gonadotropina de suero yegua preñada) *Sigma-Aldrich*, *EEUU*. Tras 48 horas se indujo la ovulación mediante la administración de 10 UI de hCG (gonadotropina coriónica humana) *Sigma-Aldrich*, *EEUU*.

Tras ello se alojaron, de forma independiente, con un macho semental durante la noche. Dos días postfecundación, las ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical, se recuperaron los embriones de las oviductos (trompas) con PBS y aguja de calibre 30 conectada a jeringa de 2 mL.

Los embriones se cultivaron durante 3 días en medio CCM-30 (*Vitrolife*, *Alemania*).

Solo se incluyeron en el estudio blastocistos expandidos con morfología normal (n= 425). Descartándose aquellos embriones degenerados o con defecto en el fenómeno de expansión. La zona pelúcida en ningún caso se eliminó artificialmente.

Los blastocitos eclosionados fueron co-cultivados, junto con cultivos procedentes de CEE deciduizadas en monocapa, dividiéndose en dos grupos, en uno de ellos se añadió ANXA2 siRNA y en el otro no (grupo control).

A las 48 horas, se evaluó la extensión de adhesión del trofoblasto sobre el cultivo (expansión trofoblástica). El co-cultivo se fijó con 3% paraformaldehído (baja concentración), bloqueándose posteriormente con BSA 5%

Tras ello se incubó con BSA 3% durante 2 horas a temperatura ambiente junto con Ac primarios antiVimentina procedente de ratón (*Sigma Aldric, EEUU*) a título de 1/50 y Ac anti- cadherina E procedente de conejo a 1/100 (*Abcam, Reino Unido*).

Tras ello para proceder a revelado, se añadió durante 60 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, Ac secundario conjugado con Rodamina (TRICT anti-ratón) para vimentina a 1/1000 (*Invitrogen, España*) y Alexa Fluor 488 (anti-conejo) a E-caherina a 1/1000 (*Invitrogen, España*).

En cada experimento fueron analizados 10-15 blastocitos de ratón. El área de excrecencia (expresada en píxeles), fueron expresados en valores medios \pm SEM de conjuntos por triplicado de las mediciones tomadas a partir de tres experimentos independientes.

2.10. Ensayo invasión embrionaria

2.10.1 Preparación esferoides JEG-3

El uso de embriones humanos está muy restringido por problemas éticos que ocasiona, además el gran número que son necesarios para llevar a cabo estudios de invasión/adhesión embrionaria.

Como aproximación de un modelo de invasión embrionaria in vitro, se emplearon esferoides generados por la línea trofoblástica JEG-3 número HTB-36 (*ATCC*:

American Type Culture Collection, EEUU), dado que muestran una morfología y comportamiento similar al embrión humano (Hannan, 2010) (Anexo III).

La línea celular del coriocarcinoma humano JEG-3 fue cultivada en suspensión celular dentro de matraz Erlenmeyer de 25 mL de medio EMEM suplementado con 10% de SBF y 0,1% de antibiótico (Gentamicina y Fungizona), a una concentración de 6×10^5 células/mL en agitación (Nancy, 1993).

2.10.2 Valoración invasión embrionaria

Para valorar la capacidad del trofoblasto en invadir a través de las CEE humanas, se usó trofoblasto derivado de la línea celular JEG-3 (*ATCC, EEUU*).

El ensayo de invasión trofoblástica se realizó colocando las esferoides JEG-3 en cada pocillo sobre la monocapa de las células del estroma endometrial decidualizadas, teniendo así diferentes condiciones:

- células control (sólo decidualizadas)
- células transfectadas con siRNA scramble
- células transfectadas con siRNA ANXA2.

Fueron cultivadas durante 24 en el incubador a 37 °C con un 5% de CO₂. Valorándose la invasión trofoblástica producida, midiendo el área de expansión con lector de microplaca estándar, expresado en OD (densidad óptica o absorbancia).

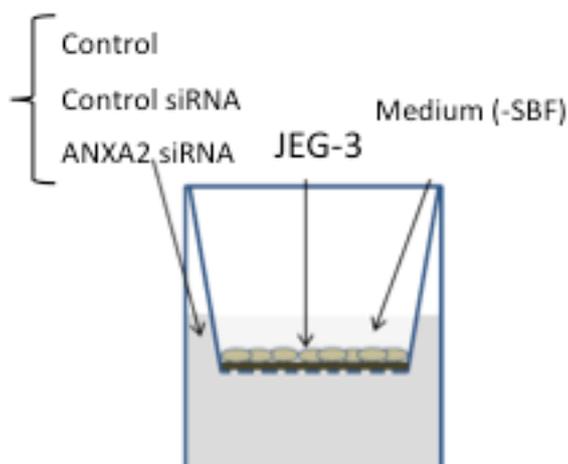


Figura 16. Esquema sobre experimento de invasión JEG-3 sobre CEE.
SBF: suero bovino fetal

2.11. Estudio Fibrinólisis

Los niveles de plasminógeno fueron evaluados gracias a Kit ELISA específicos (*Cells Biolabs, Inc. EEUU*), valorando su nivel de absorbancia media ($\Delta 450$ nm).

La actividad de la plasmina se evaluó mediante Kit de Ensayo FLuorométrico (*Anspec, EEUU*). La formación de plasmina, generaba Rodamina-110- Fluoruro, el cual, genera una fluorescencia verde brillante detectada en 496 nm (excitación) y 520 nm (emisión).

Cincuenta microlitros de medio condicionado se preincubaron 10 minutos a temperatura ambiente y 50 μ l de sustrato de plasmina en solución, fueron añadidos en cada pocillo.

La señal de fluorescencia se midió mediante lectura cinética, registrando datos cada 5 minutos durante 60 minutos, con un total de 13 lecturas.

2.12. Evaluación de niveles de MMP-2 y MMP-9

La valoración de metaloproteasas de matriz MMP-2 y MMP-9, tanto en su forma prometaloproteasas (forma inactiva) como su forma activa extracelular (tras la excisión del propéptido aminoterminal), fueron evaluadas con Kit comercial ELISA (*RayBiotech, EEUU*).

Utilizando los medios de los diferentes tratamientos de las células decidualizadas y su posterior transfección con siRNA ANXA2, se procedió a realizar ELISAS específicos para la detección y cuantificación de dichas metaloproteasas, midiendo su absorbancia a 450 nm, extrapolándose a curvas estándar.

2.13. Manejo y evaluación de RNA

2.13.1 Aislamiento de RNA

El RNA total fue extraído de los cultivos de CEE utilizando agente Trizol-LS-Reagent (*Invitrogen, España*) según método estándar. Tras ello se añadió 0,2 volúmenes de cloroformo por cada volumen de Trizol LS utilizado. Agitado durante 15 segundos, y reposado posterior durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. Con el uso del

cloroformo se consigue separar en 2 fases, una acuosa (donde se encuentra los ácidos nucleicos) y otra orgánica (pellet).

Se procedió a centrifugación a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, transfiriendo la fase acuosa a otro tubo. Se adicionó 0,5 volúmenes de Isopropanol por cada volumen de Trizol LS utilizado al inicio. Precipitado durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C obteniendo el precipitado de RNA. Este pellet obtenido se lavó con etanol al 70% en agua destilada con 0,1% de DEPC (dietil pirocarbonato).

Se centrifugó por última vez a 7.500 rpm durante 5 minutos a 4 °C, resuspendiendo en 15 µL de agua-DEPC.

2.13. 2 Retrotranscripción

Se procedió a retrotranscribir el RNA obtenido. Se usó un 1 µg de RNA total usando Kit específico Advantage RT-for-PCR (*Clontech, EEUU*).

A cada muestra se le añadió 1 µL de oligo-18-dT y agua-DEPC hasta alcanzar un volumen total de 13,5 µL, calentándose a 70 °C durante 2 minutos para desnaturalizar las cadenas de RNA, evitando la formación de estructuras secundarias de las mismas.

Tras ello a cada tubo se añadió 6,5 µL de mezcla de reacción (4 µL de tampón reacción 5X, 1 µL de dNTP mix, 0,5 µL de inhibidor recombinante RNAasa y 1 µL de la transcriptasa reversa MMLV (*Molony-Murine leucemia virus*)).

Con un volumen completado de 20 µL se procedió a llevar la reacción de retrotranscripción, incubando las muestras durante 60 minutos a 42 °C, posteriormente 5 minutos a 94 °C, para frenar la reacción y destruir la actividad DNAasa.

El producto final se diluyó con agua-DEPC hasta alcanzar un volumen de 100 µL, almacenándose a 4°C.

2.13.3 PCR tiempo real

La PCR en tiempo real es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se usa para ampliar y cuantificar, en el mismo tiempo, el producto de amplificación del ácido desoxirribonucleico (DNA). Para ello se emplea, un molde de DNA (en nuestro caso el DNA complementario tras la retrotranscripción), cebadores específicos y sistema específico de visualización.

El proceso PCR consiste en una serie de cambios de temperatura repetidos 40 veces (ciclos), donde cada ciclo presenta 3 etapas:

- desnaturalización a 95 °C: separación de ácido nucléico de doble cadena
- anidamiento a 59 °C: unión de los cebadores al DNA molde
- extensión a 72 °C: polimerización por parte de la DNA polimerasa

La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó mediante fluoróforo SYBR Green I y Taq DNA Polimerasa FastStart (*Roche Applied Science, EEUU*) en un sistema termociclador de Light Cycler 480 (*Roche Applied Science, EEUU*), el cual, es capaz de medir fluorescencia (tras excitar el fluorocromo a una longitud de onda específica), midiendo la tasa de generación de productos PCR.

Para la estandarización se usó GAPDH como gen normalizador (gen cuya expresión es casi constante, dado que participa en funciones básicas de supervivencia celular, implicando una expresión constitutiva).

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

Se utilizaron los siguientes cebadores específicos (secuencia oligonucleótidos):

- ANXA2: Iniciador reverso (*reverse primer*) TGTGCAAGCTCAGCTTGGA
 Iniciador (*forward primer*) AGGTGTCTTCAATAGGCCCAA
- GAPDH: Iniciador reverso (*reverse primer*) GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
 Iniciador (*forward primer*) GAAGATGGTGATGGGATTTC

2.14. Administración Heparina Dosis Respuesta

Las CEE fueron cultivadas en monocapa en presencia de 50 µg/mL y 100 µg/mL de Heparina (*Heparina sodium salt*, Sigma-Aldrich, EEUU) durante 15, 30 y 60 min para la elaboración de un experimento dosis-respuesta.

Tras ello se recogieron las muestras para analizar mediante ELISA los niveles de plasminógeno, actividad de la plasmina y metaloproteasas.

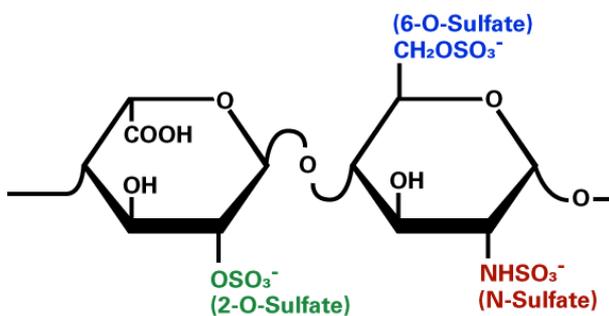
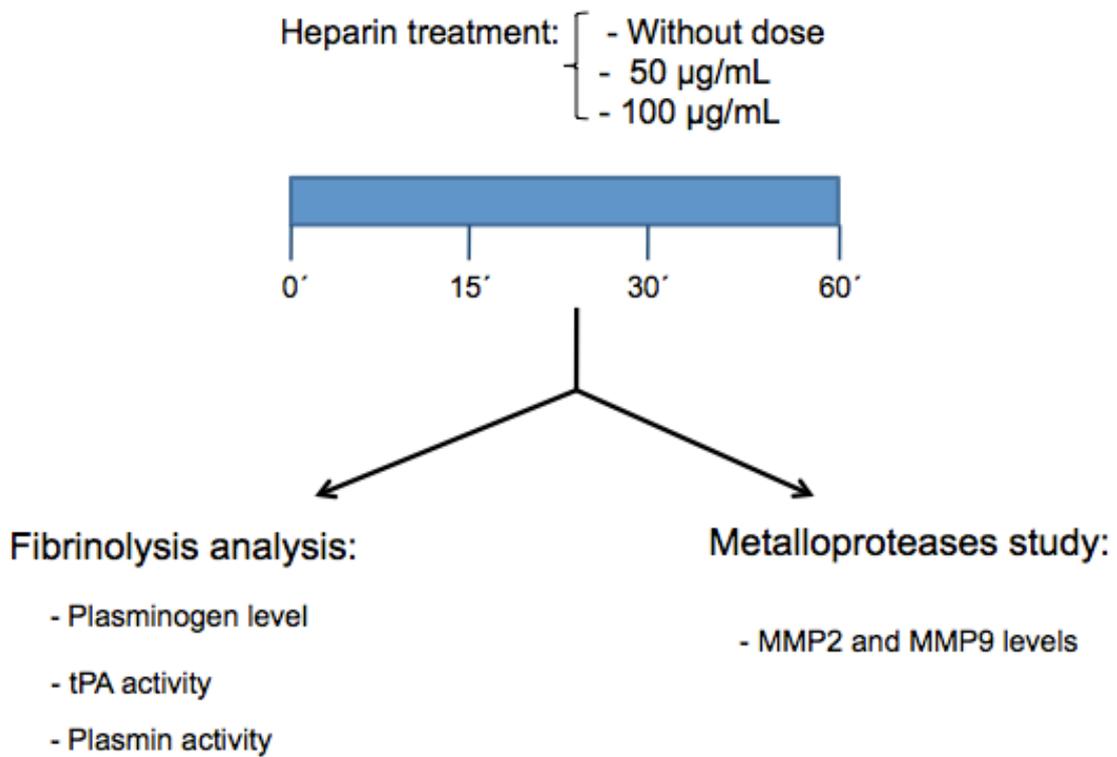


Figura 17. Estructura molecular básica de la Heparina: repetición de cadenas de polisacáridos sulfatados

3.- Análisis Estadístico

Al menos tres biopsias endometriales diferentes se utilizaron para cada experimento, tomándose cada medición por triplicado. Todos los datos se calcularon como valores medios \pm SEM (error estándar), presentados con n denotando el número de experimentos realizados.

Los datos fueron analizados con el software SPSS 15 utilizando el test de la t-student (t-test) de las diferencias globales entre los grupos analizados. Una probabilidad $\leq 0,05$ fue considerada estadísticamente significativa (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

4.- Análisis Bioinformático

Se desarrollará, si así se requiriese, un análisis bioinformático para integrar los patrones de proteoma obtenidos, junto con la información presente en bases de datos públicas. Buscando las interacciones existentes entre las proteínas diferentemente reguladas intra y extracelularmente creando un patrón de expresión.

RESULTADOS

RESULTADOS

1.- Análisis del patrón de decidualización in vitro 77

1.1 Valoración producción marcadores bioquímicos de decidualización

1.1.1 Secreción de Prolactina

1.1.2 Secreción de IGFBP-1

1.2 Valoración del fenotipo celular

2.- Expresión de ANXA2 en CEE procedente de sPE 82

2.1 Cuantificación de proteína ANXA2 en secciones endometriales

2.2 Localización de la expresión de ANXA2 en secciones endometriales

2.3 Cuantificación de ANXA2 en CEE tras decidualización

2.4 Cuantificación ANXA2 intracelular-extracelular en CEE tras decidualización

3.- Función ANXA 2 en la decidualización in vitro de las Células del Estroma Endometrial 86

3.1 Validación de la secreción ANXA2 en CEE con los dos protocolos de decidualización

3.2 Inhibición en la secreción ANXA2 en las CEE decidualizadas

3.3 Evaluación de la decidualización tras el silenciado de la proteína ANXA2

3.3.1 Expresión de biomarcadores (PRL e IGFBP-1)

3.3.2 Cambios fenotipo celular (inmunohistoquímica)

3.3.3 Valoración del fenotipo celular con estudio F / G actina

4.- Efecto de la inhibición ANXA 2 en movilidad, expansión trofoblástica e invasión embrionaria	93
4.1 Evaluación de la ANXA 2 en la migración/proliferación de las CEE in vitro: ensayo “cierre surco”	
4.2 Evaluación de la expansión/difusión embrionaria en co-cultivo heterólogo in vitro	
4.3 Capacidad de expansión de trofoblasto humano en CEE in vitro	
5.- Evaluación de la inhibición ANXA2 en la actividad fibrinolítica de las CEE humanas in vitro	97
5.1 Valoración de la fibrinólisis en CEE procedentes de sPE y en CEE silenciadas para ANXA2	
5.2 Valoración de metaloproteinasas (MMP-2, MMP-9) en CEE procedentes de sPE y en CEE silenciadas para ANXA2	
6.- Efecto de la administración de heparina en la activación del sistema de la fibrinólisis en las CEE humanas	100
6.1 Cuantificación de la fibrinólisis tras cultivo con heparina dosis variantes	
6.1.1. Cuantificación de nivel de plasminógeno	
6.1.2. Cuantificación actividad de la plasmina	
6.2 Evaluación de proteína ANXA2 secretada tras administración de heparina dosis fija	
6.3 Cuantificación de la producción de metaloproteasas tras heparina	

1.- Análisis del patrón de Decidualización In Vitro

- Evaluación del proceso de decidualización in vitro de células estromales endometriales (CEE) procedentes de muestras de aspirados endometriales en fase secretora de mujeres que han sufrido PE severa (sPE) en alguno de sus embarazos anteriores (n = 13) en comparación con el grupo control (non-PE) de pacientes con antecedentes de embarazos sanos (n = 13).
- La decidualización in vitro se llevo a cabo con estímulo decidual [cAMP + MPA] o con inductores hormonales [Progesterona + Estadiol]. Tras validación en laboratorio, ambos métodos presentan resultados similares, se decidió usar el protocolo de estímulo decidual por ser de menor duración (5 vs 9 días).
- Análisis del proceso de decidualización mediante mediadores bioquímicos en líquido de cultivo propios de decidualización (prolactina y IGFBP-1) y en cultivo celular mediante fenotipo celular (tinción F- actina).

1.1. Valoración en la producción marcadores bioquímicos de decidualización

1.1.1 Secreción de Prolactina

Mediante detección con ELISA se comprobó que existe una menor secreción de Prolactina (PRL) en la decidualización in vitro en mujeres con sPE respecto al grupo control (non-PE) con unos niveles significativos respecto al control ($p \leq 0,001$).

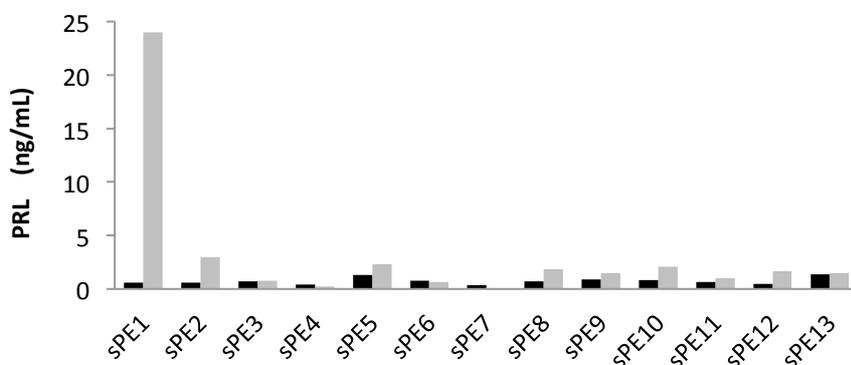


Tabla 11. Secreción de PRL en ng/mL en mujeres con antecedente de preeclampsia severa (sPE) control no decidualizadas (columna negra) y decidualizadas (columna gris) [n=13]

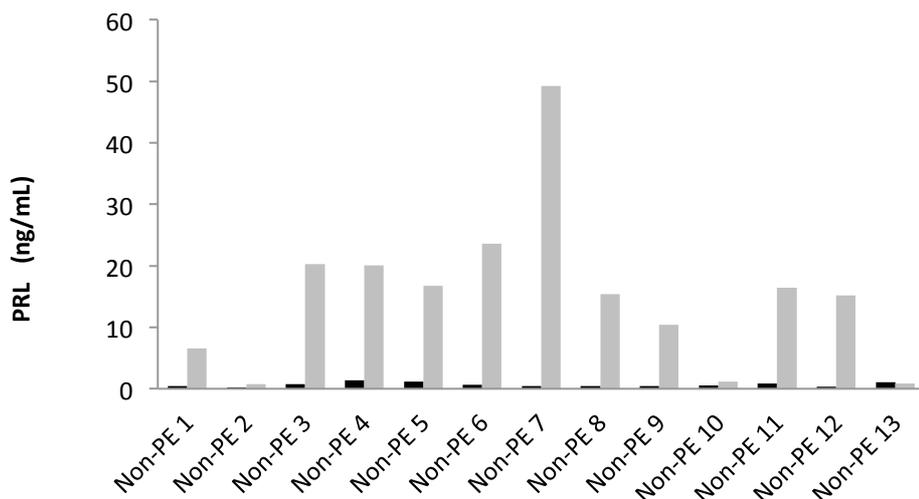


Tabla 12. Secreción de PRL (ng/mL) en mujeres con antecedente de embarazos sanos (non-PE) control no decidualizadas ((columna negra) y decidualizadas ((columna gris) [n=13].

