



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y CIRUGÍA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO 3139 MEDICINA

TESIS DOCTORAL

*“Decidualización defectuosa durante y después de un embarazo con preeclampsia
revela la contribución materna en la etiología de la enfermedad”*

AUTOR:

Laura Rubert Torró

Licenciada en Medicina

DIRECTORES:

Prof. Alfredo Perales Marín

Prof. Carlos Antonio Simón Vallés

Prof. Tamara Garrido Gómez

Valencia, Marzo de 2020

Prof. Alfredo Perales Marín, Jefe de Servicio de Obstetricia del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia y Catedrático de Obstetricia y Ginecología de la Facultad Medicina de la Universidad de Valencia,

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: ***“Decidualización defectuosa durante y después de un embarazo con preeclampsia revela la contribución materna en la etiología de la enfermedad”*** ha sido realizado íntegramente por D^a. Laura Rubert Torró bajo mi dirección. Dicha memoria está 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,



Fdo. Prof. Alfredo Perales Marín

Prof. Carlos Antonio Simón Vallés, Catedrático del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Valencia y miembro del departamento de Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Harvard, Boston, EEUU,

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: ***“Decidualización defectuosa durante y después de un embarazo con preeclampsia revela la contribución materna en la etiología de la enfermedad”*** ha sido realizado íntegramente por D^a. Laura Rubert Torró bajo mi dirección. Dicha memoria está 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,

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'C' followed by a series of loops and a horizontal stroke at the end.

Fdo. Prof. Carlos Antonio Simón Vallés

Prof. Tamara Garrido Gómez, licenciada en Biología y postdoctorada en Bioquímica clínica-médica e inmunología por la Universidad de Valencia, actual bióloga de la fundación IGENOMIX,

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: ***“Decidualización defectuosa durante y después de un embarazo con preeclampsia revela la contribución materna en la etiología de la enfermedad”*** ha sido realizado íntegramente por D^a. Laura Rubert Torró bajo mi dirección. Dicha memoria está 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,

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized, cursive letters that appear to be 'TG' followed by a horizontal line extending to the right.

Fdo. Prof. Tamara Garrido Gómez

“Cada día sabemos más y entendemos menos”

Albert Einstein. Siglo XX D.C

La presente tesis doctoral ha sido realizada gracias a la mutua colaboración entre el Hospital Universitario y Politécnico La Fe y la Fundación Igenomix.

AGRADECIMIENTOS

Después de años de trabajo el proyecto de investigación en el que se basaba mi tesis doctoral ha llegado a su fin y es en este momento cuando recuerdo el día que el Doctor Alfredo Perales me ofertó dicho trabajo, siendo yo residente de primer año. No entendí muy bien porque me eligió a mí habiendo tantos compañeros en el servicio pero creo que le estaré agradecida por ello el resto de mi vida.

En primer lugar, quiero dar las gracias a los directores, Alfredo Perales, Carlos Simón y Tamara Garrido, por haber elaborado las directrices de este fabuloso trabajo y su dedicación y creencia en mi labor. Mención especial a Tamara, por su paciencia, su cercanía y comprensión y por la ilusión que me ha transmitido en todo momento, incluso cuando pensaba que no sería capaz de completar el trabajo.

En segundo lugar, dar las gracias a la fundación Igenomix y al Hospital La Fe por facilitar la comunicación entre ambos centros de trabajo para que este proyecto haya sido posible; sin olvidar a las mujeres participantes que permitieron la toma de la muestra de forma totalmente voluntaria y altruista ya que sin su colaboración, este estudio no se hubiera podido llevar a cabo. Mi más sincera admiración para el subgrupo de mujeres con antecedentes de preeclampsia que se decidieron a participar, a pesar de que dicha contribución pudiera conllevar el recuerdo de los sentimientos vividos durante el episodio de la enfermedad.

Gracias también a todos mis compañeros del Hospital La Fe, por diseñar el camino hacia la ginecóloga que actualmente soy y por permitirme formar parte de la entrañable familia que forman y de la que me siento enormemente orgullosa. En especial, agradecer a mi guardia y a mis coerres su apoyo y amistad incondicional, siempre ocuparán un lugar en mi corazón.

Gracias a Arantxa, Ana, Noelia y Almudena por su amistad eterna y sincera y por los buenos momentos que hemos vivido y viviremos.

Quiero agradecer a mi familia los valores y creencias que me han inculcado y que me han llevado a ser la persona que actualmente soy. También por su apoyo incondicional en los buenos y sobretodo los malos momentos, por ser el aliento de esperanza que me incita a levantarme y seguir. Una pequeña mención a Homer, por su compañía, fidelidad y amor incondicional.

Mis últimas líneas de agradecimiento se las reservo a Marco, mi persona favorita, mi persona especial, esa que la vida pone en tu camino cuando menos lo esperas pero cuando más

lo necesitas. Gracias por elegir ser mi compañero de viaje, mi sustento y mi mitad. Hemos superado obstáculos impensables y si en algún momento he flaqueado, levanto la cabeza y siempre estás tú. Gracias, simplemente por ser tú y por lo que yo soy desde que estoy contigo, así como por los dos trocitos de cielo que afortunadamente hemos creado y que condicionarán nuestra vida para siempre. Maite Zaitut.

Una vez más y de forma interminable, gracias a todos.

Dedicada a:

A mi familia.

A Marco, Ibai y Martín.

INDICE

<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1. <u>Decidualización humana</u>	5
1.1. <i>Endometrio: definición, tipos celulares, función y ciclo menstrual</i>	5
1.2. <i>Procesos fundamentales: Receptividad y decidualización</i>	7
1.2.1. Receptividad	7
1.2.2. Decidualización	9
1.3. Decidualización in vitro y relación con otras patologías.....	12
2. <u>Decidua en el embarazo</u>	13
2.1. <i>Capas de la decidua</i>	14
2.2. <i>Interfase materno-fetal</i>	15
3. <u>Placentación normal</u>	17
3.1. <i>Remodelación vascular durante la placentación profunda</i>	20
4. <u>Placentación superficial: PREECLAMPSIA</u>	24
4.1. <i>Definición</i>	24
4.2. <i>Epidemiología</i>	26
4.3. <i>Patogénesis</i>	28
4.4. <i>Manifestaciones clínicas</i>	35
4.5. <i>Pronóstico</i>	36
4.6. <i>Prevención</i>	37
4.7. <i>Diagnóstico precoz</i>	39
5. <u>Estudios ómicos del endometrio: Decidualización in vitro</u>	40
5.1. <i>Transcriptómica y proteínómica del endometrio</i>	41
5.2. <i>Estudios sobre decidualización</i>	42
6. <u>Anexina A2</u>	44
6.1. <i>Definición, función celular y molecular</i>	44
6.2. <i>Participación en procesos endometriales</i>	45
6.3. <i>Experimentación con modelos in vitro e in vivo</i>	46
6.4. <i>Implicación de ANXA2 en la preeclampsia</i>	47
6.5. <i>Función en otras patologías</i>	48
<u>JUSTIFICACIÓN DEL TEMA</u>	51
<u>HIPÓTESIS</u>	57

OBJETIVOS	63
1. Generales.....	65
2. Específicos.....	65
MATERIAL Y MÉTODOS	67
1. <i>Reclutamiento de pacientes y muestras biológicas</i>	71
1.1. <i>Mujeres con embarazo previo sano</i>	71
1.2. <i>Mujeres con preeclampsia severa en embarazo previo</i>	73
1.3. <i>Toma de las muestras</i>	75
1.4. <i>Características clínicas de las pacientes reclutadas</i>	77
1.4.1. <i>Características clínicas de las pacientes preeclampsia</i>	77
1.4.2. <i>Características clínicas de las pacientes control</i>	81
1.4.3. <i>Comparativa entre ambos grupos</i>	84
2. <i>Manejo y procesamiento de la muestra en el laboratorio</i>	87
2.1. <i>Recepción y procesamiento de la muestra</i>	87
2.1.1. <i>Disgregación de células epiteliales y estromales</i>	87
2.1.2. <i>Cultivo de células endometriales estromales (CEE)</i>	88
2.2. <i>Decidualización in vitro</i>	90
2.2.1. <i>Decidualización de las células estromales</i>	90
2.2.2. <i>Comprobación del proceso de decidualización</i>	91
2.2.2.1. <i>ELISA de PRL e IGFBP-1</i>	91
2.2.2.2. <i>Marcaje con actina filamentosa (actina-F)</i>	92
2.3. <i>Análisis transcriptómico y validación</i>	93
2.3.1. <i>Análisis del transcriptoma de las CEE decidualizadas in vitro</i>	94
2.3.2. <i>Validación de los resultados de expresión génica mediante RT-PCR</i>	94
2.4. <i>Estudio de Anexina A2 (ANXA2)</i>	95
2.4.1. <i>Análisis de la expresión génica de ANXA2</i>	95
2.4.2. <i>Análisis proteína ANXA2 intra/extracelular</i>	95
2.4.2.1. <i>Extracción de proteína</i>	95
2.4.2.2. <i>Cuantificación de proteína</i>	96
2.4.2.3. <i>Western blot</i>	96
2.4.3. <i>Silenciamiento ANXA2 mediante ARNi</i>	97
2.4.4. <i>Ensayo medición in vivo actina F/ actina G</i>	98

2.4.5. Estudio con ratones Knockout o nulos.....	99
2.4.5.1. Descripción de la cepa de ratones Knockout.....	100
2.4.5.2. Diseño experimental del estudio in vivo.....	101
2.4.5.3. Evaluación cuantitativa de sititos de implantación.....	102
2.4.5.4. Tinción con hematoxilina – eosina.....	103
2.4.5.5. Inmunofluorescencia ANXA2 y otras proteínas	104
3. <u>Análisis estadístico</u>	106
4. <u>Análisis bioinformático</u>	106
RESULTADOS	109
1. <u>Análisis del proceso de decidualización in vitro de células estromales endometriales procedentes de pacientes con preeclampsia comparado con embarazo previo sano</u>	113
1.1. <i>Marcadores morfológicos: Actina filamentosa</i>	115
1.2. <i>Secreción de marcadores clásicos: PRL e IGFBP-1</i>	117
1.3. <i>Análisis transcriptómico: microarrays</i>	121
2. <u>Integración de resultados transcriptómicos</u>	127
2.1. <i>Validación de algunos genes mediante RT-PCR</i>	127
2.2. <i>Análisis funcional durante la decidualización en embarazo normal</i>	128
2.3. <i>Análisis funcional en pacientes con preeclampsia</i>	130
3. <u>Anexina A2 (ANXA2): Estudio de la expresión génica y proteica</u>	134
3.1. <i>Validación por técnicas de RT-PCR</i>	134
3.2. <i>Análisis de expresión intracelular de ANXA2</i>	135
4. <u>Estudio in vitro sobre la ruta de acción de ANXA2</u>	138
4.1. <i>Inhibición de ANXA2 y efecto sobre decidualización: morfología</i>	139
4.2. <i>Inhibición de ANXA2 y efecto sobre decidualización: secreción de marcadores</i>	143
5. <u>Estudio in vivo con ratón Knockout para ANXA2</u>	145
5.1. <i>Efecto sobre marcadores de decidualización</i>	145
5.2. <i>Estudio descriptivo sobre embarazo de ratones ANXA2 KO o nulos</i>	149
5.3. <i>Características relacionadas con la placentación</i>	152

<u>DISCUSIÓN</u>	157
1. <i>Resistencia a la decidualización in vitro en mujeres con antecedentes de PEs</i>	163
2. <i>Análisis transcripcional de las CEE decidualizadas in vitro procedentes de embarazo con PEs previa</i>	165
3. <i>Expresión reducida de anexina A2 durante la decidualización in vitro en CEE de mujeres con PEs</i>	166
4. <i>Mimetización de la decidualización anómala mediante silenciamiento de ANXA2</i>	168
5. <i>Papel in vivo de ANXA2 sobre la decidualización y desarrollo placentario</i>	170
6. <i>Implicaciones clínicas de los resultados</i>	173
7. <i>Implicaciones de los resultados en investigación</i>	175
8. <i>Fortalezas y limitaciones del proyecto de investigación actual</i>	177
<u>CONCLUSIONES</u>	181
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	187
<u>ANEXOS</u>	211

INDICE DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIGLAS

AAS	Ácido Acetilsalicílico
Ag	Antígeno
Ac	Anticuerpo
Actina- F	Actina Filamentosa
Actina-G	Actina Globular
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANGPT	Angiopoyetina
ANXA2	Anexina A2
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia pequeño o de silenciamiento
ARNm	ARN mensajero
ARNmi	MicroARN
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN de transferencia
ASB	Abúmina de suero bovino
AT-II	Angiotensina II
CD31	Grupo de diferenciación 31
CEE	Células estromales endometriales
CEEd	Células estromales endometriales decidualizadas
CID	Coagulación intravascular diseminada
CIR	Crecimiento intrauterino restringido
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
CTB	Citotrofoblasto
DAPI	Marcador 4 ',6-diamidino-2-fenilindol
DIU	Dispositivo intrauterino
dL	Decilitros
DMEM	medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco
DMEM/F12	medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco con Mixtur F-12
DPPNI	Desprendimiento prematuro de placenta normoinserta
DSM	Desviación estandar de la media
E	Estrógenos

EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERA	Análisis de receptividad endometrial
FBN	Fibrinógeno
FDR	Tasa de descubrimientos falsos
FG	Filtrado glomerular
FIV	Fecundación in vitro
FM	Fórmula menstrual
FUR	Fecha última regla
FvW	Factor de Von Willebrand
GDE	Genes diferencialmente expresados
GOT	Aspartato aminotransferasa o transaminasa glutámico oxalacética
GPCRs	Receptores asociados a proteína G
GPT	Alanina aminotransferasa o transaminasa glutámico pirúvica
Hb	Hemoglobina
H-E	Hematoxilina - Eosina
HELLP	Síndrome que asocia Hemólisis, trombocitopenia e hipertransaminasemia
HOXA10	Homeobox A10
HTA	Hipertensión arterial
IC	Intervalo de confianza
IFN- γ	Interferón gamma
IGFBP-1	Proteína de unión al factor de crecimiento 1 de la insulina
IL	Interleuquina
Kb	Kilobytes
MAPA	Monitorización ambulatoria de la presión arterial
mg	Miligramos
mL	Mililitros
MMP	Metaloproteinasas
MMPs	metaloproteinasas de matriz
MPA	Medroxiprogesterona
Neor	Neomicina
ng	Nanogramos
NKu	Natural Killers uterinos
OCT	Compuesto de temperatura de corte óptimo

OMS	Organización mundial de la salud
P	Progesterona
PBS	Tampón fosfato salino
PE	Preeclampsia
PEs	Preeclampsia severa
PFA	Paraformaldehido
pg	picogramos
PGE2	Prostaglandina E2
PGF	Factor de crecimiento placentario
PKA	Proteinkinasa A
PPT	Parto pretérmino
PRL	Prolactina
Ratones KO	Ratones silenciados o nulos
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa
RE	Receptores de estrógenos
RP	Receptores de progesterona
rpm	Revoluciones por minuto
RPM	Rotura prematura de membranas
RPM-PT	Rotura prematura de membranas pretérmino
RR	Riesgo relativo
SAF	Síndrome antifosfolípido
SBF	Suero bovino fetal
SDS	dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
sEng	Endoglina soluble
sFlt-1	Factor soluble similar a la tirosinkinasa 1
SI	Sistema inmune
SNC	Sistema nervioso central
STB	Sincitiotrofoblasto
Tª	Temperatura
TAd	Tensión arterial diastólica
TAs	Tensión arterial sistólica
TFB	Trofoblasto
TGF-β1	Factor de crecimiento trofoblástico β1

TK	Timidina kinasa
UI	Unidades Internacionales
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
ZUM	Zona de unión miometrial
%	Porcentaje

LISTA DE TABLAS Y ALGORITMOS

Algoritmo 1. Representación del total de muestras procedentes de PEs recogidas para el estudio

Algoritmo 2. Representación del total de muestra procedente de mujeres con antecedente de gestación normal recogidas para el estudio.

Tabla 1. Características de las muestras preeclampsia.

Tabla 2. Paridad, raza y antecedentes obstétricos de las muestras preeclampsia.

Tabla 3. Características de las 13 pacientes del grupo preeclampsia severa al diagnóstico.

Tabla 4. Características de las muestras control

Tabla 5. Características de las 13 pacientes del grupo control en el momento de finalizar su gestación.

Tabla 6. Comparación de las medias obtenidas en cada valor estudiado de las mujeres incluidas en ambos grupos de estudio.

Tabla 7. Comparación características maternas y neonatales.

Tabla 8. Dilución de Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en cada caso para la técnica de inmunofluorescencia así como su número de referencia y la fuente de obtención.

Tabla 9. Características maternas y neonatales de donantes endometriales.

Tabla 10. Características basales de las mujeres donantes de endometrio sometido al estudio transcriptómico.

Tabla 11. Resumen de los 5 GDE entre las CEE no decidualizadas de ambos grupos de estudio.

Tabla 12. Análisis transcriptómico de los 25 GDE más relevantes de entre los 74 totales existentes entre las CEE decidualizadas y no decidualizadas del grupo control.

Tabla 13. Análisis transcriptómico de los 25 GDE más relevantes de entre los 129 totales existentes entre las CEE decidualizadas procedentes de ambos grupos.

Tabla 14. Análisis transcriptómico de ANXA2 y la expresión de ARNm en las CEE decidualizadas para cada una de las muestras de ambos grupos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases del endometrio a lo largo del ciclo menstrual y las principales funciones que acontecen en cada etapa.

Figura 2. Irrigación arterial del endometrio, su distribución y la formación de las lagunas vasculares.

Figura 3. Las 4 fases de la implantación embrionaria humana y el día postfecundación aproximado en el que se produce cada una de ellas.

Figura 4. Remodelación vascular de la arteria espiral miometrial a las 15 semanas.

Figura 5. Inducción a decidualización in vitro

Figura 6. Capas de la decidua.

Figura 7. Interfase materno-fetal y su circulación hemocorioendotelial.

Figura 8. Inicio de la placentación humana y su circulación.

Figura 9. Evolución de las vellosidades coriónicas placentarias.

Figura 10. Composición celular endovascular de venas y arterias espirales.

Figura 11. Invasión trofoblástica endometrial y miometrial y la consecuente remodelación vascular.

Figura 12. Invasión trofoblástica intersticial y endovascular profunda.

Figura 13. Invasión trofoblástica intersticial y endovascular superficial.

Figura 14. Vasos espirales con invasión profunda en gestación normal.

Figura 15. Vasos espirales con invasión superficial en preeclampsia.

Figura 16. Hipótesis del papel que desarrolla sFlt-1 en la preeclampsia

Figura 17. Evolución de la concentración media de sFlt – 1 en pg/ml durante el curso gestacional normal y el complicado con preeclampsia.

Figura 18. Esquema que simplifica el proceso en el que se centra cada ciencia ómica dentro del ciclo molecular.

Figura 19. Proceso de obtención de las muestras control y preeclampsia severa.

Figura 20. Proceso de obtención de células estromales endometriales (CEE) a partir de una biopsia endometrial.

Figura 21. Inducción a la decidualización in vitro mediante los dos protocolos posibles.

Figura 22. Análisis de la decidualización de las células estromales endometriales obtenidas a partir de las biopsias realizadas a ambos grupos de estudio.

Figura 23. Diseño del estudio sobre el efecto del bloqueo de ANXA2 en la decidualización y placentación in vivo mediante el uso de ratones hembra ANXA2^{-/-} comparadas con ratones hembra ANXA2^{+/+} embarazadas.

Figura 24. Úteros extraídos por laparoscopia de ratones hembra con los fetos en su interior y los sitios de implantación.

Figura 25. Células estromales endometriales del grupo control teñidas con Rodamina- Faloidina y DAPI antes y después de ser sometidas in vitro al estímulo de decidualización.

Figura 26. Células estromales endometriales del grupo Preeclampsia severa teñidas con Rodamina- Faloidina y DAPI antes y después de ser sometidas in vitro al estímulo de decidualización.

Figura 27. Niveles de PRL y de IGFBP-1 medidos en pg/mL y determinados mediante ELISA, secretados al medio condicionado por las CEE control y PEs previo, a los 5 días de cultivo sin aditivos o tras añadir MPA+ AMPc (decidualizadas).

Figura 28. Niveles de PRL secretados al medio de cultivo condicionado de las CEE control antes y después de la inducción a la decidualización.

Figura 29. Comparación de los niveles de PRL secretados en el medio de cultivo de las CEE del grupo PEs previo sometidas a decidualización in vitro, comparado con CEE control que se cultivaron en ausencia de los inductores de este proceso.

Figura 30. Comparación de los niveles de IGFBP-1 en el medio de cultivo de las CEE del grupo control antes y tras la adición de MPA y AMPc y posterior cultivo durante días.

Figura 31. Comparación de los niveles de IGFBP-1 en el medio de cultivo de las CEE del grupo preeclampsia severa previa, antes y tras la adición de MPA y AMPc y posterior cultivo durante días.

Figura 32. Diseño del estudio desde la obtención de las muestras de ambos grupos (control y preeclampsia severa previa) y su procesamiento hasta análisis transcriptómico global.

Figura 33. Genes diferencialmente expresados (GDE) hallados en el análisis transcriptómico entre las CEE control y las PEs, tanto antes como después de la decidualización.

Figura 34. Validación de los resultados de microarray mediante la técnica RT-PCR.

Figura 35. Representación gráfica de las rutas biológicas reguladas al alza durante la decidualización in vitro de las células endometriales procedentes del grupo control.

Figura 36. Representación gráfica de las rutas biológicas proteica reguladas al alza y a la baja durante la decidualización in vitro de las células endometriales procedentes del grupo PEs.

Figura 37. Diagrama de Venn en el que se representa el solapamiento entre los genes diferencialmente expresados que fueron encontrados sobreexpresados durante la decidualización in vitro de las células de mujeres que tuvieron una gestación normal e infraexpresados durante la decidualización in vitro de las células de mujeres con PEs previa.

Figura 38. Diagrama de Venn en el que se representa el solapamiento entre los genes diferencialmente expresados que fueron infraexpresados en el análisis transcriptómico durante la decidualización in vitro de las células de mujeres que tuvieron una gestación normal y sobreexpresados durante la decidualización in vitro de las células de mujeres con PEs previa.

Figura 39. Validación de datos de microarrays mediante RT-PCR.

Figura 40. Niveles de proteína ANXA2 intracelular (ng/mL) medidos de CEE tratadas con ambos protocolos de inducción a la decidualización.

Figura 41. Niveles de proteína ANXA2 intracelular en la muestra de CEE antes y después de la decidualización in vitro de ambos grupos de estudio.

Figura 42. Evaluación del ARNm mediante RT-PCR en el grupo de CEE sin transferencia de ARNi (control), en el que se añade ARNi inespecífico (control ARNi) y en el que se transfiere ARNi ANXA2.

Figura 43. Estudio densitométrico mediante Western-Blot que evidencia la abundancia proteica de ANXA2 tras su bloqueo a nivel genético con ARNi, normalizado con β -actina (control endógeno) en los tres grupos de análisis.

Figura 44. Cuantificación relativa de la abundancia proteica de ANXA2 a las 24h tras la inhibición de su ARNm en los tres grupos de análisis.

Figura 45. Cambio morfológico de las CEE antes y después de la decidualización en controles y en células silenciadas con ARNi ANXA2.

Figura 46. Relación entre la actina G y la actina F mediante Western Blot tanto en las CEE no decidualizadas como en las decidualizadas de ambos grupos.

Figura 47. Relación entre la actina G y la actina F tanto en las CEE no decidualizadas como en las decidualizadas de ambos grupos.

Figura 48. Valores de PRL secretados antes y después de la decidualización en los tres grupos estudiados, medidos mediante ELISA.

Figura 49. Valores de IGFBP-1 secretados antes y después de la decidualización en los tres grupos estudiados, medidos mediante ELISA.

Figura 50. Secciones de endometrio uterino de ratonas no embarazadas en el que se muestra la ausencia de inmunorreactividad para PRL e IGFBP-1.

Figura 51. Secciones de tejido placentario y decidua de ratones ANXA2^{+/+} y ANXA2^{-/-} en el día embrionario 5.

Figura 52. Niveles de expresión de PRL en secciones de tejido placentario y decidua de ratones salvajes (ANXA2^{+/+}) y silenciados para anexina A2 (ANXA2^{-/-}) en el día embrionario 5 y 8.

Figura 53. Niveles de expresión de IGFBP-1 en secciones de tejido placentario y decidua de ratones salvajes (ANXA2^{+/+}) y silenciados para anexina A2 (ANXA2^{-/-}) en el día embrionario 5 y 8.

Figura 54. Número de sitios de implantación en los ratones ANXA2 ^{+/+} y ANXA2 ^{-/-} a día embrionario 16.

Figura 55. Peso en gramos del sitio de implantación de la masa embrionaria en los ratones ANXA2 ^{+/+} y ANXA2 ^{-/-} a día embrionario 16.

Figura 56. Imágenes del aspecto macroscópico de fetos y placentas de ratones ANXA2^{+/+} y ANXA2^{-/-}.

Figura 57. Peso en gramos del tejido placentario en los ratones ANXA2 ^{+/+} y ANXA2 ^{-/-} a día embrionario 16.

Figura 58. Peso en gramos del tejido fetal en los ratones ANXA2 ^{+/+} y ANXA2 ^{-/-} a día embrionario 16.

Figura 59. Interfaz materno-fetal del sitio de implantación de ambos grupos ANXA2 de ratones teñida con hematoxilina-eosina.

Figura 60. Estudio de la inmunorreactividad relativa a CD31 en Secciones de interfaz materno-fetal de ratones ANXA2^{+/+} y ANXA2^{-/-} en día 16 embrionario.

Figura 61. Estudio de la inmunorreactividad relativa al factor de Von Willebrand (FvW) en Secciones de interfaz materno-fetal de ratones ANXA2^{+/+} y ANXA2^{-/-} en día 16 embrionario.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. <u>Decidualización humana</u>	5
1.1. <i>Endometrio: definición, tipos celulares, función y ciclo menstrual</i>	5
1.2. <i>Procesos fundamentales: Receptividad y decidualización</i>	7
1.2.1. Receptividad	7
1.2.2. Decidualización	9
1.3. <i>Decidualización in vitro y relación con otras patologías</i>	12
2. <u>Decidua en el embarazo</u>	13
2.1. <i>Capas de la decidua</i>	14
2.2. <i>Interfase materno-fetal</i>	15
3. <u>Placentación normal</u>	17
3.1. <i>Remodelación vascular durante la placentación profunda</i>	20
4. <u>Placentación superficial: PREECLAMPSIA</u>	24
4.1. <i>Definición</i>	24
4.2. <i>Epidemiología</i>	26
4.3. <i>Patogénesis</i>	28
4.4. <i>Manifestaciones clínicas</i>	35
4.5. <i>Pronóstico</i>	36
4.6. <i>Prevención</i>	37
4.7. <i>Diagnóstico precoz</i>	39
5. <u>Estudios ómicos del endometrio: Decidualización in vitro</u>	40
5.1. <i>Transcriptómica y proteómica del endometrio</i>	41
5.2. <i>Estudios sobre decidualización</i>	42
6. <u>Anexina A2</u>	44
6.1. <i>Definición, función celular y molecular</i>	44
6.2. <i>Participación en procesos endometriales</i>	45
6.3. <i>Experimentación con modelos in vitro e in vivo</i>	46
6.4. <i>Implicación de ANXA2 en la preeclampsia</i>	47
6.5. <i>Función en otras patologías</i>	48

INTRODUCCIÓN

1. Decidualización humana.

1.1. Endometrio: Definición, tipos celulares, función y ciclo menstrual

El endometrio es el revestimiento mucoso de la cavidad uterina. Está formado por células estromales, epiteliales, linfocitos y leucocitos y arterias helicoidales denominadas arterias espirales. Es el sitio anatómico de aposición e implantación del blastocisto y del desarrollo placentario, siempre que el contacto se produzca durante el periodo de mayor receptividad endometrial (ventana de implantación) que suele coincidir con los días 20-24 del ciclo menstrual (Figura 1).

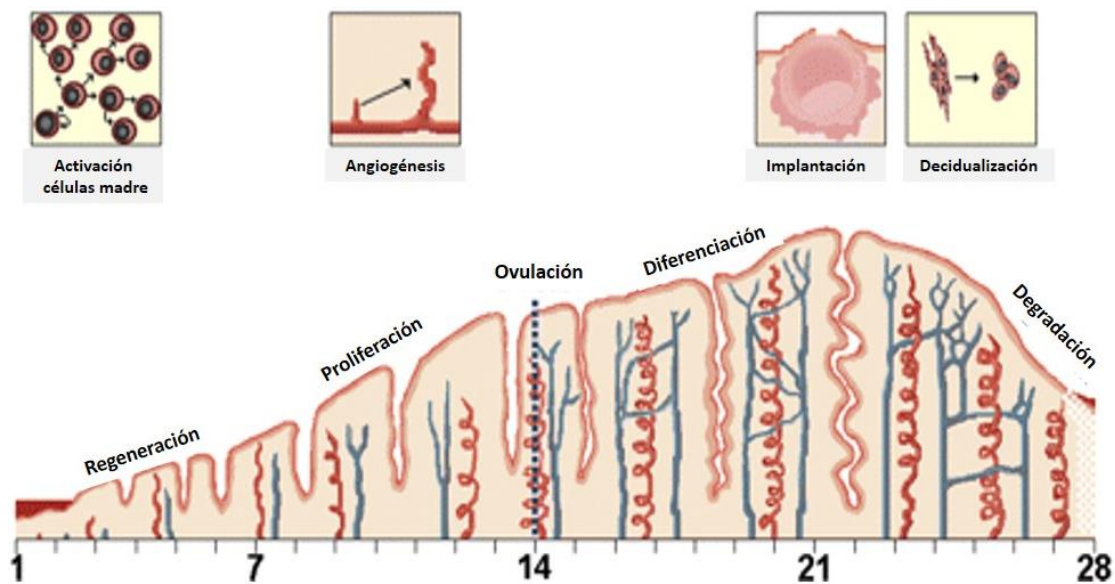


Figura 1. Fases del endometrio a lo largo del ciclo menstrual y las principales funciones que acontecen en cada etapa.

Modificado de: Munro SK, Farquhar CM, Mitchell MD, et al. *Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle*. *Molecular Human Reproduction* 2010. 16 (5), 297–310

El ciclo endometrial, menstrual o fértil de la mujer es dinámico, con un promedio de duración de 28 días y consta de 4 fases consecutivas y cíclicas que suceden a lo largo de este tiempo (Munro, 2010). La primera fase o *proliferativa*, inducida por estrógenos (E), es el periodo de tiempo iniciado desde la menstruación, con una duración aproximada de 14 días y se corresponde con el crecimiento del epitelio endometrial a expensas del incremento del número de células (sobre todo CEE) y vasos sanguíneos locales. La segunda fase es la concordante con la *ovulación*, que en un ciclo de 28 días, se produce en torno al día 14 y se corresponde con el

momento de rotura del folículo ovárico y liberación del ovocito para su posterior fecundación durante el trayecto tubárico hasta la cavidad uterina. A partir de la ovulación se inicia la tercera fase denominada *secretora o de diferenciación* en la que, gracias a la influencia de la progesterona liberada por el cuerpo lúteo presente tras la ovulación, tanto las CEE como los vasos sanguíneos cambian su morfología y secreción bioquímica para preparar al tejido ante una posible adhesión e implantación embrionaria siempre que haya habido fecundación. Estos cambios morfológicos y bioquímicos que se producen tras la ovulación para aumentar la receptividad endometrial forman parte del proceso de decidualización endometrial. Finalmente, si el ovocito no es fecundado por ningún espermatozoide, el endometrio inicia una serie de fenómenos bioquímicos de degradación tisular que concluyen en la cuarta fase denominada *menstruación* y en la que se expulsa el producto de dicha degeneración mediante un sangrado vaginal autolimitado de 5-7 días de duración.