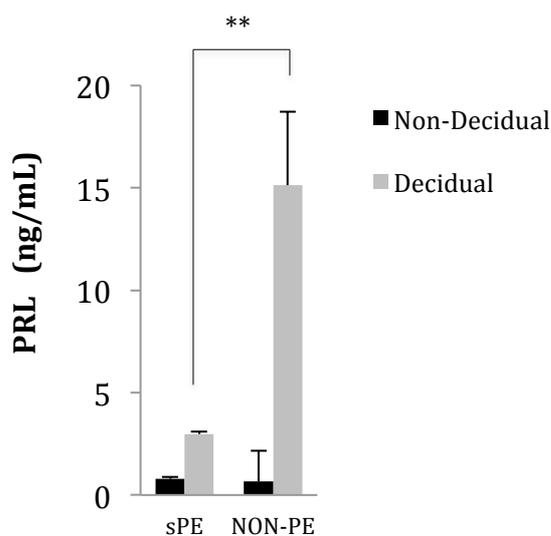


Tabla 13. Relación en la liberación de PRL en grupo sPE en comparación con non-PE en muestras decidualizadas (barra gris) respecto a su control no decidualizado (barra negra), con una media de secreción de 2,98 ng/mL en la sPE decidualizadas, respecto a 15,13 ng/mL en las non-PE decidualizadas (** $p \leq 0,01$).

1.1.2 Secreción de IGFBP-1

Mediante detección con ELISA se comprobó que existe una menor secreción de IGFBP-1 en la decidualización in vitro en mujeres con sPE respecto al grupo control (non-PE) con unos niveles estadísticamente significativo respecto al control ($p \leq 0,001$).

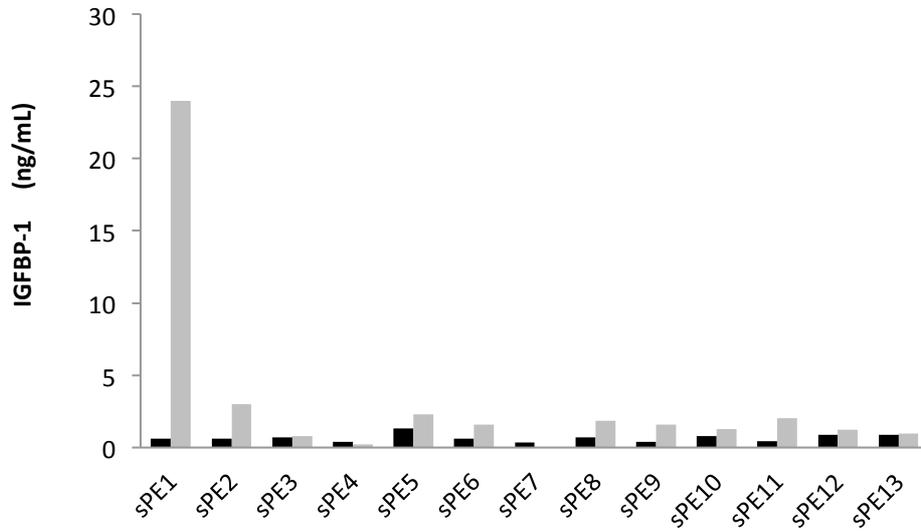


Tabla 14. Secreción de IGFBP-1 (ng/mL) en mujeres con antecedente de preeclampsia severa (sPE) control no decidualizadas (barra negra) y decidualizadas (barra gris) [n=13].

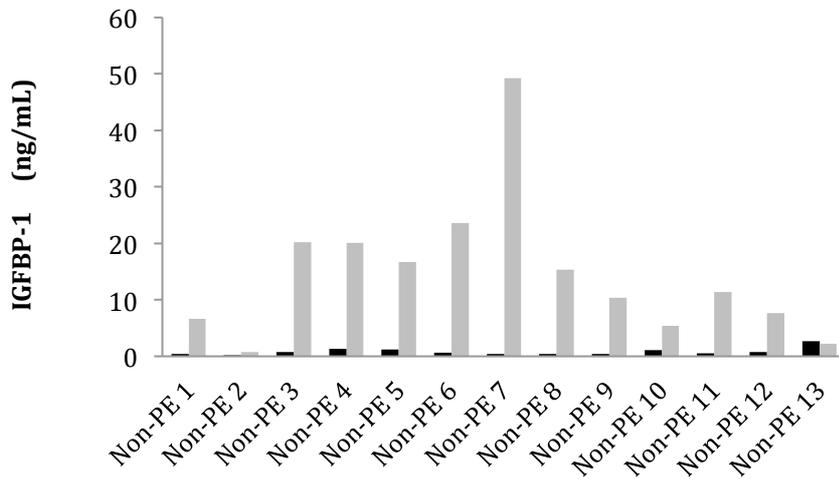


Tabla 15. Secreción de IGFBP -1 en mujeres con antecedente de embarazos sanos (non-PE) control no decidualizadas (barra negra) y decidualizadas (barra gris) [n=13]

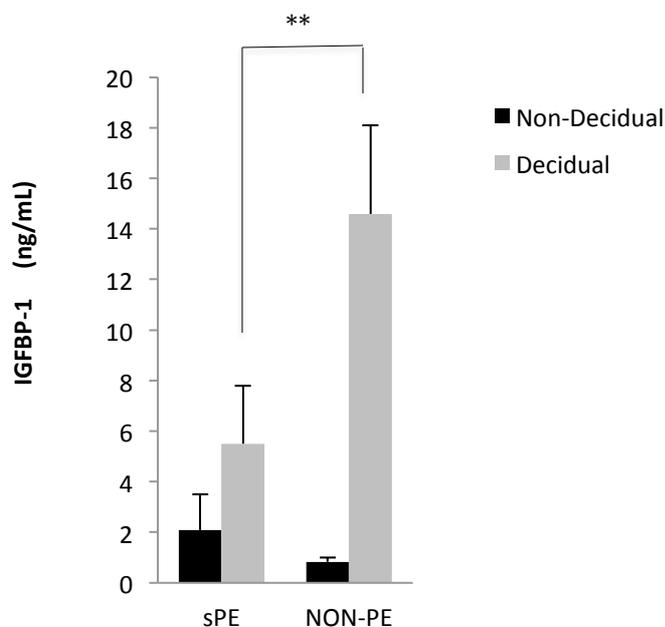


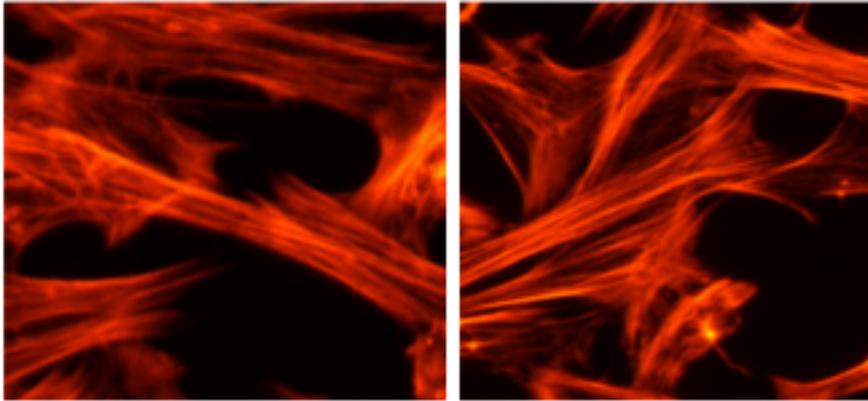
Tabla 16. Relación en la liberación de IGFBP-1 en grupo sPE en comparación con non-PE en muestras decidualizadas (barra gris) respecto a su control no decidualizado (barra negra), con una media de secreción de 5,50 ng/mL en la sPE decidualizadas, respecto a 14,59 ng/mL en las non-PE decidualizadas (** $p \leq 0,01$).

1.2. Valoración fenotipo celular

Una vez conocido que la liberación de marcadores característicos de decidualización era significativamente menor en el grupo sPE respecto al grupo non-PE, se procedió a valorar en cambio fenotípico de estas células, con la hipótesis de una resistencia a la decidualización en mujeres con antecedente de PE.

Se evaluó la reorganización de F- actina en CEE durante el proceso de decidualization in vitro, valorando la transición del morfología fibroblástica al fenotipo de célula decidualizada ya descrita (Salamonsen, 2003).

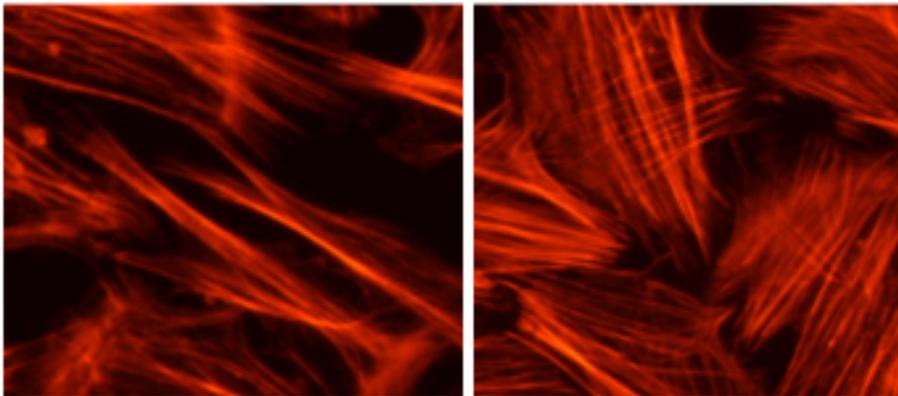
Muestra PE severa (sPE)



Sin decidualizar

Tras decidualización

Muestra Control (non-PE)



Sin decidualizar

Tras decidualización

Figura 18. Inmunohistoquímica tras tinción F- Actina, valorando la morfología de las CEE antes y después de la decidualización *in vitro* en muestras procedentes de sPE y en controles sanos (non-PE), con su correspondiente control sin decidualización para valoración en los cambios fenotípicos [n=6].

Se observó en grupo control (non-PE) las células modificaron su morfología fusiforme inicial para hacerse gradualmente más redondeadas, adoptando un aspecto epitelioide de mayor tamaño citoplasmático, típica de célula decidualizada, hechos que estuvieron ausentes en muestras preeclampsia (sPE).

2.- Expresión de ANXA 2 en Células del Estroma Endometrial procedentes de Preeclampsia Severa

- Cuantificación de proteína ANXA2 en muestras endometriales procedentes sPE en embarazo anterior (n = 6) vs controles non-PE (n = 6).
- Localización de expresión de ANXA en secciones endometriales procedentes de sPE (n = 6) vs non-PE (n = 6).
- Cuantificación de ANXA2 en células del estroma endometrial procedentes sPE en embarazo anterior (n = 3) vs controles non-PE (n = 3).
- Cuantificación de las formas ANXA2 intracelulares y extracelular en células del estroma endometrial procedentes sPE en embarazo anterior (n = 3) vs controles non-PE (n = 3).

2.1. Cuantificación de proteína ANXA2 en secciones endometriales

El análisis densitométrico mostró una reducción significativa en la abundancia de proteína ANXA2 en el endometrio de sPE (n = 6) en comparación con pacientes non-PE (n = 6) en fresco. Los niveles de expresión fueron normalizados con los valores de expresión de β - actina para cada muestra, obteniendo una media de expresión en unidades relativas de ANXA2 para PE de 3,15 y para non-PE de 4,90.

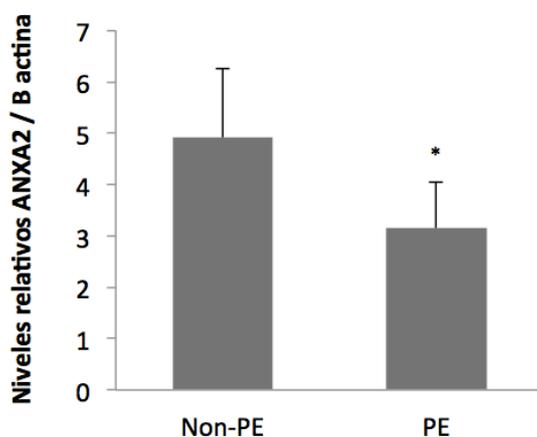


Tabla 17. Preeclampsia severa (sPE) y sanos (non-PE). Análisis densitométrico de ANXA 2 en los dos grupos en fresco, expresándose la abundancia en unidades relativas y normalizadas con β -actina, obteniendo (* $p \leq 0,05$) [n=6].

2.2. Localización de expresión de ANXA2 en secciones endometriales

Se examinó la localización de la ANXA2 en secciones de endometrio (aproximadamente 3 mm) tras su preparación e inmunohistoquímica. Observándose una tinción **menor** en el compartimiento estromal en sPE frente a las non- PE.

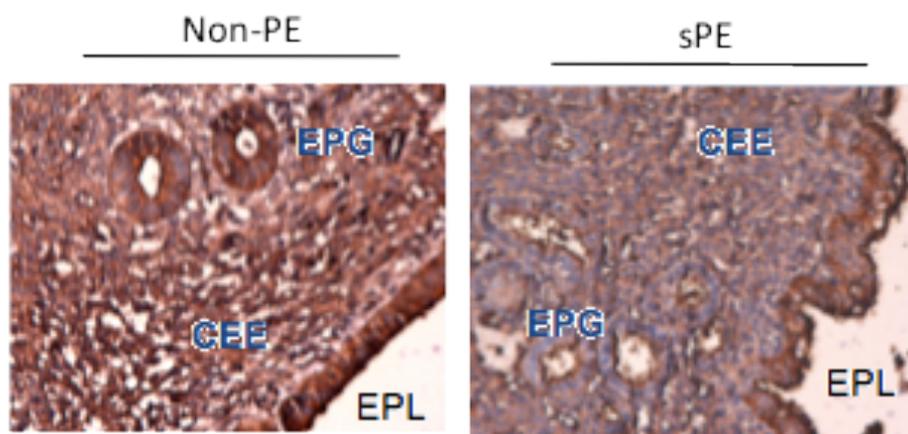


Figura 19. Patrón de distribución de ANXA2 en endometrio humano tras inmunohistoquímica: se puede observar una tinción de menor densidad en sPE (derecha) respecto a non-PE (izquierda). En ambos intenso marcaje en capa apical epitelial. Se analizaron 6 muestras de cada grupo. EPL: epitelio luminal, EPG: epitelio glandular, CEE: células estroma endometrial.

2.3. Cuantificación de ANXA2 en CEE tras decidualización

Tras ello se cuantificó mediante Western Blot, la abundancia de proteína ANXA2 en las CEE obtenidas tras cultivo celular. El análisis densitométrico demostró que en mujeres con antecedente de sPE, la proteína ANXA2 se encontraba reducida significativamente en condiciones basales (sin decidualizar) y con expresión a la baja tras la decidualización en comparación con pacientes non-PE, con un escaso aumento de ANXA2 tras la inducción de la decidualización.

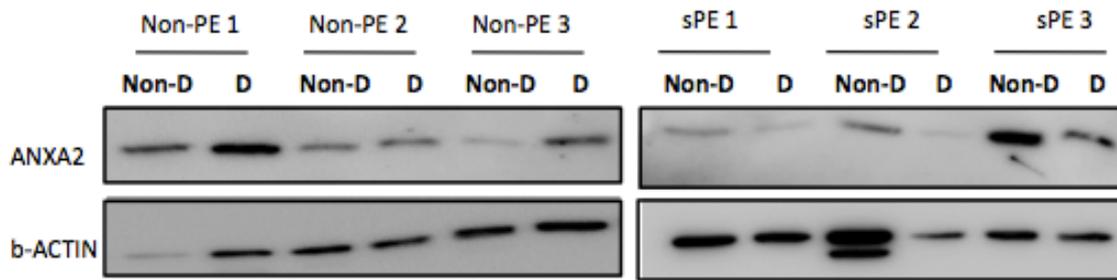


Figura 20. Niveles de proteína ANXA 2 medidos por Western Blot de CEE procedentes de sPE (n=3) y de Non-PE (n=3). Separados mediante electroforesis SDS-PAGE e inmunodetectados para la unión de Anticuerpo anti-ANXA2 (Non-D: sin decidualizar, D: decidualizada).

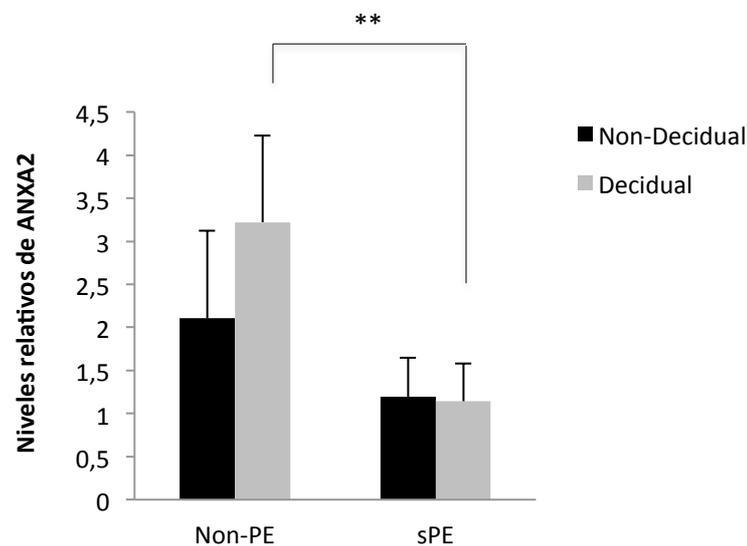


Tabla 18. Análisis densitométrico de ANXA2 procedentes de 3 experimentos de Western Blot diferentes, sin decidualizar (barra en negro) y decidualizadas (barra en gris). Resultados en unidades relativas normalizadas con β -Actina expresados como media \pm SEM (** $p \leq 0,01$).

2.4. Cuantificación de ANXA2 intracelulares y extracelular en CEE tras decidualización

Se analizó mediante ELISA la expresión de ANXA 2 intracelular (cultivo celular) y proteína ANXA 2 extracelular secretada (medio de cultivo) sin decidualizar y tras decidualización in vitro. Procedente de 3 muestras sPE y 3 muestras control.

Se obtuvo una media de expresión de ANXA2, en las diferentes situaciones, teniendo un grupo control y un grupo sPE, expresadas en ng/mL:

	Non - PE	sPE
Intracelular	65,76 ng/mL	13,53 ng/mL
Extracelular	7,88 ng/mL	2,49 ng/mL

Tabla 19. Valores medios intra-extracelular de ANXA2 tras decidualizar en muestras sanas (n=3) y muestras procedentes de sPE (n=3). Se observa que la presencia de ANXA2 es mayoritaria a nivel intracelular.

En la que se puede observar una menor cantidad significativa de proteína ANXA2 tanto intra como extracelular en los cultivos procedentes de muestras de Preeclampsia severa.

Este análisis corrobora que las CEE de las mujeres con sPE, tras el estímulo de decidualización experimentan una reducción significativa, tanto del ANXA2 intracelular como extracelular en comparación con los controles, lo cual implica una disregulación de esta proteína durante la decidualización.

Al analizar los datos se observa que la proteína ANXA 2 secretada (extracelular) es reflejo del ANXA2 intracelular, pudiendo sugerir un posible biomarcador que puede ser usado para predecir la resistencia a decidualización en pacientes con PE.

3.- Función ANXA 2 en la decidualización in vitro de las Células del Estroma Endometrial

- Validación de la secreción de la proteína ANXA2 durante la decidualización in vitro de las CEE con los dos protocolos de decidualización en muestras control
- Evaluación del silenciado génico mediante siRNA-ANXA2 durante la decidualización in vitro de las CEE.
- Evaluación tras el silenciado génico mediante siRNA-ANXA2 en la expresión de biomarcadores y cambio fenotípico en las CEE tras decidualización in vitro.
- Evaluación tras el silenciado génico mediante siRNA-ANXA2 del fenotipo celular con estudio F / G actina.

3.1. Validación de la secreción ANXA2 en CEE con los dos protocolos de decidualización

Se conoce la regulación de la proteína ANXA2 en el ciclo menstrual humano, con su participación en el *periodo ventana* y en las primeras fases de invasión del embrión humano (Garrido-Gómez, 2012). Se intenta ahora valorar el papel de la dicha proteína durante el proceso de decidualización in vitro de las células del estroma endometrial procedentes de muestras sanas (n=3).

Se validó la presencia ANXA2 intracelular mediante Western Blot usando ambos protocolos de decidualización: **protocolo A** (P + E2 9 días) y **protocolo B** (cAMP + MPA 5 días). El análisis densitométrico confirmó regulación al alza de ANXA intracelular en las CEE decidualizadas respecto al control, con ambos protocolos de decidualización in vitro. Se midió de igual forma ANXA2 en líquido de cultivo (proteína secretada = extracelular) con resultados similares.

Con todo ello se observa una regulación al alza en la expresión del ANXA2 en la decidualización in vitro de las CEE, tanto a nivel intra como extracelular.

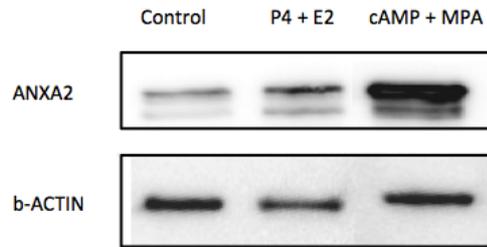


Figura 21. Western Blot de ambos protocolos de decidualización *in vitro*, valorando proteína ANXA2 normalizada con β -actinina (b-Actin).

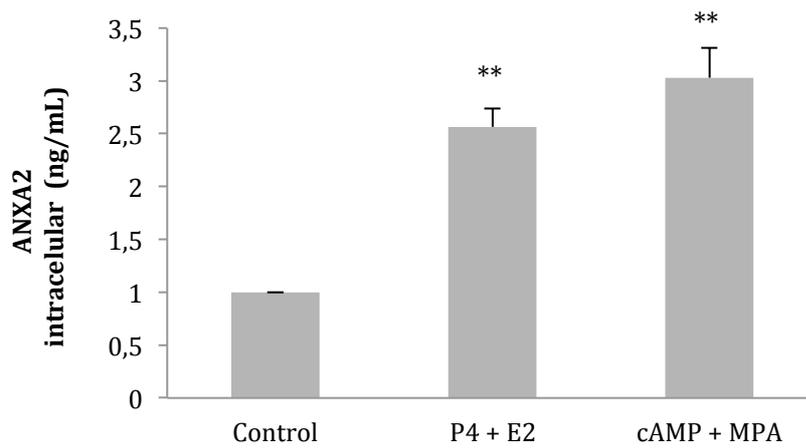


Tabla 20. Valores de ANXA2 (intracelular) de CEE decidualizadas *in vitro*, comparando ambos protocolos respecto al control no decidualizado, protocolo A un valor de ANXA2 de 2,56 ng/mL y en protocolo B de 3,03 ng/mL. Significativas ambas respecto al grupo control (** $p \leq 0,01$).

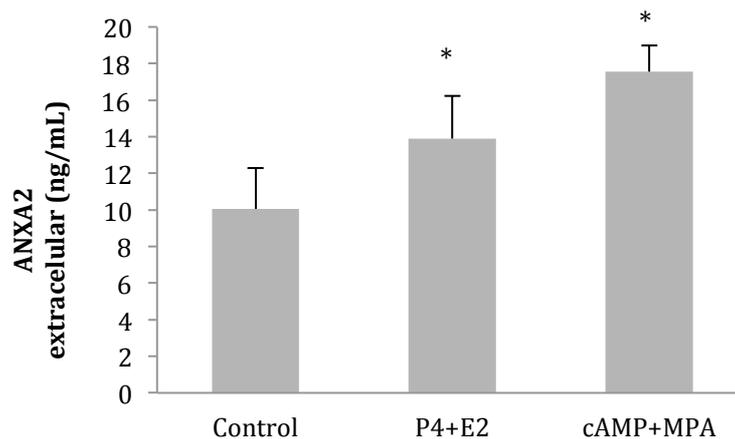


Tabla 21. Valores de ANXA2 secretados (extracelular) de CEE decidualizadas *in vitro*, comparando ambos protocolos respecto al control no decidualizado. Con una expresión media de 13,90 ng/mL en protocolo A, respecto a 17,45 ng/mL en protocolo B (* $p \leq 0,05$). Se usaron tres biopsias endometriales diferentes se utilizaron para cada experimento, tomándose mediciones por triplicado.

3.2. Inhibición en la secreción ANXA2 en las CEE decidualizadas

Tras ello se procedió a silenciar la expresión de ANXA 2 con transfección de siRNA-ANXA2 sobre las CEE sometidas a decidualización in vitro. Con lo que tenemos:

- grupo control (CEE)
- grupo con scramble siRNA (misma composición de nucleótidos, pero no secuencia específica) usado como control de transfección
- grupo ANXA siRNA (secuencia específica)

A su vez cada uno de estos 3 grupos, se subdividió en 2 subgrupos: en uno de ellos se realizó el proceso de decidualización y en el otro no.

A las 24 horas de la transfección se valoró la expresión de ANXA2 RNAm y la presencia de proteína ANXA2, tal y como se explicó en Material y Métodos.

Se vió que la presencia de ANXA2 RNAm se mantenía constante antes/después de la decidualización en los 3 grupos, pero en comparación existió una reducción significativa de la presencia de ANXA2 ARNm y de proteína ANXA 2 en el grupo silenciada la proteína (ANXA siRNA).

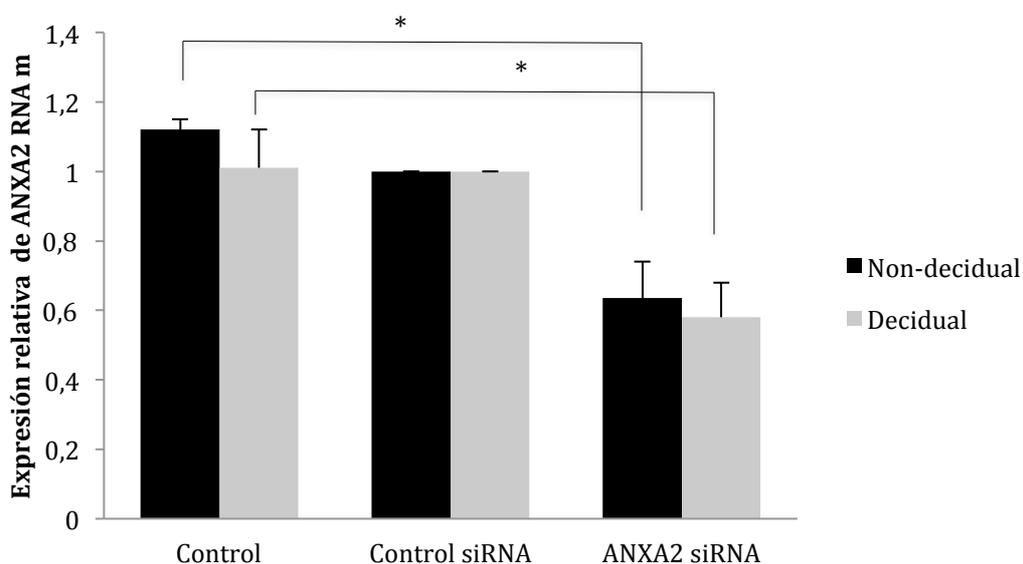


Tabla 22. Reducción significativa en la expresión de ARNm específico para ANXA2, medido por RT-PCR, en el silenciamiento génico específico tanto en la decidualización (en gris) como en el grupo no decidualizado (en negro). Con un valor relativo de ANXA2 RNAm en el control decidualizado de 1 y del ANXA2 silenciado decidualizado de 0,58 (** $p \leq 0,01$).

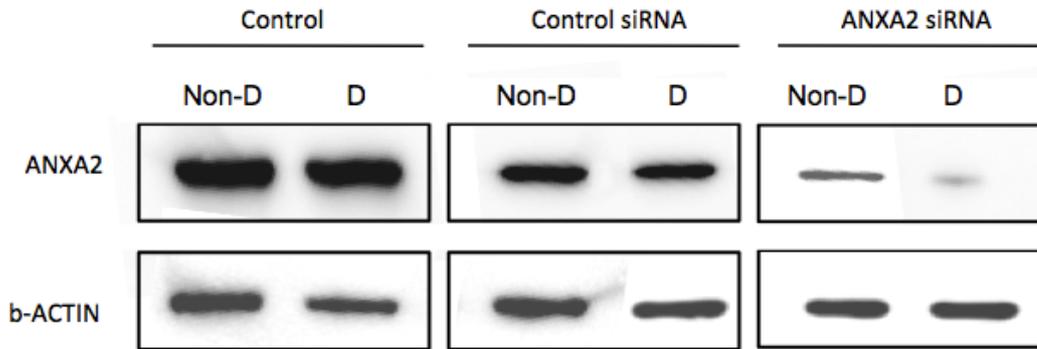


Figura 22. Estudio densitométrico en el que se observa una disminución de liberación de proteína ANXA2 tras el silenciado génico, normalizado con β -actina (control endógeno).

3.3. Evaluación de la decidualización tras el silenciado de la proteína ANXA2

Para valorar el impacto de la inhibición de la expresión en ANXA2, se cuantificó la secreción de biomarcadores de decidualización (PRL e IGFBP-1), así como los cambios fenotípicos celulares típicos del proceso.

3.3.1 Expresión de biomarcadores (PRL e IGFBP-1)

Se obtuvo en comparación con los controles, la presencia de PRL e IGFBP-1 estaba ausente en el grupo de CEE decidualizadas inhibida el ANXA 2.

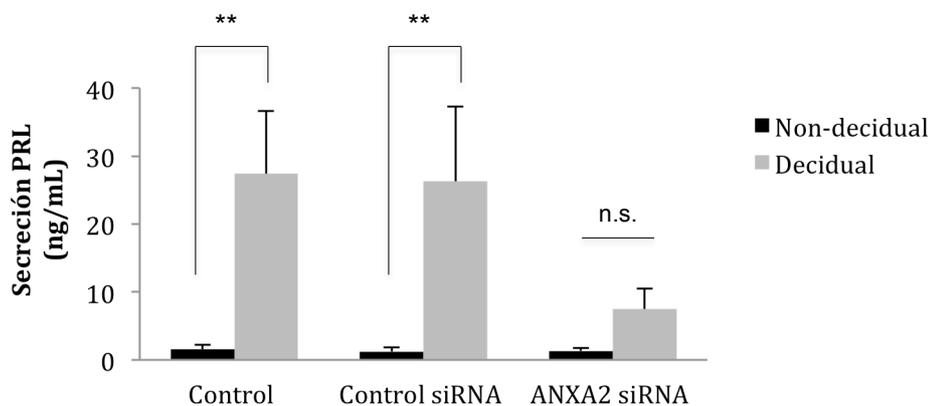


Tabla 23. Valores de PRL antes/después de la decidualización en los 3 grupos (** $p \leq 0,01$, n.s = no significativa).

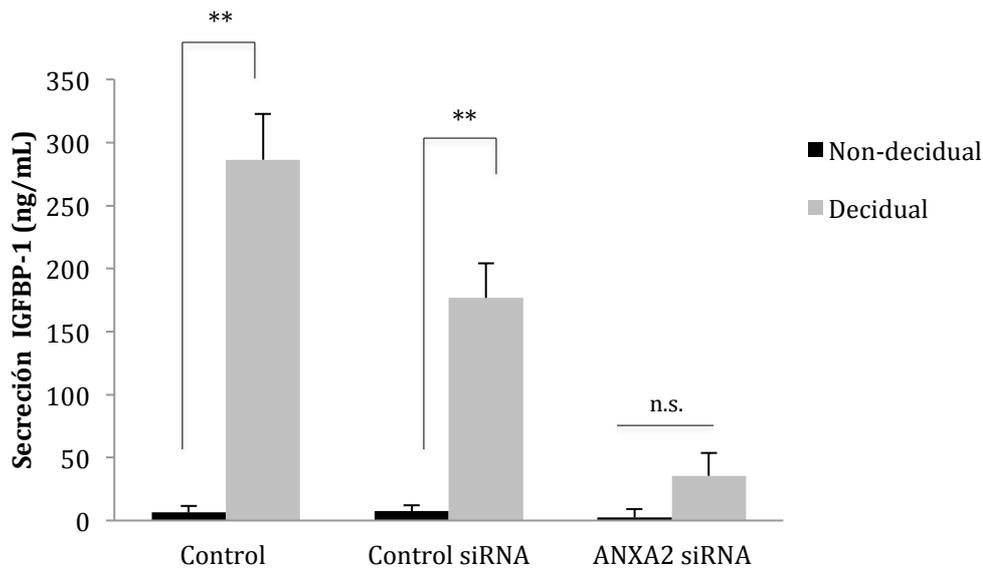


Tabla 24. Valores de IGFBP-1 antes/después de la decidualización en los 3 grupos (** $p \leq 0,01$, n.s = no significativa).

	Control	Control siRNA	ANXA 2 siRNA
Prolactina	27,40	26,27	7,46
IGFBP-1	286,35	176,75	35,45

Tabla 25. Expresión media de Prolactina (ng/mL) e IGFBP-1 (ng/mL) en las 3 situaciones tras el estímulo de decidualización, se observa una disminución en la liberación de ANXA2 cuando esta se encuentra silenciada.

3.3.2 Cambios fenotipo celular (inmunohistoquímica)

Respecto a los cambios fenotípicos a las 72h del estímulo decidual, valorando la arquitectura celular con tinción F-actina, al inhibir la expresión de ANXA2, se mantiene un fenotipo fibroblástico.

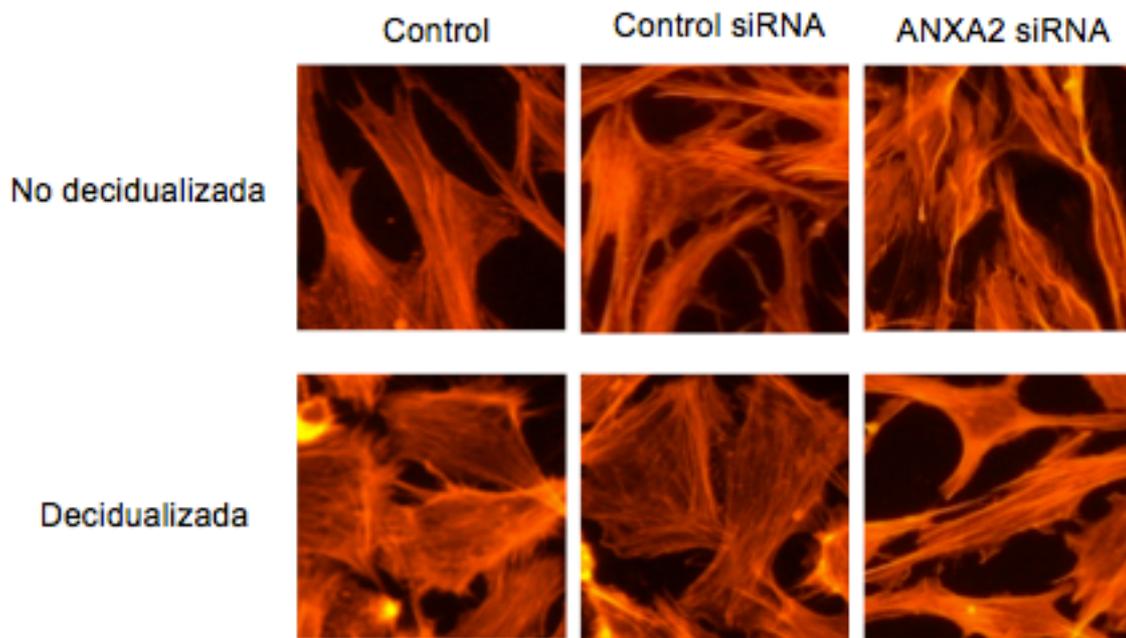


Figura 23. Mantenimiento de orientación longitudinal de los filamentos de actina F cuando se produce la inhibición de la proteína ANXA2. En las células control decidualizada red de filamentos de actina distribuidas a lo largo de la perifería celular [n=6].

3.3.3 Valoración del fenotipo celular con estudio F / G actina.

Se valoró los cambios fenotípicos del mismo modo que antes, pero con la relación entre la G-actina (monomérica, libre en citosol) y la F-actina (forma lineal, incorporada en citoesqueleto), resultado de la reorganización durante la adquisición del fenotipo decidualizado. Se conoce la participación de la proteína ANXA2 en la regulación del citoesqueleto de actina en células epiteliales (Hayes, 2006).

La relación promedio entre G / F-actina fue de aproximadamente 1:1 en el grupo control y en el control ARNsi, tanto decidualizadas como sin decidualizar. En cambio en el grupo ANXA siRNA, se observó un aumento significativo en el contenido de G-actina en comparación con la F-actina, con una proporción de 3:1 en el subgrupo no decidualizado y de 4:1 en el decidualizado.

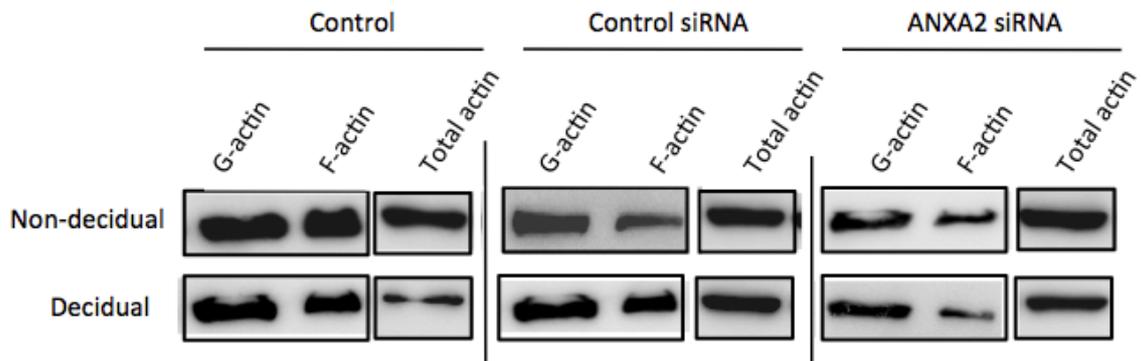


Figura 24. Relación entre la actina G libre en citoplasma, y la actina F incorporada a las fibras que constituyen el citoesqueleto, para la realización de los cambios fenotípicos que acompañan a la CEE durante la decidualización.

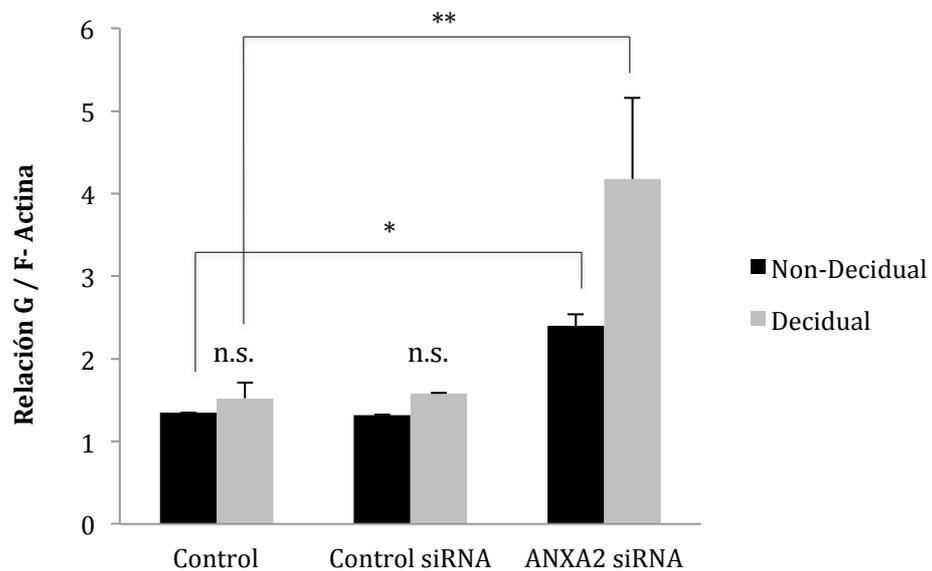


Tabla 26. Ratio entre la G / F actina, normalizados con la proporción de actina total, durante la decidualización y su relación con el silenciado génico ANXA2. Los resultados indican un aumento mayor de G-actina respecto a F- actina en las células silenciadas (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, n.s = no significativa).

Estos datos demuestran que la inhibición de la ANXA2 induce a un fallo en la reorganización del citoesqueleto, conduciendo a una resistencia a la decidualización través de la imposibilidad de adicción de actina al citoesqueleto (F-actina), con un aumento significativo en la fracción libre/monomérica (G-actina).

4.- Efecto de la inhibición ANXA 2 en movilidad, expansión trofoblástica e invasión embrionaria

- Evaluación del papel de la proteína ANXA 2 en la migración y proliferación de las CEE in vitro (ensayo “*cierre surco*”).
- Evaluación de la expansión/difusión embrionaria en co-cultivo heterólogo in vitro
- Capacidad de expansión de trofoblasto humano en CEE in vitro

4.1. Evaluación de la ANXA 2 en la migración/proliferación de las CEE in vitro: ensayo “*cierre surco*”

Se conoce que las CEE durante el proceso de decidualización e implantación embrionaria, actúan de forma activa con migración y proliferación, de carácter paracrino, con el objetivo de asegurar una adecuada implantación embrionaria (Garrido-Gómez, 2011).

Se valoró en cultivo de CEE decidualizadas en monocapa, su capacidad de migración y/o proliferación, para ello se realizó una agresión mecánica en el cultivo (lesión con punta de pipeta), y se valoró como respondía el cultivo al intentar sellar la lesión. Por ello, se valoró el área del surco a las 0 h y 24 h con microscopía de contraste de fase.

Se realizaron 3 grupos decidualizados:

- grupo control (CEE)
- grupo siRNA
- grupo ANXA siRNA (transfección durante 6h)

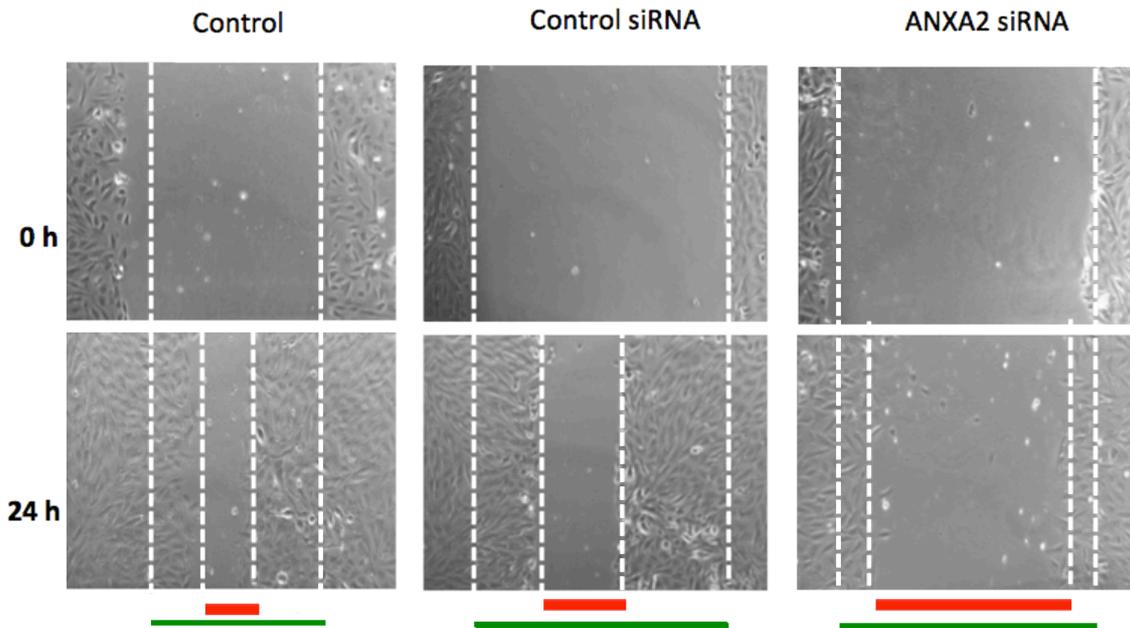


Figura 25. Área de la lesión inicial (en verde) y área lesional tras 24 h (en rojo), se observa un cierre del surco mayor en control y control siRNA en comparación al grupo ANXA2 silenciado.