Las cuatro funciones características del endometrio, cada una de ellas sucedidas en una etapa o fase endometrial son la implantación y decidualización acontecidas durante la fase secretora o de diferenciación endometrial y que se desarrollarán en un apartado individual por su importancia en el correcto desarrollo embrionario y curso gestacional, la activación de las células madre en fase menstrual o regenerativa inicial para conseguir una nueva renovación epitelial y la angiogénesis que se desarrolla en fase proliferativa a expensas de las arterias arteriales las cuales aumentan tanto en número como en tamaño para poder irrigar ese nuevo tejido endometrial en crecimiento.

Angiogénesis

El endometrio se irriga por dos tipos de vasos: las arterias rectas, que irrigan el tercio basal del endometrio, y las arterias espirales o helicinas que irrigan los dos tercios más superficiales del tejido. Estas últimas se originan en las arterias arcuatas, que a su vez son ramas de las arterias uterinas y se consideran esenciales para establecer los cambios en el flujo sanguíneo (figura 2).

Durante la fase secretora, lútea o de diferenciación endometrial, las arterias espirales presentan un notable crecimiento y desarrollo, volviéndose más tortuosas y formando una red capilar sobre la superficie del endometrio, resultando los primeros vasos en ser invadidos por citotrofoblastos del blastocisto durante la implantación, en caso de que esta se produzca.

Es probable que las células estromales y epiteliales del endometrio produzcan agentes angiogénicos específicos en respuesta al ambiente estrogénico de la primera fase del ciclo menstrual. Sin embargo, con la regresión del crecimiento endometrial, el espiralado de las

arterias helicoidales se vuelve más severo, aumenta marcadamente la resistencia al flujo y se desarrolla una estasis profunda con la consecuente hipoxia endometrial y degradación tisular que inicia la fase menstrual.

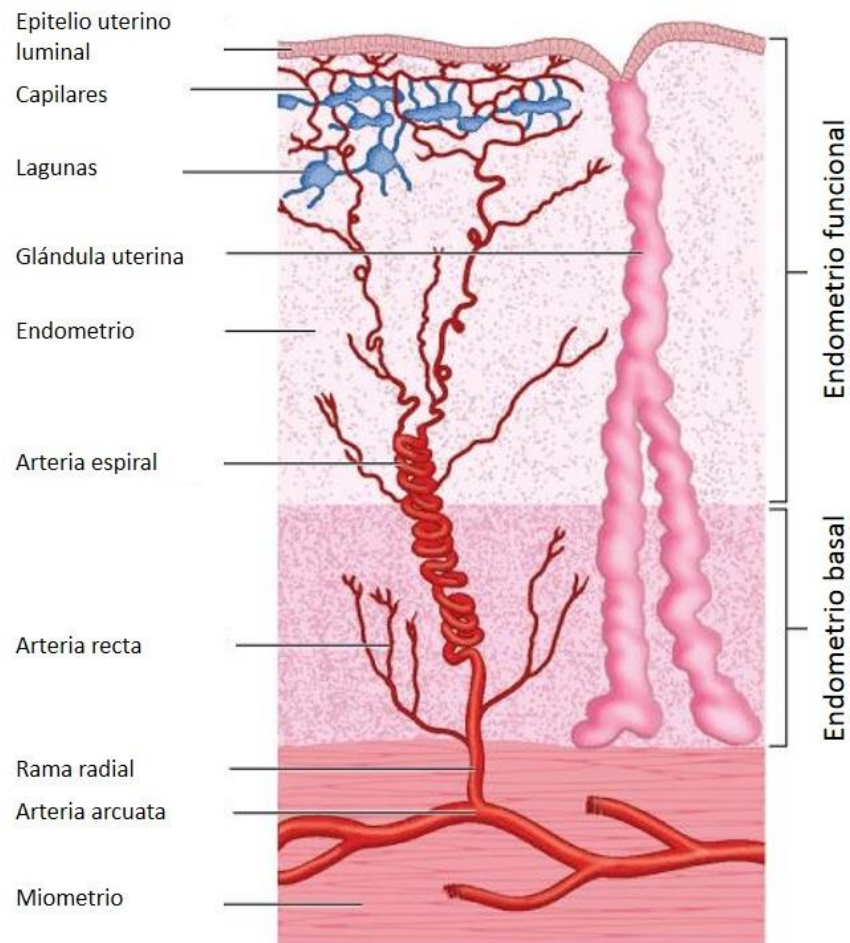


Figura 2. Representación anatómica de la irrigación arterial del endometrio, su distribución por las diferentes capas y la formación de las lagunas vasculares.

García-Soler, J. (2018). *El aparato reproductor femenino*. [figura]. Recuperado de <http://www.docplayer.es/80106061-Aparato-reproductor-femenino.html>

1.2. Procesos fundamentales: Receptividad y decidualización.

1.2.1. Receptividad endometrial

La receptividad endometrial o también denominada ventana de implantación es el periodo de tiempo en el que el endometrio permite con mayor facilidad la aposición e implantación embrionaria y, como se ha mencionado anteriormente, suele coincidir con los días 20-24 del ciclo menstrual (Domínguez, 2009).

La adquisición de receptividad acontece de forma simultánea a la decidualización del estroma y se caracteriza por la expresión de un fenotipo secretor glandular, cambio en la composición de la matriz extracelular y desarrollo de las arterias espirales con edema del estroma, necesario para la nutrición embrionaria previa al establecimiento de la circulación materno-fetal (Degner, 2017).

La implantación

El contacto directo entre el blastocisto y el endometrio materno se establece, por primera vez en torno al 6º día postfecundación del ovocito. En ese momento se establece el proceso de implantación que, en la especie humana, es de tipo intersticial ya que el blastocisto queda totalmente rodeado por tejido materno (Cha, 2012).

La implantación embrionaria consta de 3 etapas. La primera de ellas, *aposisión*, supone el íntimo contacto entre las células del trofoectodermo y el epitelio luminal del endometrio, pero sin establecer ninguna conexión (Figura 3).

La segunda etapa, denominada adhesión, se caracteriza por la interdigitación de las microvellosidades trofoectodérmicas con las microprotrusiones o pinópodos del epitelio luminal endometrial. Una vez adherido el blastocisto al epitelio endometrial, el trofoblasto empieza a proliferar y se diferencia de forma gradual en dos capas, el citotrofoblasto (CTB) que comprenden las células más próximas al embrión, y el sincitiotrofoblasto (STB) que es la masa celular más externa, encargada de completar la tercera etapa de la implantación, *la invasión* o introducción entre las células endometriales (Burton, 2011).

Para que la implantación se desarrolle correctamente es imprescindible que exista un adecuado diálogo embrión-endometrio, siendo este un proceso activo, regulable y bidireccional, en el que están involucradas muchas moléculas solubles como metaloproteasas (MMP9 o MMP2), citoquinas (leptina) o quimioquinas (subfamilia de citoquinas capaces de establecer quimiotaxis), destacando entre ellas la L-selectina o las integrinas (Carson, 2000).

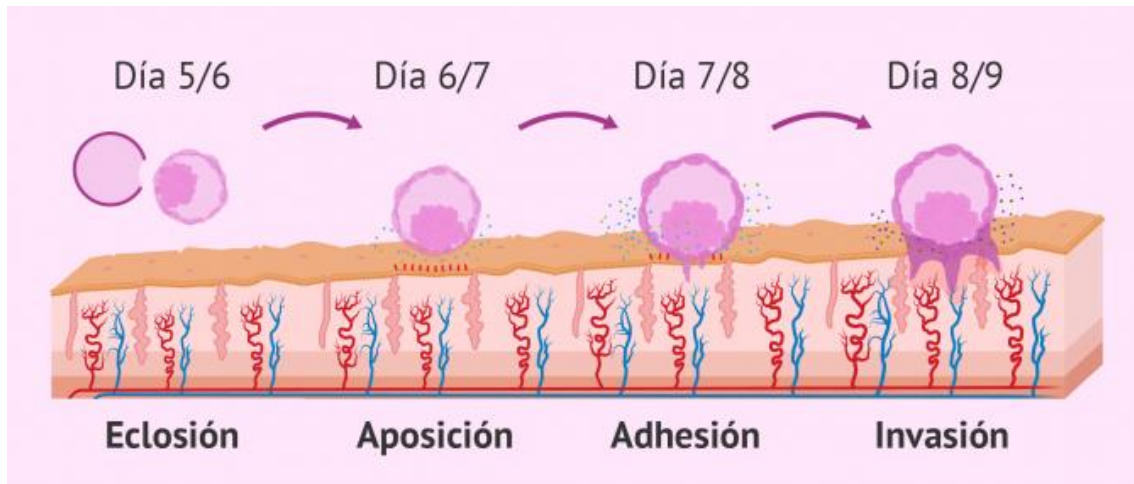


Figura 3. Ilustración que muestra las 4 fases que conforman la implantación embrionaria humana y el día postfecundación aproximado en el que se produce cada una de ellas.

Muñoz M, Salgado S, Jiménez S, et al. (2018). *¿Qué es la implantación del embrión y cuando se produce?*. [figura]. Recuperado de [http:// https://www.reproduccionasistida.org/implantacion-embionaria/](http://https://www.reproduccionasistida.org/implantacion-embionaria/)

1.2.2. Decidualización

La decidualización se define como el proceso de transformación de las células endometriales mediante cambios morfológicos, bioquímicos y genéticos dirigidos hormonalmente por la acción de los estrógenos (E) y progesterona (P) que convierten al endometrio en tejido materno diferenciado preparado para la invasión embrionaria y posterior placentación (Maruyama, 2008).

A pesar de que se trata de un proceso independiente de la señal del blastocisto, en el endometrio humano, la reacción decidual se completa sólo con su implantación (Gellersen, 2014). No obstante, la dominancia de la progesterona (P) durante la segunda fase del ciclo menstrual inicia los cambios predeciduales que comienzan primero en las células estromales endometriales (CEE) adyacentes a las arterias helicinas y arteriolas y posteriormente se extienden al resto del endometrio (Gellersen, 2010). Las CEE, inicialmente fibroblásticas y fusiformes con receptores para la progesterona, se transforman en células endometriales estromales decidualizadas (CEE_d) poligonales o esféricas con núcleos redondeados o vesiculares y el citoplasma claro, levemente basófilo y rodeado por una membrana traslúcida.

Las CEE_d presentan capacidad de liberar factores de crecimiento como la prolactina (PRL) y la proteína de unión al factor de crecimiento 1 de insulina (IGFBP-1), ambos considerados

marcadores clásicos del proceso de decidualización, así como metaloproteasas (MMP), citoquinas, glucógeno IV u otros componentes de matriz extracelular (laminina, colágeno tipo IV, fibronectina, heparán sulfato y proteoglicano) (Gellersen, 2014).

Regulación hormonal del proceso de decidualización

La acción de la P en células sensibilizadas por adenosín monofosfato cíclico (AMPc) e impregnadas por E, inicia la reacción decidual de las CEE (Gellersen, 2003; Gellersen 2007).

Durante la primera mitad del ciclo menstrual, los estrógenos, mediante su unión a sus respectivos receptores (RE), inducen la proliferación y crecimiento celular. En la segunda mitad, la progesterona interacciona con receptores específicos de esta hormona (RP) e inducen cambios bioquímicos y morfológicos en las CEE (Maruyama, 2008). Dichos receptores se localizan en las CEE previamente sensibilizadas por AMPc intracelular mediante la vía de la proteinkinasa A (PKA) y la interacción se lleva a cabo predominantemente mediante su isoforma PR-A.

La sensibilización de las CEE a la progesterona es posible gracias a la síntesis de AMPc intracelular, cuya activación es constante en este grupo celular por la unión a receptores asociados a proteínas G (GPCRs) de moléculas como prostaglandinas E2 (PGE2), relaxina, hormona liberadora de corticotropina (CRH) o gonadotropinas (FSH/LH) entre otras. Esta unión molécula-receptor concluye en el aumento de la síntesis de AMPc o disminución de su eliminación, a través de la activación de la adenilato ciclasa (PGE2), la disminución de la fosfodiesterasa (relaxina) o de la vía Fas/FasL (CRH), (Gellersen, 2003).

Entre los distintos factores de transcripción implicados en la acción de los estrógenos y la progesterona sobre la decidualización destaca el FOXO1 y STAT-5 por regular la expresión de IGFBP-1 y PRL respectivamente, y el homeobox A10 (HOXA10) (Ramathal CY, 2010).

Remodelación de las arterias espirales durante la decidualización

Durante la decidualización, además de los cambios celulares estromales, también se producen un conjunto de procesos a nivel de las arterias espirales del estroma endometrial y de la zona de unión miometrial (ZUM) (Craven, 1998) que comprenden inflamación y vacuolización endotelial y desorganización del músculo liso vascular mediado por los macrófagos localizados a ese nivel que secretan factores de crecimiento angiogénico (Li, 2008) e inducen la apoptosis

de células endoteliales y musculares lisas (Smith, 2009). Estos cambios suponen una disminución de la actividad vasomotora e incremento del flujo sanguíneo materno a la placenta, el cual se acentúa tras la invasión trofoblástica endovascular (figura 4).

A nivel de la ZUM se desconoce quién origina esta remodelación vascular preinvasora aunque estudios recientes (Bulmer, 2005) involucran a los macrófagos invasores como posibles iniciadores mediante la secreción de factores de crecimiento angiogénico a este nivel (Schiessl, 2009)

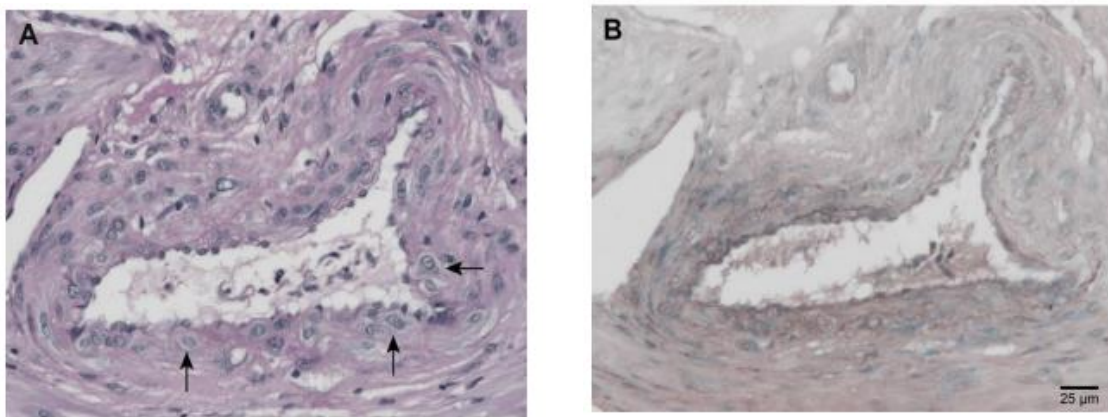


Figura 4. Arteria espiral miometrial a las 15 semanas. La figura 4A representa la remodelación vascular temprana con inflamación de las células del músculo liso vascular (flechas) mientras que la figura 4B muestra la ausencia de trofoblastos y una lámina elástica fina.

Modificado de Reyna-Villasmil E, & Briceño Pérez C, Santos-Bolívar J. (2015). *Invasión trofoblástica en el embarazo normal (II): Placentación profunda*.4, 27-37.

1.3. Decidualización *in vitro* y posible relación con patologías

Actualmente, la mayoría de los estudios científicos sobre la decidualización humana reproducen este proceso *in vitro* gracias a la exposición de las CEE a estrógenos y progesterona durante 7-9 días, o bien añadiendo adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y un análogo de la progesterona llamado medroxiprogesterona (MPA) durante 5 días (figura 5), observando la expresión en el medio de cultivo de los marcadores de decidualización, como la PRL, IGFBP-1 u otros menos utilizados, como IL11, BMP2, SGK1, etc. (Gellersen, 2010).

Recientemente, estudios científicos con modelos de decidualización *in vitro* basados en muestras humanas, han demostrado que las CEE tienen potencial invasivo intrínseco ya que favorecen la invasión trofoblástica al rodear al blastocisto durante el proceso. En los humanos, existe evidencia científica que indica que la decidualización ayuda a regular la implantación del embrión y, posteriormente, las interacciones del CTB con el útero lo que hace que este proceso sea un componente esencial para establecer la interfaz materno-fetal durante el embarazo normal (Gellersen, 2010). Además, estudios transcripcionales realizados a partir de muestras de vellosidades coriales han demostrado una decidualización insuficiente o defectuosa en embarazos que se complicaron con PE (Rabaglino MB, 2015).

Estos hallazgos abren un nuevo paradigma en el fenómeno de la implantación donde las CEE tendrían un papel principal en que este proceso se desarrollara de forma adecuada y por tanto, defectos en la decidualización del estroma endometrial podrían predisponer a complicaciones gestacionales tales como abortos de repetición, crecimiento intrauterino restringido (CIR), preeclampsia (PE) y parto pretérmino (PPT) (Brosens, 2011).

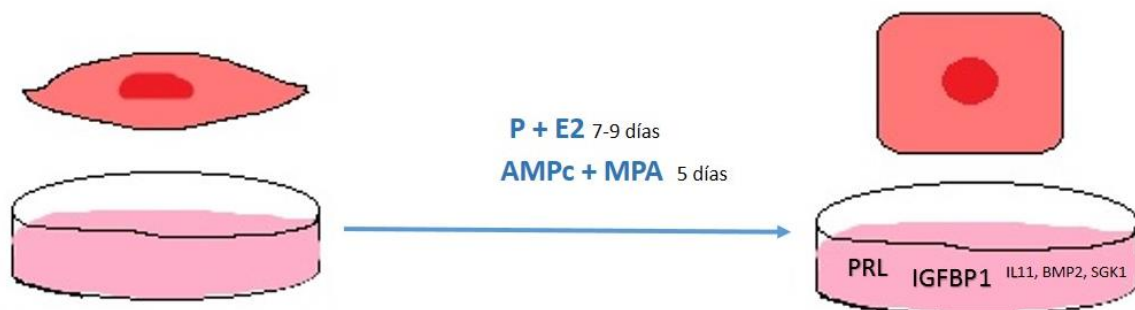


Figura 5. Representación de inducción a decidualización *in vitro* durante 5 o 7-9 días de las CEE en el laboratorio con los cambios morfológicos y bioquímicos que se producen. E2= estrógenos; P= progesterona; AMPc= adenosín monofosfato cíclico; MPA: medroxiprogesterona; PRL= prolactina; IGFBP1: Proteína de unión al factor de crecimiento 1 de la insulina. Ilustración propia.

2. Decidua en el embarazo

La decidua o endometrio especializado sirve para aceptar y luego limitar la invasión de los tejidos maternos por el trofoblasto. Al inicio del embarazo, la decidua se engruesa, alcanzando eventualmente espesores de 5-10mm de grosor, pero conforme avanza la gestación se adelgaza progresivamente. La decidua se continúa con el canal del parto, por lo que hay acceso desde la superficie de esta hasta la vagina, a través del canal cervical.

El endometrio decidualizado supone el lugar óptimo de implantación del blastocisto y su posterior desarrollo embrionario y feto-placentario como se ha expuesto anteriormente, pero no puede afirmarse que esta función sea exclusiva del endometrio debido a que se ha hallado una “decidualización exitosa” en los lugares en los que se han implantado los embarazos ectópicos.

Las células decidualizadas, bajo la influencia de la progesterona y otros factores, sufren modificaciones fenotípicas (forma esférica con núcleo redondeado) para facilitar la aposición e implantación del blastocisto. Posteriormente, suministrarán nutrición embrionaria y fetal a través de la interfase materno-fetal y secretan factores de crecimiento y citoquinas (PRL, IGFBP-1, IL-11...) que promoverán el crecimiento y la función placentaria, así como la inhibición de la apoptosis del trofoblasto (Popovici, 2000).

La decidua supone una fuente de PRL, la cual está presente en grandes cantidades en el líquido amniótico durante el embarazo humano. Los factores que regulan la secreción de PRL en la decidua no están definidos con claridad, así como tampoco el papel fisiológico que esta ejerce, pero parece influir en la regulación de funciones inmunitarias en este tejido durante el periodo gestacional.

Debido a que la población decidual es dinámica, junto a las CEEd se pueden encontrar también poblaciones importantes de derivados de la médula ósea (leucocitos y linfocitos) así como Natural Killers uterinos (NKu), siendo estos últimos la principal población leucocitaria en el estroma decidualizado (Mori M, 2016).

Los NKu presentan receptores β para estrógenos (RE- β) pero carecen de PR y de RE- α , lo que hace suponer que la acción hormonal sobre ellos está mediada por las CEEd mediante IL-15, estimulando así su crecimiento poblacional y alcanzando su máxima concentración durante el primer trimestre de la gestación. Los NKu secretan IL-2 e IL-10, así como factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento placentario (PGF), factor de crecimiento

trofoblástico (TGF- β 1), angiopoyetina 1 y 2 (ANGPT1 y ANGPT2), interferón gamma (IFN- γ) y melopeptidasa de matriz 2 (MMP-2) (Lima, 2014). Se sitúan alrededor de las arterias uterinas, sobretodo en la decidua basal por ser los principales encargados de la correcta remodelación vascular placentaria y son expulsados junto con la placenta tras el parto (Dunn CL, 2003)

2.1 Capas de la decidua

La porción de la decidua que está directamente por debajo del sitio de implantación del blastocisto y que se ve modificada por este, se denomina *decidua basal*. A este nivel, la irrigación sanguínea por debajo del espacio intervelloso se altera como consecuencia de la invasión de las arterias helicoidales por los CTB. Durante este proceso, las paredes de los vasos son destruidas eliminando la capa de músculo liso y células endoteliales, transformándose en vasos uteroplacentarios resistentes a la acción de los agentes vasoactivos.

La porción de decidua que recubre al blastocisto en crecimiento y que al inicio se separa del resto de la cavidad es la *decidua capsular*, más prominente durante el segundo mes de embarazo y a nivel interno, contacta con el corion liso o membrana fetal avascular extraembrionaria (figura 6).

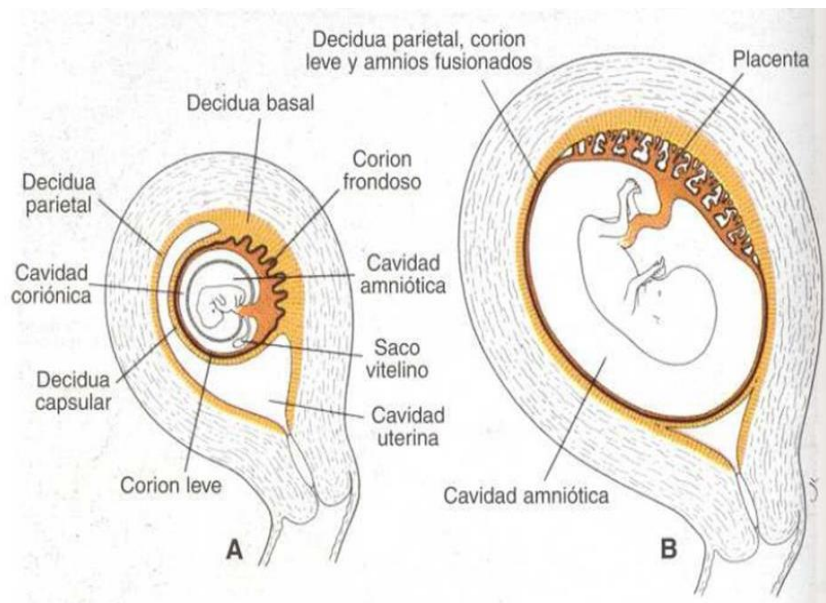


Figura 6. La decidua basal, capsular y parietal durante la gestación temprana y la fusión de estas dos últimas conforme avanza el embarazo, formando la decidua vera.

Modificado de Sadler TW. (2001). *Langman. Embriología médica*. Editorial médica panamericana, 8ª edición (p.316)

El resto de la cavidad uterina que no contacta con el blastocisto está revestido por la llamada *decidua parietal*, cuyas arterias helicoidales permanecen intactas ya que no sufren invasión ni modificación estructural y por tanto, su sensibilidad a la acción de los agentes vasoactivos no se verá afectada. Hacia las 15-17 semanas, la decidua parietal y capsular se fusionan para formar *la decidua vera o parietalis* (Young, 2014).

La decidua parietal y basal están formadas por tres capas: una superficial o compacta, una medial o esponjosa, y una basal que permanece después del parto y forma el nuevo revestimiento endometrial.

La capa compacta de la decidua basal y parietal presenta grandes células epiteloides poligonales muy agrupadas, con tinción leve y núcleos vesiculares redondos con largos procesos citoplasmáticos. La capa esponjosa está formada por grandes glándulas revestidas por epitelio uterino cilíndrico típico con actividad secretora abundante, que contribuye a la nutrición del blastocisto antes de que se establezca la circulación placentaria.

La decidua basal difiere de la parietal en que la zona esponjosa presenta sobretodo, arterias y venas muy dilatadas y en que es invadida por células gigantes trofoblásticas cuya cantidad y profundidad de penetración es muy variable. Estas células, aunque por lo general quedan confinadas en la decidua, pueden penetrar en el miometrio.

La decidua basal está en contacto directo con el corion frondoso formando la futura placenta por lo que asegura un soporte metabólico y endocrino. Por el contrario, la decidua parietalis contacta con el corion liso anembrionado formando la membrana amniótica o amnios, que aísla la cavidad amniótica de agentes tóxicos, infecciosos o traumáticos y mantiene una relativa tolerancia frente al rechazo inmunológico.

1.2. Interfase materno-fetal

También denominada placa basal, la interfase materno-fetal es la base de las vellosidades placentarias formada por las columnas celulares de CTB extravelloso que están en íntimo contacto con las células deciduales basales. La porción más basal de la interfase materno-fetal está adherida al miometrio uterino y persiste en el útero tras el parto.

Está formada por una banda fibrinoide denominada capa de Nitabuch, que engloba una mezcla celular compuesta por células estromales endometriales, células deciduales, trofoblasto extraveloso, vasos uteroplacentarios y glándulas endometriales (Jauniaux, 2003).

A diferencia de otras especies de mamíferos, el límite entre la decidua humana y la membrana basal placentaria es muy irregular y las arterias espirales presentan una orientación casi paralela a dicha membrana (Lambropoulo, 2006). En los humanos, esta membrana basal es temporal ya que se desintegra en fases tempranas del embarazo y los CTB disgregados pueden avanzar hacia el miometrio consiguiendo una posterior placentación profunda (Morel, 2011).

Entre sus múltiples funciones, la interfase materno-fetal destaca por encargarse de la regulación de la invasión del trofoblasto, el intercambio nutricional y gaseoso materno-fetal, la inmunotolerancia local y la síntesis de hormonas, citoquinas y factores de crecimiento.

El intercambio nutricional y gaseoso materno-fetal se realiza a través de la circulación sanguínea placentaria, la cual es considerada hemocorioendotelial porque no existe un contacto directo entre sangre materna y fetal sino que los tejidos de la madre están yuxtapuestos a sincitiotrofoblasto extraembrionario y no a células embrionarias o sangre fetal. Esta disposición anatómica se muestra en la figura 7 y permite que la sangre materna procedente de los vasos uteroplacentarios bañe directamente el sincitiotrofoblasto (superficie externa de las vellosidades trofoblásticas) mientras que la sangre fetal queda contenida dentro de los capilares fetales de los espacios intravellosos de las vellosidades. Tras producirse el intercambio de sustancias, la sangre materna es recogida por las venas deciduales y devuelta a la circulación materna. Esta distribución es muy importante para la comunicación y aceptación inmune del producto de la concepción.

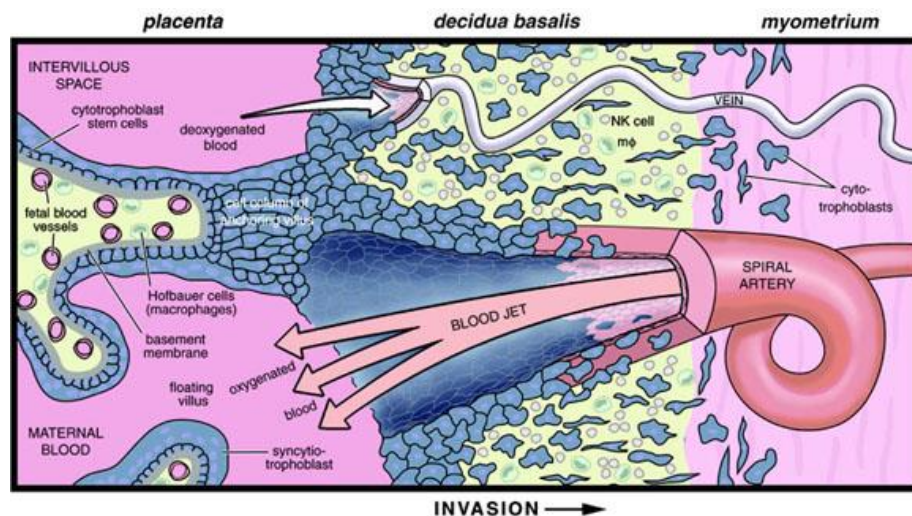


Figura 7. Ilustración que muestra la interfase materno-fetal y su circulación hemocorioendotelial. Los CTB invaden y reemplazan el endotelio materno y las regiones de la pared del músculo liso. Se forma una nueva quimera vascular compuesta de células maternas y fetales.

Modificado de Zhou, Y., Bellingard, V., Feng, K. T., McMaster, M., & Fisher, S. J. (2003). *Human cytotrophoblasts promote endothelial survival and vascular remodeling through secretion of Ang2, PlGF, and VEGF-C*. *Developmental Biology*, 263(1), 114-125.

3. Placentación normal

La placentación es el proceso en el cual las células trofoblásticas darán origen a la placenta que en humanos es única, autónoma y transitoria (Reyna-Villasmil, 2015).

La placenta definitiva humana se caracteriza por la necesidad de formarse sobre un endometrio previamente decidualizado y por el estrecho contacto del trofoblasto con las células maternas inmunitarias (Degner, 2016).

Durante la implantación del blastocisto, una vez adherido este al endometrio parcialmente decidualizado (día 7-8 postfecundación), el trofoblasto prolifera y se diferencia en dos capas, una monocapa más profunda en contacto con la masa celular interna (citotrofoblasto (CTB)) y otra más externa amorfa multinucleada y continua que forma una membrana no interrumpida por espacios intercelulares que contacta e invade las células endometriales (sincitiotrofoblasto (STB)).

Sobre el 10º día de postfecundación, las trabéculas de STB han rodeado todo el blastocisto, implantado y las bandas de STB avanzan hacia la cara miometrial del endometrio (figura 8A) invadiendo las arteriolas y luego las arterias helicoidales, destruyendo así las paredes de revestimiento de estos vasos y convirtiéndolos en arterias uteroplacentarias (Degner, 2016).

La invasión trofoblástica se inicia en el centro del futuro lecho placentario y, progresivamente va diseminándose en anillo (Zybina, 2004). A medida que la invasión progresa, el STB extraveloso forma espacios lacunares (figura 8B), inicialmente rellenos por secreción glandular endometrial y posteriormente por sangre materna, cuando alcance los capilares y vénulas adyacentes, los invade y erosione. A medida que las lagunas se unen y alcanzan el polo opuesto a la invasión, se forma un laberinto revestido de trofoblastos cuyas columnas celulares conforman el espacio intervilloso y los *tallos vellosos primarios* o *vellosidades primarias* (día 12 postfecundación) (Burton, 2009).

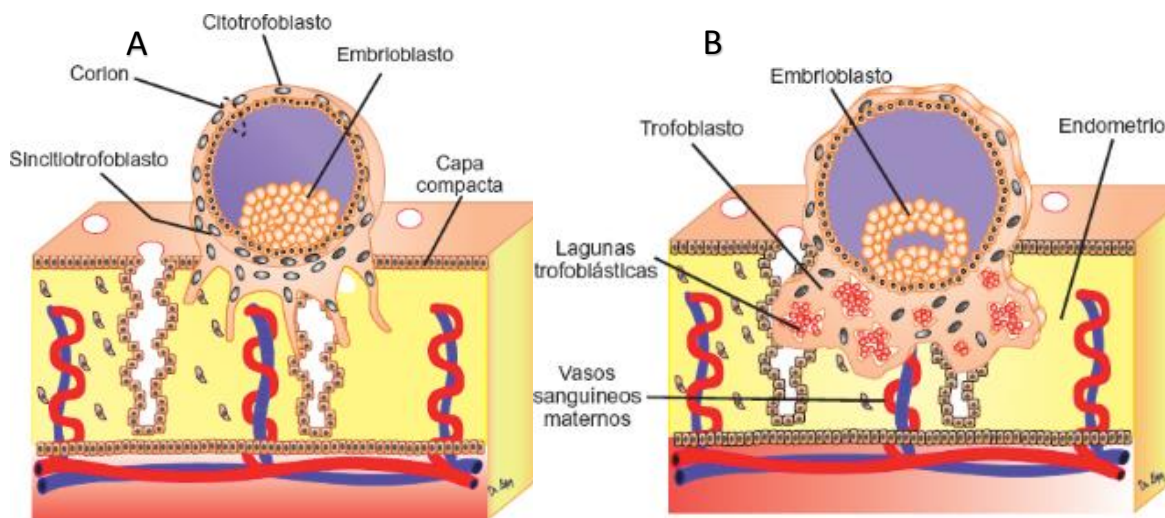


Figura 8. Inicio de la placentación humana y su circulación. **Figura 8A.** Bandas de STF avanzando a través de la decidua e invadiéndola. **Figura 8B:** Formación de las lagunas vasculares tras invasión de vasos espirales deciduales.

López Serna, N. (2000). *Desarrollo de la placenta*. En *Biología del desarrollo*. Cuaderno de trabajo. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. [figura]. Recuperado de <http://www.accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1476§ionid=95223881>

En la primera fase del embarazo las vellosidades se distribuyen sobre la periferia de la membrana coriónica. Las vellosidades en contacto con la decidua basal proliferan para formar el corion foliáceo o corion frondoso, componente fetal de la placenta, mientras que las vellosidades en contacto con la decidua capsular degeneran para formar el corion liso, más translúcido, de 1mm de grosor. El corion liso contiene trazas de vellosidades y la decidua se adhiere a su superficie. Esta estructura, junto con el amnios, forman un amniocorion avascular (miembro paracrino de sistema de comunicación materno-fetal)

A partir de la 5ª semana postmenstrual (día 17 postfecundación), un cordón mesenquimático derivado de CTB o células de Langhans, invade internamente la columna sólida de STB formando las *vellosidades secundarias* las cuales, uno o dos días después iniciarán la angiogénesis a partir del mesénquima extraembrionario, momento que determinará el inicio de la formación de las *vellosidades terciarias*. De aquí en adelante, las nuevas vellosidades y sus ramificaciones se formarán a partir de brotes trofoblásticos localizados en su superficie y que, tras ser invadidos por una columna de CTB, iniciarán el mismo proceso anteriormente descrito (figura 9).

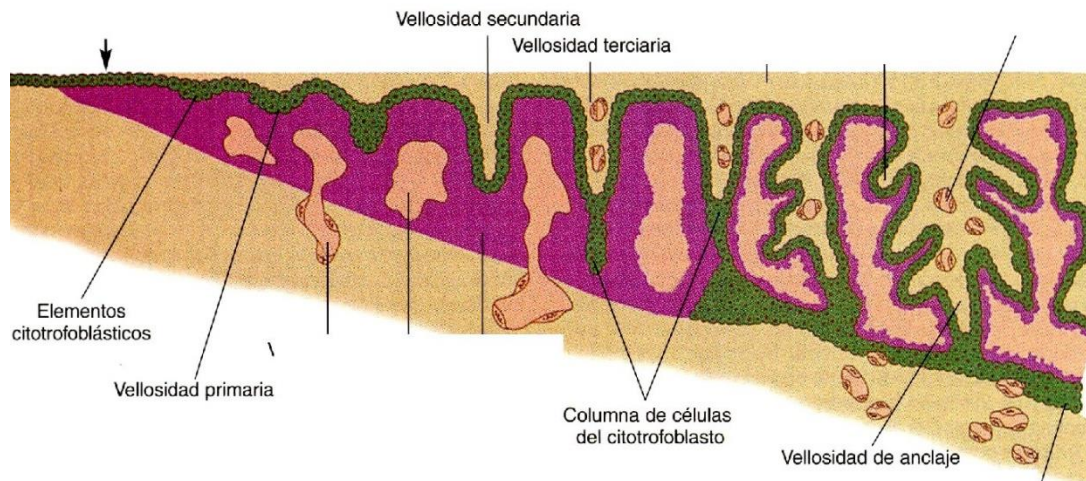


Figura 9. Evolución de las vellosidades coriónicas placentarias.

Inzuza O, Bravo H, Contreras A, et. Al. (2000) Anatomía del desarrollo humano. Embriología general. [figura]. Modificado de <http://www.publicacionesmedicina.uc.cl/Anatomia/adh/embriologia/html/parte4/membranas>

La capa de CTB más cercana al estroma embrionario de las vellosidades de fijación que no forma las columnas celulares inicia la invasión del endometrio cercano, erosionando la pared de las arterias uterinas, tapizando su endotelio y modulando la permeación arterial al espacio intervlositario, regulando la presión de la circulación a ese nivel (Red-Horse, 2004).

La red capilar vellositaria se forma de forma paralela e independiente de las arterias umbilicales fetales y se comunicarán mediante vasos placentarios derivados de la anastomosis de capilares vellositarios, alrededor de la 7ª semana postmenstrual, estableciendo así, la circulación fetoplacentaria. Los vasos coriónicos fetales, que transportan sangre entre la placenta y el feto, contienen músculo liso y sí responden a los agentes vasoactivos (Hempstock, 2003).

En torno a la octava y hasta la décima semana de gestación, el STB alcanza la membrana basal de la decidua y comienza a invadir el miometrio desde el centro del lecho placentario hacia la periferia diseminándose en anillo y avanzando en profundidad, por el estroma miometrial hasta alcanzar las arterias espirales miometriales internas (Caniggia, 2000). La invasión del tejido vascular de la madre por trofoblastos comprende sólo a las arterias helicinas deciduales, no a las venas deciduales (Merviel, 2009) por lo que estas últimas carecerán de NKu y TFB luminales, a diferencia de las arterias que sí las contendrán (figura 10).

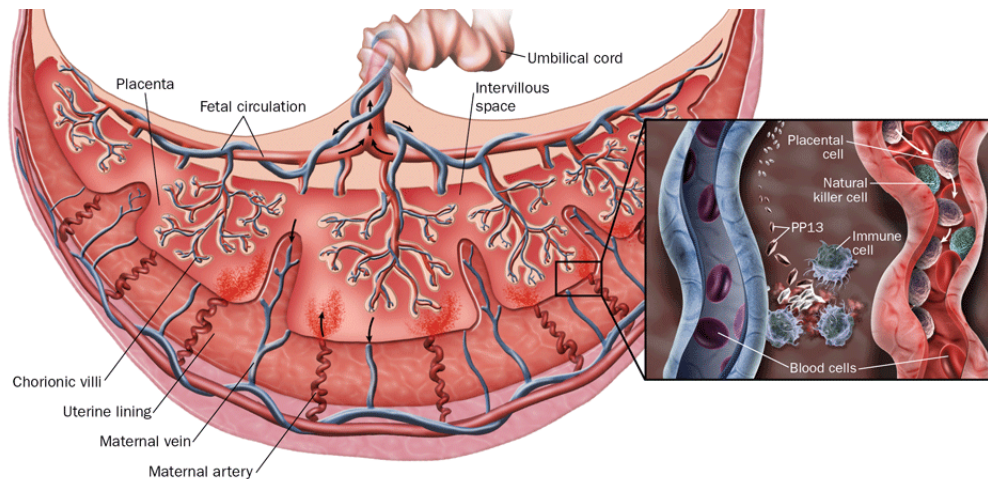


Figura 10. Imagen que ilustra la diferencia de composición celular existente a nivel endovascular entre las venas deciduales y las arterias helicinas o espirales ya que en la luz arterial destaca la presencia de NKu y TFB o células placentarias.

Modificado de Sadler TW (2016). *Langman. Embriología médica*. Editorial Panamericana. 13ª edición (p139).

3.1. Remodelación vascular durante la placentación profunda

A diferencia de la decidua, donde el STB intersticial invasor se concentra alrededor de los vasos espirales y erosiona las paredes laterales, en la zona de transición entre el endometrio y el miometrio o zona de unión miometrial (ZUM) estas células invasoras se dispersan por el estroma formando grupos que se fusionan (Pijnenborg, 2006), mediante moléculas de adhesión, en células gigantes multinucleadas, cuya persistencia indica que han perdido su capacidad invasora (Al- Nasiry, 2009)

La función exacta de la persistencia del TFB intersticial en la ZUM es desconocida pero se ha sugerido que puede tener acción sobre el tejido uterino (Slukvin, 2004), acción endocrina (Lyall, 2005) o bien tener un papel importante en la remodelación temprana de las arterias espirales deciduales ya que se ha observado una correlación entre la densidad de TFB intersticial en la ZUM y el grado de desorganización del músculo liso vascular, probablemente iniciando este proceso mediante la secreción de enzimas líticas que degradan la matriz (Reyna-Villasmil, 2015).

Tras esta primera invasión TFB intersticial, se produce una segunda invasión endovascular profunda de las arterias espirales miometriales a partir de las 14 semanas de gestación (Ball, 2006). Se postuló que esta segunda oleada pudiera ser realmente una progresión continua de la primera pero se descartó al no evidenciar migración profunda más allá de la capa miometrial superficial antes de la semana 14 (Peng, 2008). Por ello se ha estimado un intervalo temporal entre ambas oleadas invasoras de 4 semanas (Pijnenborg, 2006).

El origen de las células TFB encargadas de esta segunda oleada de migración es desconocido y actualmente existe controversia sobre si el TFB endovascular visualizado a partir de la semana 14 procede de los TFB intersticiales mononucleares deciduales que han penetrado en la luz del vaso atravesando las capas vasculares desde la adventicia (Kaufmann, 2003), o bien es originario de la cubierta CTB inicial que ha iniciado una nueva oleada de invasión (Jauniaux, 2003), si bien es cierto que esta segunda hipótesis se ve reforzada por la mayor distancia entre el TFB invasor y la pared vascular a nivel miometrial profundo que en la decidua (Pijnenborg, 2006).

Tampoco se conoce con exactitud el mecanismo que desencadena esta segunda oleada de migración TFB profunda (Lyall, 2005) aunque se postula que un incremento rápido de la concentración de oxígeno placentario (Hempstock, 2003), el aumento mantenido del flujo materno placentario o ambos puedan ser factores contribuyentes (Cao, 2008), sobretodo porque la capacidad invasora del TFB se ve incrementada por niveles elevados de oxígeno en el medio, como se ha demostrado in vitro (Aplin, 2000).

En cualquier caso, el periodo de invasión profunda que se inicia entre las 14-15 semanas con una diseminación en anillo, puede determinar el funcionamiento óptimo de la placenta ya que la remodelación de la mayoría de las arterias espirales laterales se completa progresivamente en el transcurso del II trimestre y el flujo materno placentario alcanza su máxima capacidad solo hasta la mitad del embarazo.

La presencia de TFB en la pared del vaso activa la ya mencionada anteriormente remodelación vascular de las arterias espirales que consiste en el reemplazo de la lámina elástica y el músculo liso por material fibrinoide (Degner, 2016). El mecanismo por el cual se produce este proceso es desconocido, pero in vitro, se ha demostrado que la agregación de TFB sobre este tejido, induce a apoptosis de las células endoteliales y musculares lisas (Whitley, 2010).

Durante el inicio de la gestación, la remodelación no es continua circunferencial, sino que ocurre de forma focal, lo cual sugiere que los cambios en el flujo local puedan afectar a la llegada de TFB endovascular y por tanto a la remodelación consecuente, ya que se ha demostrado que se necesita un medio de relativa hipoxia para estimular al trofoblasto (regulado por factores de matriz extracelular, citoqueratinas, factores de crecimiento y hormonas) (Chakraborty, 2002). Sin embargo, en el tercer trimestre de la gestación, la mayoría de las arterias espirales presentan una remodelación total y circunferencial completa (figura 11). Este proceso finalizado puede no darse en condiciones anormales (Coelho, 2006).

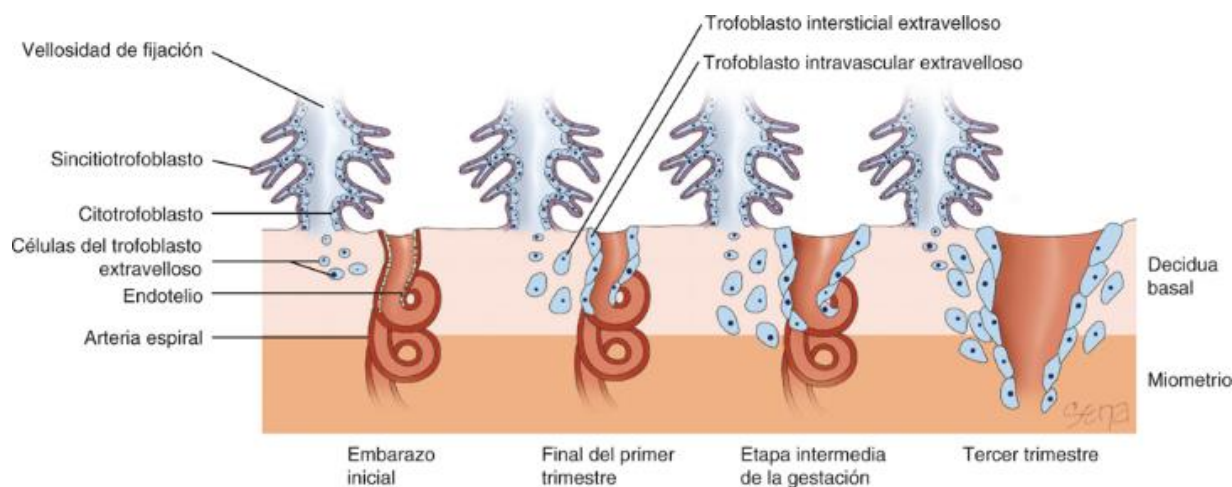


Figura 11. Invasión endometrial y miometrial por los Trofoblastos con la remodelación vascular consecuente en cada una de las etapas de la gestación.

Modificado de Cunningham G, Leveno KJ, Bloom SL, et al. (2016). *Williams. Obstetricia*. Mc Graw Hill Education. 24ª edición.

La consecuencia esperable de esta remodelación completa vascular es la insensibilización completa a agentes vasoactivos, permitiendo un flujo sanguíneo placentario ininterrumpido y un aporte de oxígeno constante (figura 12). Sin embargo, la eyección de sangre materna al espacio intervelloso ocurre por oleadas intermitentes de arterias espirales separadas y en momentos diferentes. Estos flujos discontinuos proceden, probablemente, de las arterias radiales de paredes gruesas y porciones proximales de las arterias espirales que presentan una remodelación incompleta y parcheada (Dimitriadis, 2003).

Una deficiente implantación trofoblástica y remodelación vascular es lo que se ha postulado hasta la fecha como hipótesis principal causante de la preeclampsia (Figura 13).

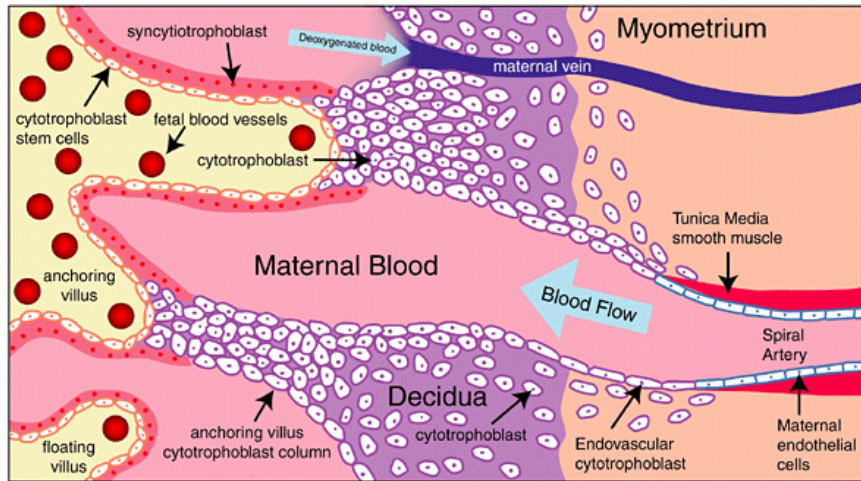


Figura 12. Invasión intersticial y endovascular trofoblástica normal que alcanza miometrio (profunda) convirtiendo arterias espirales en vasos de mayor calibre que aportan un mayor flujo sanguíneo hacia el espacio intervilloso.

Modificado de Karumanchi, S. A., Maynard, S. E., Stillman, I. E., Epstein, F. H., & Sukhatme, V. P. (2005). *Preeclampsia: A renal perspective*. *Kidney International*, 67(6), 2101-2113.

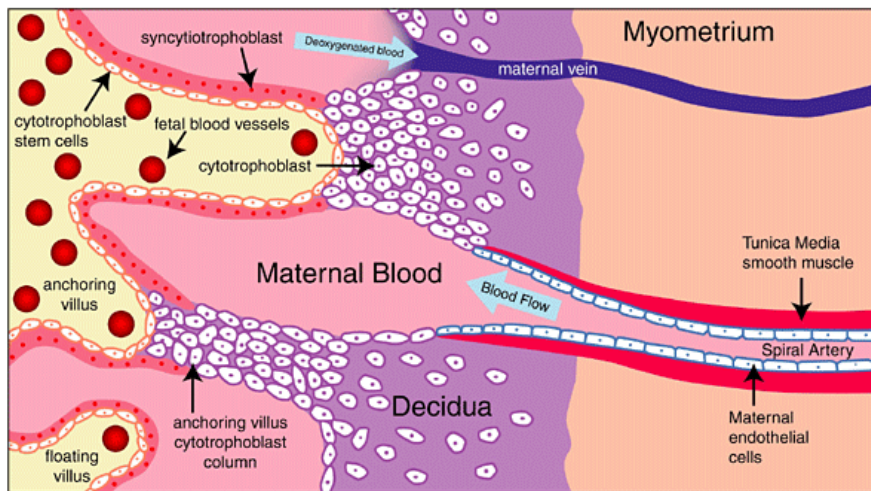


Figura 13. Invasión intersticial y endovascular trofoblástica limitada a la decidua (superficial) modificando escasamente el calibre del vaso sanguíneo por lo que el aporte de flujo materno hacia el espacio intervilloso se ve muy limitado.

Modificado de Karumanchi, S. A., Maynard, S. E., Stillman, I. E., Epstein, F. H., & Sukhatme, V. P. (2005). *Preeclampsia: A renal perspective*. *Kidney International*, 67(6), 2101-2113.

4. Placentación superficial: PREECLAMPSIA (PE)

4.1. Definición

La Preeclampsia (PE) es una enfermedad progresiva multisistémica, caracterizada por hipertensión (HTA) y proteinuria, o hipertensión y disfunción multiorgánica con o sin proteinuria en la segunda mitad del embarazo o en el postparto. Puede aparecer de novo, o superpuesta a otros trastornos hipertensivos y, aunque la mayoría de los casos se resuelven tras el alumbramiento, supone gran morbilidad materno-fetal y un aumento de riesgo cardiovascular futuro para la mujer (Bokslag, 2016).

Clásicamente se ha definido como el desarrollo de HTA 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) ≥ 30 mg/mmol (0.3mg/mg) o en su defecto ≥ 2 + en Labstix en dos mediciones repetidas en 4h de intervalo (esta última medición solo se utiliza cuando no se dispone de métodos cuantitativos o se precise para una rápida toma de decisión, debido a su baja fiabilidad diagnóstica) (Gynecologists, 2013; Poon, 2019).

La HTA se define como la elevación de la tensión arterial sistólica (TAS) ≥ 140 mmHg y/o la tensión arterial diastólica (TAD) ≥ 90 mmHg, en al menos 2 ocasiones diferentes separadas 4 horas (aunque ante cifras de TAS ≥ 160 mmHg o TAD ≥ 110 , se puede aceptar un intervalo de pocos minutos dado su gravedad).

En la actualidad se ha consensuado aceptar el diagnóstico de preeclampsia en ausencia de proteinuria (Homer 2008; Sibai 2009) cuando aparece HTA junto con síntomas de afectación sistémica grave:

- Trombocitopenia (recuento plaquetar < 150.000 μ L)
- Alteración hepática (enzimas hepáticas >40 UI/L con o sin dolor en hipocondrio derecho o epigástrico)
- Aparición de insuficiencia renal (Creatinina sérica > 1 mg/dL o ≥ 90 μ mol)
- Edema pulmonar
- Manifestaciones clínicas derivadas de alteración cerebral y/o visual (eclampsia, ceguera, accidente cerebrovascular, cefalea intensa, ceguera, escotomas...).

Nuevas actualizaciones de la definición de PE incluyen la presencia de disfunción útero placentaria (CIR, muerte fetal intraútero o forma de onda del doppler de arteria umbilical anormal) y de complicaciones vasculares como hemólisis o CID al conjunto de manifestaciones que pueden acontecer junto a la HTA sin necesidad de que se asocie proteinuria (Brown, 2018; Poon, 2019).

La PE puede ser subclasificada en función del momento gestacional en que debuta, como precoz (< 34+0 semanas) o tardía (\geq 34+0 semanas) siendo esta última circunstancia la más frecuente ya que únicamente el 10% se diagnostican por debajo de la semana 34 (Trogstad, 2011; Lisonkova, 2013; Poon, 2019).

La PE debe diferenciarse de otras 3 situaciones patológicas que pueden darse durante la gestación y que se engloban dentro del grupo de Estados Hipertensivos del Embarazo (ACOG, 2013):

- Preeclampsia / Eclampsia: Aparición de hipertensión y proteinuria o hipertensión y disfunción multiorgánica con o sin proteinuria a partir de la semana 20 de embarazo o postparto en una mujer previamente sana. La eclampsia se define como la presencia de convulsiones tónico-clónicas generalizadas en una mujer con preeclampsia establecida en ausencia de condiciones neurológicas que pudieran causarlas.
- Hipertensión crónica. Presencia de HTA previa a la gestación o diagnosticada antes de la semana 20 o que persiste después de 12 semanas postparto. Puede ser primaria (también denominada esencial) o secundaria a otras causas.
- Hipertensión gestacional. Presencia de HTA medida al menos en dos ocasiones con 4 horas durante la gestación en mujeres previamente normotensas, en ausencia de signos o síntomas de PE, que se resuelve antes de la 12 semana postparto.
- Hipertensión arterial crónica con preeclampsia sobreañadida. Inicio de proteinuria y/o disfunción multisistémica a partir de semana 20 en una gestante con HTA crónica

Las nuevas guías incluyen en esta clasificación a la *HTA de bata blanca* haciendo referencia a los casos en que se muestran repetidamente cifras de TA elevada en las tomas hospitalarias o ámbitos sanitarios y que descienden a <135/85mmHg en el domicilio, y la *HTA enmascarada* que se define como cifras de TA >140/90mmHg, solo detectables con una monitorización ambulatoria de la presión arterial (MAPA) de 24h, ya que en tomas esporádicas la paciente es normotensa (Brown, 2018).

4.2. Epidemiología

La PE es una enfermedad con mucha repercusión obstétrica y perinatal ya que asocia una elevada morbi-mortalidad materna y fetal.

La prevalencia mundial estimada es de 4.6% del total de gestaciones, (Abalos, 2013). En EEUU, la cifra disminuye a 3.4% aunque es de 1.5-2 veces mayor en nulíparas, alcanzando cifras de hasta el 8% en este sector de población (Ananth, 2013), siendo además, una de las cuatro primeras causas de muerte materna, junto con hemorragia postparto, eventos cardiovasculares y tromboembolismo (MacKay, 2011). A nivel mundial, la preeclampsia es responsable directa del 10-15% de las muertes maternas (Duley, 2009), representando más de 76.000 muertes maternas y 500.000 muertes infantiles en todo el mundo cada año (Thornton, 2013, Poon LC, 2019).

Debido a la atención médica que supone esta enfermedad, su coste adicional y el de la morbilidad asociada también se incrementan de forma que los gastos sanitarios a corto y largo plazo por PE en EEUU durante el primer año después del parto se han estimado en torno a 2.18 billones de dólares (Fox, 2017).

La mayoría de las mujeres que desarrollan la enfermedad son nulíparas y debutan con la combinación de hipertensión y proteinuria a partir de las 34 semanas de gestación, incluso durante el parto (Sibai, 1988). Un 10% desarrollará la sintomatología antes de la semana 34 (Cunningham, 1992) o incluso en torno a la 20-22 semanas, y solo un 5% lo hace durante las 48h postparto (Al-Safi, 2011).

FACTORES DE RIESGO:

Existen una serie de condiciones o patologías que, en caso de darse en una gestante, incrementan el riesgo de que desarrolle preeclampsia (Bartsch, 2016, Poon LC, 2019):

- Antecedente de PE en una gestación anterior. Incrementa el riesgo de desarrollar de nuevo la enfermedad hasta 8 veces comparado con aquellas mujeres sin esta historia personal (RR 8.4, 95% IC 7.1-9.9), sobretodo si debutó con manifestaciones severas y durante el segundo trimestre, ya que se han reportado tasas de entre 25-65% de nuevas PE en sucesivos embarazos (Gaugler-Senden, 2008).
- Nuliparidad. Incrementa dos veces el riesgo de que aparezca PE (RR2.1, 95% IC 1.9-2.4). La causa es desconocida pero se piensa que está relacionado con la

desensibilización inmunológica materna a antígenos paternos ya que este riesgo también se presenta en multíparas con una nueva pareja e incluso tras un periodo intergenésico muy largo (Skjaerven, 2002).

- Historia familiar de PE (RR 2.90, 95% IC 1.70-4.93), se sugiere por mecanismos hereditarios (Nilsson, 2004).
- Complicaciones gestacionales previas. CIR (RR 1.4, 95% IC 0.6-3.0), desprendimiento prematuro de placenta normoinserta (DPPNI) (RR 2, 95% IC 1.4-2.7) o feto muerto anteparto (RR 2.4, 95% IC 1.7-3.4)
- Intervalo entre gestaciones. Tanto los intervalos cortos (<12meses) como los largos (>72meses) aumentan el riesgo de desarrollar la enfermedad, en comparación con intervalos de embarazos entre 12 y 23 meses, y cuanto más largo es el intervalo de tiempo, mayor es el riesgo. El motivo de esta asociación se desconoce pero se cree que puede influir la edad materna avanzada, la infertilidad y afectaciones maternas médicas subyacentes (Poon LC, 2019)
- Gestación múltiple: (RR 2.9 aunque varía de 2.6 a 3.1 ya que se incrementa con el número de fetos) (Cassell, 2004)
- Edad materna avanzada. (si edad materna ≥ 35 años RR 1.2 y si ≥ 40 años RR 1.5 95% IC 1.2-2.0)
- Tratamientos de reproducción asistida (TRA). Varios estudios han informado que dichas terapias duplican el riesgo de padecer PE en las mujeres que se someten a ellas, sobretudo las que han utilizado medicación hiperestrogénica para la estimulación ovárica (Martin, 2016)) y las que se han sometido a tratamientos con donación de ovocitos o de semen (Salha, 1999; Simeone, 2016)
- Origen racial. La raza afro-caribeña tiene un riesgo de PE que aumenta en un 20%-50% respecto a las europeas y las del sur de Asia también presentan incrementado este frente a las mujeres blancas no hispanas (OR 1.3 95% de IC [1.2-1.4]). Se cree que es debido a que ambas razas son más susceptibles a desarrollar enfermedades crónicas como hipertensión, diabetes mellitus y enfermedad cardiovascular (Poon LC, 2019).

- Patología preexistente que conlleve daño endotelial (Bartsch, 2016)
 - Diabetes Mellitus pregestacional: (RR 3.7, 95% IC 3.1-4.3) 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 (Dekker, 1998).
 - Hipertensión arterial crónica (RR 5.1, 95% IC 4.0-6.5), aunque es una condición muy infrecuente y se presenta solo en el 5-10% de los casos con PE (Roberts, 2017)
 - Anticuerpos Antifosfolípido positivos (RR: 2.8 IC 95% 1.8-4.3), frecuentemente positivos en algunas enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico y el síndrome antifosfolípido (SAF).
 - Sobrepeso y obesidad. (RR 2,8 IC 95% 2.6-3.1) el riesgo se dobla con cada incremento de 5 a 7 kg/m² de IMC pregestacional (O'Brien, 2003)
 - Enfermedad renal crónica. Su RR varía en función del grado de reducción del filtrado glomerular (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)

4.3. Patogénesis

El origen de la PE continúa siendo desconocido actualmente, pero se conoce que intervienen tanto factores uteroplacentarios como fetales. Independientemente del desencadenante, todas las hipótesis convergen en una cascada de sucesos comunes: Desarrollo precoz anómalo vascular placentario produce una hipoxia relativa local con liberación de factores antiangiogénicos a la circulación materna que altera la función endotelial sistémica causando hipertensión y el resto de las manifestaciones clínicas que definen la enfermedad.

Los factores implicados en la patogénesis de la PE son:

1. Desarrollo anormal de la placenta. La presencia de este órgano es imprescindible para que se desenvuelva la enfermedad, no así el tejido fetal (Matsuo, 2007) y se cura días o semanas después del alumbramiento. La literatura científica coincide en que los defectos en la remodelación de las arterias espirales y en la invasión del TFB son procesos presentes en los diferentes trastornos hipertensivos del embarazo y en CIR (Pijnenborg, 2006).
 - *Remodelación anormal de las arterias espirales*. A diferencia de lo que ocurre en gestaciones normales, en las que la remodelación iniciada en el primer trimestre y hasta semana 18-20, alcanza parte del miometrio y los TFB invaden hasta la túnica muscular media de las arterias espirales transformándolas en vasos de poca resistencia para aumentar el aporte sanguíneo materno a nivel placentario respecto otras áreas uterinas (Zhou, 1997), en la PE, los TFB infiltran solo la porción decidual de las arterias espirales, sin penetrar al miometrio (Meekins, 1994) y no llegan a la túnica muscular por lo que los vasos continúan teniendo un calibre estrecho determinando una cierta hipoxia placentaria (figura 14 y 15). Esta placentación defectuosa se ha asociado con otras patologías gestacionales como la muerte fetal intraútero, infartos placentarios, abrupcio placentario, preeclampsia con o sin CIR, restricción del crecimiento intrauterino sin hipertensión materna, rotura prematura de membranas y parto prematuro (Brosens, 2011).

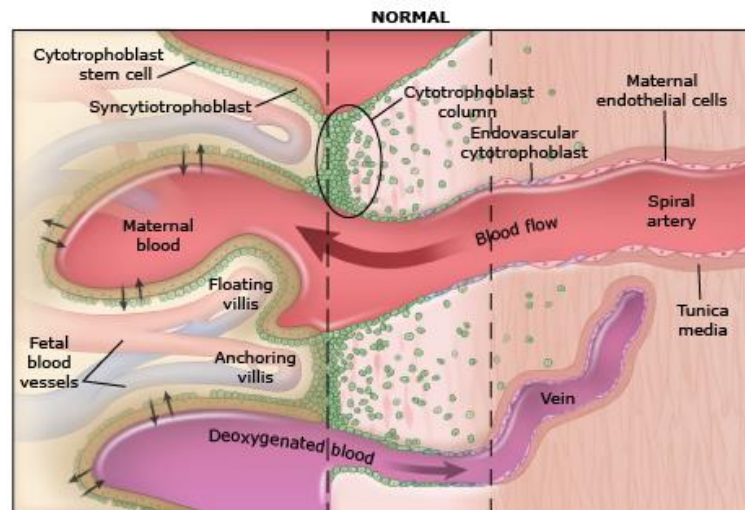


Figura 14. Arterias espirales de una gestación normal, invadidas por CTB con fenotipo endotelial, que han aumentado su calibre para convertirse en vasos de mayor capacidad.