El porcentaje de cierre del surco fue significativamente menor en el grupo con inhibición expresión ANXA2 (ANXA2 siRNA) en comparación con los controles y con el control siRNA (** $p \leq 0,01$).

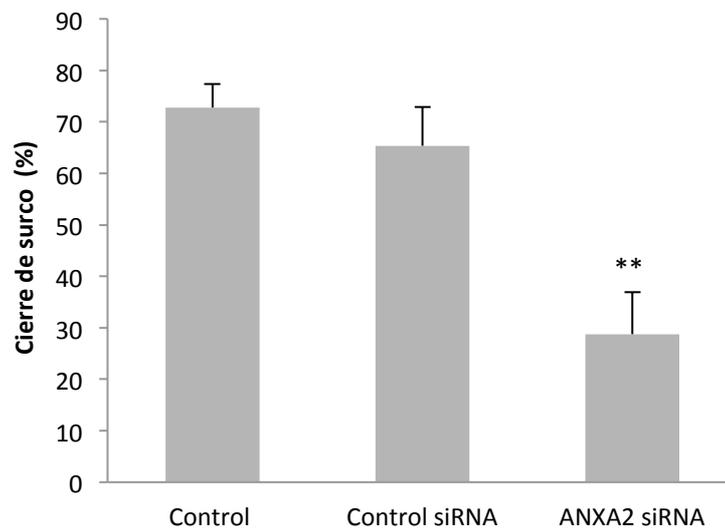


Tabla 27. Porcentaje de cierre de la lesión en comparación con la inicial (0 h) y la final (24 h), con un 28,77 % de sellado de la lesión en el grupo ANXA2 silenciado, respecto a un 72,8 % en el grupo control y un 65,37 en control de transfección (** $p \leq 0,05$).

4.2. Evaluación de la expansión/difusión embrionaria en co-cultivo heterólogo in vitro

Se procede a valorar la participación del ANXA2 en la expansión/difusión embrionaria in vitro. Para ello se uso un co-cultivo heterólogo (CEE en monocapa decidualizadas + blastocisto eclosionados de ratones). Tras ello se procede a inhibición de ANXA2. Usandose tinción para E-cadherina (identificación trofoblasto) y vimentina (identificación de las CEE humanas).

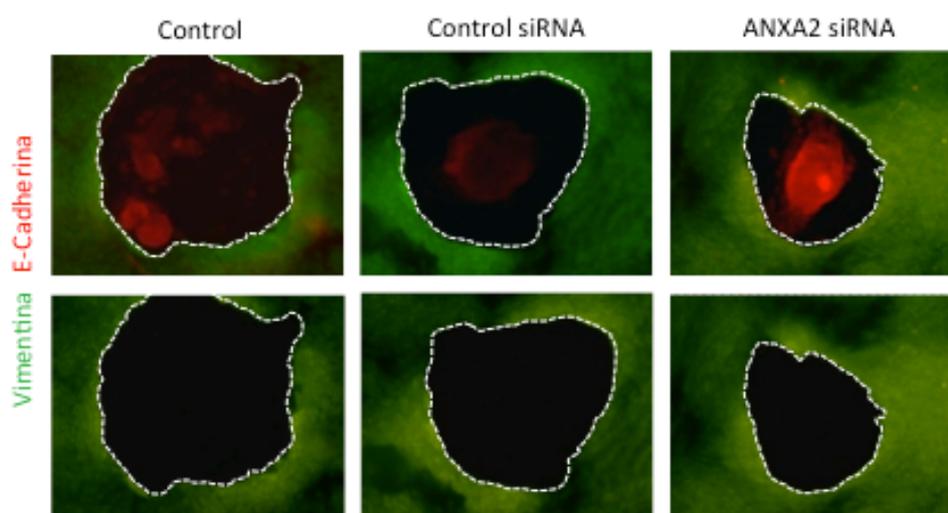


Figura 26. Tras 48 h de co-cultivo, se observó la expansión del blastocito de ratón (en rojo) sobre las CEE (en verde), rodeado con una línea punteada blanca, midiendo esta área de expansión (en píxeles).

Se evaluó el área de expansión trofoblástica (expresada en número de píxeles) en los 3 grupos. Se observó una disminución significativa de la expansión trofoblástica en el grupo silenciado para ANXA 2 tanto para el grupo control como en el grupo siRNA.

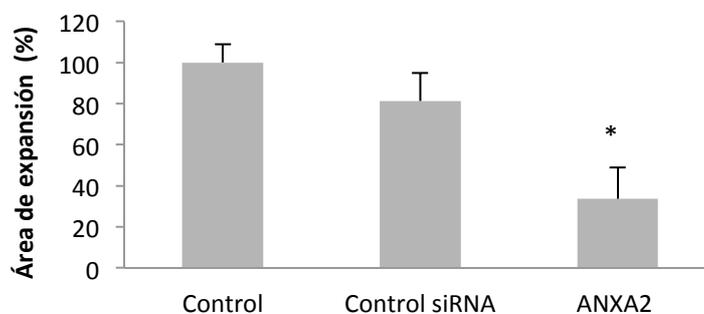


Tabla 28. Relación área de expansión, siendo del 100% en grupo control, del 82% en control siRNA y del 34% en grupo ANXA2 silenciado (ANXA2 siRNA) (* $p \leq 0,05$).

4.3. Capacidad de expansión de trofoblasto humano en CEE in vitro

Se procedió a evaluar la capacidad de invasión del trofoblasto humano, procedente de línea celular JEG-3, en un ensayo en cámara de invasión de colágeno, en un cultivo en monocapa de CEE insertas en capa de colágeno. Valorando la capacidad de los esferoides JEG-3, tras su suspensión en la parte superior, en alcanzar dicha capa de colágeno.

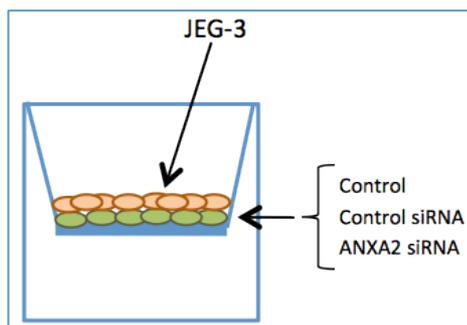


Figura 27. Ensayo de invasión: en la parte superior los esferoides JEG-3 (en color marrón), en parte intermedia la monocapa deciduizada de CEE (en verde), y por último la barrera de colágeno (en azul).

Se observó un porcentaje de invasión (alcanzar barrera de colágeno) significativamente menor en el grupo ANXA siRNA en relación grupo control.

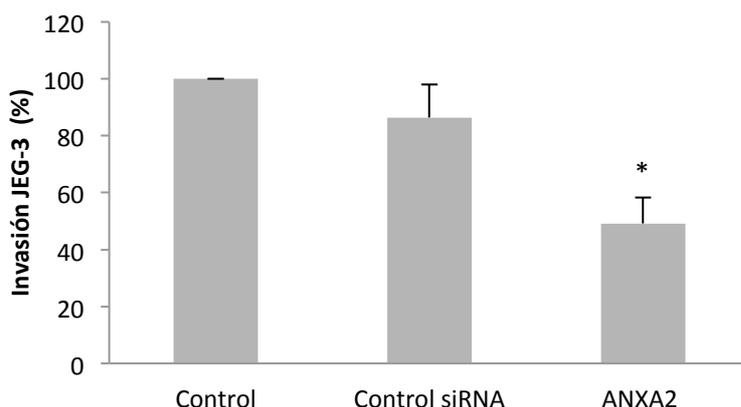


Tabla 29. Porcentaje de invasión de los esferoides JEG3, en el grupo control (100%), control siRNA (86%) y del ANXA2 silenciado (49%) (* $p \leq 0,05$).

5.- Evaluación de la inhibición ANXA 2 en la actividad fibrinolítica de las CEE humanas in vitro

- Valoración del sistema fibrinolítico en las CEE silenciadas para ANXA2 y en CEE procedentes de sPE.
- Valoración de los niveles de metaloproteinasas (MMP-2, MMP-9) en muestras inhibidas para ANXA2 y muestras de sPE.

5.1. Valoración de la fibrinólisis en CEE procedentes de sPE y en CEE silenciadas para ANXA2

Se conoce la participación del sistema fibrinolítico en la patogenia de la PE, mediado por una disfunción endotelial con depósitos de fibrina (Cesarman-Maus, 2006).

Se evalúa el efecto del silenciado en la expresión del ANXA2 en las células del estroma endometrial decidualizadas in vitro procedentes de pacientes sanas y pacientes con antecedentes de PE. Para ello, se analizó los niveles de plasminógeno y actividad de la plasmina.

Existió una reducción significativa de los niveles de plasminógeno y en la actividad de la plasmina en el grupo silenciado (ANXA2 siRNA) y en las muestras procedentes de sPE, comparado con control siRNA y control de CEE decidualizadas ($229,1 \pm 23,1$ y $191,5 \pm 36,7$ pg/ml frente a $305,1 \pm 23,2$ y $397,1 \pm 45,1$ pg/ml , respectivamente).

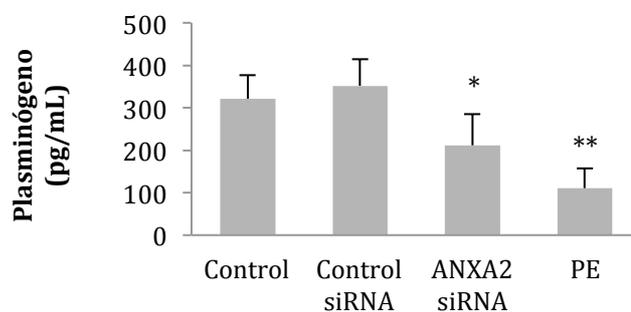


Tabla 30. Niveles de plasminógeno (pg/mL) en los 4 modelos, observando cifras menores en muestras PE, reflejo de una fibrinólisis disrregulada.

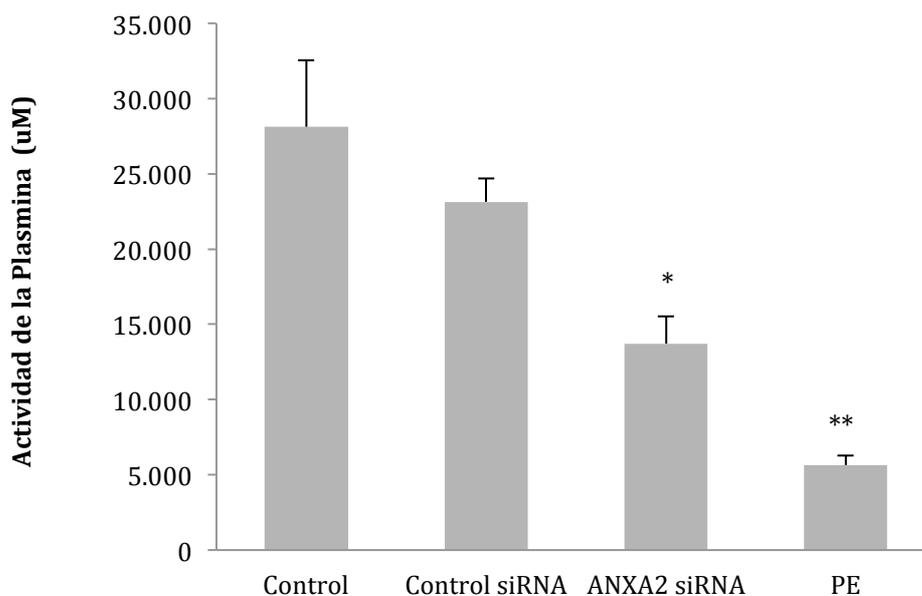


Tabla 31. Actividad de la plasmina (uM), siendo como en el ejemplo anterior, menor en el grupo PE, reflejo de la disregulación de la fibrinólisis en la patogenia de la enfermedad.

Por lo tanto, el sistema de fibrinólisis es deficitario *per se* en mayor medida en muestras procedentes de sPE, y su vez se consigue su disminución si se bloquea la expresión de la proteína ANXA2 en las CEE.

5.2. Valoración de metaloproteinasas (MMP-2, MMP-9) en CEE procedentes de sPE y en CEE silenciadas para ANXA2

Se conoce que el sistema plasminógeno/plasmina regula la invasión del trofoblasto humano mediante la producción de metaloproteinasas MMP2 y MMP9, con el objetivo de degradar los componentes de la matriz extracelular, como la fibrina y el colágeno, favoreciendo la invasión del embrión (Beier 2011, Chu 2006).

Se procedió a analizar la liberación de proteínas MMP2 y MMP9 en los medios de cultivo, mediante ELISA de las CEE decidualizadas silenciadas para ANXA2 y procedentes de sPE, como en el experimento anterior.

Existe una reducción significativa de los niveles de ambas metaloproteinasas en el grupo silenciado (ANXA2 siRNA) y en las muestras procedentes de sPE, comparado con control siRNA y control de CEE decidualizadas.

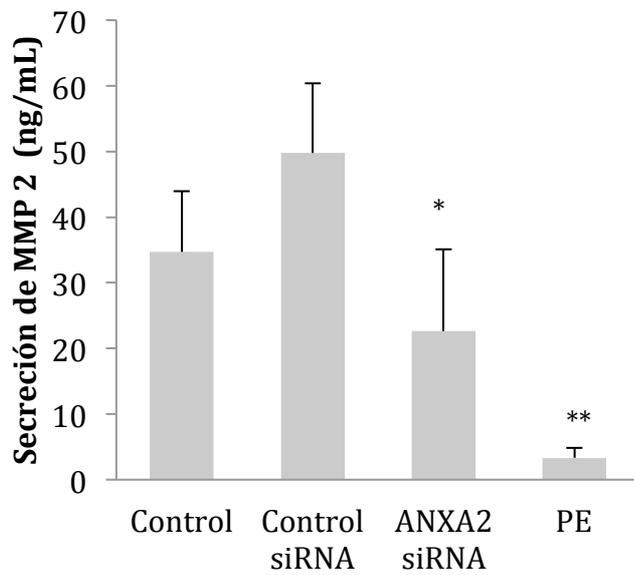


Tabla 32. Liberación de MMP2 (expresada en ng/mL): grupo control (34,69 ng/mL), control siRNA (49,74 ng/mL), ANXA siRNA (22,63 ng/mL) y en menor de todos, el grupo sPE (3,33 ng/mL).

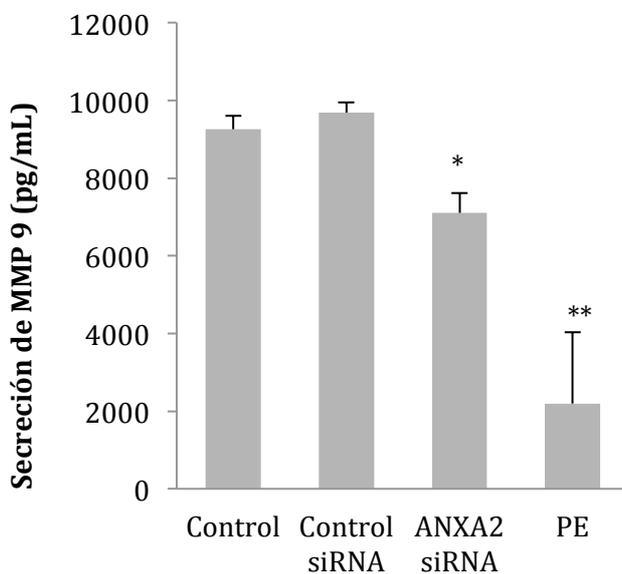


Tabla 33. Liberación de MMP9 (expresada en pg/mL): grupo control (9254 pg/mL), control siRNA (9686 pg/mL), ANXA siRNA (7102 pg/mL) y en menor de todos, el grupo sPE (2195 pg/mL).

6.- Efecto de la administración de heparina en la activación del sistema de la fibrinólisis en las CEE humanas.

- Cuantificación de la actividad de la plasmina y nivel de plasminógeno tras cultivo con heparina dosis variantes.
- Evaluación de proteína ANXA2 secretada tras administración de heparina dosis fija
- Cuantificación de la producción de metaloproteasas MMP2 y MMP9, tras administración de heparina

6.1. Cuantificación fibrinólisis tras cultivo con heparina dosis variantes.

La heparina es un potente anticoagulante, genera complejos moleculares entre la antitrombina III y los factores II-X de la coagulación, inactivándolos. Se ha descrito asociación entre la acción de la heparina y el ANXA 2 (Shao, 2006).

La fibrinólisis, consiste en la degradación mediada por plasmina, tras la activación de su precursor el plasminógeno, mediado por el activador tisular del plasminógeno (t-PA) (Kruse-Blinkenberg, 1980).

6.1.1. Cuantificación de nivel de plasminógeno

Se valoró el efecto en la fibrinólisis (nivel de plasminógeno y actividad de la plasmina) en la administración de heparina dosis dependiente (50 y 100 µg/mL respectivamente) en células control, células siRNA, células inhibidas ANXA2 siRNA y células procedentes de sPE, todas ellas decidualizadas.

La heparina a 100 µg/mL generó un aumento estadísticamente significativo de plasminógeno en las 4 condiciones estudiadas, incluyendo en el cultivo ANXA2 silenciado y en las muestras procedentes de sPE.

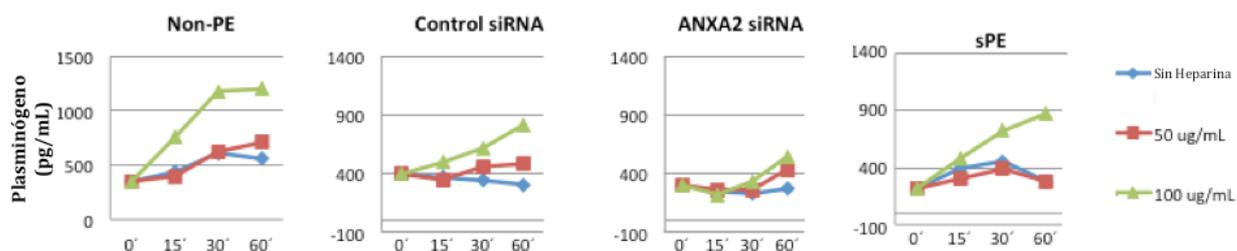


Tabla 34. Valor de plasminógeno (pg/mL) en las 4 condiciones de cultivo: sin administración de heparina (en azul), con heparina 50 $\mu\text{g/mL}$ (en rojo) y con heparina 100 $\mu\text{g/mL}$ (en verde). En todos ellos valorado al inicio (0 minutos), a los 15, 30 y 60 minutos.

	Plasminógeno inicial	15 min	30 min	60 min
Non -PE	351,5	754,43	1178,87	1198,44
ANXA2 siRNA	301,4	220,9	333,83	545,35

Tabla 35. Relación en plasminógeno (pg/mL) con la administración de 100 $\mu\text{g/mL}$ Heparina en el cultivo, en muestras sanas (non-PE) respecto a muestras silenciadas para la expresión de ANXA2 (ANXA2 siRNA). Se observa cifras iniciales de plasminógeno similares, pero con la Heparina en grupo ANXA2 silenciado no se consigue incrementar como en el grupo control, con lo que debe existir participación de la proteína ANXA2 en la función del plasminógeno.

	Plasminógeno inicial	15 min	30 min	60 min
Non -PE	351,5	754,43	1178,87	1198,44
sPE	216,1	478,88	723,23	875,99

Tabla 36. Relación en plasminógeno (pg/mL) con la administración de 100 $\mu\text{g/mL}$ Heparina en el cultivo, en muestras sanas (non-PE) respecto a muestras procedentes de PE severa (sPE). Se observa que en sPE se parte de una menor cantidad respecto al control, pero se consigue incrementar en el tiempo con la administración de Heparina.

6.1.2. Cuantificación actividad de la plasmina

Se evaluó del mismo modo la actividad de la plasmina, encontrando un aumento significativo de actividad de la plasmina en el cultivo de ANXA siRNA y en cultivo procedente de sPE.

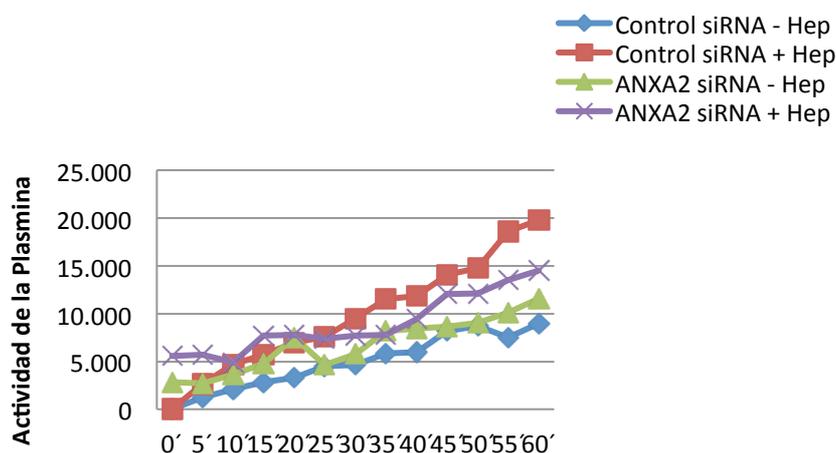


Tabla 37. Actividad de la plasmina en función del tiempo (en minutos): control siRNA sin heparina (en azul), control siRNA con heparina 100 µg/mL (en rojo), control ANXA2 siRNA sin heparina (en verde), control ANXA2 siRNA con heparina 100 µg/mL (en morado). En todos ellos valorado en múltiplos de 5 desde inicio hasta los 60 minutos.