Karumanchi SA, Lim KH, August P (2019). *Preeclampsia: Pathogenesis*. [figura3]. Recuperado de <http://www.uptodatecom.sangva.a17.csinet.es/contents/preeclampsia-pathogenesis>

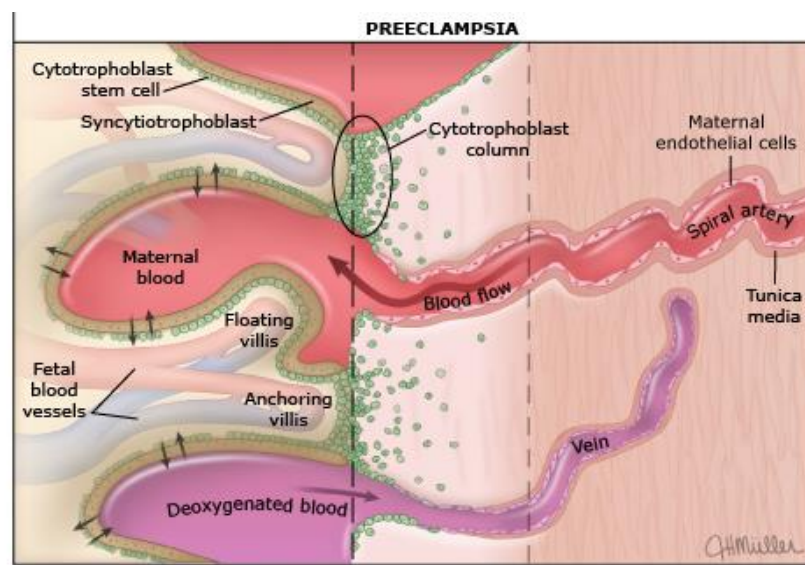


Figura 15. Vasos espirales en la Preeclampsia, con invasión muy superficial del CTB que no es capaz de transformarse en fenotipo endotelial y mantiene el calibre pequeño, con mayor resistencia al flujo sanguíneo.

Karumanchi SA, Lim KH, August P (2019). *Preeclampsia: Pathogenesis*. [figura3]. Recuperado de <http://www.uptodatecom.sangva.a17.csinet.es/contents/preeclampsia-pathogenesis>

- *Diferenciación TFB defectuosa.* Para que se produzca una correcta diferenciación TFB y consecuentemente, una adecuada invasión vascular, estas células fetales precisan cambiar la expresión de moléculas de adhesión con características de célula epitelial (integrina $\alpha6/\beta1$, $\alphaV/\beta5$ y E-cadherina) por las de célula endotelial (integrina $\alpha1/\beta1$, $\text{Av}/\beta3$ y VE-cadherina), proceso conocido como pseudovasculogénesis. Sin embargo, los TFB de mujeres con PE grave son incapaces de regular al alza expresión de moléculas de adhesión, se cree debido a la producción de semaforina 3B, proteína que inhibe la señal del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Zhou, 2013). Un estudio basado en microdissección láser permitió la identificación de nuevos ARN mensajeros y ARN no codificantes que difirieron en su expresión por diversas subpoblaciones de TFB en PE grave (Gormley, 2017).

 - *Hipoperfusión, hipoxia e isquemia.* La hipoperfusión parece ser tanto causa como consecuencia del desarrollo anormal de la placenta, debido a una remodelación inadecuada de las arterias espirales y se vuelve más pronunciada con el tiempo ya que la vascularización uterina alterada no puede acomodar el aumento normal del flujo sanguíneo hacia la unidad feto-placentaria conforme aumenta la edad gestacional. A nivel histológico, la isquemia se plasma como aterosclerosis, necrosis fibrinoide, trombosis, estrechamiento esclerótico de las arteriolas e infarto placentario y, aunque no siempre están presentes todos ellos, existe una correlación entre la severidad de la enfermedad y la extensión de estas lesiones (Walker, 2000).
2. *Factores inmunológicos* (Saftlas, 2005). La creencia de que el sistema inmune (SI) puede estar implicado en la patogénesis de la PE se basa, en parte, en que la exposición previa a antígenos (Ag) fetales o paternos protege de la enfermedad. De hecho, gestaciones con ovodonación tienen dos veces más riesgo de desarrollar la enfermedad que mediante otros métodos de reproducción asistida, y cuatro veces más que las concepciones naturales, lo cual defiende también la inmunotolerancia materna (Masoudian, 2016). La tendencia actual es a responsabilizar a los mecanismos en conjunto que participan en la inmunotolerancia a la invasión del TFB, más que a un subtipo específico de HLA (aunque la más estudiada sea el HLA-1, presente en el TFB extraveloso y sobre el que interaccionan los NKu).

3. Incremento de la sensibilidad a la Angiotensina II (AT-II) (Granger, 2001). Los pacientes con preeclampsia tienen niveles aumentados de anticuerpos agonistas para el receptor de angiotensina (AT-1). La angiotensina II es el ligando endógeno para el receptor AT-1, por lo que su aumento de activación por autoanticuerpos podría inducir tanto la hipertensión como la lesión vascular observada en la PE (Wenzel, 2011). Estudios en ratones sugieren, sin embargo, que la disfunción endotelial inducida por factores antiangiogénicos circulantes es suficiente para inducir la sensibilidad a la angiotensina II (Burke, 2016).

4. Factores genéticos (Skjaerven, 2005). Aunque la mayoría de casos aparecen de novo, hay factores genéticos (sFlt-1 en cromosoma 13, locus-12 en casos de HELLP con PE previa), que desarrollan un aumento de susceptibilidad a la enfermedad presente en casos de historia familiar, aumento de riesgo en gestaciones posteriores o bien en mujeres cuya pareja presenta antecedentes de PE en la gestación previa con otra mujer.

5. Factores ambientales. Estudios recientes han relacionado el déficit de calcio con el aumento de riesgo de desarrollar preeclampsia. El mecanismo en el que se basa esta asociación no se conoce con exactitud pero se cree debido al efecto en la regulación inmunológica o vascular que tiene este ion y por ello, se está empezando a introducir suplementos de calcio en las mujeres con alto riesgo de desarrollar la enfermedad. La obesidad también es un factor ambiental conocido para la aparición de la PE ya que induce inflamación crónica y disfunción endotelial (Zera, 2014)

6. Disfunción endotelial sistémica. La afectación vascular generalizada es la responsable última de las características clínicas de la enfermedad ya que genera una respuesta inflamatoria sistémica con activación plaquetar y formación de microtrombos. La relación entre el daño vascular preexistente y la susceptibilidad a desarrollar PE puede deberse a una alteración preexistente de las células endoteliales (Levine, 2006), lo cual explicaría que las mujeres con PE presentan a su vez mayor riesgo de padecer, en un futuro, enfermedades cardiovasculares (Bellamy, 2007) y/o afectación renal terminal e hipotiroidismo (Levine, 2009). En una gestación normal, la placenta en desarrollo libera factores proangiogénicos (VEGF, PlGF) y antiangiogénicos (sFlt-1) de forma equilibrada, favoreciendo una correcta angiogénesis, necesaria para el adecuado aporte de nutrientes y oxígeno al feto. En la PE, se produce un desequilibrio de estos factores,

umentando la concentración sanguínea de sFlt-1, que determina un estado de disfunción endotelial sistémico, responsable último de las manifestaciones clínicas.

- **sFlt-1.** El factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) induce a angiogénesis cuando interacciona con sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2, selectivamente expresados en la superficie de la célula endotelial. El factor de crecimiento placentario (PlGF) es de la familia de VEGF, predominante en la placenta, que también se une al VEGFR-1, induciendo la formación vascular (Dvorak, 2002). sFlt-1 es un antagonista circulante natural del VEGF y PlGF que tras su unión, impide la interacción de estos con sus receptores endógenos. Se cree que esta molécula juega un papel clave en la patogenia de la PE (figura 16) (Chaiworapongsa, 2004) pero se desconoce el desencadenante placentario que provoca un aumento de su concentración (Widmer, 2007). Se ha postulado que su origen provenga de los CTB invasores ante un ambiente reducido de oxígeno (Nagamatsu, 2004), hipótesis que se ve reforzada por el aumento de expresión de factores de transcripción inducidos por la hipoxia presentes en placentas de mujeres con PE (Rajakumar, 2003). Los últimos resultados científicos apuntan también a posibles factores genéticos implicados (Bdolah, 2008).

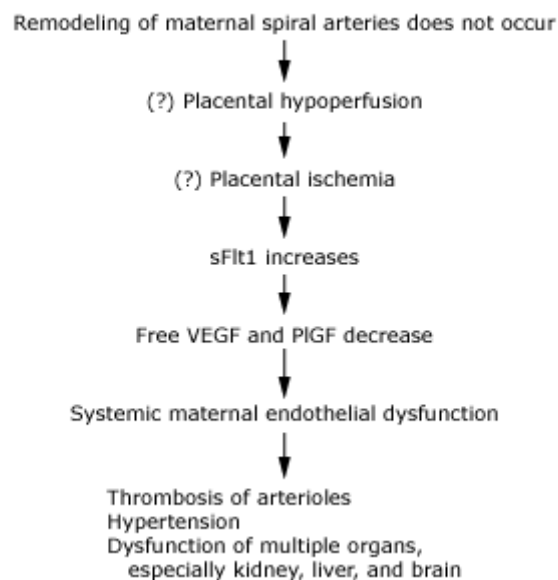


Figura 16. Esquema que resume la posible hipótesis del papel de sFlt-1 en la PE.

Karumanchi SA, Lim KH, August P (2019). *Preeclampsia: Pathogenesis*. [figura 7]. Recuperado de <http://www.uptodate.com.sangva.a17.csinet.es/contents/preeclampsia-pathogenesis>

Se ha demostrado que los niveles circulantes de sFlt-1 en PE están elevados en comparación con los gestantes sanas y su vez VEGF y PIGF están disminuidos, previamente a la aparición de las manifestaciones clínicas (Levine, 2004).

sFlt-1 aumenta en todas los casos al final del embarazo, pero en las mujeres que luego desarrollan PE, este aumento es precoz respecto a las gestaciones de curso normal (21 a 24 semanas en comparación con 33 a 36 semanas) alcanzando además, niveles más elevados (figura 17). A su vez, los niveles séricos de PIGF y VEGF en mujeres con PE disminuyen al mismo tiempo aumenta sFlt-1 (Tsatsaris, 2003).

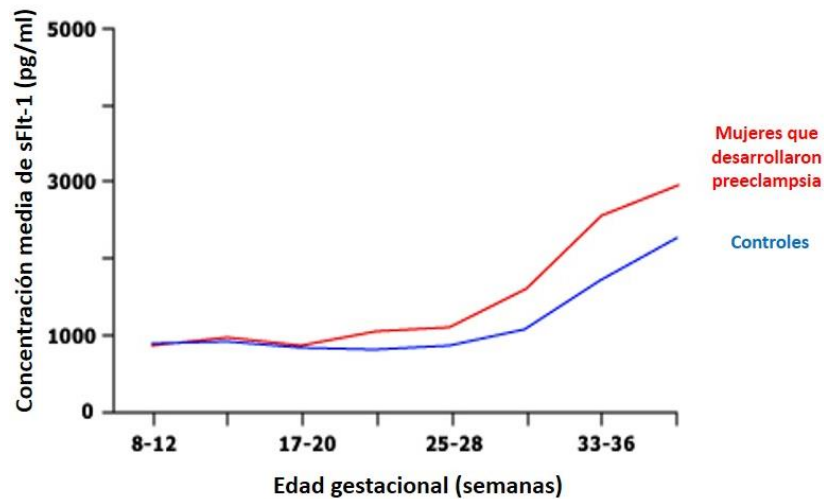


Figura 17. Evolución de la concentración media de sFlt-1 en pg/ml durante el curso gestacional (en semanas) tanto en mujeres con embarazos de curso normal (azul) como en las que desarrollan Preeclampsia (rojo).

Karumanchi SA, Lim KH, August P (2019). *Preeclampsia: Pathogenesis*. [figura 5]. Recuperado de <http://www-uptodatecom.sangva.a17.csinet.es/contents/preeclampsia-pathogenesis>

Se ha sugerido que el aumento de sFlt-1 y su disfunción endotelial secundaria pueden ser los eventos principales que conduzcan a la sensibilidad a los vasoconstrictores e hipertensión (Burke, 2016).

De todas formas, la utilizada clínica de la medición sérica de sFlt-1 sigue investigándose en la actualidad, mediante el desarrollo de estudios prospectivos que buscan determinar su posible efecto predictivo sobre el desarrollo de PE (Widmer, 2007). Se están llevando a cabo estudios que buscan

relacionar el cociente sFlt-1/ PIGF con el riesgo de desarrollar PE en mujeres con riesgo (Zeisler, 2016), y en caso de que esta esté establecida, de predecir el riesgo de desarrollar una preeclampsia grave a lo largo de las dos semanas siguientes cuanto más elevada sea dicha determinación (Rana, 2012). Por todo ello, la creación de un fármaco que disminuyera los niveles de sFlt-1 o elevara los de PIGF podría colaborar en gran medida en la prevención de la PE (Thadani, 2016).

- **Endoglina soluble (sEng).** Se trata de una proteína sintetizada por la placenta con capacidad antiangiogénica que se cree implicada en el desarrollo de PE al colaborar en la disfunción endotelial pero por un mecanismo distinto al de sFlt-1. sEng bloquea la activación del TGF- β 1 endotelial e impide su acción, inhibiendo por tanto la vasodilatación (Venkatesha, 2006).

7. Inflamación. El DNA placentario liberado a la circulación materna podría desempeñar un papel en la respuesta inflamatoria sistémica de la enfermedad (Hartley, 2015), ya que los niveles de DNA libre procedente de TFB en sangre materna son más elevados en mujeres con PE respecto a controles. Este estado proinflamatorio podría aumentar la susceptibilidad del endotelio a tóxicos como sFlt-1 y sEng.

4.4. Manifestaciones clínicas

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

Además de la clínica más frecuente, existen síntomas y signos de alarma que en caso de presentarse, exigen una actuación inmediata ya que cataloga la enfermedad como PE grave (ACOG, 2013):

- HTA severa (TAS ≥ 160 y/o TAD ≥ 110) en 2 ocasiones al menos con 4 horas de intervalo entre ambas tomas, con la paciente en reposo.
- Daño SNC: cefalea severa y/o persistente a pesar de la administración de analgésicos, anomalías visuales (escotomas, fotofobia, visión borrosa), alteración del estado mental.
- Daño hepático: dolor epigástrico y /o en hipocondrio derecho, náuseas, vómitos.
- Edema pulmonar: disnea, dolor retrocostal.

La preeclampsia también se puede sospechar ante 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 ($< 100.000/\mu\text{L}$)
- Elevación Cr sérica ($>1,1 \text{ mg/dL}$) y enzimas hepáticas (GOT – GPT)

Cabe destacar la retirada de la clasificación de la proteinuria masiva ($>5 \text{ g}$ 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.

4.5. Pronóstico

La PE es una enfermedad multisistémica que conlleva importantes consecuencias socio-sanitarias. Aunque la mayoría de las pacientes desarrollan los síntomas de forma progresiva y lenta a partir del tercer trimestre del embarazo, en el 25% de los casos, coincidiendo frecuentemente con edades gestacionales precoces, el deterioro orgánico avanza rápidamente desencadenando un fallo multiorgánico con afectación vascular, renal y cerebral (Sibai, 2004). Afortunadamente, tras el alumbramiento, se resuelven la mayoría de los síntomas normalizando la situación clínica dentro de las primeras 4 semanas postparto. Sin embargo, a largo plazo, la PE representa una de las enfermedades obstétricas con mayor repercusión materno-fetal.

A nivel materno, la PE asocia un futuro riesgo, mayor respecto a población general, de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares. Las mujeres con PE tienen una mayor incidencia 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]) (Valdés, 2009). De ellas, las que presentan un debut precoz y/o severo con parto prematuro (<37 semanas), son las que más riesgo cardiovascular presentan a largo plazo, teniendo una tasa de mortalidad por este motivo ocho veces superior que la población general (Hermes, 2013) ya que también presentan una mayor tendencia al desarrollo de síndrome metabólico y diabetes mellitus a lo largo de su vida (Lykke, 2012). Por estos motivos, la *American Heart Association* añadió la PE a la lista de factores de riesgo de patología cardiovascular desde el año 2011.

A nivel neonatal, la PE no está exenta de complicaciones ya que tiene incrementada la morbilidad precoz en el neonato, que se puede extender a etapas de crecimiento más tardías, alcanzando incluso la adolescencia. Dicha morbilidad es debida a las consecuencias de la hipoperfusión placentaria sobre el sistema cardiovascular, Sistema nervioso central (SNC) y renal (Barker, 2012). A nivel del SNC, se han descrito alteraciones cognitivas como menor CI, aprendizaje alterado y distintos grados de discapacidad intelectual. A nivel cardiovascular se definen accidentes cerebrovasculares, infartos cardíacos, dislipemias, DM tipo II e incrementos de la TA, también como consecuencia del daño renal acontecido, todo ello dando como consecuencia una menor esperanza de vida. Finalmente, se debe tener en cuenta que el bajo peso al nacimiento (< 2000 gr) predispone a un incremento de la patología cardiovascular en la edad adulta (Figueras, 2011).

4.6. Prevención

Dado que la preeclampsia supone una enfermedad con una elevada morbimortalidad materna y fetal asociada y que actualmente no existe ningún tratamiento curativo, salvo el parto de la placenta, cualquier estrategia dedicada a prevenir su aparición supone un gran impacto en la salud materna y fetal a nivel mundial.

La mayoría de los factores de riesgo asociados a la PE no son modificables (salvo la obesidad, que su tratamiento pregestacional ha demostrado reducir la incidencia de PE en esta población (Cnossen, 2009)). Sin embargo, sí que existen estrategias terapéuticas que han demostrado ser efectivas como prevención de la enfermedad al disminuir notablemente la tasa de nuevos casos. Cabe destacar:

- **Aspirina (AAS):** Se conoce que la AAS (60-150mg) reduce la frecuencia de PE y sus consecuencias gestacionales (PPT, CIR) en 10-20% de las mujeres con riesgo moderado y alto de desarrollar la enfermedad. El mecanismo por el cual consigue

esta finalidad es a través de la disminución de la síntesis de tromboxano plaquetar (que se encuentra elevado en la PE) y el aumento de la prostaciclina en la pared vascular, además de que puede influir en la modulación de la inflamación, que es exagerada en la PE (Cadavid, 2017). Sin embargo, la administración de AAS una vez está desarrollada la PE no ha demostrado ningún beneficio y, por el contrario, puede exacerbar la hemorragia en pacientes con trombocitopenia asociada a PE o síndrome de HELLP (Schiff, 1990). Idealmente, la administración de AAS a una dosis de 100-150mg/día debe iniciarse desde el principio del primer trimestre de gestación ya que es cuando se producen los cambios deciduales asociados a la mala placentación (Tong, 2017). No existe un consenso sobre cuando finalizar la toma de este fármaco, si bien es cierto, que por consenso, la mayoría de sociedades científicas indican su retirada de 5 a 10 días antes del parto para disminuir el riesgo de hemorragia durante el parto (Coomarasamy, 2003); sin embargo, no se han demostrado efectos adversos maternos o fetales relacionados con el uso de dosis bajas de aspirina en el momento del parto. Los últimos estudios apuntan a que dosis diarias de ≥ 100 mg antes de la semana 16 reducen el riesgo de preeclampsia, preeclampsia grave y CIR de hasta un 10% (Roberge, 2017); incluso más concretamente, se ha demostrado que esta disminución es más marcada si se instaura desde el inicio de la gestación y hasta la semana 16 incluida, dosis diarias de 150mg en mujeres con riesgo moderado a elevado a desarrollar la enfermedad (Wright, 2018) ya que parece existir un efecto dosis-dependiente que cesa a partir del segundo trimestre.

- Suplementos de calcio. La ingesta baja de calcio en la dieta se ha asociado con la hipertensión en la población general por lo que se recomienda alcanzar la dosis diaria recomendada de calcio elemental a través de la dieta o suplementos, sin sobrepasar estos valores, ya que no aportan beneficio mayor (WHO guideline: Calcium supplementation in pregnant women, 2013)
- Alcanzar peso corporal adecuado. Sobretudo, previamente a la gestación ya que presenta beneficios reproductivos y disminuye el riesgo de PE de novo y recurrente (Maggard, 2008).

4.7. Diagnóstico precoz

Actualmente, la preeclampsia no tiene ninguna prueba predictiva fiable (Comitte Opinion No 638, 2015), por lo que el foco de atención actual se centra en su detección temprana, si bien es cierto que esta estrategia tiene un beneficio limitado ya que no evita ni su desarrollo ni su progresión. Aun así, la identificación de las mujeres con riesgo de padecer preeclampsia puede garantizar un manejo adecuado y consecuentemente, mejorar los resultados obstétricos y fetales. Una buena prueba predictora de PE debe ser simple, rápida, no invasiva, de bajo coste, fácil de realizar y segura para la paciente aunque también debe tener una elevada sensibilidad y especificidad (Levine, 2009)

Las estrategias actuales en la que se basa el diagnóstico precoz de la preeclampsia son:

- Medición universal de la TA a todas las gestantes en cada visita obstétrica, ayudará a determinar la TA inicial de la mujer (Henderson, 2017).
- Identificar, mediante la anamnesis, a aquellas mujeres con alto riesgo desde el inicio del embarazo para ofrecer medidas profilácticas y asistencia en centros especializados (Magee, 2014), teniendo en cuenta que los factores de riesgo clásicos por sí solos únicamente predicen el 30% aproximadamente de todas las preeclampsias (Mabuchi, 2016). Se investiga actualmente si la asociación de factores de riesgo históricos asociados a pruebas de laboratorio y de imagen (índice de pulsatilidad medio de las arterias uterinas en la ecografía del primer trimestre) pudiera aumentar este porcentaje de predicción aunque los modelos actuales tienen un valor predictivo positivo bajo.

5. Estudios ómicos del endometrio: Decidualización in vitro.

Desde que se descubrió la secuenciación completa del genoma humano en 2002, la posibilidad de conocer la fisiología funcional endometrio humano es muy amplia y variada así como la repercusión de dicho funcionamiento sobre puntos de estudio actuales como son la esterilidad primaria por alteraciones en la receptividad endometrial y/o el desarrollo de la placentación humana, proceso sobre el que se centran las principales hipótesis etiopatogénicas de enfermedades obstétricas graves que actualmente son de causa desconocida, como la preeclampsia o el CIR.

El conocimiento actual de las denominadas ciencias *ómicas* han permitido la creación de nuevas biotecnologías con las que se consiguen realizar estudios moleculares que han producido un cambio de paradigma en el entendimiento de la biomedicina así como en el diagnóstico médico de enfermedades cuya causa hasta la fecha era desconocida tales como displasias óseas fetales o microdeleciones, entre muchas otras (Medina 2010). Además, el conocimiento de estas ciencias ómicas también ha dado paso a la introducción de la bioinformática en este campo ya que se requiere para poder analizar e interpretar los datos masivos obtenidos.

Las ciencias ómicas son cuatro y su punto de estudio se resume en la imagen 18: genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica. La genómica es un conjunto de disciplinas científicas que se encargan del estudio de la función, regulación y transmisión del material genético (genomas) y sus aplicaciones en terapia génica, biotecnológica etc. La transcriptómica se encarga del estudio del conjunto de ARN que existe en una célula, tejido u órgano, entendiendo este conjunto de ARN como la suma del ARN ribosomal (ARNr), ARN de transferencia (ARNt), ARN mensajero (ARNm), ARN de interferencia (ARNi) y micro ARN (ARNmi). La proteómica se centra en el estudio de la estructura y función proteica y la metabolómica estudia el perfil de los metabolitos o moléculas pequeñas de una muestra biológica así como los procesos químicos que los involucran.

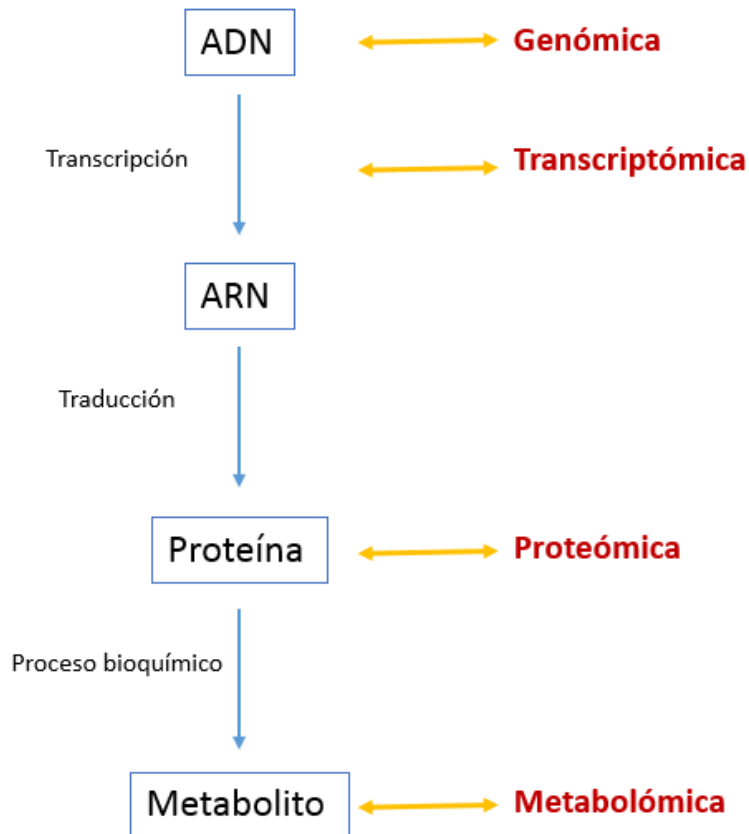


Fig. 18. Esquema que simplifica el proceso en el que se centra cada ciencia ómica dentro del ciclo molecular.

5.1. Transcriptómica y proteómica del endometrio

Como se ha mencionado anteriormente, gracias a la tecnología de arrays y a programas bioinformáticos creados a partir de las ciencias ómicas, actualmente es posible caracterizar enfermedades y procesos biológicos a nivel molecular según su transcriptoma, es decir, según el conjunto de genes que se expresan en un tejido y un momento concreto (Medina, 2010).

Los microarrays de proteínas permiten la detección, caracterización y cuantificación de las proteínas así como el estudio de su función y sus interacciones tanto entre diferentes proteínas como con otras moléculas como ADN o lípidos. Constituyen una matriz plana de diferentes sustratos en los que las moléculas a analizar quedan inmovilizadas en diferentes puntos con el objetivo de capturar mediante uniones específicas la presencia de determinadas proteínas, permitiendo su análisis cuantitativo.

En el tejido endometrial, la transcriptómica y las herramientas moleculares como los arrays de proteínas se vienen utilizando desde hace más de 10 años permitiendo un análisis

objetivo del endometrio humano. Estudios científicos publicados utilizan estas herramientas para la evaluación de la receptividad endometrial en el contexto de medicina reproductiva (Horcajadas, 2007) ya que aporta gran cantidad de información sobre la regulación y la desregulación de los genes durante el periodo de la ventana de implantación. Otros estudios se han centrado en conocer la proteómica y secretómica del endometrio con la finalidad de modelar el interactoma decidual humano y entender la respuesta celular a diferentes señales intra y extracelulares (Garrido-Gómez, 2011).

Así pues, tanto la transcriptómica como la proteómica endometrial han permitido abrir un amplio abanico de estudio en este campo, tanto en la medicina reproductiva en la que ha permitido grandes avances a nivel de la baja receptividad, como en la obstetricia en la que podría ser un herramienta muy útil para el diagnóstico precoz de enfermedades graves como la preeclampsia, sobretodo en pacientes candidatas o con factores de riesgo ya que permitirían un control más estricto de su gestación y/o incluso adoptar medidas encaminadas a evitar su aparición.

5.2. Estudios sobre decidualización.

El estudio del endometrio utilizando las ciencias ómicas es relativamente reciente. Desde que se publicó la secuencia completa del genoma humano, y nacieron dichas ciencias, se han desarrollado múltiples estudios destinados a conocer el funcionamiento fisiológico del endometrio humano y la decidualización celular endometrial así como las posibles patologías relacionadas con la alteración de algunas de estas funciones.

Centrando la atención en la decidualización humana, en la literatura científica existen múltiples estudios que han destinado sus herramientas transcriptómicas para valorar la posible relación de la alteración de la decidualización en el campo de la medicina reproductiva, o más concretamente, en la evaluación de la receptividad endometrial como causa de esterilidad (Horcajadas, 2007). Además, gracias al desarrollo de la bioinformática, se ha conseguido desarrollar una herramienta genómica denominada Matriz de Receptividad Endometrial (ERA) que consiste en un microarray personalizado y un algoritmo informático de predicción bioinformática que permite identificar de forma individual los días de mayor receptividad endometrial en cada caso (Garrido- Gómez, 2013).

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 cómo responde a nivel celular a diferentes señales intra y extracelulares con el objetivo de modelar el interactoma decidual humano (Garrido-Gómez, 2011).

Otros estudios demuestran, mediante transcriptómica de CTB aislados de mujeres con PEs, que existe una aberración común en la expresión de sus genes inmediatamente después del aislamiento de estos CTB por lo que proponen que, en una PEs, el entorno de los CTB invasores, altera la regulación de la expresión de sus genes (Zhou, 2013). En este sentido, la decidua, que apoya el crecimiento y la función de la placenta, es un candidato principal.

Utilizando la bioinformática, estudios más recientes han revelado la diferente expresión de 396 genes en las vellosidades coriónicas de gestantes de 11 semanas y 5 días de gestación que posteriormente desarrollaron PEs versus muestras de mujeres de estas mismas características pero con embarazos de curso normal. Este hallazgo les permitió concluir el estudio con que el perfil transcripcional global de estas muestras de vellosidades coriónicas apuntaba a una decidualización insuficiente o defectuosa en los embarazos que luego se complicaron con la sPE (Rabaglino, 2015).

Por tanto, cada vez más, la teoría de que la decidualización deficiente o defectuosa es el principal factor etiopatogénico del desarrollo de una preeclampsia va cobrando fuerza respecto a otras hipótesis hasta la fecha estudiadas como la placentación alterada (Redman, 2005), y es por ello que los estudios ómicos centran su atención en conocer la fisiología decidual humana y su diferente expresión en los casos afectados de PE.

6. Anexina A2

6.1. Definición, función celular y molecular

Anexina A2 (ANXA2) es una proteína de unión a fosfolípidos, mediada por la activación de canales de calcio, que se expresa en casi todas las líneas celulares eucariotas y se asocia con los filamentos de actina por lo que cumple un espectro de funciones dentro como en la superficie celular, regulando por tanto, las interacciones membrana – membrana y membrana - citoesqueleto (Luo, 2013). Además, se sospecha que pueda estar implicada y ser necesaria para el contacto estrecho entre membranas de células adyacentes, regulando este proceso mediante la formación de complejos con Rac1/p21 asociados a cadherina y quinasa y ricos en actina (Hansen, 2002)

En las superficies celulares, ANXA2 se presenta formando un complejo heterotetramérico localizado en el citoesqueleto de membrana y formado por dos moléculas de ANXA2 y dos de S100A10 encargándose de la organización de dominios citoplasmáticos del receptor con el citoesqueleto de la membrana del subplasma. Este complejo también se ocupa del ensamblaje del plasminógeno y su activador en el tejido de forma que esta unión acelera la conversión de plasminógeno en plasmina y activando a esta última molécula. Dicha activación permite la regulación de la hemostasia y la trombosis debido a la actividad fibrinolítica de la plasmina (Liu, 2016).

En el interior celular, ANXA2 se presenta como monómero citosólico participando en interacciones dinámicas con microdominios lipídicos por lo que está involucrada en múltiples sucesos dinámicos de la membrana plasmática incluyendo la endocitosis, exocitosis, formación del fagóforo en macroautofagia y reparación lisosómica.

Para conseguir el mantenimiento de la dinámica celular, anexina A2 participa de forma importante en el tráfico de membranas, en la estabilización de complejos de proteínas asociados a la membrana del citoesqueleto de actina y en la modulación de la migración celular mediante la reorganización de actina y la adhesión celular gracias a que actúa como sustrato del receptor mayor de la insulina (Domínguez, 2009). Además se ha demostrado su implicación en la regulación del propio citoesqueleto de actina para la migración celular mediante el hallazgo de ANXA 2 asociada al complejo Rho / proteinquinasa sérica / treonina (ROCK) que influye en la orientación de Rho a las membranas celulares y por tanto controla los eventos de señalización relacionados con Rho que regulan la reorganización del citoesqueleto durante la migración de células epiteliales (Babbin, 2007)

También se ha demostrado la participación de ANXA2 en la polimerización de los filamentos de actina en presencia de calcio, permitiendo así el transporte de vesículas. Para llevar a cabo esta función, ANXA2 se ha localizado formando parte de estructuras dinámicas del citoesqueleto o de la membrana plasmática como fagosomas o pinocitomas, o incluso en los tallos de actina de los macropinosomas móviles (Hayes, 2006).

Por tanto ANXA2 juega un papel fundamental en la regulación de las modificaciones estructurales del citoesqueleto de actina que son necesarias para que las células realicen de forma adecuada los procesos de migración, adhesión y motilidad así como cambios en la propia morfología celular.

6.2. Participación de ANXA2 en procesos endometriales.

Aunque varios estudios han demostrado la expresión de ANXA2 en el endometrio humano, su función durante la decidualización y la implantación embrionaria se desconoce.

A pesar de ello, sí se sabe que uno de los procesos endometriales más afectados por las alteraciones de ANXA2 es la receptividad endometrial. Se trata de un estado transitorio de las células endometriales de 2 días de duración que coinciden con los días 7 a 9 tras el pico de LH y el día 21 a 23 del ciclo endometrial. Durante este tiempo, las células endometriales sufren cambios endocrinos, génicos y bioquímicos que les permiten facilitar la adhesión del blastocisto y la posterior implantación embrionaria.

Diversos estudios científicos han demostrado la participación de ANXA2 en este proceso. Uno de ellos demostró la necesidad de niveles elevados de ANXA2 durante la fase secretora media y tardía del ciclo menstrual para que la remodelación y preparación endometrial se lleve a cabo de forma correcta y se consiga la adhesión del blastocisto ya que se observaron niveles descendidos de ANXA2 característicos de endometrios no receptivos en muestras endometriales obtenidas los días correspondientes al periodo de receptividad endometrial (Domínguez, 2009).

Además, gracias al desarrollo bioinformático en el campo de la medicina, se han podido crear herramientas diagnósticas como el test de receptividad endometrial (ERA) que permite evaluar a nivel génico e individual si el endometrio se encuentra receptivo el día en el que se plantea realizar una transferencia embrionaria (Garrido-Gómez, 2013). Esto lo consigue mediante análisis por microarray de la expresión de diversas moléculas que se conoce participan en la receptividad endometrial, entre ellas ANXA2, de forma que informa de si el endometrio se

encuentra o no receptivo y por tanto la necesidad de adelantar o retrasar la transferencia embrionaria unas horas.

Estudios recientes sobre el endometrio han demostrado un defecto de decidualización en este tejido presente en las mujeres con PEs que se detecta en el momento del parto y persiste durante años a partir de entonces, desafiando el concepto previo de que la PEs tenía su origen en un fallo placentario (Garrido Gómez, 2017).

6.3. Experimentación con modelos in vitro e in vivo

El papel que juega ANXA2 sobre la decidualización humana y su contribución a las alteraciones de este proceso es desconocido y por ello es objetivo de múltiples estudios de investigación desarrollados en la actualidad ya que de comprobarse esta relación causa-efecto, ANXA2 se convertiría en una herramienta de diagnóstico precoz o incluso una herramienta terapéutica para múltiples enfermedades o complicaciones relacionadas con una decidualización defectuosa o inexistente, tales como el crecimiento intrauterino retardado (CIR), parto prematuro, desprendimiento de placenta, esterilidad secundaria a causa uterina o la propia preeclampsia.

Los estudios que han pretendido demostrar la contribución de ANXA2 como agente etiológico implicado en una decidualización defectuosa han demostrado, basándose en el perfil transcripcional global del endometrio decidualizado, que hay una infraexpresión significativa de ANXA2 durante la decidualización in vitro de CEE procedentes de mujeres con antecedentes de PEs (Garrido-Gómez, 2017). También se ha demostrado que esta infraexpresión de ANXA2 se ha implicado en los pasos iniciales de la adhesión del embrión al epitelio endometrial durante la implantación (Garrido-Gómez, 2012).

Otros estudios se han centrado en demostrar el efecto in vivo del silenciamiento de ANXA2 sobre la decidualización endometrial en el modelo de ratón y han observado que las camadas de los roedores ANXA2^{-/-} o nulos presentan una reducción en el peso del 10-13%, efecto que podría compararse con los CIR humanos (Ling, 2004).

6.4. Implicación de ANXA2 en preeclampsia

Debido a que la preeclampsia se trata de una enfermedad obstétrica grave desde el punto de vista de morbi-mortalidad (Stegers, 2010) y que actualmente no se conoce la causa exacta de su origen, los investigadores centran sus esfuerzos en intentar elaborar un modelo etiopatogénico que pueda explicar el origen y desencadenamiento de esta enfermedad así como poder descubrir una molécula o proceso molecular sobre el que lanzar dianas terapéuticas o preventivas.

Siempre se ha considerado que una hipotética mala placentación podía ser el origen de la PE y por tanto muchos estudios estaban dirigidos a demostrar el papel principal del blastocisto en la etiología postulando defectos de implantación o de invasión vascular de las arterias espirales maternas por parte del CTB placentario (Phipps, 2019). Sin embargo, en la actualidad, esta línea de investigación se ha ido abandonando para pasar a darle más protagonismo a una posible decidualización defectuosa o deficiente como causa etiológica de la PE.

A raíz de los estudios publicados que concluyen que niveles descendidos de ANXA2 en CEE han conducido a una decidualización defectuosa o deficiente demostrado por la escasa presencia de marcadores moleculares de decidualización como la PRL e IGFBP-1 (Garrido-Gómez, 2017), y teniendo en cuenta la fuerte relación causa-efecto existente entre la decidualización defectuosa y el posible origen de la preeclampsia, son muchos los estudios actuales que centran sus esfuerzos en demostrar la implicación de ANXA2 en la etiopatogenia de esta enfermedad.

Tras el conocimiento de las ciencias ómicas y el desarrollo de técnicas bioinformáticas, los últimos estudios se han centrado en el perfil transcripcional del endometrio y sus características génicas en las distintas fases del ciclo menstrual. Al comparar el perfil transcripcional global de endometrio procedente de mujeres con antecedente de preeclampsia severa (PEs) en alguna gestación anterior frente a mujeres con gestaciones de curso normal, se evidenció una reducción en la expresión de ANXA2 en el grupo PEs (Garrido-Gómez, 2012).

A nivel de la superficie celular, ANXA2 presente en los filamentos de actina como complejo heterotetramérico se encarga de la activación de la plasmina, tras la unión del plasminógeno con su activador tisular, de forma que favorece la actividad fibrinolítica y permite la migración dirigida de células endoteliales en ambiente favorecedor de angiogénesis (Ling, 2004). Se ha demostrado que el bloqueo de ANXA2, puede condicionar la formación de microtrombos en el torrente circulatorio, evento característico del síndrome antifosfolípido (SAF), el cual se conoce que predispone al desarrollo de PE (Xin, 2012).

6.5. Función en otras patologías

ANXA2 se expresa en la mayoría de líneas celulares eucariotas y al regular la remodelación del citoesqueleto dependiente de los filamentos de actina así como la dinámica de la membrana plasmática, se ve implicada en múltiples funciones fisiológicas o patológicas en función de su expresión. Entre ellas destaca:

- Promueve la actividad fibrinolítica, mediante el incremento de rapidez en la producción de plasmina y la unión del plasminógeno a su activador tisular en la superficie de las células vasculares endoteliales (Kwon, 2005). Por tanto, un defecto de dicha actividad fibrinolítica, ligada a niveles bajos de ANXA2 puede conferir un ambiente protrombótico (Xin, 2012). Un estudio in vivo con ratones ANXA2^{-/-} o silenciados para la expresión de esta proteína ha demostrado que anexina II regula tanto la homeostasis microvascular de la fibrina como el aclaramiento macrovascular de trombos (Ling, 2004)
- La decidualización endometrial humana mediante la reorganización de los filamentos de actina para conseguir el cambio morfológico de las células endometriales estromales (CEE) (Ihnatovych, 2009).
- Crecimiento intrauterino retardado (CIR) y parto prematuro: los defectos de decidualización secundarios a infraexpresión de ANXA2 entre otros mecanismos implicados, conlleva defectos de placentación que pueden desencadenar ambas patologías (Cha, 2012).
- Cicatrización. Se han hallado niveles inferiores de ANXA2 en cicatrices queloides respecto a cicatrices de curación normal, por lo que se relaciona su expresión con una correcta cicatrización al regular la movilidad de los fibroblastos (Kim, 2014).
- Hepatocarcinoma: se ha relacionado una sobreexpresión de ANXA2 en tejido tumoral con mayor tasa de metástasis y agresividad de los hepatocarcinomas, postulando a la anexina A2 como una diana terapéutica y como marcador de diagnóstico precoz junto con la alfa-fetoproteína en este tipo de tumores (Dong, 2014).
- Actividad bronquial: se postula la participación del ANXA2 en la correcta funcionabilidad y permeabilidad bronquial por su implicación en la motilidad celular debido a su relación con los filamentos de actina (Dassah, 2014).

JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

La Preeclampsia (PE) supone un trastorno obstétrico específico, ya que solo ocurre en mujeres embarazadas a partir de la semana 20 de gestación, cuya presentación clínica suele coincidir en la mayoría de los casos con una subida de la tensión arterial (TA) por encima de 140/90mmHg en repetidas tomas y proteinuria o evidencia de afectación sistémica por dicha HTA (Stegers, 2010). El concepto de preeclampsia severa (PEs) implica una exacerbación de la HTA o la aparición de edema de pulmón, trombocitopenia o insuficiencia renal entre otros signos y síntomas considerados graves y, si no se diagnostica y se actúa a tiempo, pueden llegar a traer consecuencias para la salud de la gestante y su feto, llegando incluso a la muerte (Bokslag, 2016).

Actualmente, la única cura definitiva para terminar con la PE es la extracción de la placenta, mediante parto o cesárea, independientemente de la edad gestacional, por lo que no debe extrañar la repercusión mundial que tiene esta enfermedad tanto a nivel de morbimortalidad materna y fetal como de costes sanitarios.

Por tanto, la gran cantidad de recursos empleados en sanidad e investigación dedicados al estudio de la preeclampsia se justifican por estas razones:

- *Prevalencia.* La PE afecta al 8% de gestantes primigestas y a 8 millones de parejas de madres e hijos en todo el mundo cada año (Fisher, 2015).
- *Morbilidad y mortalidad materna e infantil.* La morbilidad y mortalidad materno-infantil son indicadores clave de la salud general de la población. La PE supone, anualmente, más de 76.000 muertes maternas y 500.000 infantiles a nivel mundial (Ghulmiyyah, 2012). Además supone la primera causa de prematuridad tanto en Occidente como en países en vía de desarrollo, alcanzando un porcentaje del 15% en EEUU (Navaratnam, 2013).
- *Costes sanitarios.* El gasto anual sanitario estimado en países desarrollados es de 31 mil millones de euros, derivados de la atención y asistencia prenatal a las gestantes afectadas por PE y supone el 20% del gasto de las unidades de cuidados intensivos neonatales ya que se trata de la primera causa de parto prematuro no espontáneo en países desarrollados (Meads, 2008). A corto plazo, los gastos de atención médica durante los primeros 12 meses tras el parto suponen 2.18 billones de dólares en EEUU (Fox, 2017).

Actualmente se desconoce la causa que origina la enfermedad. Sin embargo, sí se ha podido demostrar que una invasión superficial del trofoblasto placentario por la decidua hasta el segmento miometrial de las arterias espirales con la consecuente remodelación arterial defectuosa e hipoperfusión uteroplacentaria están presentes, por lo que se considera una teoría ya aceptada y comprobada que participa en la patogénesis de la enfermedad. La remodelación arterial deficiente también está presente en la etiopatogenia de otros síndromes obstétricos como el crecimiento fetal restringido (CIR), parto prematuro con membranas íntegras, abortos, muerte fetal en el segundo y tercer trimestre de la gestación o rotura prematura de membranas pretérmino (Brosens, 2011).

Hasta hace pocos años, la mayoría de esfuerzos científicos estaban dirigidos a demostrar la implicación de las células trofoblásticas de origen fetal como causantes de la remodelación arterial deficiente presente en la PE, restando importancia al papel de la decidua materna en este proceso.

Sin embargo, tras el conocimiento del genoma humano y la introducción de las ciencias ómicas y tecnologías bioinformáticas al campo de la investigación médica, se ha conseguido descubrir la participación del endometrio materno y su proceso de decidualización en el origen de la PE, descubriendo nuevas moléculas cuya expresión se ve alterada en mujeres que han desarrollado la enfermedad (Garrido- Gómez, 2012).

A pesar de todos los esfuerzos, todavía en la actualidad se desconoce el origen exacto de la PE y la causa que provoca que en algunas gestantes dicha enfermedad debute con sintomatología grave, incluso mortal. Es por ello que si se consigue alcanzar el conocimiento de las causas y mecanismos que llevan a una mala placentación, se abriría un nuevo abanico de posibilidades de prevenir, e incluso combatir, no solo la propia PE sino también enfermedades que comparten una etiopatogenia similar a ella.

HIPÓTESIS

3. Hipótesis

Durante décadas de investigación se han destinado múltiples recursos materiales y económicos para comprender completamente la patogénesis de la preeclampsia (PE) y todavía, en la actualidad, este objetivo sigue siendo difícil de alcanzar lo que dificulta las posibilidades de identificar biomarcadores predictivos o de diagnóstico precoz, así como estrategias terapéuticas específicas que ayuden a evitar, o al menos paliar, las consecuencias de esta enfermedad.

El objetivo general durante todos estos años anteriores de trabajo ha sido la demostrar que la placenta juega un papel central en el desarrollo de la PE, ya que una invasión deficiente de los citotrofoblastos en las arterias espirales ha sido revelado como un factor causal (Khong, 1986).

Posteriormente, a este fundamento se le añadió la participación materna, de forma que se consideraba que la etiopatogenia de la PE se desarrollaba en dos etapas sucesivas, la primera en la que se desarrollaba un defecto placentario, y la segunda en la que a raíz de la mala placentación se desencadenaba una respuesta materna anormal que se manifestaba con los signos y/o síntomas de esta enfermedad (Redman, 2005). Esta afirmación creó un gran interés en la población científica en torno a la subpoblación de citotrofoblastos que invade las capas uterinas maternas, por lo que se desarrollaron diferentes estudios transcripcionales y moleculares para intentar demostrar, y de hecho lo consiguieron, un patrón de expresión de diferenciación alterado en estas células trofoblásticas extraídas de placentas de mujeres con PEs y cultivadas durante 48h (Zhou, 1997). Sin embargo dicha anomalía se autocorregía al final del período de cultivo celular, apuntando fuertemente hacia una participación materna del ambiente paracrino donde tiene lugar la placentación, y en ese sentido, las células endometriales decidualizadas podían ser las principales candidatas a ejercer dicho efecto ya que entre sus funciones destaca el soporte al crecimiento y función de la placenta.

A partir de aquí, se abren nuevas líneas de investigación en la etiopatogenia de la PE teniendo al factor materno, mediante el estudio de la decidualización que experimenta el endometrio, como contribuyente principal al desencadenamiento de la enfermedad (Garrido-Gómez, 2017). Además, mediante estudios transcripcionales y moleculares del endometrio se ha hallado una alteración en la expresión y función de proteínas, especialmente la anexina A2 (ANXA2), presente en las células endometriales epiteliales que gobiernan la receptividad endometrial pero cuya expresión en el estroma podría tener un rol importante en este proceso de decidualización (Garrido-Gómez, 2012).

El presente estudio pretende demostrar la contribución uterina a la etiología de la preeclampsia severa. Más concretamente, se plantea la hipótesis de que una decidualización deficiente o defectuosa podría contribuir fuertemente a la implantación e invasión embrionaria que gobierna la consecuente placentación, ocasionando las alteraciones fenotípicas a las que se asocia la preeclampsia severa. Además este estudio de investigación pretende valorar el papel funcional de la deficiencia de anexina A2 in vitro e in vivo en la resistencia a la decidualización que acontece en esta enfermedad cuya hipótesis es que una deficiencia en anexina A2 puede ser la causa total o parcial de la decidualización alterada, característica de pacientes con antecedente de preeclampsia severa.

OBJETIVOS

4. Objetivos

4.1. Objetivos generales

- Demostrar una contribución materna en los sucesos que ocurren durante la etiopatogenia de la Preeclampsia.
- Estudio y valoración del perfil transcripcional global del endometrio antes y después del proceso de decidualización en mujeres con antecedente de preeclampsia severa.
- Evaluar la participación de la ANXA2 en la decidualización endometrial de mujeres con antecedente de preeclampsia severa.

4.2. Objetivos específicos

- Análisis in vitro de la decidualización de células endometriales procedentes de mujeres con antecedentes de preeclampsia severa en gestaciones anteriores y las posibles diferencias existentes respecto a aquellas cuyo embarazo transcurrió con normalidad.
- Estudiar los genes que se expresan de forma diferencial en el endometrio de mujeres con antecedente de preeclampsia severa respecto a las sanas, tanto antes como después de la decidualización.
- Valorar los efectos in vitro e in vivo de la inhibición de ANXA2 sobre la decidualización endometrial y la posterior placentación.
- Evaluar la posibilidad de que ANXA2 pueda ser considerado como un biomarcador materno preconcepcional que evalúe el riesgo de desarrollar preeclampsia severa.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. <u>Reclutamiento de pacientes y muestras biológicas</u>	71
1.1. <i>Mujeres con embarazo previo sano</i>	71
1.2. <i>Mujeres con preeclampsia severa en embarazo previo</i>	73
1.3. <i>Toma de las muestras</i>	75
1.4. <i>Características clínicas de las pacientes reclutadas</i>	77
1.4.1. <i>Características clínicas de las pacientes preeclampsia</i>	81
1.4.2. <i>Características clínicas de las pacientes control</i>	81
1.4.3. <i>Comparativa entre ambos grupos</i>	84
2. <u>Manejo y procesamiento de la muestra en el laboratorio</u>	87
2.1. <i>Recepción y procesamiento de la muestra</i>	87
2.1.1. <i>Disgregación de células epiteliales y estromales</i>	87
2.1.2. <i>Cultivo de células endometriales estromales (CEE)</i>	88
2.2. <i>Decidualización in vitro</i>	90
2.2.1. <i>Decidualización de las células estromales</i>	90
2.2.2. <i>Comprobación del proceso de decidualización</i>	91
2.2.2.1. <i>ELISA de PRL e IGFBP-1</i>	91
2.2.2.2. <i>Marcaje con actina filamentosa (actina-F)</i>	92
2.3. <i>Análisis transcriptómico y validación</i>	83
2.3.1. <i>Análisis del transcriptoma de las CEE decidualizadas in vitro</i>	94
2.3.2. <i>Validación de los resultados de expresión génica mediante RT-PCR</i>	94
2.4. <i>Estudio de Anexina A2 (ANXA2)</i>	95
2.4.1. <i>Análisis de la expresión génica de ANXA2</i>	95
2.4.2. <i>Análisis proteína ANXA2 intra/extracelular</i>	95
2.4.2.1. <i>Extracción de proteína</i>	95
2.4.2.2. <i>Cuantificación de proteína</i>	96
2.4.2.3. <i>Western blot</i>	96
2.4.3. <i>Silenciamiento ANXA2 mediante ARNi</i>	97
2.4.4. <i>Ensayo medición in vivo actina F/ actina G</i>	98
2.4.5. <i>Estudio con ratones Knockout o nulos</i>	99
2.4.5.1. <i>Descripción de la cepa de ratones Knockout</i>	100
2.4.5.2. <i>Diseño experimental del estudio in vivo</i>	101
2.4.5.3. <i>Evaluación cuantitativa de sitios de implantación</i>	102
2.4.5.4. <i>Tinción con hematoxilina – eosina</i>	103

2.4.5.5. Inmunofluorescencia ANXA2 y otras proteínas	104
3. <u>Análisis estadístico</u>	106
4. <u>Análisis bioinformático</u>	106

1. Reclutamiento de pacientes y muestras biológicas

1.1. Mujeres con embarazo previo sano

Las muestras control proceden de pacientes cuyo parto o cesárea se produjo en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia desde septiembre de 2015 hasta mayo de 2017. Dichos partos procedían de un curso gestacional normal, sin complicaciones obstétricas. Dichas pacientes se reclutaron gracias a la búsqueda por diagnóstico principal de “gestación de curso normal” 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.

Se obtiene un listado de números de historia clínica a partir de los cuales se inicia la revisión de los criterios de inclusión para la participación en este estudio, que son los siguientes:

- Mujeres entre 18 y 42 años (ambos incluidos)
- Antecedente de embarazo previo de curso normal con recién nacido sano, descartando preeclampsia, crecimiento intrauterino restringido (CIR) o prematuridad, entre otras muchas complicaciones obstétricas.
- Ausencia de uso de anticoncepción hormonal los 3 meses previos a la toma de la muestra.

De todas las pacientes seleccionadas por cumplir con estos criterios se recogieron antecedentes ginecológicos generales como fórmula menstrual (FM), revisiones previas y complicaciones obstétricas de gestaciones anteriores a la que se estudia, en caso de que existieran. Teniendo en cuenta estos datos se descartan aquellas mujeres que tienen alguno de los criterios de exclusión para la participación en este estudio que consisten en:

- Presencia de patología ginecológica (endometriosis, hipermenorreas...) o neoplasia hormonodependiente.
- Toma de fármacos
- Uso de anticoncepción hormonal (orales, transdérmicos, vaginales e intramusculares) o DIU de cobre
- HTA Crónica
- Lactancia Materna

Una vez obtenido el registro de las pacientes que cumplen criterios de inclusión y ninguno de exclusión, se recogen los datos de la gestación última por la que son candidatas a incluirse en el estudio. Dichos datos se enumeran a continuación:

- Al ingreso hospitalario:
 - Edad gestacional
 - TAS y TAD
 - Hallazgos analíticos:
 - Proteínas en la orina mediante pruebas de anormales y sedimento (proteinuria)
 - Hemoglobina (Hb)
 - Plaquetas
 - Fibrinógeno (FBN)
 - Aspartatoaminotransferasa (GOT)
 - Alaninaaminotransferasa (GPT)
 - Proteínas totales
 - Otras complicaciones no asociadas a la gestación.

- Finalización de la gestación:
 - Edad gestacional
 - Vía de finalización (parto/cesárea)
 - Peso del neonato
 - Peso de la placenta

Una vez revisada la historia, se contactaba con la paciente vía telefónica, explicándoles el diseño del estudio y en qué consistía su participación. Además, se revisaban de nuevo los criterios de exclusión. Si se comprobaba que la paciente era candidata a entrar a formar parte del estudio, se preguntaba y quedaba registrada su fecha de última regla (FUR) y fórmula menstrual y se citaba en el hospital entre los días 15 y 19 de ciclo menstrual.

El día de la cita, previamente a su participación, se le explicaba de nuevo a la paciente en qué consiste el estudio y se entregaba la Hoja de información a la paciente (anexo I), y solo en caso de que no revocara su intención de participar, firmaba el Consentimiento Informado (anexo II).

1.2. Mujeres con preeclampsia severa en embarazo previo.

Las muestras de preeclampsia severa (PEs) proceden de pacientes cuyo parto o cesárea se produjo en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia desde septiembre de 2015 hasta mayo de 2017. Dichos partos procedían de gestaciones complicadas con PEs, con o sin complicaciones obstétricas añadidas. Dichas pacientes se reclutaron gracias a la búsqueda por diagnóstico principal de “Preeclampsia severa” o “Preeclampsia grave” 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.

Se obtiene un listado de números de historia clínica a partir de los cuales se inicia la revisión de los criterios de inclusión para la participación en este estudio, que son los siguientes:

- Mujeres entre 18 y 42 años (ambos incluidos)
- Antecedente de preeclampsia severa en algunos de sus embarazos, documentado mediante diagnóstico médico y analítico: obligatorio la presencia de hipertensión arterial (HTA) con o sin proteinuria asociada (muestra aislada > 30 mg/dL) en gestaciones de 20 semanas o más avanzadas.
- Ausencia de uso de Anticoncepción hormonal los 3 meses previos a la toma de la muestra.

Entendiendo como PEs o grave la presencia de al menos uno de estos criterios publicados en la guía de asistencia clínica “*Trastornos hipertensivos del embarazo*” de 2006 por la Sección Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO):

- TAS \geq 160 mmHg y/o TAD \geq 110 mmHg en dos determinaciones separadas 6 horas, estando la paciente en reposo en cama.
- Proteinuria \geq 2 gramos en orina de 24 horas.
- Deterioro renal progresivo (oliguria \leq 500 ml en 24 horas y/o creatinina sérica >1,2 mg/dl).
- Alteraciones cerebrales o visuales (hiperreflexia con clonus, cefalea severa, escotomas, visión borrosa, amaurosis).
- Edema de pulmón o cianosis.

- Alteración de las pruebas funcionales hepáticas (elevación del doble de su valor referencia de GOT Y GPT), pudiendo añadir dolor persistente en epigastrio y/o hipocondrio derecho.
- Alteraciones hematológicas: trombocitopenia (< 100.000 plaquetas/ mm^3), coagulación intravascular diseminada (CID), hemólisis.
- Alteración placentaria con manifestaciones fetales como crecimiento intrauterino restringido (CIR).

De todas las pacientes seleccionadas por cumplir con estos criterios se recogieron antecedentes ginecológicos generales como fórmula menstrual (FM), revisiones previas y complicaciones obstétricas de gestaciones anteriores a la que se estudia, en caso de que existieran. Teniendo en cuenta estos datos se descartan aquellas mujeres que tienen alguno de los criterios de exclusión para la participación en este estudio que consisten en:

- Presencia de patología ginecológica (endometriosis, hipermenorreas...) o neoplasia hormonodependiente.
- Toma de fármacos
- Uso de anticoncepción hormonal (orales, transdérmicos, vaginales e intramusculares) o DIU de cobre
- HTA Crónica
- Lactancia Materna

Una vez obtenido el registro de las pacientes que cumplen criterios de inclusión y ninguno de exclusión, se recogen los datos de la gestación última por la que son candidatas a incluirse en el estudio. Dichos datos se enumeran a continuación:

- Al ingreso hospitalario:
 - Edad gestacional
 - TAS y TAD
 - Hallazgos analíticos:
 - Proteínas en la orina mediante pruebas de anormales y sedimento (proteinuria)
 - Hemoglobina (Hb)
 - Plaquetas
 - Fibrinógeno (FBN)

- Aspartatoaminotransferasa (GOT)
 - Alaninaaminotransferasa (GPT)
 - Proteínas totales
 - Otras complicaciones no asociadas a la gestación.
- Finalización de la gestación:
 - Edad gestacional
 - Vía de finalización (parto/cesárea)
 - Peso del neonato
 - Peso de la placenta

Una vez revisada la historia, se contactaba con la paciente vía telefónica, explicándoles el diseño del estudio y en qué consistía su participación. Además se revisaban de nuevo los criterios de exclusión. Si se comprobaba que la paciente era candidata a entrar a formar parte del estudio, se preguntaba y quedaba registrada su fecha de última regla (FUR) y fórmula menstrual y se citaba en el hospital entre los días 15 y 19 de ciclo menstrual.

El día de la cita, previamente a su participación, se le explicaba de nuevo a la paciente en qué consiste el estudio y se entregaba la Hoja de información a la paciente (anexo I), y solo en caso de que no revocara su intención de participar, firmaba el Consentimiento Informado (anexo II).

1.3. Toma de las muestras

La obtención de la muestra endometrial se realizaba de forma idéntica en ambos grupos de pacientes y siempre efectuado por la misma persona. Como se ha descrito anteriormente y se resume en la figura 19, se citaba a la paciente entre el día 15 y 19 de ciclo menstrual en base a su FUR y su FM y tras firmar el consentimiento informado, se procedía a la toma de la muestra que consiste en colocación de un espéculo desechable (*Unidix, España*) para abrir la cavidad vaginal y visualizar el cérvix. A través del orificio cervical externo (OCE) se introduce una cánula flexible (*Gynetics, Bélgica*) atravesando el orificio cervical interno (OCI) hasta alcanzar el fondo uterino. Una vez llegado a este punto se procede a la toma del aspirado endometrial mediante la retirada de la guía interna de la cánula y su posterior rotación hasta llenar dicho conducto. El

material obtenido se mantenía estéril en un frasco de polipropileno relleno de PBS frío para su traslado al laboratorio y su posterior procesamiento.

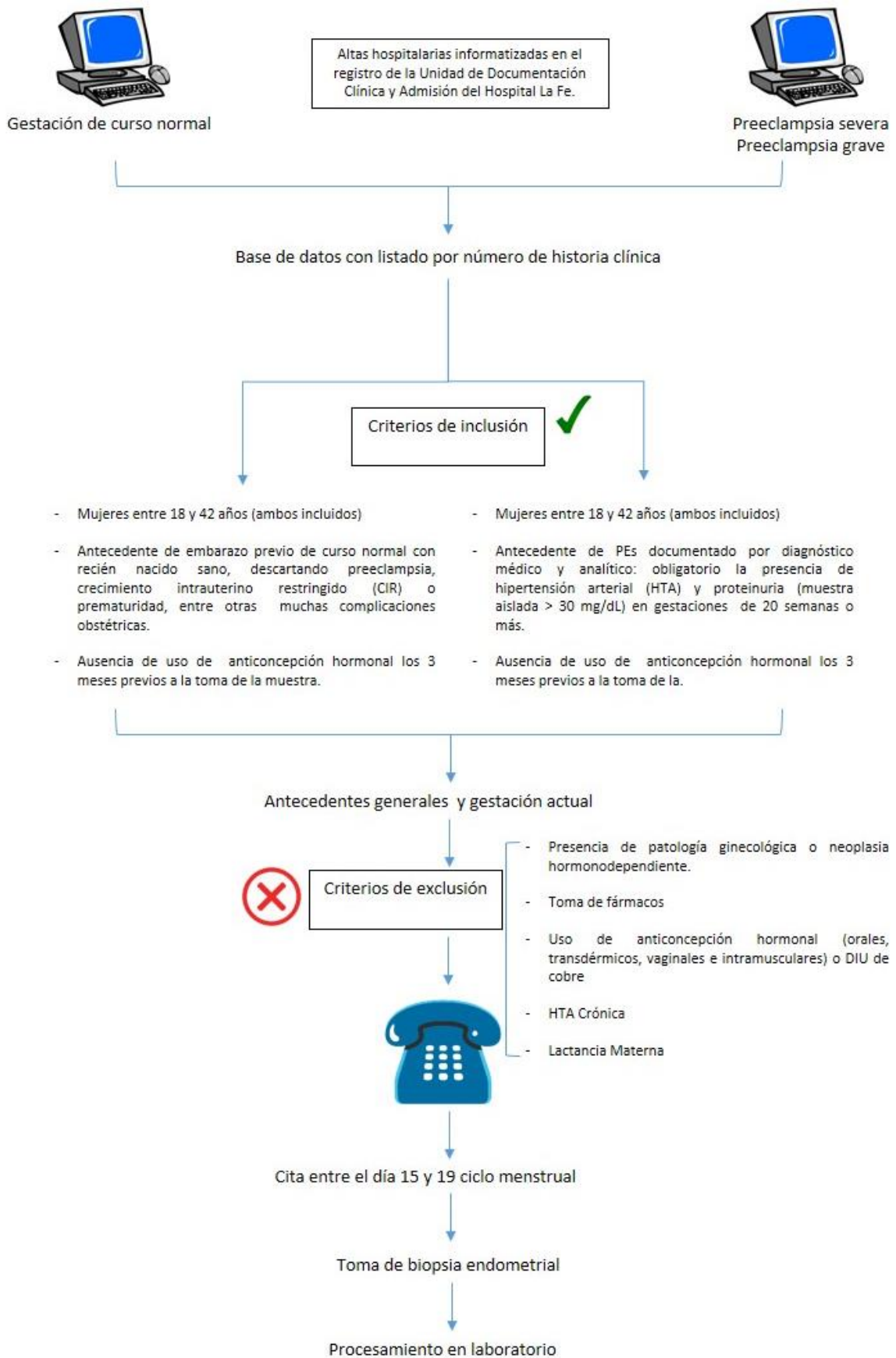


Figura 19. Resumen del proceso de obtención de las muestras control y PEs necesarias para llevar a cabo el estudio actual.