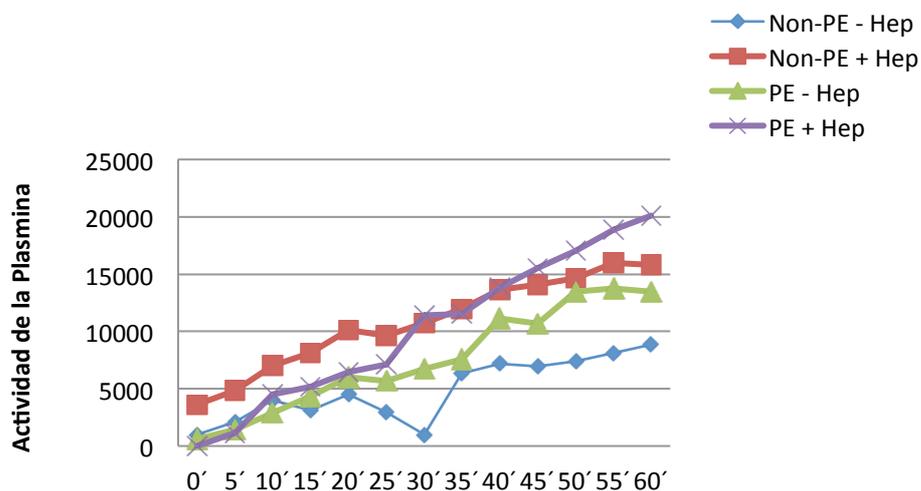


Tabla 38. Actividad de la plasmina en función del tiempo (en minutos): control non-PE sin heparina (en azul), control non-PE con heparina 100 µg/mL (en rojo), muestra sPE sin heparina (en verde), muestra sPE con heparina 100 µg/mL (en morado). En todos ellos valorado en múltiplos de 5 desde inicio hasta los 60 minutos.

6.2. Evaluación de proteína ANXA2 secretada tras administración de heparina dosis fija

Se valoró los niveles de ANXA2 secretados en las 4 condiciones medidos con ELISA, sin administración de heparina y con administración de 100 µg/mL de heparina. Se observó que el tratamiento con heparina induce un aumento significativo de ANXA2 secretada en medio de cultivo.

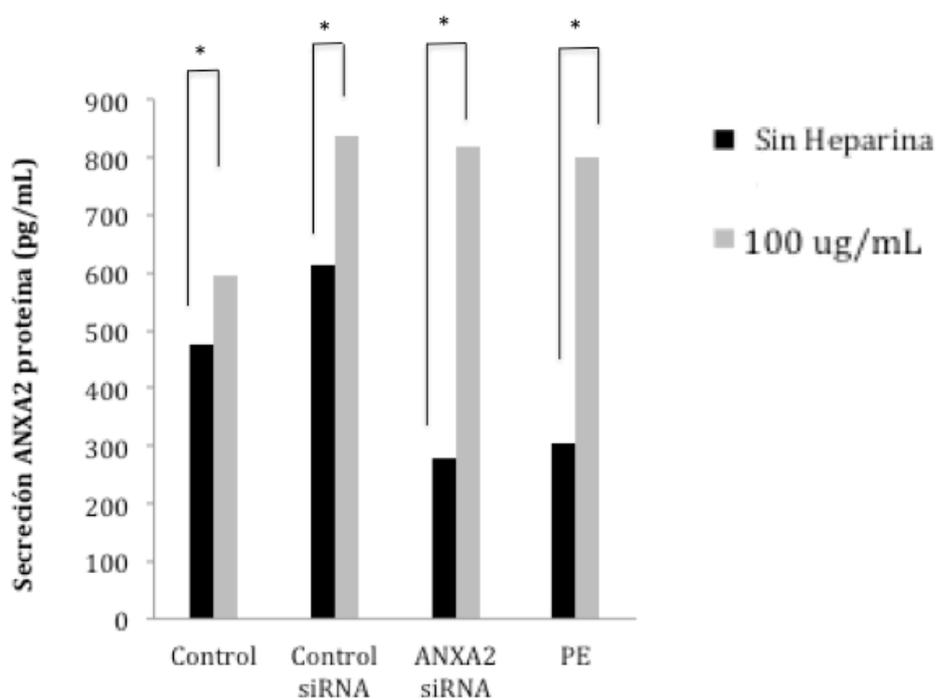


Tabla 39. Liberación de ANXA2 sin heparina (en negro) y con heparina (en gris), apareciendo una mayor liberación de ANXA2 en muestras procedentes de PE y en muestras inhibidas para ANXA2.

6.3. Cuantificación de la producción de metaloproteasas tras heparina

Cuantificación de las metaloproteasas MMP2 y MMP9 en los 4 situaciones de cultivo con y sin administración de 100 µg/mL de heparina. El tratamiento con heparina induce un aumento significativo de las metaloproteasas, elementos clave para facilitar la invasión del trofoblasto a través de las células del estroma endometrial.

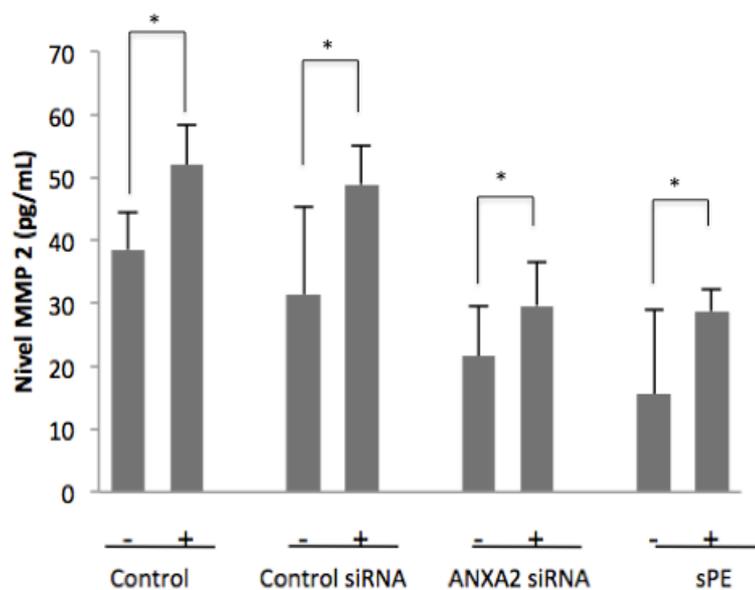


Tabla 40. Valores de MMP2 (pg/mL) en 4 condiciones, sin administrar heparina (-) y administrando 100 µg/mL de heparina (+). En todos los grupos el incremento de MMP2 se produjo, siendo escaso en el grupo de ANXA2 inhibido (sin tto 21,56 pg/mL a 29,58 pg/mL con tto heparina). En cambio en la PE, se consiguió el duplicado del nivel de MMP2 sin tto (15,52 pg/mL) a nivel con tto (28,71 pg/mL).

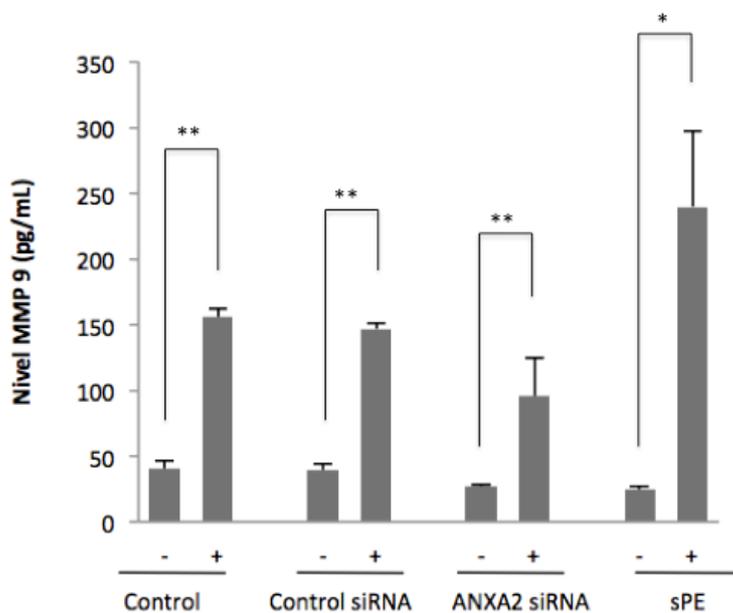


Tabla 41. Valores de MMP9 (pg/mL) en 4 condiciones, sin administrar heparina (-) y administrando 100 µg/mL de heparina (+). Se observa, igual que en la valoración del MMP2, un nivel más bajo de metaloproteinasas en el grupo sPE respecto al control sano (40,24 vs 24,79 pg/mL).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La PE es una enfermedad seria y prevalente, causante de una de las patologías gestacionales más frecuentes en la práctica clínica habitual (Brosens, 2010).

Se sabe que el flujo útero-placentario está determinado por el tamaño del lecho placentario, reflejo del número de arterias espirales que están en comunicación con el espacio intervelloso, y por la transformación de las arterias espirales por el trofoblasto.

En la PE, existe una incorrecta transformación de estas arterias espirales, expresada por un número menor de transformación a nivel del segmento miometrial. Este hecho se conoce como la teoría de la *placentación anómala*, que conlleva un desarrollo placentario inadecuado en mujeres con una predisposición individual al desarrollo de la enfermedad, derivado de una invasión incorrecta del citotrofoblasto sobre la decidua materna, descrito con gran amplitud y aun en estudio (Zhou, 2013; Menkhorst, 2014).

Este estudio se centra en el estudio y conocimiento de la participación materna en la patogenia de la enfermedad, conocer los factores paracrinos endometriales que acontecen el fenómeno de la invasión trofoblástica, como punto inicial del origen de la enfermedad. Nos hemos centrado en describir el papel de las células del estroma endometrial (CEE) en todo este proceso, detallando a nivel ómico, su participación.

Se sabe, gracias a estudios epidemiológicos, la presencia de herencia familiar en el desarrollo de la PE. En líneas generales, la presencia de PE en familiares de primer riesgo incrementa el riesgo de desarrollo de esta patología (Nilsson, 2004). De forma más detallada, el incremento del riesgo solo se observa si ha acontecido en la familia materna, dado que la presencia de episodios previos de PE en la familia paterna no modifica el riesgo (Boyd, 2013), con lo que la susceptibilidad genética para el desarrollo de la enfermedad esta asociada exclusivamente con la línea materna, con lo que se justifica el estudio ómico en la participación materna en la invasión embrionaria.

- **Resistencia a la decidualización *in vitro* en mujeres con antecedente de sPE**

La primera parte del proyecto consistió en valorar el patrón de decidualización *in vitro* de las células del estroma endometrial, con la sospecha de una resistencia a la decidualización en la PE.

El modelo de decidualización *in vitro* es una herramienta ampliamente usada y establecida para el estudio de este proceso biológico. Una vez aisladas y cultivadas las células del estroma endometrial, se puede inducir la decidualización con protocolos establecidos, con el uso de hormonas esteroideas (Irwin, 1991) o bien con la administración de segundo mensajero cAMP (Brar, 1997), reflejo real de lo que ocurre *in vivo*. A su vez tanto la prolactina como IGFBP-1 son marcadores conocidos de decidualización humana (Ihnatovych, 2009).

En nuestro estudio se observó una deficiente decidualización en las muestras procedentes de mujeres diagnosticadas de sPE, con una escasa liberación de biomarcadores (PRL e IGFBP-1) así como la ausencia de desarrollo de fenotipo de célula decidualizada.

Se postula una resistencia a la decidualización de las CEE en las pacientes con antecedente de la enfermedad. Se sabe que las CEE decidualizadas controlan la invasión trofoblástica, dado que actúan como una fuente de citoquinas y factores de crecimiento necesarios para una correcta invasión embrionaria (Finn, 1997). Ante la presencia de una decidualización anómala y deficitaria, se imposibilita una correcta penetración del citotrofoblasto, sobre una decidua materna no preparada para tal fin.

Se rompe el binomio necesario de embrión-decidua para un desarrollo correcto en este complejo mecanismo biológico, al no encontrar el apoyo materno a nivel paracrino para una correcta placentación. Con lo que esta resistencia, reflejo de una decidualización insuficiente, podría ser el primer escalón de la participación materna en la PE.

Este hecho es más complejo que esta afirmación, dado que tal y como hemos visto en la paridad, existen ocasiones en las que todas las gestaciones fueron afectas, pero en otras, hubo gestaciones sanas tanto anterior como posterior a la gestación PE.

Es común la resistencia a la decidualización en todas las muestras, pero se desconoce el motivo por el cual, en algunas gestaciones se consigue un embarazo sano y en otras ocasiones un embarazo complicado con PE, siendo la misma pareja sexual.

Se ha descrito el cambio de Ag paternos como FR para el desarrollo de PE en múltiparas, cifrándolo en un riesgo de 2,75 en el desarrollo de PE (RR: 2,75, IC 95% [1,33-5,68] (Trupin, 1996; Bandoli, 2013). En nuestro caso, el cambio de antígeno paterno podría implicar una relación, pero este hecho no se produjo (todas las gestaciones, tanto PE como sanas, se mantuvo el mismo progenitor).

Otro aspecto que podría guardar relación con este tema, es la inmunotolerancia materna al Ag fetal. En una gestación normal el reconocimiento de antígenos paternos (citotrofoblasto extraveloso) limitará la profundidad de la placentación mediante la activación de mecanismos de inmunotolerancia locales de la madre (Saito, 2007).

En el caso de la PE, la invasión trofoblástica se encuentra excesivamente inhibida por una mala tolerancia, mediada por inmunidad innata, sobre todo por la acción de las células NK (Hiby, 2004; Redman, 2005). Por lo que puede contribuir esta disregulación en el sistema inmune materno hacia el reconocimiento de los antígenos fetales en las mujeres con PE (Miko, 2013).

Se plantea la hipótesis que la expresión de antígenos fetales propios, diferentes en cada gestación, pueden modular una respuesta distinta en la inmunotolerancia materna, que contribuirá a mejorar/empeorar la invasión sobre una decidua de base de mala calidad (confirmado con una decidualización deficitaria) basado en estudios que encuentran un mayor riesgo de desarrollo de PE según subtipos de HLA fetal expresados, implicados en el proceso de invasión e inmunotolerancia (Hiby, 2004).

▪ **Disregulación y regulación a la baja en la producción de ANXA2 en sPE**

La Anexina A2 (ANXA2) es una proteína de unión a fosfolípidos-dependiente de calcio, implicada en gran variedad de procesos celulares, como pueda ser la regulación del crecimiento celular. En la actualidad se postula que la ANXA2 es la llave para la

adquisición de la receptividad, durante el periodo ventana, del epitelio endometrial modulado por la F-actina (Garrido-Gómez, 2012).

El ANXA2 es una proteína presente en las CEE, actúa como co-receptor para el plasminógeno y como activador tisular del plasminógeno, generando un incremento de plasmina en la superficie celular (Cesarman, 1994; Bharadwaj, 2013).

Dada la alteración en la fibrinólisis característica de la PE, centramos en relacionar la presencia de ANXA2 en las pacientes PE, basándonos en diferentes hechos que relacionan esta proteína y la preeclampsia:

- títulos elevados de Anticuerpos anti-ANXA 2 en los eventos trombóticos asociados al síndrome fosfolípido (Ling, 2004), existiendo un incremento de las tasas de enfermedad en aquellas mujeres con Ac anti-fosfolípidos positivos (Ferrer-Oliveras, 2012).

- se ha detectado Ac anti-ANXA 2 en placentas procedentes de gestaciones PE (Cesarman-Maus, 2006) y a su vez una menor expresión de RNAm ANXA2 en muestras placentarias procedentes de gestaciones PE (Xin, 2012).

Por lo que con todo ello, se decidió estudiar la relación existente entre la ANXA2 y la resistencia a la decidualización en estas pacientes.

Se encontró en las biopsias endometriales de muestras procedentes de PE (todas ellas en fase secretora) una menor cantidad de proteína ANXA2 en relación a los controles sanos, hecho que se confirmó con la inmunohistoquímica, con una menor tinción en el compartimento estromal.

Se realizó la cuantificación de ANXA2 in vitro tras decidualización de las CCE, tanto a nivel intracelular como extracelular. En las muestras control, tras la inducción decidual, se conseguía un incremento en la presencia de ANXA2 respecto al no decidualizado, hecho que ya se conocía de trabajos de estudio de decidualización humana in vitro (Garrido-Gómez, 2011). Lo llamativo fue que este incremento de proteína no se produjo en la PE, es más, presentaron unos niveles basales (sin decidualizar) menores respecto a los controles, y tras la inducción estos apenas se incrementaron.

Se mantuvo esta constante cuando se evaluó por compartimento, siempre niveles mayores intracelulares y en muestras procedentes de pacientes sanas. Curiosamente se observó un incremento de esta proteína en ambos compartimentos, por lo que la proteína ANXA2 secretada (extracelular) actúa como reflejo de la ANXA intracelular.

Cuando se evaluó las sPE, el aumento de ANXA2 tanto intra como extracelular fue escaso tras la inducción.

Por todo ello, nos hace suponer que existe una disregulación intrínseca en la liberación de la ANXA2 acorde con la resistencia a la decidualización en la PE, y que esta podría ser la llave del déficit de decidualización en la preeclampsia.

Es curioso que en situaciones basales los niveles ya sean menores que en el grupo control, hecho que se mantiene tras la decidualización, además se plantea la posibilidad dado la concordancia intra/extracelular de usar esta proteína como posible biomarcador como predictor de riesgo de decidualización anómala en estas pacientes.

Si tenemos niveles extracelulares menores, recogidos mediante toma de líquido estromal en fase secretora, dado que su liberación varía en el ciclo menstrual, mostrando valores mayores durante la fase secretora (Domínguez, 2009), podríamos realizar un patrón predictivo de riesgo de desarrollo de PE en función del nivel de esta proteína.

▪ **Reproducción de la decidualización anómala con silenciado ANXA2**

Una vez conocida la presencia de ANXA2 y su disregulación en las muestras PE, se decidió realizar un silenciado génico, con el objetivo de suprimir la expresión de esta proteína en muestras sanas, y valorar si modificaba la decidualización, conociendo la gran importancia de esta proteína para la adquisición de receptividad endometrial y en la decidualización (Garrido-Gómez, 2011).

La ANXA2 es una proteína asociada con los filamentos de actina, esencial para el mantenimiento de la dinámica de la membrana celular, citoesqueleto e interacciones con otras células (Hayes, 2006).

En muestras sanas silenciadas para la expresión de ANXA2, tras la inducción de decidualización, esta no se conseguía, valorada como en el estudio anterior mediante biomarcadores y fenotipo.

Se conoce que la ANXA2 se involucra en la reorganización del citoesqueleto mediado por actina, necesario para conseguir un fenotipo decidual (Hayes, 2006). Se realizó un estudio de relación entre G-actina (libre en citosol) y F-actina (incorporada en citoesqueleto), con la premisa que al alcanzar el fenotipo decidualizado, debería existir modificación en la relación de ambas fracciones, con la hipótesis de una mayor incorporación de actina al citoesqueleto, para generar las modificaciones de la morfología celular típica decidualizada, disminuyendo su fracción despolimerizada.

Llamó la atención que en el grupo control antes y después de la decidualización la relación entre G/F- actina fue de 1, se mantuvo estable. En cambio en las muestras silenciadas para la expresión de ANXA2, en situación basal la relación era de 3:1 pero tras la decidualización esta aumento a 4:1, a favor de la Actina libre (G-actina) en citoplasma, es decir, actina que no está siendo incorporada al citoesqueleto, necesario para los cambios fenotípicos (Hansen, 2002).

De todo ello sugiere que la ANXA2 tiene una papel fundamental para la reorganización del citoesqueleto en la decidualización humana.

- **Inhibición ANXA 2 reduce la movilidad de las CEE, la expansión trofoblástica y la invasión embrionaria**

Es conocida la necesidad de la participación activa de las CEE durante la invasión embrionaria, ya no solo con liberación de diferentes citoquinas y factores moleculares paracrino, si no también con su dinamismo. Para que esto ocurra se precisa la reorganización del citoesqueleto de actina (Ihnatovych, 2009).

La decidualización es el proceso de diferenciación de las células del estroma endometrial, iniciado en la fase secretora, en respuesta a la progesterona e independiente de la señal del blastocito. La transformación de estas células se inicia en las proximidades de las arterias espirales terminales y se extiende por todo el compartimento siguiendo señales autocrinas y paracrinas (Gellersen, 2010). Es aceptado que las CEE, presentan potencial migratorio e invasivo de manera

fisiológica. Después de la menstruación, se precisa células móviles capaces de regenerar la capa funcional del endometrio. Desde el punto de vista reproductivo, cada vez se apoya más la importancia de esta movilidad para una correcta implantación embrionaria (*“teoría del acompañamiento”*).

Se ha observado una importante cascada proteolítica y degradación selectiva de proteínas, mediadas por la acción del ANXA2. De hecho, esta proteína se sobreexpresa en gran cantidad de líneas tumorales, como carcinoma hepatocelular, glioma de alto grado o leucemia promielocítica aguda; favoreciendo la motilidad, migración e invasión de las células neoplásicas (Chung 1996; Mai, 2000).

Se investigó la expansión e invasión embrionaria mediante co-cultivo de blastocito de ratón y esferoides humanos JEG-3 (derivados línea trofoblástica) en monocapas de CEE decidualizadas con/sin silenciamiento específicamente con ARN de interferencia para expresión de ANXA2. Este sistema es ampliamente utilizado y aceptado como comparativa al proceso que ocurre in vivo (Nancy, 1993).

Se propuso el uso de embriones vivos (de ratón) con un modelo interespecie, y por otro lado, un modelo intraespecie, con co-cultivo con esferoides JEG-3, que presentan una morfología y comportamiento muy similar al embrión humano, evitando los problemas éticos que ocasiona el uso de embriones humanos.

Se observó que tanto la capacidad migratoria de las CEE, la expansión e invasión embrionaria estaban disminuidas cuando era inhibida la proteína ANXA2.

Una vez el blastocito se adhiere sobre la superficie de la célula epitelial, comienza el fenómeno de expansión (Cuman, 2014) e invasión a través de las células estromales de la decidua. Ambos hechos estuvieron reducidos al silenciar ANXA2, pudiendo explicarlo al presentar un CEE con una estructura menos flexible y una menor interacción entre el trofoblasto - CEE, dado que se ha visto que la proteína ANXA2 genera interacciones de las membranas plasmática célula-célula, a través de complejos asociados a quinasa y cadherina (Hansen, 2002) producto todo ello, de una incapacidad de reestructuración del citoesqueleto.

Es más, se ha descrito el ANXA2 induce la expresión de moléculas de adhesión sobre la superficie de célula endometrial (Wolberg, 2005) implicando una deficiente invasión/expansión embrionaria.

El blastocito tras la adhesión, penetra a través de la superficie epitelial, sellándose esta solución de continuidad producida (Aplin, 2007). Mediante nuestro ensayo de “*cierre de surco*”, pudimos comprobar como al inhibir ANXA2, se disminuía la capacidad migratoria de las CEE. Este hecho correlaciona esta proteína con el movimiento celular mediado por adhesiones focales e interacción de actina (Hayes, 2006).

▪ **La fibrinólisis deficitaria en la sPE se reproduce con inhibición ANXA2**

La fibrinólisis es un proceso complejo, por el cual, se consigue la conversión de plasminógeno en plasmina (forma activa), a través de una vía extrínseca mediante la acción de moléculas liberadas por el endotelio (activador del plasminógeno tisular o tPA) y del activador del plasminógeno uroquinasa (uPA), o bien, por la vía extrínseca, mediante la acción de la calicreína (Raum, 1980). El objetivo de la plasmina es degradación de la fibrina formada, transformándola en fibrinopéptidos solubles de rápida eliminación, como pueda ser el Dímero-D, manteniendo la homeostasis (Cesarman-Maus 2005).

En mujeres con PE existe un incremento de D-Dímero y disminución de fibrinógeno, reflejo de una disregulación de la fibrinólisis (Halligan, 1994). A nivel placentario es frecuente encontrar depósitos de fibrina, generando áreas de microtrombos (Vinnars, 2011). Por lo que, se ha descrito en pacientes PE un estado pro-trombótico mayor que gestaciones sanas (Sucak, 2006).

Se observó que tanto el plasminógeno como la actividad de la plasmina y los niveles de metaloproteinasas era menor en muestras PE y en la muestras silenciadas para ANXA2, con lo que debe existir relación entre ANXA2 con la disregulación fibrinolítica de las preeclampsia y en el fallo de invasión trofoblástica.

Existe asociación entre ANXA2 y fibrinólisis. Esta proteína promueve la fibrinólisis en la superficie de las células endoteliales vasculares por unión de plasminógeno y activador del plasminógeno tisular (incrementando su eficacia catalítica) y mediante la aceleración de la producción de plasmina (Kwon, 2005). La ANXA2 genera una unión reversible calcio dependiente con el tPA en las células endoteliales, promoviendo la génesis de plasmina activa en la superficie celular (Hajjar, 1998).

Se conoce que el sistema plasminógeno/plasmina regula la invasión del trofoblasto humano mediante la producción de metaloproteinas, con el objetivo de degradar los componentes de la matriz extracelular, como la fibrina y el colágeno, favoreciendo la invasión del embrión (Beier, 2011; Chu, 2006). También se ha valorado la necesidad de una correcta expresión de ANXA2, como paso crítico durante la invasión embrionaria (Garrido-Gómez, 2012).

Una consecuencia importante, al disminuir la génesis de plasmina activa, se genera un efecto local protrombótico, mediada por una fibrinólisis deficitaria. Al inhibir ANXA2, induces una invasión superficial, reflejado por menor lisis extracelular (reflejo de MMP2 y MMP9).

- **El tratamiento con Heparina mejora el proceso de la fibrinólisis**

Actualmente el único tratamiento eficaz en la preeclampsia es la terminación de la gestación (parto de la placenta), lo cual incrementa la morbimortalidad neonatal, sobre todo en relación con la prematuridad (Conde-Agudelo, 2004).

El uso de Heparina de Bajo Peso Molecular (HBPM) parece ser una prometedora herramienta en la prevención de enfermedades mediadas por una mala placentación (Rodger, 2014). Se ha observado buenos resultados, con su administración desde el 1er T, en aquellas mujeres con FR de desarrollo de enfermedad, como pueda ser el antecedente de PE o la presencia de HTA pregestacional, siendo un tratamiento seguro en la gestación (Sasaki, 2013).

La PE se engloba como un estado pro-inflamatorio con una disminución de los factores de crecimiento (tales como el VEGF y el PIGF), implicado en la diferenciación e invasión trofoblástica, observándose elevación de niveles de endoglina y sFlt-1 (Leach, 2002).

Por otro lado la heparina esta dotada de actividad antiinflamatoria, como lo demuestra su capacidad de inhibición de la adhesión leucocitaria a la célula endotelial, el incremento del factor alfa de necrosis tumoral (α -TNF) y el estímulo de la expresión intracelular de ICAM-1 (Nelson, 1993; Lever, 2000).

También presenta función moduladora sobre factores de crecimiento, así diferentes estudios in vitro han mostrado un efecto regulador sobre el factor de crecimiento endotelial y sobre el VEGF (Levine, 2002; Lash, 2003). Es más se ha observado que la HBPM es un factor protector frente al daño renal en mujeres con PE, mediado por la estabilización del endotelio glomerular (Li, 2012).

En nuestro estudio la administración in vitro de heparina a dosis de 100 ug/mL aumentó la expresión de ANXA2 secretada, plasminógeno, plasmina, MMP2 y MMP9 en todas las condiciones investigadas. Con lo que se confirma en laboratorio, lo ya observado en clínica, mejorando el estado fibrinolítico y la expresión de ANXA2.

Se conoce que durante la invasión embrionaria existe una regulación al alza de las metaloproteinasas de matriz, catepsinas y uroquinasa. Entre ellos, la MMP 2 y 9 representan las proteasas mejor conocidas en el contexto de la invasión del trofoblasto (Pollheimer, 2014).

Ambas metaloproteinasas son expresadas y secretadas en cultivo de línea trofoblástica (Librach, 1991) y la adición de inhibidores tisulares o Ac bloqueantes específicos, produce una regulación a la baja de la invasión in vitro (Isaka, 2003). Relacionándose en modelos en animal (ratón) la deficiencia de MMP9 con un desarrollo de fenotipo de PE (Plaks, 2013).

Con todo ello, una invasión superficial, se consigue revertir con la adición de heparina tanto en modelos indirectos (ANXA2 silenciadas) o en modelos directos (muestras sPE), al menos la disregulación fibrinolítica local.

▪ **Perspectiva en Investigación y aplicación clínica**

Del mismo modo que existen modelos de decidualización humana, basados en datos proteómicos y secretómicos (Aghajanova, 2010; Garrido-Gómez, 2011), se abre la posibilidad ante la presencia de una resistencia de la decidualización comprobada in vitro, del desarrollo de un modelo propio para las mujeres con antecedente de PE, pudiendo establecer implicaciones diagnósticas y clínicas.

Permitiendo mejorar el conocimiento de este complejo fenómeno biológico. Estudiando la génesis de esta enfermedad, permite el estudio en otras patologías englobadas dentro de la teoría de la *placentación anómala*, como pueda ser el parto pretérmino o el aborto espontáneo, y sus posibles correlaciones entre ellas.

Es necesario un mayor estudio molecular, pero abre la posibilidad del uso de ANXA2 en líquido estromal en fase secretora, como un nuevo biomarcador usado para la predicción precoz de la PE. Al analizar los datos se observa que la proteína ANXA 2 secretada (extracelular) es reflejo del ANXA2 intracelular, pudiendo ser usado como predictor de resistencia a la deciduización en pacientes con PE. Necesitando más estudios para su valoración en mujeres con antecedente de la enfermedad y sobre todo su correlación en mujeres nuligestas, para poder confirmarlo como marcador de cribado.

La proteína ANXA2 presenta una importante aplicación en Investigación, cada vez se está estudiando más , por un lado, su implicación en procesos reproductivos , tales como la deciduización e invasión embrionaria, tanto en su fisiología como en su patología, y en la endometriosis (Fowler, 2007). También en la esfera oncológica, se observa una importante participación y sobreexpresión de esta proteína, como clava para la capacidad migratoria en los fenómenos de invasión y metástasis tisular.

▪ **Reto en el conocimiento y diferenciación de la PE precoz - tardía**

Queda abierto la aplicación de estos hallazgos en la cronología de la aparición de la preeclampsia. Cada vez esta cobrando mayor importancia, el momento de aparición de la enfermedad, ya que existe una relación inversa entre la edad gestacional de aparición y la severidad de las complicaciones.

Así la PE puede ser englobada en PE precoz (≤ 34 semanas) o tardía (>34 semanas). Existen peores resultados, tanto maternos como neonatales, cuanto más precoz en su aparición, así casos de PE diagnosticados antes de la 32 semana presentan una mortalidad materna 20 veces mayor que una PE diagnosticada pasada la semana 37 (Von Dadelszen, 2003).

	PE TARDÍA	PE PRECOZ
Frecuencia	1/20 embarazos	1/ 200 embarazos
Total diagnóstico de PE	80-90%	10-20%
Morbimortalidad	Baja	Alta
Fenotipo materno	IMC elevados	IMC normal o elevado
Asociación con CIR	raro	frecuente
Arterias Uterinas	Ausencia de Notch	Persistencia de Notch
Recurrencia de la enfermedad	Baja	Alta

Tabla 42. Comparativa entre las características de la PE tardía y la PE precoz. Observándose como es mucho más frecuente y leve los casos diagnosticados por encima de la 34 semana de gestación (PE tardías).

Además la principal diferencia entre estas dos forma clínicas parece estar relacionado con su etiopatogenia, tema todavía en estudio. La teoría de la placentación anómala ya explicada anteriormente, como causa de las PE precoces, reservando la PE tardía como una mala adaptación y sobrecarga placentaria a la necesidades relacionadas con el avance de la gestación (Huppertz, 2008).

Se acepta la teoría de una invasión trofoblástica deficitaria en la etiopatogenia de la PE precoz, en cambio este hecho no está tan confirmado en la patogenia de la PE tardía, parece ser que predomina más factores extrínsecos al desarrollo placentario que influyen en la aparición de la enfermedad (Barden, 2006).

Así en mujeres con criterios de síndrome metabólico (obesidad, hipertensión, DM, dislipemia) reflejo de una vasculopatía incipiente, o en aquellas con hiperplacentosis (gestaciones múltiples, anemia, mal de altura), se genera una sobrecarga de estrés endotelial generando las manifestaciones de la enfermedad de forma más tardía, bien por la saturación de los mecanismos protectores del daño oxidativo, o bien por la liberación de factores antiangiogénicos que incrementan de forma proporcional al tamaño placentario.

De manera fisiológica al aproximarse al final de la gestación, existe un incremento en la liberación de factores antiangiogénicos (aumento del cociente sFit1 / PIGF) reflejo de un agotamiento placentario en la etapa final, sin generar enfermedad por estar intactos los mecanismos de protección del daño endotelial (Verlohren, 2010). Pero en aquellas pacientes que partan de una situación con una predisposición constitucional a la mala tolerancia a la sobrecarga de este daño endotelial, puede generar la

enfermedad con aparición tardía reflejo de un daño endotelial sistémico (Roberts, 2011).

Este hecho, no ha sido demostrado en nuestro estudio. Presentamos 13 muestras procedentes de PE severas, 7 de las cuales fueron precoces (≤ 34 sem) y 6 tardías (>34 sem). Al analizar el proceso de decidualización en todas ellas, hubo una pobre decidualización, bien expresado por marcadores bioquímicos y/o fenotípicos. Al analizar la presencia de ANXA2 tanto intra como extracelular, los resultados fueron similares, menor cantidad respecto a los controles, antes y después de la inducción de la decidualización. Al diferenciar los datos por esos dos grupos, no se observaron diferencias entre los mismos. Por lo que rechazar la vinculación de una mala invasión trofoblástica en los casos de PE tardías, a la luz de los resultados, no parece correcto.

Se precisa mayor investigación en los factores que van asociados al desarrollo de una PE precoz respecto a la tardía, dado que parece existir una decidualización insuficiente en todos los casos, pero que factores influyen tanto a nivel placentario como a nivel sistémico, para prolongar/acortar la aparición de la enfermedad son desconocidos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- Existe una decidualización deficitaria en mujeres con antecedente de preeclampsia severa, valorado por marcadores bioquímicos y fenotípicos.
- 2.- La Anexina A2 se encuentra vinculada en el proceso de resistencia de la decidualización, estando infraexpresada basalmente y tras decidualización en las células del estroma endometrial procedentes de preeclampsia. Siendo la ANXA2 secretada (extracelular) un reflejo directo del ANXA2 intracelular.
- 3.- La Anexina A2 se encuentra vinculada con la invasión embrionaria, al inhibir su expresión se consigue una disminución de la decidualización in vitro, de la capacidad migratoria de las células del estroma endometrial y de la expansión e invasión embrionaria.
- 4.- Existe una disregulación fibrinolítica a nivel local en la PE, mediada por la ANXA2, dado que se reproduce con su inhibición.
- 5.- La administración in vitro de heparina mejora el estado fibrinolítico y la expresión de ANXA2, con lo que mejora todos los parámetros evaluados en la invasión embrionaria.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Aghajanova L, Hamilton AE, Giudice LC. Uterine receptivity to human embryonic implantation: histology, biomarkers, and transcriptomics. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(2):204-11.

American College of Obstetricians and Gynecologists Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2013; 122(5):1122-31.

Ananth CV, Keyes KM, Wapner RJ. Pre-eclampsia rates in the United States, 1980-2010: age-period-cohort analysis. *BMJ.* 2013;347:f6564.

Aplin JD. Embryo implantation: the molecular mechanism remains elusive. *Reprod Biomed Online.* 2007;14 Spec No 1:49-55.

Babbin B, Parkos C, Mandell K, Winfree M, Laur O, Ivanoc A, et al. Annexin 2 regulates intestinal epithelial cell spreading and wound closure through Rho-related signaling. *Am J Pathol.* 2007;170(3):951-66.

Babiychuk EB, Draeger A. Annexins in cell membrane dynamics. Ca²⁺-regulated association of lipid microdomains. *J Cell Biol.* 2000;150(5):1113-24.

Bandoli G, Lindsay S, Johnson DL, Kao K, Luo Y, Chambers CD. Change in paternity and select perinatal outcomes: causal or confounded?. *J Obstet Gynaecol.* 2012;32(7):657-62.

Barden A. Pre-eclampsia: contribution of maternal constitutional factors and the consequences for cardiovascular health. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006;33(9):826-30.

Barker D. Fetal origins of coronary heart disease. *Br Med J* 1995;311(6998):171-4.

Barker DJ, Lampl M, Roseboom T, Winder N. Resource allocation in utero and health in later life. *Placenta.* 2012;33 Suppl 2:e30-4.

Barton JR, O'Brien JM, Bergauer NK, Jacques DL, Sibai BM. Mild gestational hypertension remote from term: progression and outcome. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184(5):979-83.

Barton JR, Sibai BM. Prediction and prevention of recurrent preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2008;112(2 Pt 1):359-72.

Beier AF, Schulz JC, Zimmermann H. Cryopreservation with a twist - towards a sterile, serum-free surface-based vitrification of hESCs. *Cryobiology.* 2013;66(1):8-16.

Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams DJ. Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2007;335(7627):974.

Bharadwaj A, Bydoun M, Holloway R, Waisman D. Annexin A2 heterotetramer: structure and function. *Int J Mol Sci.* 2013;14(3):6259-305.

Boyd HA, Tahir H, Wohlfahrt J, Melbye M. Associations of personal and family preeclampsia history with the risk of early-, intermediate- and late-onset preeclampsia. *Am J Epidemiol.* 2013;178(11):1611-9.

Brar AK, Frank GR, Kessler CA, Cedars MI, Handwerger S. Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. *Endocrine.* 1997;6(3):301-7.

Brosens I, Pijnenborg R, Vercruysse L, Romero R. The "Great Obstetrical Syndromes" are associated with disorders of deep placentation. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 204(3):193-201.

Bujold E, Roberge S, Lacasse Y, Bureau M, Audibert F, Marcoux S, et al. Prevention of preeclampsia and intrauterine growth restriction with aspirin started in early pregnancy: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2010;116(2 Pt1):402-14.

Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011; 25(3):287-99.

Caritis S, Sibai B, Hauth J, Lindheimer MD, Klebanoff M, Thom E, et al. Low-dose aspirin to prevent preeclampsia in women at high risk. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *N Engl J Med*. 1998;338(11):701-5.

Cesarman GM, Guevara CA, Hajjar KA. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator (t-PA). II. Annexin II-mediated enhancement of t-PA-dependent plasminogen activation. *J Biol Chem*. 1994;269(33):21198-203.

Cesarman-Maus G, Ríos-Luna NP, Deora AB, Huang B, Villa R, Cravioto M del C, et al. Autoantibodies against the fibrinolytic receptor, annexin 2, in antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2006;107(11):4375-82.

Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol* 2005; 129(3): 307–21.

Chu H, Thievessen I, Sixt M, Lämmermann T, Waisman A, Braun A, et al. Gamma-Parvin is dispensable for hematopoiesis, leukocyte trafficking, and T-cell-dependent antibody response. *Mol Cell Biol*. 2006;26(5):1817-25.

Chung CY, Murphy-Ullrich JE, Erickson HP. Mitogenesis, cell migration, and loss of focal adhesions induced by tenascin-C interacting with its cell surface receptor, annexin II. *Mol Biol Cell*. 1996;7(6):883-92.

Cnossen JS, Morris RK, Riet G, Mol BW, van der Post JA, Coomarasamy A, et al. Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis. *CMAJ*. 2008;178(6):701-11.

Conde-Agudelo A, Belizan JM, Lammers C. Maternal-perinatal morbidity and mortality associated with adolescent pregnancy in Latin America: Cross-sectional study. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;192(2):342-9.

Conde-Agudelo A, Villar J, Lindheimer M. World Health Organization Systematic Review of Screening Tests for Preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2004;104(6):1367–91.

Cuman C, Menkhorst E, Winship A, Van Sinderen M, Osianlis T, Rombauts LJ, et al. Fetal-maternal communication: the role of Notch signalling in embryo implantation. *Reproduction*. 2014;147(3):R75-86.

Dassah M, Almeida D, Hahn R, Bonaldo P, Worgall S, Hajjar KA. Annexin A2 mediates collagen VI secretion, pulmonary elasticity, and bronchial epithelial cell apoptosis. *J Cell Sci*. 2014;127(Pt 4):828-44

Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev*. 2004;25(3):341-73.

Domínguez F, Garrido-Gómez T, López JA, Camafeita E, Quiñonero A, Pellicer A, et al. 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. *Hum Reprod*. 2009;24(10):2607-17.

Dong Z, Yao M, Zhang H, Wang L, Huang H, Yan M, et al. Inhibition of Annexin A2 gene transcription is a promising molecular target for hepatoma cell proliferation and metastasis. *Oncol Lett*. 2014;7(1):28-34.

Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ*. 2005;330(7491):565.

Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol*. 2009;33(3):130-7.

Ferrer-Oliveras R, Llurba E, Cabero-Roura L, Alijotas-Reig J. Prevalence and clinical usefulness of antiphospholipid and anticofactor antibodies in different Spanish preeclampsia subsets. *Lupus*. 2012;21(3):257-63.

Figueras F, Gardosi J. Intrauterine growth restriction: new concepts in antenatal surveillance, diagnosis, and management. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;204(4):288-300.

Finn CA, Martin L. The control of implantation. *J Reprod Fertil*. 1974;39(1):195-206.

Friedman SA, Schiff E, Emeis JJ, Dekker GA, Sibai BM. Biochemical corroboration of endothelial involvement in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172(1):202-3.

Fowler PA, Tattum J, Bhattacharya S, Klonisch T, Hombach-Klonisch S, Gazvani R, et al. An investigation of the effects of endometriosis on the proteome of human eutopic endometrium: a heterogeneous tissue with a complex disease. *Proteomics*. 2007;7(1):130-42.

Garrido-Gómez T, Domínguez F, Lopez JA, Camafeita E, Quiñonero A, Martínez-Conejero JA, et al. Modeling human endometrial decidualization from the interaction between proteome and secretome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(3):706-16.

Garrido-Gómez T, Domínguez F, Quiñonero A, Estella C, Vilella F, Pellicer A, et al. Annexin A2 is critical for embryo adhesiveness to the human endometrium by RhoA activation through F-actin regulation. *FASEB J*. 2012;26(9):3715-27.

Garrido-Gómez T, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Diaz-Gimeno P, Vilella F, Simón C. Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. *Fertil Steril*. 2013;99(4):1078-85.

Gaugler-Senden IP, Berends AL, de Groot CJ, Steegers EA. Severe, very early onset preeclampsia: subsequent pregnancies and future parental cardiovascular health. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008;140(2):171-7.