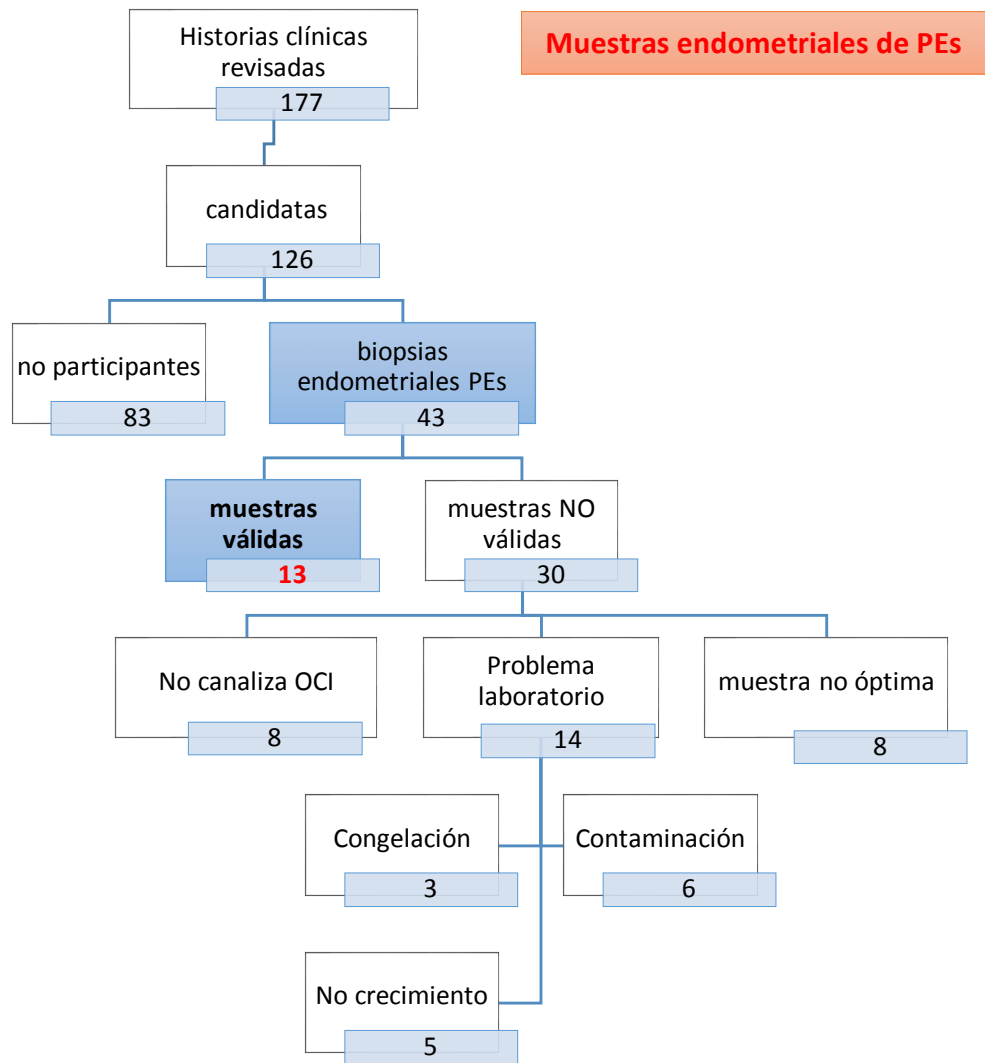
1.4. Características clínicas de las pacientes reclutadas.

Las muestras biológicas de endometrio humano obtenidas a partir de las biopsias tomada en los días 15 a 19 del ciclo menstrual y destinadas al desarrollo del estudio actual fueron un total de 26 biopsias endometriales. Todas ellas proceden de mujeres entre 18 y 42 años de edad, sanas, con ciclos ováricos regulares de 25 a 33 días y sin uso de anticonceptivos durante los 3 meses previos a la toma de la biopsia ni en estado de lactancia materna.

1.4.1. Características clínicas de las pacientes preeclampsia.

Tras obtener la base de datos de las historias clínicas que contenían el diagnóstico codificado de “Preeclampsia grave o severa”, se revisaron 177 historias clínicas, de las cuales 126 cumplían los criterios de inclusión ya detallados anteriormente. Se contactó por teléfono con estas mujeres las cuales, tras recibir la información del diseño y objetivos del estudio, solo 43 de ellas accedieron a participar y acudieron a la cita prevista entre el día 15 y 19 del ciclo ovárico. El resto no acudieron a la cita o ya expresaron su desinterés o inapetencia vía telefónica alegando consecuencias psicológicas que la enfermedad les causó en aquel momento y no deseaban revivirlo, miedo al dolor de la biopsia endometrial o simplemente no deseaban colaborar en el estudio.

De las 43 mujeres con antecedente de PEs que acudieron a la cita prevista y firmaron el consentimiento informado, 30 de ellas no resultaron válidas para el estudio y la causa de la pérdida fue que a 8 mujeres no se les consiguió realizar la biopsia por no poder canalizar el orificio cervical interno (OCI), otras 8 que sí se biopsiaron no fueron muestras válidas anatomopatológicamente por escaso material obtenido o no valorable, y las 14 biopsias restantes no se pudieron utilizar por problemas surgidos durante el procesado en el laboratorio, de forma que 3 de ellas se congelaron directamente, 6 estaban contaminadas y 5 no crecieron en la placa tras el sembrado. Finalmente, por lo tanto, se seleccionaron 13 muestras endometriales válidas para el desarrollo del estudio. Este tamaño muestral resulta adecuado y suficiente para la realización de los análisis transcriptómicos, tal y como en el resto de los artículos científicos similares se plasma. El algoritmo 1 esquematiza la obtención del tamaño muestral.



Algoritmo 1. Representación del total de muestras procedentes de PEs recogidas para el estudio. OCI: orificio cervical interno. PEs: Preeclampsia severa.

La media de edad de las 13 mujeres de las que procedían las muestras endometriales válidas era de 32 años [23-37] al diagnóstico de la enfermedad y de 35 años [26-41] en el momento de la toma de la biopsia (tabla 1). 11 mujeres eran de raza caucásica y 2 de raza latina.

PREECLAMPSIA	Edad mujer	Edad diagnóstico PE	Paridad	Día biopsia
PE 1	26	25	G3 C3	15
PE 2	24	23	G3 E1 C2	15
PE 3	36	35	G2 P1 C1	15
PE 4	37	35	G1 P1	17
PE 5	38	37	G1 P1	17
PE 6	36	33	G1 C1	15
PE 7	41	37	G3 A2 C1	17
PE 8	32	29	G2 P2	18
PE 9	35	34	G2 C2	22
PE 10	31	29	G1 P1	18
PE 11	39	37	G2 C2	17
PE 12	35	31	G2 C2	16
PE 13	38	35	G2 C1 P1	16

Tabla 1. Características de las muestras preeclampsia: Paridad y edad al diagnóstico de la enfermedad así como edad y día del ciclo menstrual a la toma de la biopsia endometrial. (G: gestación, P: parto, C: cesárea)

**En azul, los casos correspondientes a debut de PE tardía (>34 semanas)*

Como antecedentes obstétricos destaca que 4 de ellas presentaron PE en sus dos gestaciones previas, mientras que 2 tenían un embarazo previo normal y otro complicado con PEs; la gestación que se consideró para el estudio era la primera para 4 mujeres, y la segunda para 9 de ellas, aunque en dos no habían recién nacidos vivos previos ya que tuvieron un embarazo ectópico en uno de los casos y dos abortos previos en el otro (tabla 2). De los 13 casos, solo 3 obtuvieron la gestación gracias a técnicas de reproducción asistida, concretamente FIV-ICSI (Fecundación in vitro- inyección intracitoplasmática de espermatozoides), el resto fueron gestaciones espontáneas.

PREECLAMPSIA	Paridad	Raza	Antecedentes obstétricos
PE 1	G3 C3	caucásica	Eclampsia en primera gesta, PEs en segunda y tercera
PE 2	G3 E1 C2	caucásica	PEs en las dos gestaciones
PE 3	G2 P1 C1	caucásica	PEs + CIR en 2º embarazo
PE 4	G1 P1	caucásica	FIV-ICSI
PE 5	G1 P1	caucásica	FIV-ICSI
PE 6	G1 C1	caucásica	FIV-ICSI, PEs + HELLP
PE 7	G3 A2 C1	Latina	Eclampsia
PE 8	G2 P2	caucásica	2º embarazo PEs
PE 9	G2 C2	caucásica	PEs + HELLP
PE 10	G1 P1	caucásica	PEs
PE 11	G2 C2	caucásica	PEs + HELLP
PE 12	G2 C2	caucásica	PEs en las 2 gestaciones
PE 13	G2 P1 C1	Latina	PEs en las 2a gestación

Tabla 2. Paridad, raza y antecedentes obstétricos de las muestras PEs. G: gestación, C: cesárea, P: parto, A: aborto PE: preeclampsia, FIV: fecundación In vitro; ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

* En marrón las 3 gestaciones conseguidas mediante FIV-ICSI

La enfermedad debutó como PE precoz en 7 mujeres, es decir, en la semana 34 o previamente y en las 6 restantes posteriormente, diagnosticándolas de PE tardía. En el momento del diagnóstico la media de TAS fue de 162 mmHg [139-176], la TAD de 101 mmHg [84-121] y la proteinuria de 268 mg/dL [30-500]. De los parámetros analíticos característicamente alterados en la PE, la hemoglobina media fue de 11,9 g/dL [9,4-14,2], las plaquetas de 161.000/ μ L [57.000-306.000], el fibrinógeno calculado de 523 mg/dL [375-673] y las proteínas totales de 5,53 g/dL [4,4-6,8]. Respecto al patrón hepático la media de la enzima GOT fue de 101 U/L [15-526] y de la GPT 88 U/L [9-426]. Todos estos datos se plasman en la tabla 3.

La edad gestacional media en el momento del diagnóstico de PE fue de 32 semanas [26-37] y la de finalización de 34 semanas [26-38], mediante cesárea en 9 mujeres y parto vaginal en las 4 restantes. El peso medio de los recién nacidos fue de 1844 gr [640-3000] y el de las placentas de 596 gr [250-1100].

PE	EG diagnóstico	Peso RN	Placenta	TAS	TAD	Proteinuria	Hb	Plaquetas	FBN	GOT	GPT	Proteínas Totales
PE 1	26+3	640	250	165	94	45	10,9	119.000	476	43	62	5,4
PE 2	32+5	1650	550	176	121	150	13,2	204.000	673	16	10	5,1
PE 3	30+3	1200	600	163	98	55	12,6	220.000	543	15	12	6
PE 4	35+5	2380	700	171	111	30	14,2	194.000	607	16	9	6,3
PE 5	29+3	1310	750	163	97	30	9,4	306.000	612	348	275	5,6
PE 6	31+1	1577	750	160	84	500	10,9	66.000	507	526	426	5,2
PE 7	35+2	2825	1100	160	89	30	11,3	226.000	375	19	22	6,8
PE 8	35+2	1950	550	165	98	500	11,4	193.000	417	17	11	4,4
PE 9	32+4	1650	400	139	112	500	13,4	57.000	525	132	123	5,1
PE 10	36+6	2730	500	173	101	500	13,8	155.000	427	34	46	5,6
PE 11	31+6	1150	450	153	92	150	10,1	65.000	541	93	90	5,3
PE 12	35+1	2225	550	159	110	500	9,8	167.000	470	20	13	5,4
PE 13	35+2	2690	600	153	105	500	13,9	122.000	623	40	45	5,7

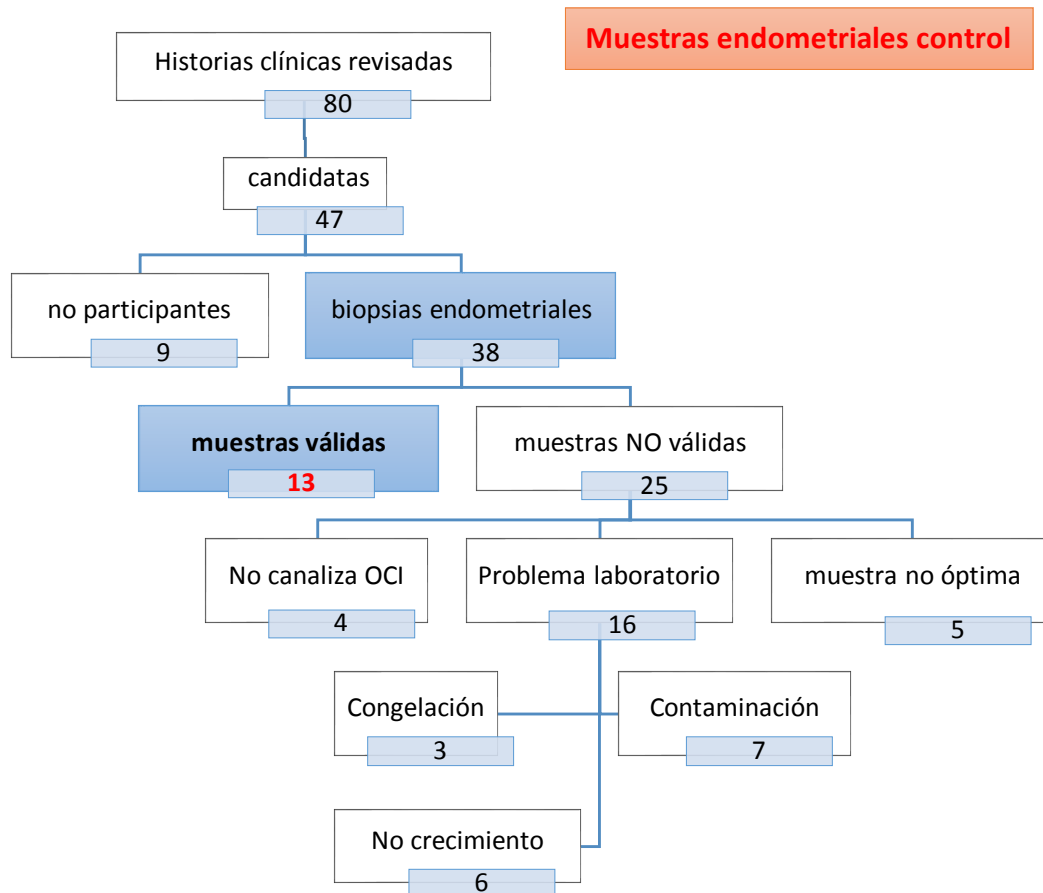
Tabla 3. Características de las 13 pacientes del grupo PEs en el momento del diagnóstico, informando de semanas de gestación, peso del recién nacido y de la placenta, TA (mmHg), proteinuria en muestra orina aislada (mg/dL), Hemoglobina (Hb en g/dL), plaquetas, Fibrinógeno o FBN (mg/dL), patrón hepático (GOT y GPT en U/L) y proteínas totales (g/dL).

1.4.2. Características clínicas pacientes control

Tras obtener la base de datos de las historias clínicas que contenían el diagnóstico codificado de “Gestación de curso normal”, se revisaron un total de 80 historias clínicas, de las cuales 47 cumplían los criterios de inclusión ya detallados anteriormente. Se contactó por teléfono con estas mujeres las cuales, tras recibir la información del diseño y objetivos del estudio, 38 de ellas accedieron a participar y acudieron a la cita prevista entre el día 15 y 19 del ciclo ovárico. El resto no acudieron a la cita o ya expresaron su desinterés o inapetencia vía telefónica alegando miedo a la prueba, no tener tiempo para acudir a la cita o incluso sin explicación alguna.

De las 38 mujeres con antecedente de gestación normal que acudieron a la cita prevista y firmaron el consentimiento informado, se seleccionaron 13 muestras endometriales válidas como expone el algoritmo que se muestra a continuación, ya que 25 mujeres no pudieron reclutarse debido a que en 4 de ellas no se consiguió realizar la biopsia por no poder canalizar el orificio cervical interno (OCI), otras 5 que sí se biopsiaron no fueron válidas por escaso

material o no valorable, y las 16 biopsias restantes no se pudieron utilizar por problemas en el laboratorio, de forma que 3 de ellas se congelaron directamente, 7 estaban contaminadas y 6 no crecieron en la placa tras el sembrado.



Algoritmo 2. Representación del total de muestra procedente de mujeres con antecedente de gestación normal recogidas para el estudio. OCI: orificio cervical interno.

La media de edad de las 13 mujeres del grupo control y de las que procedían las muestras endometriales válidas era de 38 años [32-42] en el momento de la toma de la biopsia y de 34 años [28-40] cuando finalizaron la gestación por la que se incluyó en el estudio (tabla 4). De ellas, 7 eran primigestas, 3 habían tenido un hijo previamente, 1 era tercigesta y otra cuartigesta, aunque solo tenía 2 hijos ya que previamente sufrió dos abortos espontáneos. Esta última paciente fue la única de raza latina, las 12 restantes eran caucásicas. Todas alcanzaron gestación de forma espontánea, es decir, no se halló ninguna mujer sometida a terapias de reproducción asistida para obtener el embarazo.

CONTROL	Edad última Gestación	Paridad	Edad mujer	Día ciclo Toma	Raza
C1	35	G1 P1	39	17	Caucásica
C2	34	G1 P1	36	17	Caucásica
C3	37	G2 P2	41	18	Caucásica
C4	36	G2 P2	38	17	Caucásica
C5	35	G 1 P1	37	18	Caucásica
C6	29	G1 P1	41	16	Caucásica
C7	30	G 1 P1	32	18	Caucásica
C8	33	G1 P1	35	18	Caucásica
C9	28	G2 P2	41	17	Caucásica
C10	35	G3 P3	36	19	Caucásica
C11	35	G1 P1	38	16	Caucásica
C12	30	G1 P1	35	19	Caucásica
C13	40	G4 C2 A2	42	15	Latina

Tabla 4. Características de las muestras control: Paridad, edad al finalizar la gestación así como edad y día del ciclo menstrual en que se toma la biopsia endometrial.

En el momento del ingreso para finalizar la gestación, la media de TAS de las 13 mujeres de este grupo control fue de 121 mmHg [98-135], la TAD de 74 mmHg [67-84] y no se encontró ninguna con proteinuria en el sedimento de orina (tabla 5). La media de los parámetros analíticos evaluados fueron hemoglobina media (Hb) de 13,9 g/dL [11,3-14,9], las plaquetas de 215.000/ μ L [57.000-306.000], el fibrinógeno calculado de 570 mg/dL [476-705] y las proteínas totales de 6,9 g/dL [6-7,4]. Respecto al patrón hepático, la media de la enzima GOT fue de 19 U/L [13-41] y de la GPT 16 U/L [7-52].

La edad gestacional media en el momento de finalización del embarazo fue de 39 semanas [38-41] obteniendo unos recién nacidos con peso medio de 3258gr [2140-3800] y el de las placentas de 712 gr [650-800].

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

Tabla 5. Características de las 13 pacientes del grupo control en el momento finalizar su gestación, informando de semanas gestacionales, peso del recién nacido y de la placenta, TA (mmHg), proteinuria en muestra orina aislada (mg/dL), Hemoglobina (Hb en g/dL), plaquetas, Fibrinógeno o FBN (mg/dL), patrón hepático (GOT y GPT en U/L) y proteínas totales (g/dL).

1.4.3. Comparativa entre ambos grupos

En ambos grupos de estudio, PEs (n=13) y control (n=13), las mujeres incluidas no presentan antecedentes médicos ni ginecológicos importantes, existe un predominio de la raza caucásica y ninguna destaca por obesidad, factor de riesgo conocido y demostrado para desarrollar preeclampsia, ya que los IMC de ambos grupos oscilan entre 19 – 27,8 kg/m². Además, la edad de las mujeres también es comparable (rango de 24-42 años). Todas las muestras endometriales fueron recogidas entre día 15-19 de ciclo menstrual, clasificándolas como muestras en fase secretora tardía, según criterios de Noyes (Noyes, 1975).

Las principales diferencias residen en los parámetros analíticos y los resultados obstétricos del final de la gestación, como muestra la tabla 6. La media de la TA al ingreso, tanto sistólica como diastólica en el grupo de PEs es de 162/101mmHg, claramente más elevada que en el grupo control, cumple el criterio diagnóstico principal para considerarla un signo de PEs y

además, dicha diferencia es estadísticamente significativa. También la diferencia en los valores de proteinuria muestra un resultado significativo.

De los parámetros analíticos que se solicitan complementariamente al ingreso de las pacientes, tanto la hemoglobina como el fibrinógeno, proteínas totales y plaquetas presentan unos valores inferiores en el grupo PEs respecto al control, siendo este último parámetro estadísticamente significativo. Sin embargo, las enzimas hepáticas (GOT y GPT) se presentan más elevadas en el grupo con el antecedente de la enfermedad, siendo solo la GPT un resultado significativo. Estos hallazgos analíticos son acordes con el curso de la PE de debut o curso grave.

Comparativa grupos	PEs (n=13)	Control (n=13)
Edad materna a la toma de la biopsia (años)	35 [26-41]	38 [32-42]
Edad materna fin gestación (años)	32 [23-37]	34 [28-40]
Tensión Arterial Sistólica (mmHg)	162 [139-176]	121 [98-135]
Tensión Arterial Diastólica (mmHg)	101 [84-121]	74 [67-84]
Proteinuria (mg/dL)	268 [30-500]	No
Hemoglobina (g/dL)	11,9 [9,4-14,2]	13,9 [11,3-14,9]
Plaquetas (plaquetas/ μ L)	161.000 [57.000-306.000]	215000 [57000-306.000]
Fibrinógeno calculado (mg/dL)	523 [375-673]	570 [476-705]
Proteínas totales (g/dL)	5,53 [4,4-6,8]	6,9 [6-7,4]
GOT (U/L)	101 [15-526]	19 [13-41]
GPT (U/L)	88 [9-426]	16 [7-52]
Edad Gestacional parto (semanas)	34 [26-38]	39 [38-41]
Peso Recién Nacidos (g)	1844 [640-3000]	3258 [2140-3800]
Peso placenta (g)	596 [250-1100]	712 [650-800]

Tabla 6. Comparación de las medias obtenidas en cada valor estudiado de las mujeres incluidas en ambos grupos de estudio, PEs (n=13) y control (n=13), incluyendo el rango de valores en los que se mueve cada uno de ellos. mmHg: milímetros de mercurio; mg/dL: miligramos por decilitro; μ L: microlitro; U/L: unidades por litro; g: gramos

Finalmente, comparando los datos de la finalización de la gestación, se observa que de forma estadísticamente significativa las mujeres con antecedente de PEs presentan menor edad gestacional que las que tuvieron un curso normal, debido a la propia enfermedad que fuerza a finalizar el embarazo, incluso antes de llegar a término. Esta conclusión explica que la tasa de recién nacidos prematuros sea superior y, por tanto, su peso medio y el de sus placentas en el grupo PEs sea muy inferior al del control.

La tabla 7 muestra aquellos datos que tras el análisis comparativo con t-student, han mostrado resultados estadísticamente significativos.

	control (n=13)	PEs (n=13)	P
Tensión Arterial Sistólica (mmHg)	121.6 (2.5)	161.5 (2.7)	< 0.001
Tensión Arterial Diastólica (mmHg)	74.1 (1.7)	100.9 (2.9)	< 0.001
Proteinuria (mg/dL)	0 o ND	268.5 (2.3)	< 0.05
GPT (U/L)	15.92 (1.5)	88 (125.4)	< 0.05
Edad Gestacional al parto (semanas)	39.5 (0.3)	33.7 (1.0)	< 0.001
Peso del recién nacido (gr)	3250 (111.4)	1844 (190.9)	< 0.001
Plaquetas x 10 ³	215.153 (59485)	161.076 (73658)	< 0.05

Tabla 7. Comparación características maternas y neonatales estadísticamente significativas, expresadas como media \pm DE, usando test T-student. PEs: muestras preeclampsia severa; ND: No disponible.

2. Manejo y procesamiento de las muestras en el laboratorio

En este punto es importante destacar que todo el trabajo realizado en el laboratorio se ha llevado en condiciones de extrema higiene, dentro de campanas extractoras y utilizando materiales estériles. Todo ello con la finalidad de disminuir al máximo el riesgo de contaminación de la muestra, necesaria para el estudio.

2.1. Recepción y procesamiento de la muestra

2.1.1. Disgregación de células epiteliales y estromales

La muestra endometrial se obtiene por *Pipelle* (Genetics, Hamont-Achel, Bélgica) en condiciones estériles y en fase secretora temprana (días 15-19) del ciclo menstrual. Inmediatamente tras su adquisición, se introduce la biopsia en un recipiente herméticamente cerrado que contiene una solución salina isotónica tamponada con fosfato cuyas siglas conocidas en inglés son PBS (Phosphate Buffered Saline, (*DPBS Euroclone*®)) para eliminar la sangre y el moco que pueda haber adherido a ella. Dicha muestra se remite al laboratorio mediante un transportista.

Tras su recepción se procede a su disgregación mecánica mediante dos hojas de bisturí del número 11 realizando una trituración de la muestra hasta conseguir fragmentos de menos de un milímetro aproximadamente. Una vez obtenida la consistencia blanda deseada, se introduce el material en un tubo cónico al que se le añaden 9 mililitros del medio de cultivo celular "*Eagle modificado de Dulbecco*" (DMEM) y 1 mililitro de la enzima colagenasa tipo IA (*Sigma-Aldrich, EEUU*) con la finalidad de conseguir una disgregación enzimática. El medio de cultivo DMEM es una fórmula modificada que permite el crecimiento celular in vitro proporcionando los nutrientes esenciales requeridos por la célula.

La mezcla obtenida se incuba a una velocidad de 80 rpm durante 90 minutos manteniéndola en todo momento a 37°C de temperatura, para permitir la hidrólisis del colágeno, disgregar fragmentos de tejido y obtener células aisladas. Tras finalizar este procedimiento se deja reposar la muestra durante 10 minutos asegurando que esté en todo momento en posición vertical para conseguir la separación de las células estromales de las epiteliales. Esto último se alcanza gracias al cociente de sedimentación que permite diferenciar

dos contenidos dentro del tubo: la parte inferior o pellet que corresponde a las células epiteliales y glandulares ya que por su mayor peso y tamaño sedimentan más rápido, y la parte superior o sobrenadante formado por las células del estroma endometrial.

2.1.2. Cultivo de las células estromales (CEE)

Una vez separadas las CEE de las epiteliales y glandulares por sedimentación, el sobrenadante que las contiene es recogido mediante una pipeta y se pasa por filtros formados por poros de 50 micras (*Partec Celltrics®*) para posteriormente realizar un nuevo lavado con 5 mililitros del cultivo celular DMEM, agitando el contenido y dejándolo reposar durante 5 minutos, para volver a recoger el nuevo sobrenadante obtenido. Este proceso de filtrado, lavado y recogida del sobrenadante se repite tres veces consecutivas, obteniendo finalmente una nueva suspensión resultante de todo el sobrenadante recogido que se divide en dos tubos de 14mL y se centrifuga a 2000 rpm durante 10 minutos. El resultado tras la centrifugación es un nuevo sobrenadante que se desecha, y un pellet formado por las células estromales endometriales (CEE) que se resuspende en 5 mililitros de medio de cultivo celular.

El procesamiento completo realizado en el laboratorio para la obtención de las CEE a partir de la biopsia endometrial se recoge en la figura 20.

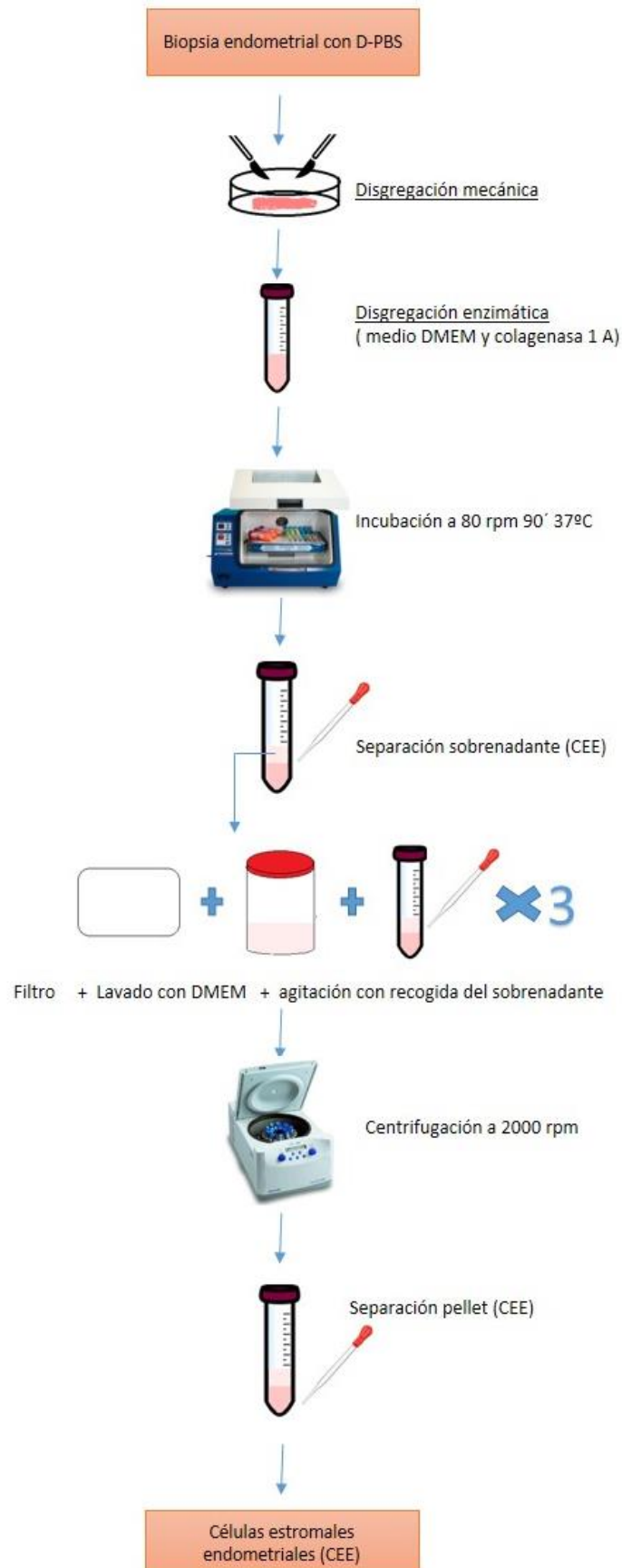


Figura 20. Resumen del proceso de obtención de células estromales endometriales (CEE) a partir de una biopsia endometrial. RPM: Revoluciones por minuto; DMEM: Medio cultivo celular

2.2. Decidualización in vitro

2.2.1. Decidualización de las células estromales

Una vez obtenidas las CEE mediante el procedimiento anteriormente descrito, se cultivan en placas de plástico de 24 pocillos (*BD, España*), aproximadamente 300.000 células por pocillo y en presencia de 400 μ L de medio de crecimiento celular llamado DMEM/F12 que contiene un 10% de suero bovino fetal (SBF) y 0.1% de los antibióticos gentamicina y anfotericina B y se dejan durante 24-72h en crecimiento.