Gellersen B, Reimann K, Samalecos A, Aupers S, Bamberger AM. Invasiveness of human endometrial stromal cells is promoted by decidualization and by trophoblast-derived signals. *Hum Reprod*. 2010;25(4):862-73.

Gerbasi FR, Bottoms S, Farag A, Mammen E. Increased intravascular coagulation associated with pregnancy. *Obstet Gynecol* 1990; 75(3 Pt 1):385-9.

Gómez O, Martínez JM, Figueras F, Del Río M, Borobio V, Puerto B, et al. Uterine artery Doppler at 11-14 weeks of gestation to screen for hypertensive disorders and associated complications in an unselected population. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2005;26(5):490-4.

Granger JP, Alexander BT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of pregnancy-induced hypertension. *Am J Hypertens.* 2001;14(6 Pt 2):178S-185S.

Grewal S, Carver JG, Ridley AJ, Mardon HJ. Implantation of the human embryo requires Rac1-dependent endometrial stromal cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(42):16189-94.

Hajjar KA, Jacovina AT. Modulation of annexin II by homocysteine: implications for atherothrombosis. *J Investig Med.* 1998;46(8):364-9.

Halligan A, Bonnar J, Sheppard B, Darling M, Walshe J. Haemostatic, fibrinolytic and endothelial variables in normal pregnancies and pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1994;101(6):488-92.

Hannan NJ, Paiva P, Dimitriadis E, Salamonsen LA. Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines?. *Biol Reprod.* 2010;82(2):235-45.

Hansen 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(47):45371-6.

Hauth JC, Ewell MG, Levine RJ, Esterlitz JR, Sibai B, Curet LB, et al. Pregnancy outcomes in healthy nulliparas who developed hypertension. Calcium for Preeclampsia Prevention Study Group. *Obstet Gynecol* 2000;95(1):24-8.

Hayes MJ, Shao D, Bailly M, Moss SE. Regulation of actin dynamics by annexin 2. *EMBO J.* 2006;25(9):1816-26.

Hermes W, Franx A, van Pampus MG, Bloemenkamp KW, Bots ML, van der Post JA, et al. Cardiovascular risk factors in women who had hypertensive disorders late in pregnancy: a cohort study. *Am J Obstet Gynecol.* 2013;208(6):474.e1-8.

Hermes W, Ket JC, van Pampus MG, Franx A, Veenendaal MV, Kolster C, et al. Biochemical cardiovascular risk factors after hypertensive pregnancy disorders: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol Surv.* 2012;67(12):793-809.

Hiby SE, Walker JJ, O'shaughnessy KM, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, et al. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med*. 2004;200(8):957-65.

Homer CS, Brown MA, Mangos G, Davis GK. Non-proteinuric pre-eclampsia: a novel risk indicator in women with gestational hypertension. *J Hypertens*. 2008;26(2):295-302.

Horcajadas JA, Pellicer A, Simón C. Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. *Hum Reprod Update*. 2007;13(1):77-86.

Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension* 2008;51(4):970-5.

Ihnatovych I, Livak M, Reed J, de Lanerolle P, Strakova Z. Manipulating actin dynamics affects human in vitro decidualization. *Biol Reprod*. 2009; 81(1):222-30.

Irgens HU, Reisaeter L, Irgens LM, Lie RT. Long term mortality of mothers and fathers after pre-eclampsia: population based cohort study. *BMJ* 2001;323(7323):1213-7.

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(5):2385-92.

Isaka K, Usuda S, Ito H, Sagawa Y, Nakamura H, Nishi H. Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta*. 2003;24(1):53-64.

Johnsson N, Marriott G, Weber K. p36, the major cytoplasmic substrate of src tyrosine protein kinase, binds to its p11 regulatory subunit via a short amino-terminal amphiphatic helix. *EMBO J*.1988;7(8):2435-42.

Konijnenberg A, Stokkers EW, van der Post JA, Schaap MC, Boer K, Bleker OP, et al. Extensive platelet activation in preeclampsia compared with normal pregnancy: enhanced expression of cell adhesion molecules. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176(2):461-9.

Kruse-Blinkenberg HO, Gormsen J, Jensen J, Thomsen F, Wille-Jørgensen P. Low dose heparin in elective abdominal surgery. Correlation between concentrations of heparin, antithrombin III and antiplasmin in patients with and without DVT. *Acta Chir Scand*. 1980;146(6):383-90.

Kwon M, MacLeod TJ, Zhang Y, Waisman DM. S100A10, annexin A2, and annexin a2 heterotetramer as candidate plasminogen receptors. *Front Biosci*. 2005;10:300-25.

Lachmeijer AM, Dekker GA, Pals G, Aarnoudse JG, ten Kate LP, Arngrímsson R. Searching for preeclampsia genes: the current position. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;105(2):94-113.

Lain KY, Roberts JM. Contemporary concepts of the pathogenesis and management of preeclampsia. *JAMA* 2002; 287(24):3183-6.

Lanzieri G. First demographic estimates for 2009. Eurostat. Disponibles en Eurostat, European Union; 2009.

Lash GE, Warren AY, Underwood S, Baker PN. Vascular endothelial growth factor is a chemoattractant for trophoblast cells. *Placenta*. 2003; 24(5):549–56.

Leach RE, Romero R, Kim YM, Chaiworapongsa T, Kiburn B, Das SK, et al. Preeclampsia and expression of heparin-binding EGF-like growth factor. *Lancet*. 2002; 360(9341):1215–9.

Lever R, Hoult RS, Page CP. The effects of heparin and related molecules upon the adhesion of human polymorphonuclear leucocytes to vascular endothelium in vitro. *Br J Pharmacol*. 2000; 129(3):533–40.

Levine A, Kenet G, Bruck R, Avni Y, Avinoach I, Aeed H, et al. Effect of heparin on tissue binding activity of fibroblast growth factor and heparin-binding epidermal growth factor in experimental colitis in rats. *Pediatr Res*. 2002;51(5):635–40.

Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*. 2004; 350(7):672-83.

Levine RJ, Lindheimer MD. First-trimester prediction of early preeclampsia: a possibility at last! *Hypertension* 2009; 53(5):747-8.

Levine RJ, Vatten LJ, Horowitz GL, Qian C, Romundstad PR, Yu KF, et al. Preeclampsia, soluble fms-like tyrosine kinase 1, and the risk of reduced thyroid function: nested case-control and population based study. *BMJ* 2009; 339:b4336.

Li Y, Wu Y, Gong X, Shi X, Qiao F, Liu H. Low molecular weight heparin decreases the permeability of glomerular endothelial cells when exposed to pre-eclampsia serum in vitro. *Nephrology (Carlton)*. 2012;17(8):754-9.

Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol*. 1991;113(2):437-49.

Ling Q, Jacovina AT, Deora A, Febbraio M, Simantov R, Silverstein RL. Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo. *J Clin Invest*. 2004;113(1):38-48.

Lisonkova S, Joseph KS. Incidence of preeclampsia: risk factors and outcomes associated with early- versus late-onset disease. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;209(6):544.e12.

Lykke JA, Langhoff-Roos J, Sibai BM, Funai EF, Triche EW, Paidas MJ. Hypertensive pregnancy disorders and subsequent cardiovascular morbidity and type 2 diabetes mellitus in the mother. *Hypertension*. 2009;53(6):944-51.

MacKay AP, Berg CJ, Liu X, Duran C, Hoyert DL. Changes in pregnancy mortality ascertainment: United States, 1999-2005. *Obstet Gynecol*. 2011;118(1):104-10.

Magee LA, Helewa M, Moutquin JM, von Dadelszen P; Hypertension Guideline Committee; Strategic Training Initiative in Research in the Reproductive Health Sciences (STIRRH) Scholars. Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy. *J Obstet Gynaecol Can*. 2008;30:S1-48.

Mai J, Finley RL Jr, Waisman DM, Sloane BF. Human procathepsin B interacts with the annexin II tetramer on the surface of tumor cells. *J Biol Chem*. 2000;275(17):12806-12.

Makris A, Thornton C, Thompson J, Thomson S, Martin R, Ogle R, et al. Uteroplacental ischemia results in proteinuric hypertension and elevated sFLT-1. *Kidney Int* 2007; 71(10):977-94.

Maruyama T, Yoshimura Y. Molecular and Cellular Mechanisms for Differentiation and Regeneration of the Uterine Endometrium. *Endocr J.* 2008;55(5):795–810.

Maynard SE, Min JY, Merchan J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003;111(5):649-58.

McDonald SD, Malinowski A, Zhou Q, Yusuf S, Devereaux PJ. Cardiovascular sequelae of preeclampsia/eclampsia: a systematic review and meta-analyses. *Am Heart J.* 2008;156(5):918-30.

McParland P, Pearce JM, Chamberlain GV. Doppler ultrasound and aspirin in recognition and prevention of pregnancy-induced hypertension. *Lancet* 1990; 335(8705):1552-5.

Meads C, Cnossen J, Meher S, Juarez-Garcia A, ter Riet G, Duley L. Methods of prediction and prevention of pre-eclampsia: systematic reviews of accuracy and effectiveness literature with economic modelling. *Health Technol Assess* 2008;12(6):III-IV, 1-270.

Medina I, Carbonell J, Pulido L. Babelomics: an integrative platform for the analysis of transcriptomics, proteomics and genomic data with advanced functional profiling. *Nucleic Acids Res* 2010;38(Web Server issue):W210-3.

Menkhorst E, Koga K, Van Sinderen M, Dimitriadis E. Galectin-7 serum levels are altered prior to the onset of pre-eclampsia. *Placenta.* 2014;35(4):281-5.

Miko E, Meggyes M, Bogar B, Schmitz N, Barakonyi A, Varnagy A, et al. Involvement of Galectin-9/TIM-3 pathway in the systemic inflammatory response in early-onset preeclampsia. *PLoS One.* 2013;8(8):e71811.

Milne F, Redman C, Walker J, et al. The pre-eclampsia community guideline (PRECOG): how to screen for and detect onset of pre-eclampsia in the community. *BMJ*. 2005;330(7491):576-80.

Moore-Maxwell CA, Robboy SJ. Placental site trophoblastic tumor arising from antecedent molar pregnancy. *Gynecol Oncol* 2004;92(2):708-12.

Myatt L, Clifton RG, Roberts JM, Spong CY, Hauth JC, Varner MW, et al. The utility of uterine artery Doppler velocimetry in prediction of preeclampsia in a low-risk population. *Obstet Gynecol* 2012;120(4):815-22.

Myatt L. Role of placenta in preeclampsia. *Endocrine* 2002;19(1):103-11.

Nancy J, Manuela L, Hans-Werner D. Quantitation of Human choriocarcinoma spheroid attachment to uterine epithelial cell monolayers. *In Vitro Cell Dev Biol* 1993;29A(6):461-8.

Navaratnam K, Alfirevic Z, Baker PN, Gluud C, Grüttner B, Kublickiene K, et al. A multi-centre phase IIa clinical study of predictive testing for preeclampsia: improved pregnancy outcomes via early detection (IMPROvED). *BMC Pregnancy Childbirth*. 2013;13:226.

Nelson RM, Cecconi O, Roberts WG, Aruffo A, Linhardt RJ, Bevilacqua MP. Heparin oligosaccharides bind L- and P-Selectin and inhibit acute inflammation. *Blood*. 1993; 82(11):3253-8.

Nevis IF, Reitsma A, Dominic A, McDonald S, Thabane L, Akl EA, et al. Pregnancy outcomes in women with chronic kidney disease: a systematic review. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(11):2587-98.

Nilsson E, Salonen Ros H, Cnattingius S, Lichtenstein P. The importance of genetic and environmental effects for pre-eclampsia and gestational hypertension: a family study. *BJOG*. 2004;111(3):200-6.

Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol*. 1975;122(2):262-3.

Plaks V, Rinkenberger J, Dai J, Flannery M, Sund M, Kanasaki K. Matrix metalloproteinase-9 deficiency phenocopies features of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(27):11109–14.

Pollheimer J, Fock V, Knöfler M. Review: The ADAM metalloproteinases - Novel regulators of trophoblast invasion? *Placenta*. 2014;35Suppl:S57-63.

Powe C, Levine R, Karumanchi S. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of anti-angiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation*. 2011;123(24):2856-69.

Ramathal CY, Bagchi IC, Taylor RN, Bagchi MK. Endometrial decidualization: of mice and men. *Semin Reprod Med*. 2010;28(1):17-26.

Raum D, Marcus D, Alper CA, Levey R, Taylor PD, Starzl TE. Synthesis of human plasminogen by the liver. *Science*. 1980;208(4447):1036-7.

Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*. 2005;308(5728):1592-4.

Roberge S, Nicolaides KH, Demers S, Villa P, Bujold E. Prevention of perinatal death and adverse perinatal outcome using low-dose aspirin: a meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 41(5):491-9.

Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol*. 1989;161(5):1200-4.

Roberts JM, Redman CW. Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. *Lancet* 1993; 341(8858):1447-51.

Roberts JM, Bodnar LM, Patrick TE, Powers RW. The Role of Obesity in Preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2011;1(1):6-16.

Rodger MA, Carrier M, Le Gal G, Martinelli I, Perna A, Rey E, et al. Low-Molecular-Weight Heparin for Placenta-Mediated Pregnancy Complications Study Group. Meta-analysis of low-molecular-weight heparin to prevent recurrent placenta-mediated pregnancy complications. *Blood*. 2014;123(6):822-8.

Saftlas AF, Beydoun H, Triche E. Immunogenetic determinants of preeclampsia and related pregnancy disorders: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2005;106(1):162-72.

Saito S, Sakai M, Sasaki Y, Nakashima A, Shiozaki A. Inadequate tolerance induction may induce pre-eclampsia. *J Reprod Immunol*. 2007;76(1-2):30-9.

Salamonsen LA, Dimitriadis E, Jones RL, Nie G. Complex regulation of decidualization: a role for cytokines and proteases--a review. *Placenta*. 2003;24 Suppl A:S76-85.

Sasaki H, Yonemoto N, Hanada N, Mori R. Methods for administering subcutaneous heparin during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;3:CD009136.

Shao C, Zhang F, Kemp MM, Linhardt RJ, Waisman DM, Head JF, et al. Crystallographic analysis of calcium-dependent heparin binding to annexin A2. *J Biol Chem*. 2006;281(42):31689-95.

Sibai BM. Magnesium sulfate prophylaxis in preeclampsia: Lessons learned from recent trials. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;190(6):1520-6.

Sibai BM, Stella CL. Diagnosis and management of atypical preeclampsia-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;200(5):481.e1-7.

Staff AC, Benton SJ, von Dadelszen P, Roberts JM, Taylor RN, Powers RW, et al. Redefining preeclampsia using placenta-derived biomarkers. *Hypertension*. 2013;61(5):932-42.

Subtil D, Goeusse P, Puech F, Lequien P, Biaisque S, Breart G, et al. Aspirin (100 mg) used for prevention of pre-eclampsia in nulliparous women: the Essai Régional Aspirine Mère-Enfant study (Part 1). *BJOG* 2003;110(5):475-84.

Subtil D, Goeusse P, Houfflin-Debarge V, Puech F, Lequien P, Breart G, et al. Randomised comparison of uterine artery Doppler and aspirin (100 mg) with placebo in nulliparous women: the Essai Régional Aspirine Mère-Enfant study (Part 2). *BJOG* 2003;110(5):485-91.

Sucak GT, Acar K, Sucak A, Kirazli S, Haznedar R. Increased global fibrinolytic capacity as a clue for activated fibrinolysis in pre-eclampsia. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2006;17(5): 347-52.

Trogstad L, Magnus P, Stoltenberg C. Pre-eclampsia: Risk factors and causal models. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011;25(3):329-42.

Trupin LS, Simon LP, Eskenazi B. Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparas. *Epidemiology*. 1996;7(3):240-4.

Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C, Brichant JF, Pignon MR, Noel A et al. Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(11):5555-63-

Valdés G, Quezada F, Marchant E, von Schultzendorff A, Morán S, Padilla O, et al. Association of remote hypertension in pregnancy with coronary artery disease: a case-control study. *Hypertension* 2009;53(4):733-8.

Van der Weiden RM, Helmerhorst FM, Keirse MJ. Prostanoid excretion in incipient singleton and twin pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174(5):1614-7.

Verlohren S, Galindo A, Schlembach D, Zeisler H, Herraiz I, Moertl MG, et al. An automated method for the determination of the sFlt-1/PlGF ratio in the assessment of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2010;202(2):161.e1.

Vikse B, Irgens L, Leivestad T, Skjaerven R, Iversen B: Preeclampsia and the risk of end-stage renal disease. *N Engl J Med* 2008, 359(8):800-9.

Villar J, Carroli G, Wojdyla D, Abalos E, Giordano D, Ba'aqeel H, et al. Kramer M; World Health Organization Antenatal Care Trial Research Group. Preeclampsia, gestational hypertension and intrauterine growth restriction, related or independent conditions?. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194(4):921-31.

Vinnars MT, Nasiell J, Ghazi S, Westgren M, Papadogiannakis N. The severity of clinical manifestations in preeclampsia correlates with the amount of placental infarction. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2011;90(1):19–25.

Visintin C, Mugglestone MA, Almerie MQ, Nherera LM, James D, Walkinshaw S, et al. Management of hypertensive disorders during pregnancy: summary of NICE guidance. *BMJ* 2010;341:c2207.

Von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM. Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2003;22(2):143-8.

Wallenburg HC, Dekker GA, Makovitz JW, Rotmans P. Low-dose aspirin prevents pregnancy-induced hypertension and pre-eclampsia in angiotensin-sensitive primigravidae. *Lancet* 1986;1(8471):1-3.

Wallis AB, Saftlas AF, Hsia J, Atrash HK. Secular trends in the rates of preeclampsia, eclampsia, and gestational hypertension, United States, 1987-2004. *Am J Hypertens*. 2008;21(5):521-6.

Widmer M, Villar J, Benigni A, et al. Mapping the theories of preeclampsia and the role of angiogenic factors: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2007;109(1):168-80.

Wolberg AS, Roubey RA. Annexin A2: better left alone. *Blood*. 2005;105(5):1845-6.

Xin H, Zhang Y, Wang H, Sun S. Alterations of profibrinolytic receptor annexin A2 in pre-eclampsia: a possible role in placental thrombin formation. *Thromb Res*. 2012;129(5):563-7.

Xiong X, Fraser WD, Demianczuk NN. History of abortion, preterm, term birth, and risk of preeclampsia: a population-based study. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;187(4):1013-8.

Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, Roberts JM, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J Clin Invest* 1993; 91(3):950-60.

Zhong Y, Tuuli M, Odibo AO. First-trimester assessment of placenta function and the prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Prenat Diagn* 2010; 30(4):293-308.

Zhou Y, Gormley MJ, Hunkapiller NM, Kapidzic M, Stolyarov Y, Feng V, et al. Reversal of gene dysregulation in cultured cytotrophoblasts reveals possible causes of preeclampsia. *J Clin Invest.* 2013;123(7):2862-72.

ANEXOS

ANEXO I.- Hoja Información al paciente



HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Investigador Principal: <i>(Incluir nombre, servicio y forma de localizarle)</i> Pablo Padilla Iserte / Alfredo Perales Marín, Servicio de Obstetricia, Pabellón F 3ª planta. Telf. 630306333245837
CENTRO: Hospital Universitario y Politécnico La FE
Título del proyecto de investigación: <i>Patrón de decidualización en mujeres con preeclampsia mediante la aplicación de métodos de transcriptómica, epigenómica, secretómica y proteómica.</i>

1. INTRODUCCIÓN:

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio 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 sólo 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 oportunas.

2. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA:

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar 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.

Si tiene cualquier pregunta relativa al estudio o a sus derechos como paciente, contacte con el Dr. Alfredo Perales Marín Jefe de Servicio de Obstetricia del Hospital Universitario LA FE y Profesor Titular de Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Valencia.

3. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

Se le ha propuesto que participe en un estudio piloto donde se utilizará un fragmento de su tejido endometrial con el fin de definir el patrón del proceso de decidualización en 15 mujeres con preeclampsia versus 15 mujeres sanas. Para el cuál disgregaremos las células de dicho tejido endometrial, la fracción de células estromales las decidualizaremos in vitro con el fin de determinar el perfil epigenético, genómico y proteico del endometrio decidualizado aplicando la tecnologías actuales más punteras. De esta manera, conociendo los genes y proteínas que se expresan diferencialmente en muestras de preeclampsia comparados con la situación normal, se pretende obtener un patrón que permita detectar y evaluar, de forma objetiva y precoz, mujeres

con posible predisposición a padecer preeclampsia y tratar desde el inicio como un embarazo de riesgo.

Solicitamos su permiso para obtener una pequeña biopsia endometrial para 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. Este consentimiento informado le da información detallada sobre el estudio y una vez comprendido se le solicitará que firme si desea participar en él. Se le dará una copia de este documento para que pueda guardarlo.

Su participación en este estudio es voluntaria.

4. BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO:

Le vamos a solicitar la obtención de una muestra de su endometrio mediante una cánula de plástico. Se trata de un procedimiento rutinario que le causará un dolor similar a un pinchazo. Habitualmente no hay riesgo alguno aunque en algunas ocasiones se ha descrito un pequeño sangrado y molestias que ceden en horas.

Los principales beneficios que se pueden generar de la consecución de esta investigación son:

En Ginecología, servir de alarma y diagnosticar de forma precoz la pre-eclampsia lo cual permitiría aplicar estrategias de vigilancia y prevención.

Evitando el sufrimiento de la paciente, así como el avance de la enfermedad.

Sin embargo, es posible que Ud. no se beneficie de los resultados obtenidos por razón del tiempo que se necesita para generarlos.

5. TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS:

Actualmente el único tratamiento eficaz para la preeclampsia es la terminación de la gestación (parto de la placenta), lo cual incrementa las secuelas en los hijos de madres con preeclampsia. No existe una prueba para el diagnóstico precoz de la enfermedad que permita adoptar medidas preventivas (estilos de vida, fármacos..).

Este estudio no implica un tratamiento. Quiere confirmar las diferencias entre las pacientes que han sufrido preeclampsia y las que no.

6. Nº DE URGENCIA PARA PROBLEMAS DEL ESTUDIO:

En caso de que desee formular preguntas acerca del estudio o daños relacionados con el mismo, contactar con el médico del estudio *Dr. Pablo Padilla Iserte / Dr. Alfredo Perales Marín* en el número de teléfono 630306333245837

7. CONFIDENCIALIDAD:

Este CEIC entiende que la entrega de este tipo de muestras no tiene carácter de propiedad permanente, que la donación debe estar limitada a unos objetivos claros y concretos, a un tiempo de estudio razonable (no superior a los 6 años) durante el cual el promotor tendrá la oportunidad y ventaja de realizar el estudio sobre dichas

muestras con exclusividad y sin competencias; así como desarrollar tantas patentes como pueda y le sean autorizadas.

Transcurrido este tiempo:

- Los datos de la información genética derivados del estudio deben ser públicos y/o podrán ser fácilmente consultados.
- El material genómico dejará ser propiedad del promotor y el destino del mismo debe ser decidido y/o regulado por los Organismos Gubernamentales del país de procedencia de las muestras, o en su caso, ser destruido.
- Bajo ningún concepto y en ningún momento las muestras serán motivo de lucro directo, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

Todo lo anteriormente expuesto debe ser recogido en los protocolos de ensayos clínicos y en la hoja de información al paciente.

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 sólo su médico del estudio o 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 tramitarán 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. El acceso a su historia clínica ha de ser sólo en lo relativo al estudio.

Las muestras biológicas serán custodiadas por el Dr. Carlos Simón Catedrático de Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Valencia, durante el periodo de tiempo que dure este estudio.

Al tratarse de un estudio de donde se realizarán técnicas genómicas, la utilización de las muestras, será limitada a los objetivos del estudio (creación e un perfil genómico en pacientes con preeclampsia), durante un tiempo no superior a los 6 años).

Transcurrido este tiempo:

- *Los datos de la información genética derivados del estudio deben ser públicos y/o podrán ser fácilmente consultados.*
- *El material genómico dejará ser propiedad del promotor y el destino del mismo debe ser decidido y/o regulado por los Organismos Gubernamentales del país de procedencia de las muestras, o en su caso, ser destruido.*
- *Bajo ningún concepto y en ningún momento las muestras serán motivo de lucro directo, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.*

8. COMPENSACIÓN ECONÓMICA:

El promotor del estudio es el responsable de gestionar la financiación del mismo, por lo que su participación en éste no le supondrá ningún gasto.

9. OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE:

Cualquier nueva información referente a los fármacos utilizados en el estudio que se descubra durante su participación y que pueda afectar a su disposición para participar en el estudio, le será comunicada por su médico lo antes posible.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, no se añadirá ningún dato nuevo a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente obtenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

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

El promotor podrá suspender el estudio siempre y cuando sea por alguno de los supuestos contemplados en la legislación vigente.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto. Cuando acabe su participación recibirá el mejor tratamiento disponible y que su médico considere el más adecuado para su enfermedad, pero es posible que no se le pueda seguir administrando la medicación objeto del presente estudio. Por lo tanto, ni el investigador, ni el promotor, adquieren compromiso alguno de mantener dicho tratamiento fuera de este estudio.

10. PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICOS EN MENORES DE EDAD:

No procede ya que todas las pacientes incluidas deben ser mayores de edad

ANEXO II.- Consentimiento Informado



MODELO DE CONSENTIMIENTO POR ESCRITO

Título del estudio: *Patrón de decidualización en mujeres con preeclampsia mediante la aplicación de métodos de transcriptómica, epigenómica, secretómica y proteómica.*

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: *Dr Pablo Padilla Iserte / Alfredo Perales Marín*

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.

Firma del Participante

Firma del Investigador

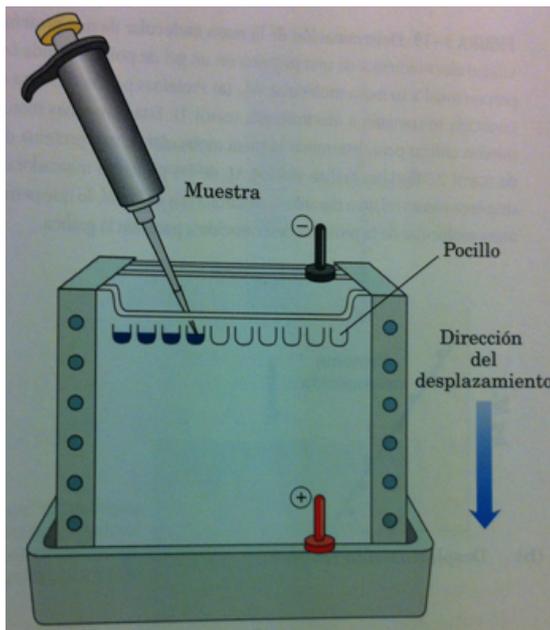
Nombre:
Fecha:

Nombre:
Fecha:

ANEXO III.- Diccionario Terminológico

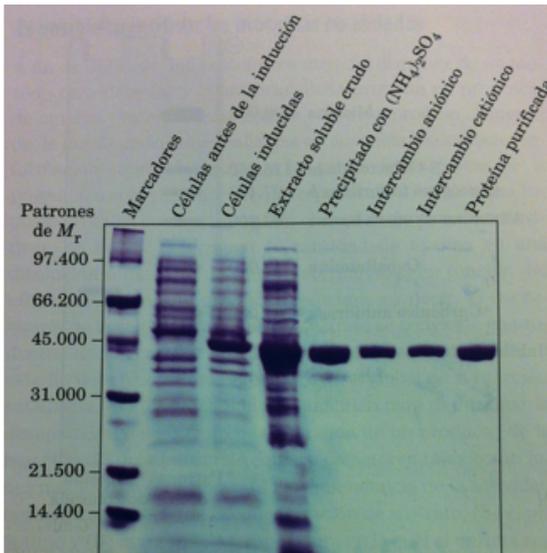
- **Electroforesis:** técnica de separación de proteínas en función de su carga eléctrica. Se basa en el desplazamiento de las proteínas cargadas en un campo eléctrico; una proteína con carga neta positiva se desplazará hacia el ánodo (negativo), una proteína con carga neta negativa se desplazará hacia el cátodo (positivo) y una proteína sin carga no se desplaza.

Es una herramienta analítica muy útil, pero el uso de métodos electroforéticos afecta a la estructura, por tanto, a la función de la proteína. Es un método sencillo, el que se puede usar para separar y visualizar las proteínas, permitiendo una estimación rápida del número de proteínas en una mezcla o el grado de pureza de una preparación con proteínas determinadas. Con la electroforesis se puede determinar el punto isoeléctrico y la masa molecular aproximada de la proteína.



Se cargan diferentes muestras en los pocillos en la parte superior del gel. Las proteínas migran a través de él cuando es aplicado un campo eléctrico (Lehninger, 2009).

Se lleva a cabo en geles formados por un polímero entrecruzado de poliacrilamida o agarosa. Estos geles actúan como un tamiz molecular, retrasando la migración de las proteínas de una forma proporcional a su cociente masa/carga, separándolas en función de su peso molecular y forma. La fuerza que mueve a la macromolécula es su potencial eléctrico, que varía en función de su tamaño y de su forma (coeficiente friccional).



Ejemplo de una electroforesis: tras realizarse se puede visualizar las proteínas tratando al gel con un colorante (como el azul de Coomassie, que se fija a las proteínas pero no al gel). Cada banda de gel representa una proteína diferente o subunidad. Las más pequeñas, migran más rápido, por lo que se encuentran más próximas al extremo inferior del gel. El primer carril muestra un conjunto de proteínas patrón (se conoce su peso molecular), se utilizan como marcadores de referencia (Lehninger, 2009).

- **Electroforesis bidimensional:** combinación secuencial del enfoque isoelectrico y electroforesis con SDS, muy usado para separación de mezclas complejas de proteínas.
- **Electroforesis SDS (dodecil sulfato sódico):** el SDS tiene la característica de unirse a la mayoría de las proteínas estudiadas, en una cantidad proporcional a la masa molecular de la proteína. A su vez, incorpora una carga neta negativa, lo que hace que la carga intrínseca de la proteína a la que se ha ligado sea insignificante, confiriendo a toda la proteína un cociente carga/masa similar, dado que todas adoptan una forma similar (al fijar el SDS altera la conformación nativa de la proteína). Por todo ello, la electroforesis con SDS, se separan las proteínas casi exclusivamente por su masa (peso molecular), con lo que los polipéptidos más pequeños se desplazarán más rápido.
- **ELISA (análisis de inmunoabsorbente unido a enzima):** técnica sencilla que permite el rastreo rápido y cuantificación de la presencia de un antígeno en una muestra. Las proteínas de la muestra se adsorben sobre una superficie inerte (generalmente una placa de poliestireno de 96 pocillos), se trata con una solución que contiene el Ac primario (dirigido contra la proteína de interés), se realiza lavado para eliminar el Ac no unido. Posteriormente se lava con una disolución de una proteína no específica (lo más frecuente caseína procedente de leche descremada en polvo), con el objetivo de bloquear los sitios no ocupados evitando que otras proteínas se unan a ellos en los pasos siguientes. Tras esto, se añade una solución que contiene el Ac secundario (Ac contra el Ac primario) conjugado a

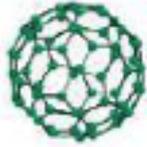
una enzima que cataliza la reacción, dando lugar tras la unión un producto coloreado. Se lava el Ac secundario no unido, y se añade el sustrato para el trabajo de la enzima conjugada. La obtención del producto obtenido (valorado mediante colorimetría) es proporcional a la concentración de la proteína de interés en la muestra inicial.



Representación esquemática del uso de reacción específica de la unión de un Ag a su Ac mediante el ELISA de manera secuencial (Lehninger, 2009).

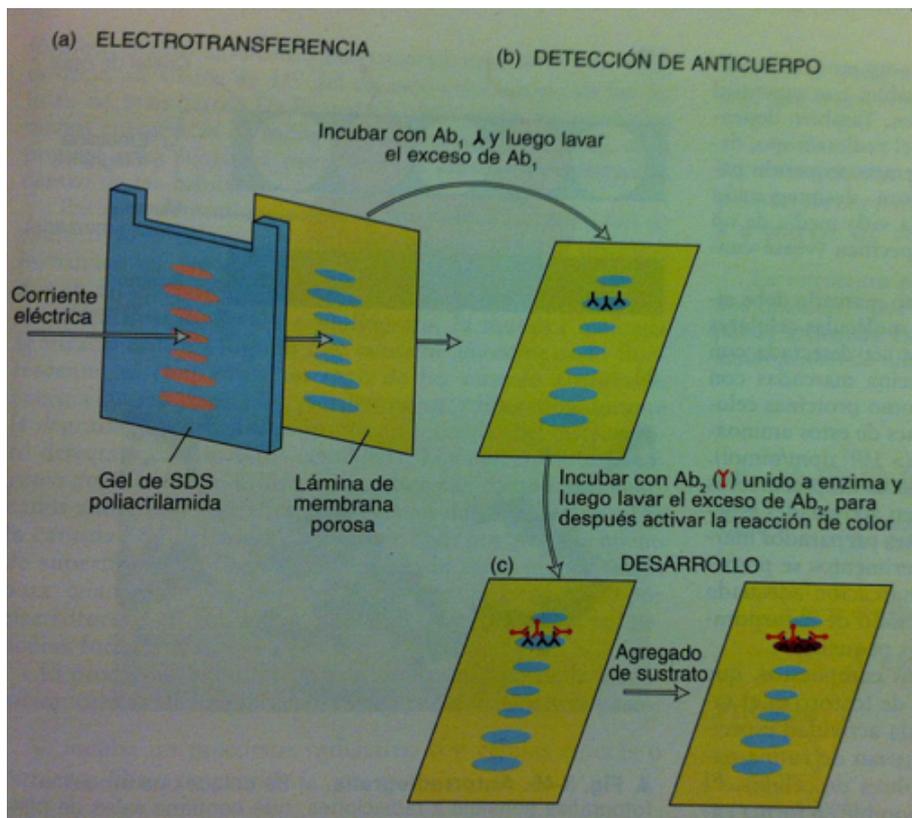
- **Enfoque Isoeléctrico:** se basa en la determinación del punto isoelectrico de una proteína. Se establece un gradiente de pH dejando una mezcla de ácidos y bases orgánicos de baja masa molecular (anfólitos) distribuyéndose espontáneamente en un campo eléctrico generado a través de un gel. Cuando se aplica una mezcla de proteínas, cada una se desplaza hasta alcanzar el pH que iguale su punto isoelectrico. Así proteínas con diferentes puntos isoelectricos se distribuyen de manera diferente en el gel. Se consigue la separación gracias a un gradiente de pH estable, basándose en el principio que la carga neta de una proteína es cero cuando el pH es igual a su punto isoelectrico.
- **Esferoides:** es un hecho común la génesis de líneas celulares mediante la creación específica de esferoides. En estudios de implantación, el uso de embriones humanos no son usados por problemas éticos y por el gran número necesario. De ahí se han utilizado líneas celulares similares al trofoblasto, mediante la formación

de esferoides (conglomerado de células estable), simulando el comportamiento del embrión humano.



Esquema representativo de la morfología de los esferoides usados en los cultivos celulares.

- **Inmunoblot (Wester Blot o ensayo de inmunotransferencia):** técnica usada para la determinación de componentes minoritarios en una muestra. Las proteínas separadas mediante electroforesis en gel se transfieren electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se boquea (de la misma forma que en ELISA), tras ello, se trata sucesivamente con Ac primario, Ac secundario conjugado con el enzima y sustrato. Se obtiene un precipitado coloreado únicamente sobre la banda que contiene la proteína de interés.



Esquema sobre el Western Blot: primero se realiza separación proteica mediante electroforesis (a), posteriormente se busca la proteína específica de manera similar como se realiza en ELISA (b,c).

- **Inmunohistoquímica:** grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los antígenos específicos. Esta reacción es visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce una coloración identificable.

- **Normalización:** el trabajo con muestras biológicas y su experimentación en laboratorio, precisa del uso controles endógenos estables. Por ejemplo, el uso de genes de referencia como β -actina o GAPDH en la normalización de la PCR, es esencial para reflejar datos fiables sobre los procesos biológicos de las proteínas objeto de estudio. Del mismo modo que se normaliza en Western Blot con la proteína β actina, la cual presenta la característica de ser indispensable para la viabilidad celular, y su expresión es constante e independiente de las condiciones experimentales. También el tener un marcador constante conocido permite obtener una cantidad relativa de la molécula de interés.

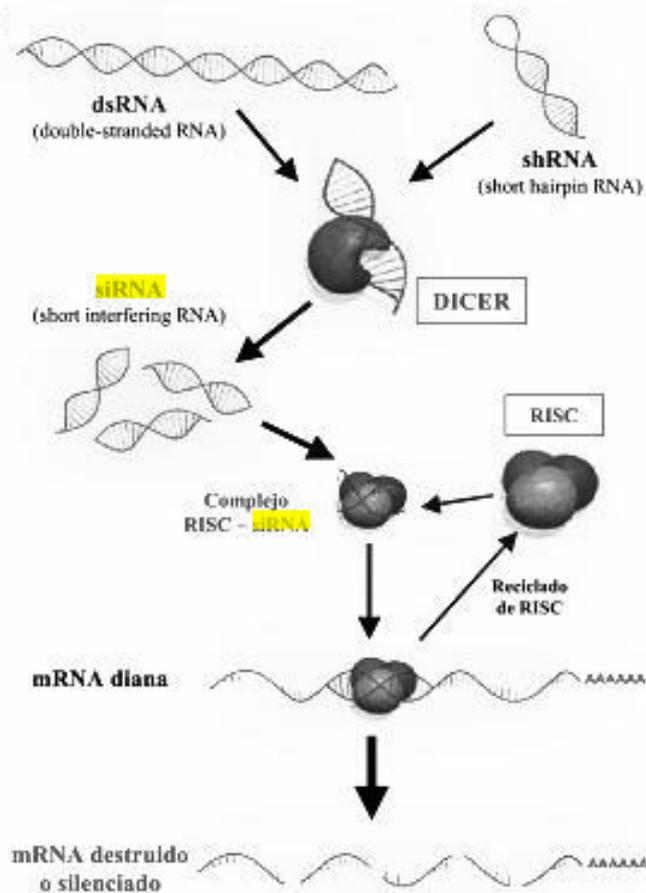
- **PCR (reacción en cadena de la polimerasa):** método enzimático in vitro que permite amplificar secuencias de DNA de forma rápida. Se calienta el DNA para separar sus dos hebras, uniéndose a cebadores (primers) al DNA diana, que servirán de base para que actúe la DNA polimerasa, sintetizando gran cantidad de nuevas cadenas.

- **PCR tiempo real:** mide la cantidad de DNA o RNA en la reacción inicial, lo que permite una cuantificación de cantidades muy pequeñas de secuencias de nucleótidos. Muy usada en la práctica habitual, dado que permite ver como responde la expresión de un gen en diferentes situaciones, valorando cuantitativamente la cantidad de mRNA producido a modo de respuesta.

- **PCR – RT (reacción en cadena de la polimerasa inversa):** utiliza mRNA como material de partida, tras la unión del primer cebador se sintetiza DNA complementario mediante transcripción inversa, utilizándose como molde para una nueva cadena de DNA.

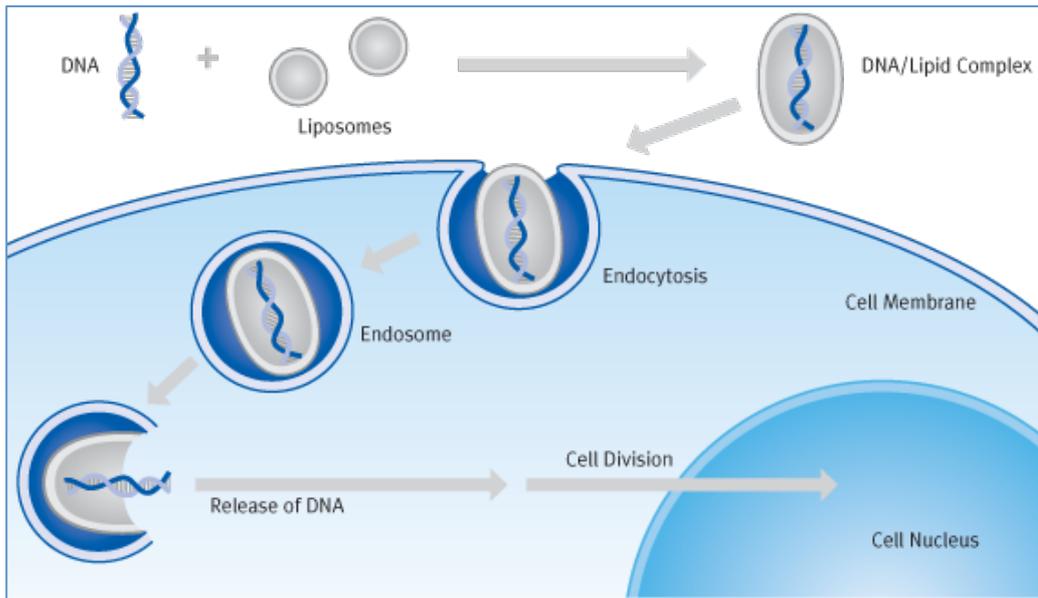
- **siRNA (small interfering RNA):** variedad de ARN interferente, con una longitud de 20 a 25 nucleótidos, bicatenario, que es altamente específico para la secuencia de nucleótidos de su ARN mensajero diana, interfiriendo por ello con la expresión

del gen respectivo, silenciándolo. Es un complejo mecanismo, con gran utilidad en Investigación sobre todo en patología oncológica.



Actuación siRNA: se centra en la acción del complejo RISC. Los siRNA permiten cebar el complejo RISC de forma que por complementariedad en la secuencia de bases entre una de las cadenas de siRNA y el mRNA diana, generan un corte específico en la cadena del mRNA unido, lo que conduce a la liberación y posterior degradación del mRNA cortado. El complejo RISC-siRNA puede volver a unirse a otra molécula de mRNA, empezando de nuevo la repetición de unión-corte-liberación-degradación, que conlleva al final con la degradación de todas las moléculas de mRNA transcritas y el silenciamiento del gen. RISC: RNA-induced silencing complex

- **siRNA scramble:** cuando se realiza silenciamiento génico, para comprobar que el proceso de transfección es debido a esta supresión y no a otros factores, como pudiera ser la presencia de material genético foráneo, es necesario el uso de controles. Para ello se utiliza scramble siRNA, que presenta la misma composición de nucleótidos que siRNA, pero no como secuencia específica, si no como una distribución “*sin sentido*”.
- **Transfección:** técnica genérica in vitro que se basa en la introducción de material genético foráneo en células eucariotas en cultivo en monocapa. El método de transfección más usado requiere DNA/RNA a inyectar junto con fosfato cálcico o dietilaminoetil dextrano. Este complejo es captado por la célula mediante endocitosis, posteriormente transfiriéndose al citoplasma y a nivel nuclear. Los detalles del mecanismo de transfección no se conocen, se suele conseguir la expresión transitoria del 10-20% de las células en cultivo.



Esquema básico del proceso de transfección, desde la unión del DNA a un vehículo (liposoma) hasta su introducción y dirección al núcleo celular.