Cuando el contenido de los pocillos alcanza una densidad de 80-90% de confluencia, se cultivan en presencia de 400 μ L de medio de cultivo suplementado con 2% de SBF y se inicia la inducción a la decidualización in vitro de las CEE (Figura 21). Para ello existen dos protocolos distintos en los que se usan los inductores de la decidualización que se detallan a continuación, ambos igualmente válidos:

- Protocolo A o de estímulo hormonal (Lrwin, 1991): consiste en la adición de 1 μ M de progesterona (P) y 30nM de 17 β -estradiol (E2) al medio de cultivo suplementado con 2% de SBF y dejarlo en cultivo durante 9 días renovando el medio cada 72h.
- Protocolo B o de estímulo decidual (Brar, 1997): consiste en la adición de 0.5M de 8-bromo-Adenosinmonofosfato cíclico (AMPc, *Sigma- Aldrich, EEUU*) y 1 μ M de acetato de medroxiprogesterona (MPA, *Sigma- Aldrich, EEUU*) durante 5 días.

En ambos protocolos se usa como control a las CEE obtenidas de la misma muestra que se cultiva en paralelo pero sin añadir inductores de la decidualización.

En este estudio se ha utilizado el protocolo B para inducir la decidualización in vitro de las CEE.

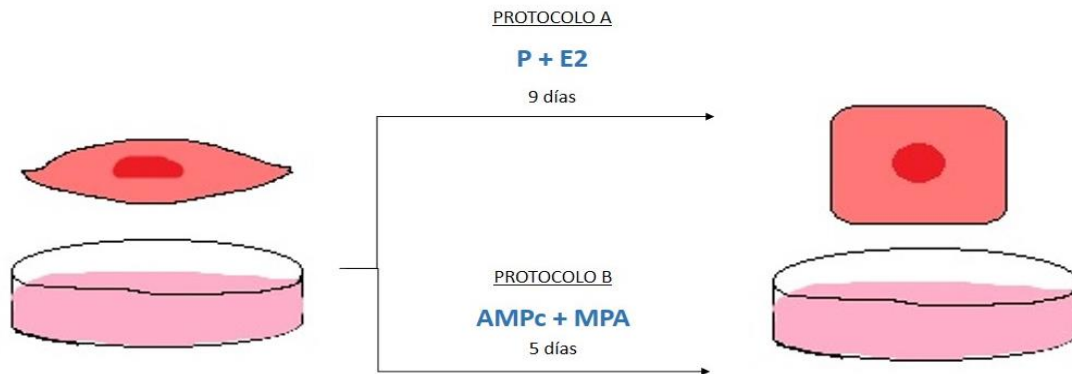


Figura 21. Ilustración de la inducción a la decidualización in vitro mediante los dos protocolos posibles, el A u hormonal, en el que se añade progesterona (P) y 17β-estradiol (E2) cultivando durante 9 días, o el B que añade al medio Adenosinmonofosfato cíclico (AMPc) y medroxiprogesterona (MPA) y se cultiva durante 5 días.

2.2.2. Comprobación del proceso de decidualización

Tras los 5 días de cultivo celular se recogen por separado las células y el medio condicionado con la finalidad de comprobar morfológica- y bioquímicamente que se ha producido la decidualización endometrial in vitro. En primer lugar, se toma los 400 µL de medio condicionado de cada uno de los pocillos, se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos, se elimina el posible pellet de restos celulares y se guarda a -20°C. Por otro lado, las CEE se obtienen mediante incubación con 100 µL de la enzima tripsina durante 5 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, se añaden 100 µL del medio CEE y 2% de SBF para inactivar la tripsina y se centrifuga de nuevo el material, eliminando el sobrenadante y guardando el pellet que contiene las CEE, a -20°C.

2.2.2.1. ELISA de PRL e IGFBP-1

La comprobación bioquímica del éxito del proceso de decidualización in vitro de las CEE se realiza mediante la cuantificación de la cantidad de proteínas secretadas por estas células en el medio condicionado obtenido. En este caso, se la prolactina (PRL) y la proteína de unión al factor 1 de crecimiento de la insulina (IGFBP-1), que son marcadores clásicos del proceso de decidualización.

Para dicha cuantificación se utilizan Kits específicos de la técnica ELISA o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas; concretamente para cuantificar la PRL se utiliza el Kit *Abnova System* y para la IGFBP-1 el *RayBiotech*. Para la aplicación de estos Kits, se han seguido las instrucciones de la empresa de elaboración de los mismos. Los resultados proporcionados por dichos Kits de ELISA se muestran mediante curvas estandarizadas donde se interpolan los valores de cada una de las muestras analizadas y se expresan en pg/mL.

2.2.2.2. Marcaje con Actina filamentosa (actina-F)

La comprobación histológica de decidualización se consigue mediante técnicas de inmunohistoquímica celular con las CEE crecidas y tratadas con los inductores de la decidualización in vitro en monocapa utilizando una tinción fluorescente que cuenta con un marcador específico para las fibras de actina filamentosa (actina-F).

Para llevar a cabo este proceso, se realiza una fijación celular con bajas concentraciones de 2-3% de paraformaldehído y posterior bloqueo mediante albúmina de suero bovino (ASB) al 5%. Posteriormente, las CEE fijadas se incuban con 0.1 g/ml de faloidina – tetrametilrodamina B isocianato de conjugado de la toxina *Amanita Phalloides* (*Sigma-Aldrich, EE.UU*), que presenta fluorescencia para la actina F, de forma que su unión y fijación produce un marcaje inmunofluorescente a los 30 minutos de reposo a la oscuridad y en temperatura ambiente. La tinción fluorescente se observa mediante un microscopio Nikon que lleva una unidad confocal de disco giratorio Yokogawa (*PerkinElmer*) y un objetivo de apertura numérica 100 x 1.45.

El procedimiento completo de comprobación de decidualización in vitro se resume en la figura 22.

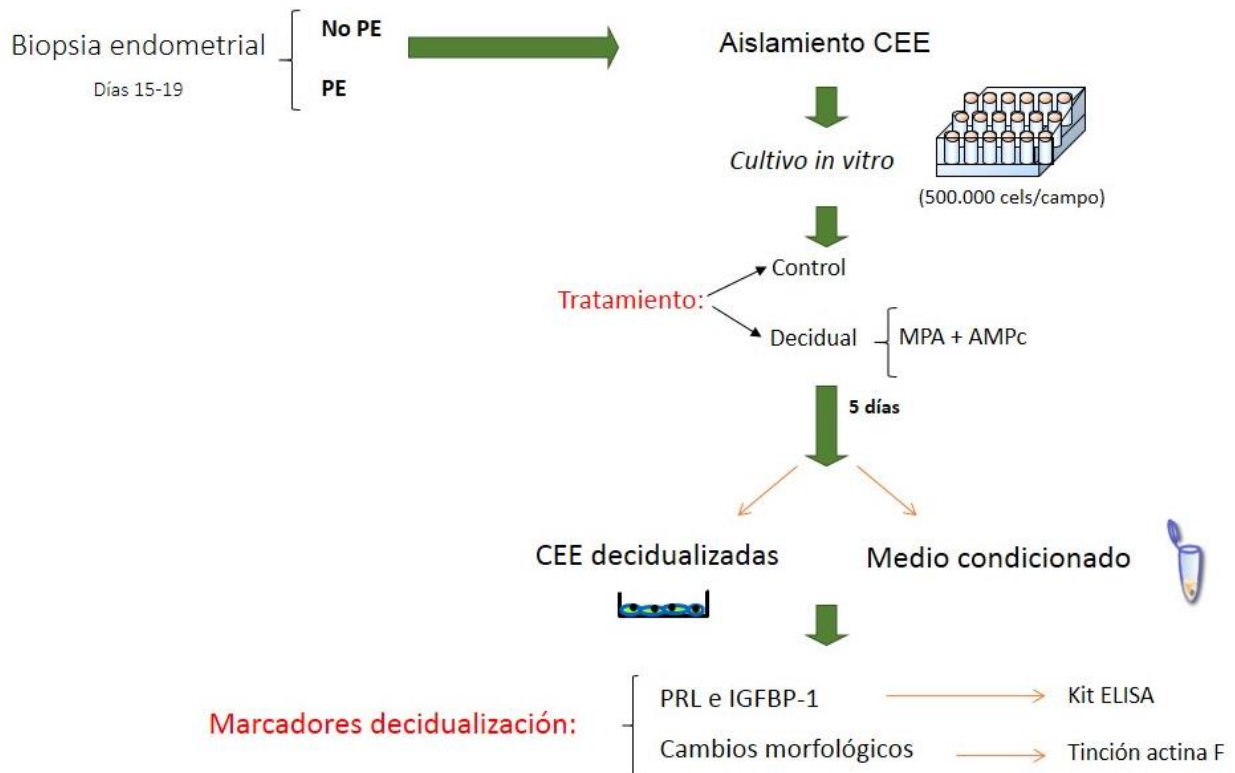


Figura 22. Esquema que resume el análisis de la decidualización de las células estromales endometriales obtenidas a partir de las biopsias realizadas a las mujeres con antecedente de preeclampsia severa y precoz (grupo PEs) y a las que tuvieron un embarazo de transcurso normal (grupo control o no PEs). CEE: células estromales endometriales; MPA: Medroxiprogesterona; AMPc: Adenosinmonofosfato cíclico; PRL: prolactina; IGFBP1: Proteína de unión al factor 1 de crecimiento de insulina.

2.3. Análisis transcriptómico y validación.

Para llevar a cabo esta parte del estudio se utilizan CEE procedentes de 7 muestras control: dentro de ellas se obtuvieron 7 no decidualizadas y 5 decidualizadas, mientras que se usan 5 muestras procedentes del grupo PEs, obteniendo de ellas 5 no decidualizadas y 5 decidualizadas, utilizando en todos los casos el mismo protocolo de decidualización *in vitro* (incubación con AMPc + MPA durante 5 días).

2.3.1. Análisis del transcriptoma de las CEE deciduizadas in vitro.

El ARN total de las CEE se extrae en TRIzol siguiendo las instrucciones del fabricante (*Life Technologies*) y su calidad se evalúa mediante el uso de un ARN LabChip y un bioanalizador A2100 (*Agilent Technologies*). Para el análisis de microarrays se seleccionan las muestras con una integridad del ARN superior a 7 que se preparan e hibridan mediante el bioanalizador Agilent 2100, siguiendo las pautas del fabricante.

Las secuencias de microarrays hibridadas se fotografían con un escáner Axon 4100 A (*Molecular Devices*) y los datos se extraen con el software GenePix Pro-6.0 (*Molecular Devices*). Los valores de expresión génica se preprocesan y normalizan y las comparaciones por pares se analizan estadísticamente utilizando un bioconductor (paquete LIMMA en software R). Los genes diferencialmente expresados de manera significativa se determinan mediante el análisis estadístico tasa de descubrimiento falsos o $FDR < 0.05$ y tasa de cambio ≥ 2 (Benjamini, 2001). Los datos obtenidos se depositan en la base de datos de expresión génica Omnibus (número de acceso GSE94644).

2.3.2. Validación de los resultados de expresión génica mediante RT-PCR

Los niveles de expresión relativos de cuatro genes (*ALDH1A1*, *IGFBP1*, *NANOS3* y *HSD17B2*) se determinan por RT-PCR con el uso del gen β -actina como control interno. Los cebadores específicos para cada gen son los siguientes:

- *ALDH1A1*:
 - Secuencia 3' → 5': 5'-agatgacgtgatcaaaagagca
 - Secuencia 5' → 3': 5'-cagacatcttgaatccaccaa
- *IGFBP1*:
 - Secuencia 3' → 5': 5'-atggcatacctcaacgcaa
 - Secuencia 5' → 3': 5'-aaggacttgctcgttgaca
- *NANOS3*:
 - Secuencia 3' → 5': 5'-gggaaagagggtcctgaaac
 - Secuencia 5' → 3': 5'-agcacgtgggactgtagat

- HSD17B2
 - Secuencia 3' → 5': 5'-agtctgcctgctcatcctgt
 - Secuencia 5' → 3': 5'-ttatctgcatcggcttcgtg
- β-actina
 - Secuencia 3' → 5': 5'-cacactgtgccatctacga
 - Secuencia 5' → 3': 5'-tagctcttctccaggagga.

2.4. Estudio de la anexina A2 (ANXA2)

Para poder realizar los estudios de anexina A2 se utilizan, del total de muestras recogidas y válidas, 5 muestras del grupo control y 5 muestras más del grupo PEs (n=5 muestras/grupo).

2.4.1. Análisis de la expresión génica de ANXA2

La expresión relativa del gen ANXA2 se determina por la técnica reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real (RT-PCR), con el uso del gen β-actina como control interno, al igual que en el estudio transcriptómico global, ya descrito anteriormente. Los cebadores específicos para cada gen son los siguientes:

- ANXA2:
 - Secuencia 3' → 5': 5'-cttcgcctaccagagaagga
 - Secuencia 5' → 3': 5'-catcagcttcgcaagtca
- β-actina:
 - Secuencia 3' → 5': 5'-cacactgtgccatctacga
 - Secuencia 5' → 3': 5'-tagctcttctccaggagga.

2.4.2. Análisis proteína ANXA2 intra/extracelular

2.4.2.1. Extracción de proteínas.

Para obtener las proteínas a partir de las CEE, estas se lisan mediante solución tampón formado por Tris-HCL 50mM, NaCl 150 mM, IGEPAL CA 360® al 1% (octilfenoxi poli (etilenoxi) etanol), 0.5% de Na-DOC (dodecil sulfato), SDS al 0.1% (dodecil sulfato de sodio) y EDTA 0.5M

(ácido etilendiaminotetraacético). Se utilizan 50 μ L de tampón por cada 800.000 células aproximadamente.

Se deja actuar durante 20 minutos en hielo y se centrifuga la muestra a 12.000 rpm y 4°C durante 15 minutos para recoger el sobrenadante ya que contiene el extracto proteico resuspendido.

2.4.2.2. Cuantificación de proteína

Una vez obtenidos los extractos proteicos en el sobrenadante celular, se procede a la cuantificación proteica utilizando el método Bradford, que consiste en un colorante (Comassie Blue G-250 (*BioRad, Reino Unido*) que se tiñe de azul intenso cuando está expuesto a un entorno hidrofóbico como es el interior de las proteínas, a las que se une permitiendo así su medición con mucha facilidad.

La medición proteica se realiza mediante un espectrofotómetro con absorbancia 280nm que muestra los valores de absorbancia de forma que se interpolan los datos y se crea una curva estándar para establecer la concentración de ANXA2 total presente (ng/mL), empleando la proteína seroalbúmina bovina como patrón.

2.4.2.3. Western Blot

Los extractos proteicos obtenidos (25 μ g/carril) se separan mediante tampón SDS (docecilsulfato) al 10% y se transfieren a una membrana de poliacrilamida para posteriormente realizar una electroforesis discontinua en gel PAGE (gel apilamiento de poliacrilamida al 4% y gel resolutivo de poliacrilamida al 10%) durante 60 minutos a 180V. Este tipo de electroforesis se conoce como SDS-PAGE y tiene como finalidad separar las proteínas únicamente en función de su tamaño ya que rompe la estructura secundaria y terciaria proteica, pero mantiene los polipéptidos primarios desnaturalizados.

Una vez realizada la electroforesis SDS-PAGE, las proteínas son transferidas desde el gel donde se encontraban, a una membrana de difluoruro de polivinilideno hidrófoba PVDF (*Hybond-P, Amersham Biosciences, NJ, EE.UU*) mediante electrotransferencia húmeda durante 4h en agitación a 160V y 4°C.

Tras completar la transferencia a las membranas, a estas se les añade un bloqueo en solución salina tamponada con PBS con leche al 5% y detergente Tween al 0.1% con la finalidad de saturar todos los lugares de unión proteica no ocupados e impedir así, la unión no específica de anticuerpos.

Posteriormente, las membranas son incubadas durante 12h nocturnas y a 4°C en 5ml de PBS-T y 3% de leche al que se le añaden anticuerpos policlonales de conejo anti-Anexina A2 humana a título de 1/2500 (*Abcam, UK*). Para poder tener un control y normalizar los resultados, a otra membrana con las proteínas obtenidas de las mismas muestras se le añaden anticuerpos monoclonales de ratón anti β -actina humana 1/2000 (*Santa Cruz Biotechnology, EEUU*) ya que la expresión de la proteína β -actina es prácticamente constante.

Una vez se completa el periodo de primera incubación, se añaden a las membranas 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*), y se vuelven a dejar en incubación durante 60 minutos pero esta vez a temperatura ambiente.

El revelado se realiza mediante con quimioluminiscencia que consiste en la detección específica de la unión antígeno-anticuerpo gracias a un reactivo ECL Plus (*Amersham Biosciences, CT, EEUU*) en equipo LAS3000 Fujifilm.

Tras el revelado, se analiza la densitometría de las bandas correspondientes a cada una de las muestras normalizadas con las bandas correspondientes a la proteína β -actina y con ello la cuantificación de ANXA2 utilizando el propio software del equipo *LAS3000*.

2.4.3. Silenciamiento ANXA2 mediante ARNi

El ARN de interferencia (ARNi) es una secuencia de oligonucleótidos complementaria, específica y opuesta a una secuencia determinada de ARNm y tiene como función el bloqueo de la secuencia a la que se une específicamente de forma que impide su expresión génica.

Para silenciar la expresión génica de ANXA2, se utilizan oligonucleótidos de ARN de interferencia (ARNi) bicatenario que presenta especificidad para la proteína ANXA2 (CGGCCUGAGCGUCCAGAAATT) mientras que como control negativo se utiliza una ARNi cuya secuencia de oligonucleótidos es inespecífica y no bloquea ninguna otra secuencia

complementaria, ambos con la adición de fluoróforo AlexaFluor488 (*Qiagen, EEUU*) a su extremo 3´.

Para este estudio de silenciado de ANXA2 se toman 3 grupos de muestras: unas sin adición de ARNi (grupo control), otras a las que se les añade ARNi inespecífico (grupo control negativo o grupo control ARNi) y un tercer grupo a las que se les transfectará el ARNi específico y complementario de ANXA2 (grupo ANXA2 ARNi).

Así pues, las CEE que consideradas grupo de estudio de silenciamiento de ANXA2 son transfectadas con 100nM de ARNi específico para ARNm de ANXA2, mientras que al control negativo se le introducen 100nM de ARNi de secuencia inespecífica para valorar la respuesta celular al silenciado génico y asegurar que la técnica no se ha visto alterada por el tratamiento del ARNi “per se” y puedan que afectan a la estructura de las CEE.

Las CEE que van a ser sometidas a transfección son preparadas previamente mediante cultivo en placa de 24 pocillos con medio DMEM/F12 y sin antibióticos, hasta conseguir una confluencia del 50-70%.

A cada pocillo de la placa de 24 donde se encuentran las CEE destinadas a transfección se les añaden 100µL de solución formada por los oligonucleótidos ARNi y lipofectamina 2000 (*Invitrogen TM, EEUU*). La lipofectamina es una sustancia cuya función es abrir pequeños poros en la membrana de las CEE para que pueda ser atravesada por otras moléculas, en este caso concreto, el ARNi ANXA2 y se una así a su secuencia de ARNm complementaria.

Tras la aplicación de ARNi se mueve suavemente la placa para que los complejos de transfección se distribuyan homogéneamente, incubándolas durante 24h a 37°C. Transcurrido este tiempo, se comprueba el silenciamiento mediante RT-PCR y Western Blot.

2.4.4. Ensayo in vivo de actina F/actina G

La actina es la proteína más importante y abundante del citoesqueleto de la célula endometrial estromal y puede localizarse en monómeros libres citosólicos (actina globular o actina-G) o bien como parte del propio citoesqueleto formando polímeros lineales filamentosos (actina filamentososa o actina-F).

El objetivo del ensayo es valorar la relación existente entre la cantidad de actina G frente a la de actina F en las CEE ya silenciadas previamente con ARNi ANXA2 y decidualizadas mediante

la inducción con AMPc y MPA. El desarrollo de este estudio se realiza con un kit de ensayo específico denominado *G-actin/F-actin In Vivo Assay Biochem Kit (Cytoskeleton, EEUU)*.

Para llevar a cabo este estudio se utilizan los tres grupos experimentales de CEE empleados en el estudio del silenciado con ARNi ANXA2, es decir el grupo control sin ARNi, el control con ARNi inespecífico y el que está silenciado con ARNi ANXA2. Además, los tres grupos experimentales se evalúan antes y después de la inducción a decidualización con AMPc y MPA.

El procedimiento del ensayo es el siguiente para los tres grupos: las CEE se homogenizan en tampón de estabilización de actina F durante 10 minutos a 37°C obteniendo lisados celulares que se aclaran mediante centrifugación a baja velocidad (2000rpm) para eliminar restos celulares de las células ininterrumpidas. El sobrenadante obtenido se vuelve a centrifugar a 100.000 g durante 15 minutos a 4°C para separar los fragmentos solubles presentes en el nuevo sobrenadante y correspondientes a la actina G de los insolubles formados por actina F filamentosa y que conforman el pellet, el cual se resuspende en agua mili-Q® (ultrapura) y 1/100 de agente despolimerizante de actina F, actuando durante 60 minutos en un medio de hielo.

Ambas fracciones se cargan proporcionalmente en un gel de poliacrilamida, se separan por SDS-PAGE mediante electroforesis y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa para sondear con anticuerpo anti-actina 1/500 (Cytoskeleton, CO, EE. UU.). La cuantificación densitométrica de la transferencia western blot determina la proporción de actina G encontrada en el citosol versus la actina F incorporada en el citoesqueleto, normalizada respecto a la cantidad de actina total.

2.4.5. Estudio con ratones nulos o Knockout

El objetivo de esta parte del estudio es tratar de demostrar si existe un fallo de decidualización in vivo y sus consecuencias sobre la placentación debido al defecto en la expresión del gen ANXA2, ya que todos los procedimientos descritos hasta ahora se han realizado in vitro a partir de las biopsias endometriales y mediante tratamiento para estimular la decidualización de las CEE. Para realizar los resultados in vivo, se utilizan ratones Knockout (KO) o nulos (ANXA2^{-/-}) y ratones control o salvajes (ANXA2^{+/+}) cedidos por el laboratorio de Katherine Hajjar (*Weill Cornell Institute, Nueva York, USA*).

2.4.5.1. Descripción de la cepa de ratones Knockout (KO) o nulos.

La construcción del vector de direccionamiento de Anexina A2 se lleva a cabo mediante el uso de genes seleccionables dentro de un plásmido pPNT, el cual se caracteriza por presentar resistencia a la neomicina (Neor) y timidina quinasa (TK). De una biblioteca de ADN genómico de ratón empaquetada en el bacteriófago Lambda FIX II 129/SvJ (Stratagene, La Jolla, California, EEUU) se usan:

- 2 sondas de ADN complementario (ADNc) de ratón específicas para los exones 2 y 3, que contienen el lugar de inicio de la traducción.
- 2 sondas de ADNc para el exón 5, que codifican para los exones 1-4 y 2-5.

Además, tras digestión con enzimas de restricción se obtienen dos fragmentos, uno de 2.2 kilobytes (kb) ubicado a 5' del exón 3 y otro de 4kb localizado a 3' del exón 4 que son sometidos a análisis de transferencia Southern y posterior subclonación en el plásmido pPNT en una orientación de transcripción opuesta a la del casete Neor (Ling, 2004).

El vector de direccionamiento se somete a secuenciación para analizar su integridad y su construcción se linealiza mediante digestión con enzimas de restricción *NotI* (Thermo Fisher Scientific) para ser introducido, mediante electroporación, en las células 129 / SvJ ES (Genome Systems, St. Louis, Missouri, EE. UU.)

Se realiza una hibridación de transferencia Southern para seleccionar los clones por resistencia a G418 (350 µg / ml; Gibco BRL, Grand Island, Nueva York, EE. UU.) y ganciclovir (2 µM; Roche Diagnostics, Indianápolis, Indiana, EE. UU), de forma que aquellos que contienen el alelo de ANXA2 alterado son los que se microinyectan en blastocistos y se implantan en el útero de ratones hembra pseudopreñadas C57Bl / 6J. Se denominan ratones hembra pseudopreñadas o madres adoptivas cuando estas han sido apareadas anteriormente con ratones machos estériles. La descendencia quimérica se retrocruza con ratones C57Bl/6J. Dicha descendencia quimérica se identifica por la presencia del color del pelaje "agouti" es decir, el pelo presenta tres colores a lo largo de su longitud de forma que el tercio más cercano a la raíz es de color gris, el extremo o punta es negro y el tercio medio adopta un color amarillento.

La transmisión de la línea germinal del alelo mutado se verifica mediante transferencia Southern de ADN genómico obtenido de las puntas de la cola. Los compañeros de camada heterocigotos se cruzan para generar una progenie nula homocigótica (ANXA2 -/-).

Para el análisis de transferencia Southern, las células o las puntas de la cola se incuban durante una noche en tampón de lisis (SDS al 0,2%, 200 µg / ml de proteinasa K, Tris-HCl 100 mM, pH 8,5, NaCl 200 mM y EDTA 5 mM) a 56 ° C y se extraen con fenol cloroformo-álcool isoamílico. El ADN genómico de estas células se fracciona mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,45%, se transfiere a membranas de nailon con sonda Zeta (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EE. UU.) y se hibrida con una sonda de 800 pb con cebado aleatorio de 3 pb. Esta sonda, que representa secuencias externas a la secuencia del vector de direccionamiento, se encarga de detectar fragmentos de 18,8 y 16,4 kb de los alelos de tipo salvaje (ANXA2 +/+) y mutado (ANXA2 -/-) respectivamente, de forma que identifica animales de tipo salvaje, heterocigotos y homocigotos.

Todos los procedimientos descritos en este apartado se realizan en el laboratorio de la Dra. Katherine Hajjar (*Weill Cornell Medicine, Nueva York, USA*) de acuerdo con la aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales.

2.4.5.2. Diseño experimental del estudio in vivo

A diferencia de la raza humana donde la decidualización de las CEE se produce durante cada ciclo menstrual y acontece independiente de si ha habido fecundación del óvulo, en los ratones este fenómeno solo se produce si ha habido fecundación o como consecuencia de una lesión mecánica (Wang, 2006). En los roedores hembra, el ciclo estral dura 4 o 5 días. Si ocurre la fecundación, se determina como día embrionario 0 (E0) en el momento de aparición del tapón vaginal. A partir del quinto día, la presencia del blastocisto marca el inicio de la decidualización (día embrionario 5 o E5) que se desarrolla aproximadamente en 72 horas, considerándose esta establecida en torno al día embrionario 8 (E8) (Gellersen, 2007).

Para el experimento, se utilizan 14 ratones hembra: 7 a los que se les silencia Anexina A2 (ANXA2 -/-) y 7 ratones hembra control tipo salvaje (ANXA2 +/+) y gestan, considerando la presencia de tapón copulatorio temprano como día embrionario 0 (E0). A 8 hembras ANXA2 -/- se las sacrifica en el día E5 y E8 (4 ratones en cada estadio) para valorar el proceso de decidualización alcanzado hasta la fecha, ya que el día embrionario 5 se corresponde con el inicio de la decidualización y el día embrionario 8 cuando este proceso se considera establecido. A las 6 ratonas embarazadas restantes se las sacrifica en día E16 para estudiar el desarrollo placentario. El diseño del estudio se resume en la figura 23.



Figura 23. Esquema del diseño del estudio sobre el efecto del bloqueo de ANXA2 en la decidualización y placentación in vivo mediante el uso de ratones hembra ANXA2 nulos (ANXA2^{-/-}) comparadas con ratones hembra de tipo salvaje (ANXA2^{+/+}) embarazadas. E= días embrionarios.

2.4.5.3. Evaluación cuantitativa de los sitios de implantación.

Para llevar a cabo este estudio se sacrifican a 8 de los ratones hembra embarazadas en día embrionario 5 (E5) y en día embrionario E8, ya que estos días se corresponden con el inicio y el establecimiento de la decidualización en la raza roedora. De ellos, se extraen sus úteros y se cuenta el número de sitios de implantación para posteriormente diseccionarlos, y tras ello se miden y pesan de forma individual (figura 24). Finalmente, se procede a abrir cada uno de los sitios de implantación extrayendo el tejido placentario y el feto para pesarlos en una balanza de precisión de forma individual.



Figura 24. Imágenes de úteros extraídos por laparoscopia de ratones hembra con los fetos en su interior y los sitios de implantación.

Modificado de Huang, J., Xue, M., Zhang, J., Yu, H., Gu, Y., Du, Zhang, Y. (2019). Protective role of GPR120 in the maintenance of pregnancy by promoting decidualization via regulation of glucose metabolism. *Ebiomedicine*. 39, 540-551.

2.4.5.4. Tinción con hematoxilina- eosina

Para visualizar los tejidos de los sitios de implantación y sus características histológicas, estos se fijan en paraformaldehído al 4% (PFA) durante 30 minutos y posteriormente se lava tres veces consecutivas en PBS. Tras el lavado, se infiltran los tejidos con sacarosa al 5 - 15% y gel OCT (Compuesto de Temperatura de corte Óptima; *Miles Scientific, Newark, DE, EEUU*) y se congelan en nitrógeno líquido obteniendo bloques de tejido criopreservado.

Las secciones obtenidas se cortan hasta un tamaño de 5 μm en un criostato Leica y se montan en portaobjetos de vidrio. La muestra se fija en formol al 4%, se incluye en parafina y se tiñe con la tinción Hematoxilina-Eosina (H-E) para su evaluación posterior del grado de degradación del tejido útero-placentario.

La tinción H-E es una técnica de coloración formada por la combinación de los colorantes hematoxilina y eosina. La hematoxilina es considerada un colorante básico, presentando mucha afinidad por estructuras ácidas, entre ellas, los núcleos celulares debido a la cantidad de ácidos nucleicos, los cuales adoptan un color azul oscuro o púrpura. Para poder teñir, la hematoxilina debe estar en estado oxidado y unido a un metal que actúa como fijador de la tinción. La oxidación se consigue gracias a su exposición al oxígeno ambiental o mediante sustancias químicas. La eosina, por el contrario, es un colorante considerado ácido teniendo gran afinidad por las estructuras alcalinas o básicas, como el citoplasma celular que lo tiñe de rojo o rosado. Gracias a esta tinción se puede distinguir entre células vivas e inertes ya que la eosina solo es capaz de atravesar la membrana de las células muertas, dejando a las vivas incoloras.

Tras la tinción con H-E durante 10 segundos y posterior lavado con agua destilada, se monta el portaobjetos con solución hidrófoba Entellan (Merck, Alemania) y se visualiza en microscopio óptico las secciones tisulares obtenidas, teniendo en cuenta que las células se plasmarán con núcleos azulados y citoplasmas rosados.

2.4.5.5. Inmunofluorescencia ANXA2 y otras proteínas.

Para detectar la presencia de proteínas en los sitios de implantación se utiliza la técnica de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para cada proteína en cuestión.

Tras obtener los tejidos correspondientes a los sitios de implantación, estos se fijan con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se lavan 3 veces consecutivas en PBS y se infiltran con sacarosa al 5-15% seguido del compuesto OCT (Miles Scientific, Newark, DE, EEUU) para permitir una congelación de bloques de tejido criopreservado con nitrógeno líquido. Los bloques obtenidos se cortan en secciones de 5 μm en un criostato Leica y se montan en portaobjetos de vidrio para posterior rehidratación durante 20 minutos con PBS.

Los cortes fijados y rehidratados se someten a incubación en tampón de bloqueo a temperatura ambiente durante 30 minutos para impedir la reactividad inespecífica. El tampón de bloqueo utilizado es el BSA al 3%/Tween 20 al 0.1% (Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU).

Una vez bloqueada la reactividad no específica, estas secciones de tejido de implantación son diluidas en tampón de bloqueo y sometidas a una nueva incubación de 37^aC durante una hora, pero esta vez con anticuerpos primarios dirigidos específicamente a cada proteína del estudio. Las concentraciones de anticuerpo y la dilución utilizadas, así como sus fuentes de obtención se muestran en la tabla 8.

Tras ello, se lavan las secciones tres veces consecutivas con PBS y de nuevo se incuban durante 30 minutos a 37^aC con anticuerpos secundarios conjugados con AlexaFluor específicos de la especie, diluidos también en tampón de bloqueo a temperatura ambiente (1:1000, *Life technologies, Carlsbad, CA, EEUU*). Una vez finalizado el proceso de incubación se vuelven a lavar las secciones tres veces con PBS.

Para visualizar los núcleos celulares se utiliza un medio de montaje Vectashield con la tinción 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EEUU). Dicha

tinción permite la visualización de los núcleos en color azul, en contraste con la fluorescencia ligada a los anticuerpos de las moléculas a estudio que aparecen en fluorescencia verde.

El control negativo para evaluar la tinción de fondo es la omisión del anticuerpo primario y la adición del secundario. La autofluorescencia es insignificante para la concentración secundaria de anticuerpos utilizada.

Las secciones de tejido del lugar de implantación se visualizan mediante el uso del microscopio Leica DM5000 B.

Anticuerpo	Número catálogo	Fuente	Dilución
PRL	PA5-26006	Thermo Fisher	1:100
IGFBP1	ab111203	Abcam	1:50
CD31	550274	Pharmigen	1:100
FvW	NB600-586	Novus Biologicals	1:100
ANXA2	ab41803	Abcam	1:100
Ac secundario anti-conejo	A21206	Life Technologies	1:1000
Ac secundario anti-ratón	712-025-153	Jackson Immuno	1:100

Tabla 8. Dilución de Anticuerpos primarios y secundarios utilizada en cada caso para la técnica de inmunofluorescencia así como su número de referencia y la fuente de obtención. PRL: Prolactina; IGFBP1: Proteína de unión al factor de crecimiento 1 de la insulina; CD31: grupo de diferenciación 31; FvW: Factor de Von Willebrand; ANXA2: Anexina A2; Ac: Anticuerpo

3. Análisis estadístico

Por cada experimento, se toma un mínimo de tres biopsias endometriales diferentes, realizándose las mediciones por triplicado. Los datos para cada experimento se muestran como valores medios +/- DSM (desviación estándar de la media) y se presentan con n denotando el número de experimentos.

El software utilizado para analizar los datos es el SPSS15 utilizando el test de distribución t-student para comparar los valores medios de los grupos. La significación estadística se define como una probabilidad $p \leq 0.05$ (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$). Dado que el tamaño muestral es reducido en ambos grupos de estudio, se aplica en todos los casos y previamente al t-student, el análisis de Kolmogorov – Smirnov para corroborar la distribución normal de los datos

4. Análisis bioinformático

En el estudio transcriptómico se realiza un análisis bioinformático para integrar los valores de microarrays obtenidos junto con la información presente en bases de datos públicas, con el objetivo de encontrar nexos de unión existentes entre los genes diferencialmente expresados en ambos grupos (control y PEs) tanto antes como después de la decidualización y su función, que pudiera estar relacionada con el proceso de decidualización endometrial o incluso, la propia preeclampsia.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. <u>Análisis del proceso de decidualización in vitro de células estromales endometriales procedentes de pacientes con preeclampsia comparado con embarazo previo sano</u>	113
1.1. Marcadores morfológicos: Actina filamentosa	115
1.2. Secreción de marcadores clásicos: PRL e IGFBP-1	117
1.3. Análisis transcriptómico: microarrays	121
2. <u>Integración de resultados transcriptómicos</u>	127
2.1. Validación de algunos genes mediante RT-PCR	128
2.2. Análisis funcional durante la decidualización en embarazo normal	130
2.3. Análisis funcional en pacientes con preeclampsia	130
3. <u>Anexina A2 (ANXA2): Estudio de la expresión génica y proteica</u>	134
3.1. Validación por técnicas de RT-PCR.....	134
3.2. Análisis de expresión intracelular de ANXA2	135
4. <u>Estudio in vitro sobre la ruta de acción de ANXA2</u>	138
4.1. Inhibición de ANXA2 y efecto sobre decidualización: morfología	139
4.2. Inhibición de ANXA2 y efecto sobre decidualización: secreción de marcadores	143
5. <u>Estudio in vivo con ratón Knockout para ANXA2</u>	145
5.1. Efecto sobre marcadores de decidualización	145
5.2. Estudio descriptivo sobre embarazo de ratones ANXA2 KO o nulos	149
5.3. Características relacionadas con la placentación.....	152

1. Análisis del proceso de decidualización in vitro de células CEE procedentes de pacientes con preeclampsia comparado con embarazo previo sano.

Para evaluar el proceso de decidualización in vitro se aíslan las células estromales endometriales (CEE) obtenidas de las biopsias endometriales realizadas en fase secretora temprana (día 14-16 del ciclo menstrual) de las 13 mujeres con antecedentes de embarazo normal no complicado en comparación con aquellas 13 en las que tuvieron previamente una gestación en la que se desarrolló preeclampsia severa (PEs). Las características maternas y neonatales se resumen en la tabla 9.

	Embarazo normal (n=13)	PEs* (n=13)	p**
Edad materna (años)	37.8 (0.8)	35.2 (1.4)	> 0.05
Paridad (n)	1.5 (0.2)	1.8 (0.2)	> 0.05
Presión arterial sistólica (mmHg)	121.6 (2.5)	161.5 (2.7)	< 0.001
Presión arterial diastólica (mmHg)	74.1 (1.7)	100.9 (2.9)	< 0.001
Proteinuria	0 o No disponible	+1 a +2	< 0.05
Edad gestacional al parto (semanas)	39.5 (0.3)	33.7 (1.0)	< 0.001
Peso del recién nacido (gr)	3250 (111.4)	1844 (190.9)	< 0.001
Intervalo desde el parto hasta la biopsia de endometrio (años)	3.9 (1.2)	2.2 (0.3)	> 0.05

Tabla 9. Características maternas y neonatales de donantes endometriales. * PEs: Preeclampsia severa; ** Media \pm DSM (Desviación estándar de la media) utilizando T-Student

Las mujeres elegidas para participar en el estudio que cumplían criterios para incluirse en el grupo control eran nulíparas en su mayoría, con antecedente de embarazo previo finalizado a una edad gestacional considerada a término (en torno a las 39-40 semanas de gestación) y sin complicaciones en el momento del parto, que en todos los casos fue por vía vaginal. El peso medio de los recién nacidos resultado de estos embarazos fue de 3250g. Su exploración previa a finalizar la gestación mostró valores tensionales dentro de los parámetros normales (presión arterial sistólica (PAS) <140mmHg y presión arterial diastólica (PAD) <90mmHg) y ausencia de proteinuria en el análisis de orina, si bien es cierto que en 7 de ellas no se pudo obtener este dato por no disponer de la muestra urinaria ya que no se requería para el ingreso. En el momento de la toma de la biopsia endometrial, este grupo presentaba una edad materna media de 38 años y una media de intervalo de tiempo desde el parto de casi 4 años.

Como única semejanza con el grupo anterior, las mujeres que cumplían criterios de inclusión para el grupo de preeclampsia grave (PEs) también fueron en su mayoría nulíparas (7 de 13) destacando la paciente número 8 que, a pesar de ser secundípara desarrolló la PEs en el primer embarazo con crecimiento intrauterino restringido (CIR) asociado y sin embargo, 7 años más tarde consiguió una gestación a término y normal, tras la toma diaria de ácido acetil salicílico a dosis de 100mg hasta la semana 14. De las 13 mujeres que conforman este grupo, 9 eran de raza caucásica y 2 de origen latino. Tres pacientes necesitaron tratamiento con fecundación in vitro (FIV) para obtener gestación, mientras que las 10 restantes lo consiguieron de forma espontánea.

Salvo 5 mujeres cuyo único signo de PEs fue la hipertensión arterial (HTA), el resto debutaron con clínica asociada (61.5%): 3 desarrollaron síndrome de HELLP, 2 eclampsias, 2 CIR y una combinó HTA y edemas en miembros inferiores. Además 5 mujeres (38.4%) tuvieron PEs en las gestaciones posteriores. La media de la edad gestacional alcanzada en el momento de finalizar el embarazo fue de 33-34 semanas debido a que en 10 de ellas se tuvo que finalizar la gestación por la propia patología, siendo la cesárea, la vía de parto más frecuente en este grupo (84.6%). Las 2 pacientes que parieron vía vaginal presentaban edades gestacionales de 36 y 37 semanas, y fue debido a que presentaban dinámica uterina regular e intensa así como partes blandas muy favorables cuando se detectó HTA asintomática que se controló con fármacos antihipertensivos intravenosos, por lo que se decidió continuar el proceso de parto siempre que no se demorara en el tiempo. La media de peso de los recién nacidos de este grupo fue de 1884 gramos debido en gran parte a la elevada tasa de prematuridad y de CIR asociados.

En el momento de la toma de la biopsia endometrial, la edad media de las mujeres fue de 35 años, aunque sin significación estadística puesto que existe gran disparidad dentro de este intervalo ya que la más joven tenía 24 años (PEs 2) y la de mayor edad alcanzaba los 41 años (PEs 10). Previo a la toma de la muestra biológica, la media de presión arterial sistólica (PAS) fue de 161.5mmHg y la diastólica (PAD) de 100.9 mmHg. El análisis urinario en el grupo PEs sí mostró presencia de 1 o 2 + de proteinuria en todos los casos. El intervalo de tiempo medio desde la última gestación hasta la toma de la biopsia fue de dos años (Anexo III).

Una vez definidos ambos grupos de pacientes y recogidas sus características clínicas se procede a concretar con ellas por vía telefónica la cita personal dentro de los días 15-19 de su ciclo menstrual para, tras explicación del estudio y entrega de la hoja informativa y el consentimiento informado firmado, realizar la biopsia endometrial y remitirla al laboratorio. La obtención de las CEE se consigue a partir de la digestión enzimática de la muestra y posterior

separación del estroma, como ya se ha comentado en el apartado de material y métodos. Estas CEE, tras su aislamiento, se mantienen *in vitro* en un medio condicionado (CEE control o no decidualizadas) y otras se inducen a decidualización mediante la adición a dicho medio de las hormonas adenosinmonofosfato cíclico (AMPC) y medroxiprogesterona (MPA) para posterior cultivo durante 5 días.

El análisis del proceso de decidualización *in vitro* se realiza evaluando marcadores fenotípicos, bioquímicos y transcriptómicos que permiten caracterizar si este proceso ha tenido lugar con éxito.

1.1. Marcadores morfológicos: actina F

Las CEE control no decidualizadas obtenidas a partir de un embarazo normal presentan en su citoesqueleto un claro predominio de la actina F o filamentosa, proteína responsable de su estructura elongada similar al fibroblasto. Sin embargo, durante la decidualización, la morfología de estas células cambia, adoptando un aspecto poligonal con núcleos más grandes y redondos y un citoesqueleto extensamente formado que da soporte a esta estructura (Yen, 2017).

Para seguir los cambios morfológicos de las CEE durante el proceso de decidualización inducido, se aplica la tinción de Rodamina faloidina (R-F) la cual tiene afinidad intrínseca por los filamentos de actina F marcándolos de color rojo. Los núcleos celulares se tiñen de azul con la tinción DAPI.

Como se puede observar en la figura 25 las CEE del grupo control presentan una morfología elongada, ahusada y, tras someterlas a la acción de MPA y AMPC en el medio complementado, reorganizan su citoesqueleto adoptando el característico fenotipo de célula decidualizada, con estructura más poligonal y núcleo esférico.

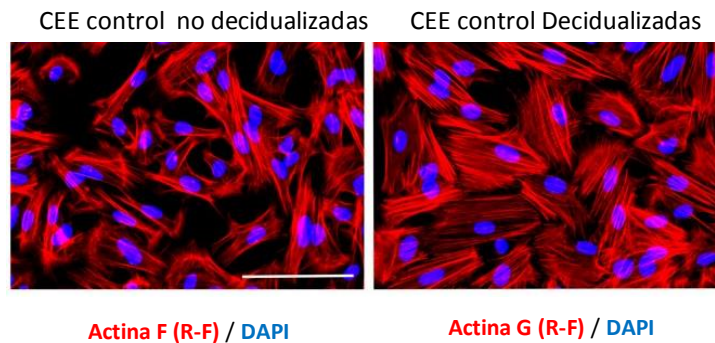


Figura 25. CEE procedentes de mujeres con antecedente de gestación normal cuyas fibras de actina se han teñido con rodamina faloidina (R-F) (en rojo) y el núcleo celular con DAPI (azul). La primera imagen corresponde a las CEE control en el medio condicionado y la segunda a estas mismas células tras ser sometidas a decidualización (mediante la adición de AMP y MPA). LAS CEE sin decidualizar presentan una disposición similar al fibroblasto mientras que dichas células son más grandes, poligonales y con núcleo redondeado cuando se han sometido al estímulo de decidualización. Escala 100 μm .

Al analizar morfológicamente las CEE del grupo PEs, estas presentan una conformación fibroblástica muy similar a las del grupo control. Sin embargo, tras cultivarlas en medio enriquecido con MPA y AMPc, la reorganización del citoesqueleto característica de la decidualización no se produce, por lo que no se evidencian apenas cambios entre la CEE no decidualizadas y las decidualizadas (figura 26).

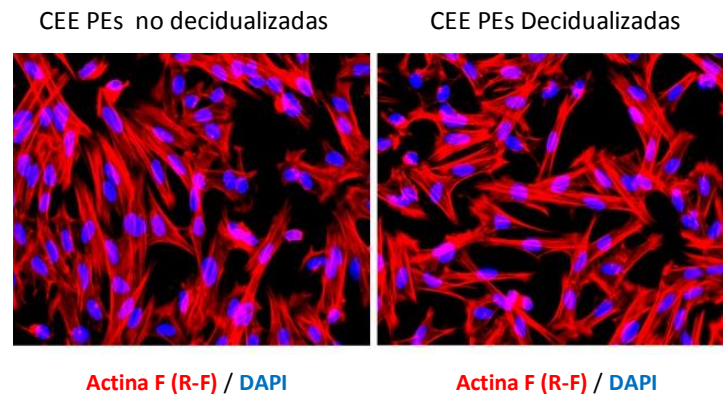


Figura 26. CEE procedentes de mujeres con antecedente de PEs cuyas fibras de actina se han teñido con rodamina faloidina (R-F) (rojo) y el núcleo celular con DAPI (azul). La primera imagen corresponde a las CEE previa decidualización y la segunda a estas mismas células tras ser sometidas a MPA+ AMPc durante 5 días. La morfología fibroblastoide de las CEE se mantiene en el grupo PEs a pesar de ser sometidas a estímulo de decidualización *in vitro*.

1.2. Secreción de marcadores clásicos de decidualización: PRL e IGFBP-1

Como ya se ha comentado anteriormente, la prolactina (PRL) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGFBP-1) se consideran marcadores bioquímicos de las células endometriales estromales decidualizadas (CEE_d) ya que, en condiciones normales las secretan al medio en grandes cantidades, jugando un papel esencial en la diferenciación y control de la invasión del citotrofoblasto (CTB).

Tras el cultivo in vitro de las CEE de ambos grupos (n=13/grupo) en presencia de los inductores de la decidualización, se toma el medio condicionado y se analiza la presencia de ambas proteínas mediante kits comerciales de ELISA específicos para su detección. Los resultados de esta técnica no han mostrado grandes diferencias entre las concentraciones de PRL e IGFBP-1 en el medio condicionado de las células endometriales no decidualizadas de ambos grupos, obteniendo niveles bajos para las dos proteínas analizadas (Figura 27). Sin embargo, cuando estas células son sometidas a estímulo de decidualización, sí se plasma una marcada diferencia en la secreción de estos biomarcadores al medio condicionado, de manera que en el grupo control, la concentración, tanto de PRL como de IGFBP-1 asciende considerablemente respecto al estado no decidualizado, mientras que en el caso de PEs estos niveles prácticamente no varían respecto sus valores obtenidos previos a la decidualización.

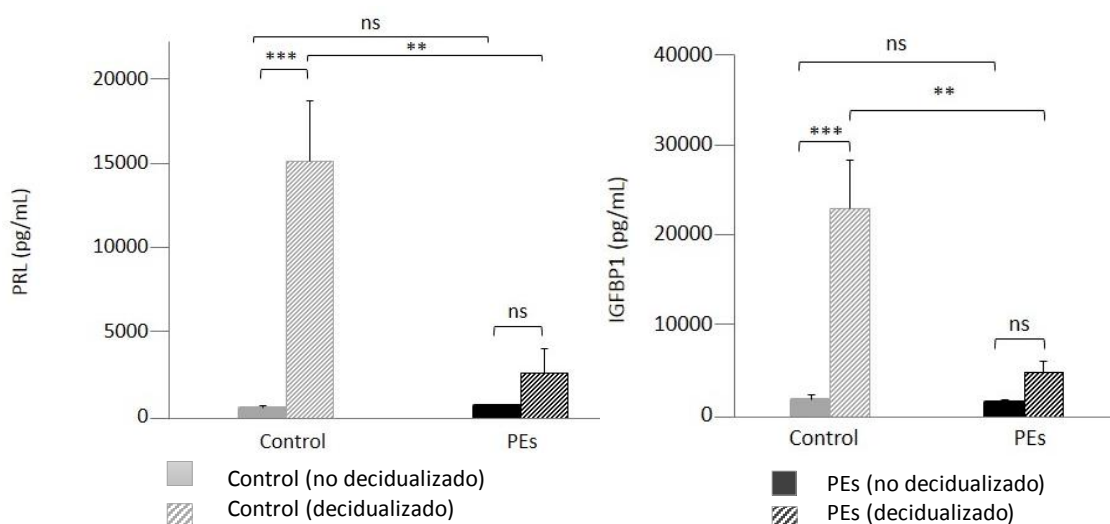


Figura 27. Niveles de PRL y de IGFBP-1 medidos en pg/mL y determinados mediante ELISA, secretados al medio condicionado por las CEE control (gris) y PEs previo (negro), a los 5 días de cultivo sin aditivos (no decidualizadas) o tras añadir MPA+ AMPc (decidualizadas). La concentración de ambas moléculas secretadas al medio condicionado sin aditivos es similar en ambos grupos. Sin embargo en las CEE control sometidas al estímulo de decidualización se evidencia un marcado aumento en sus niveles que es estadísticamente significativo, a diferencia de las PEs en las que apenas hay diferencia de secreción entre las CEE decidualizadas y las que no. Los datos se muestran como la media +/-DSM; **P<0.05 ; ***P<0.001; n.s no significativo.

Analizando individualmente la secreción de estos biomarcadores para cada una de las 13 muestras presentes en cada grupo, se evidencia que la tendencia general antes descrita se repite en la mayor parte de los casos.

Iniciando el estudio por la PRL, se observa como en los 13 casos del grupo control las CEE presentan concentraciones disminuidas de esta molécula en su medio condicionado basal y que dichos niveles aumentan de forma significativa transcurridos los 5 días de cultivo en presencia de AMPc y MPA, salvo en las muestras 2, 10 y 13, en las que el cambio fue mucho más reducido, debido a la variabilidad experimental que existe en los experimentos *in vitro* (Figura 28).

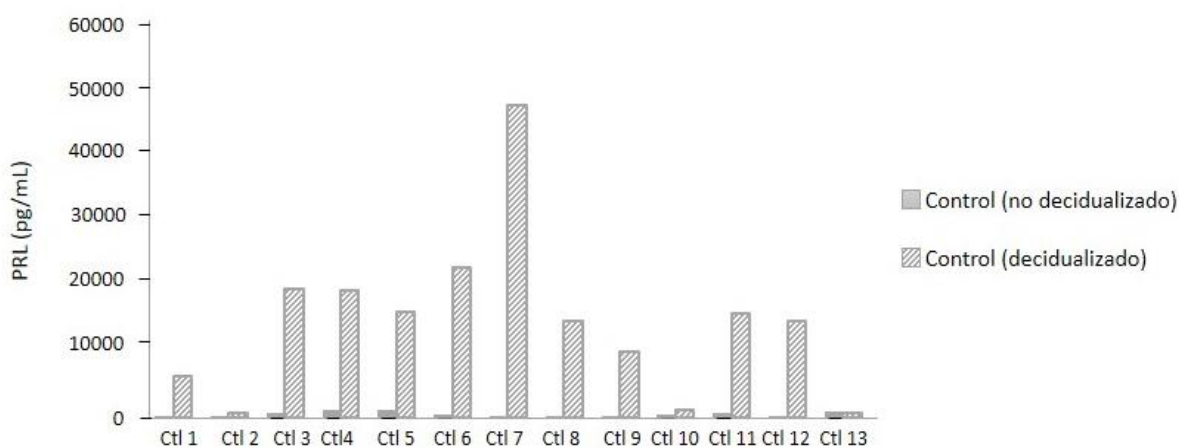


Figura 28. Niveles de PRL (en pg/mL) secretados al medio de cultivo condicionado de las CEE control antes y después de la inducción a la decidualización (n=13). En términos generales, la concentración de PRL aumenta de forma considerable cuando las CEE control son sometidas al estímulo de la decidualización.

En el caso de las CEE del grupo PEs, la concentración de PRL en ausencia de las hormonas inductoras de la decidualización es prácticamente inexistente y similar a las del grupo control. Sin embargo una vez inducida decidualización, los niveles de PRL secretados en el medio condicionado del grupo PEs prácticamente no se ven modificados (salvo en un solo caso que sí aumenta la PRL en la CEE de la mujer caso 1) (Figura 29).

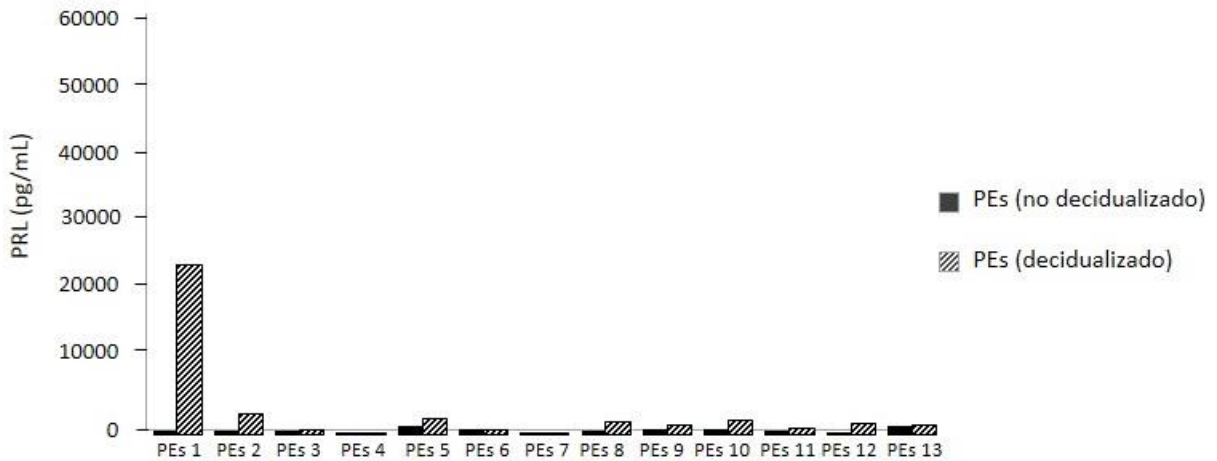


Figura 29. Gráfico en el que se muestra la comparación de los niveles de PRL (en pg/mL) secretado en el medio de cultivo de las CEE procedentes de las mujeres con antecedente de gestación complicada con PEs previo, sometidas a decidualización in vitro comparado con CEE control que se cultivaron en ausencia de los inductores de este proceso.

Centrando la atención en la IGFBP-1 y realizando también un estudio disgregativo de sus niveles por mujeres de cada grupo se puede observar que el comportamiento de las CEE en cuanto a la secreción de esta molécula es muy similar al de la PRL.

El medio condicionado de las CEE control procedentes de las mujeres con antecedente de gestación normal presentan unos niveles secretados de IGFBP-1 muy disminuidos, pero tras 5 días de cultivo sometidos a la acción del MPA y AMPc, dicha concentración asciende de forma llamativa (más en unos casos que en otros), si bien es cierto que sus niveles secretados al medio de las CEE decidualizadas son superiores que los de la secreción de PRL para estas mismas células (Figura 30.)

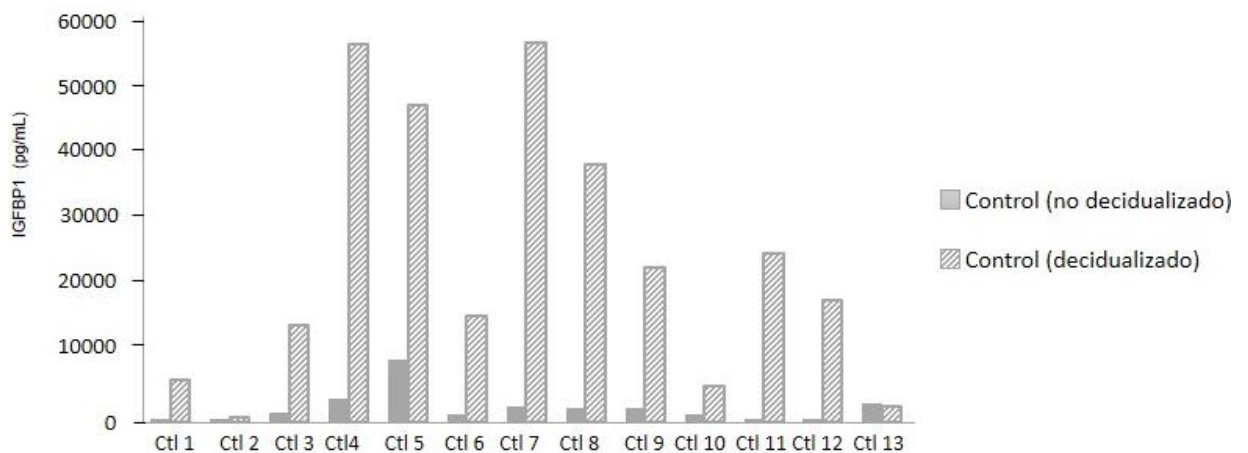


Figura 30. Gráfico en el que se muestra la comparación de los niveles de IGFBP-1 (en pg/mL) en el medio de cultivo condicionado de las CEE procedentes de las mujeres con antecedente de gestación normal antes y tras la adición de MPA y AMPc y posterior cultivo durante días.

Sin embargo, y como ocurre con la secreción de PRL, la concentración de IGFBP-1 secretada al medio por las CEE basales procedentes de mujeres con PEs anterior está muy disminuida en todos los casos, y sufre un ascenso leve, incluso prácticamente inexistente en algunos casos, al 5º día postinducción de decidualización de estas células (Figura 31).

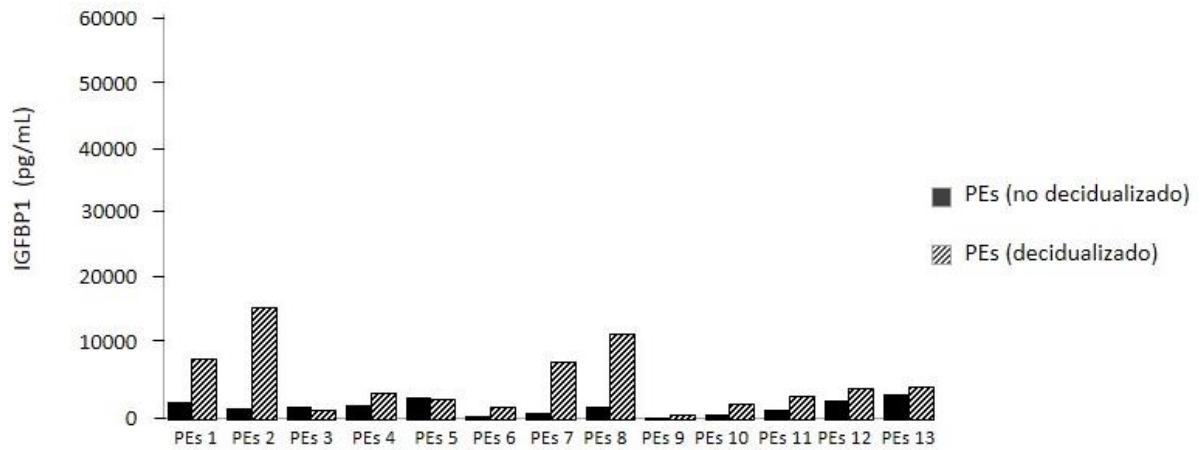


Figura 31. Gráfico en el que se muestra la comparación de los niveles de IGFBP-1 (en pg/mL) en el medio de cultivo de las CEE procedentes de las mujeres con antecedente de PEs en el medio condicionado antes y tras la adición de MPA y AMPc y posterior cultivo durante 5 días.

1.3. Análisis transcriptómico: microarrays

Para poder identificar los cambios moleculares existentes durante el proceso de decidualización entre ambos grupos se realiza un análisis transcripcional usando la tecnología de microarray, o más concretamente un estudio transcriptómico de las células endometriales no decidualizadas y decidualizadas in vitro tanto de los controles como de las PEs (Figura 32). Las características basales de ambos grupos se resumen en la tabla 10.

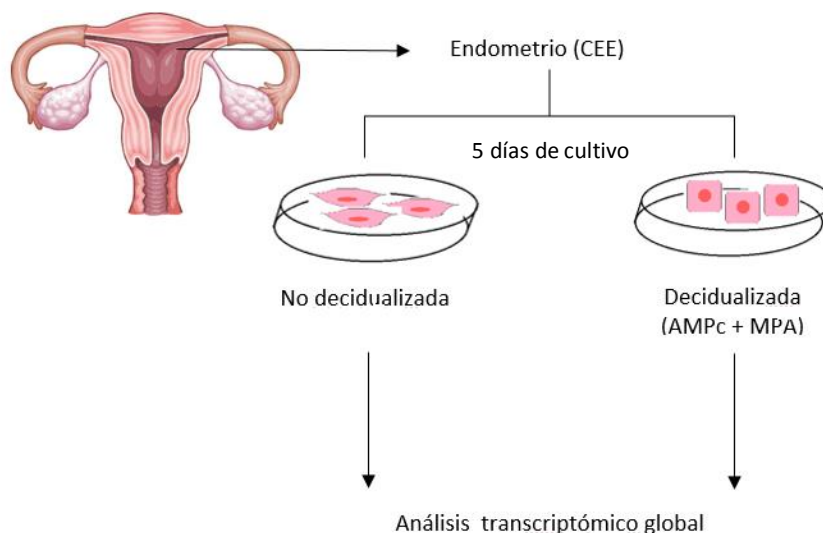


Figura 32. Ilustración que resume el diseño del estudio desde la obtención de las muestras y su procesamiento hasta análisis transcriptómico global, tanto en mujeres con antecedente de gestación complicada con PEs como con mujeres con embarazo previo sano (control). Se toma la biopsia endometrial a las 13 mujeres de cada uno de los grupos y se aíslan CEE que se cultivan durante 5 días en medio condicionado sin aditivos (no decidualizadas) o con las hormonas MPA + AMPc (decidualizadas o CEEed). Posteriormente, se extrae su ARN y se realiza un estudio transcriptómico global mediante la técnica de microarrays.

	Embarazo normal (n=7)	PEs* (n=5)	p**
Edad materna (años)	36.6 (1.3)	32.2 (3.0)	> 0.05
Tensión arterial sistólica (mmHg)	126.0 (2.2)	161.6 (3.7)	< 0.001
Tensión arterial diastólica (mmHg)	74.3 (1.9)	109.4 (5.1)	< 0.001
Proteinuria	0 o ND	+1 a +2	< 0.01
Edad gestacional al parto (semanas)	39.3 (0.3)	37.1 (0.4)	< 0.01
Peso al nacimiento (g)	3110.1 (177.3)	2611 (200.7)	< 0.05
Paridad (n)	1.6 (0.2)	1.6 (0.4)	> 0.05
Intervalo desde el embarazo hasta biopsia endometrial (años)	2.3 (0.5)	3.1 (0.8)	> 0.05

Tabla 10. Características basales de las mujeres donantes de endometrio sometido al estudio transcriptómico.

El análisis transcriptómico de las CEE sin decidualizar entre ambos grupos solo revela diferencias estadísticamente significativas en la expresión de 5 genes, con unas tasas de cambio en esos genes muy reducidas (figura 33). Por lo tanto se puede considerar que las CEE no decidualizadas de las mujeres con PE son muy similares a las del grupo control con gestación previa normal y sana.

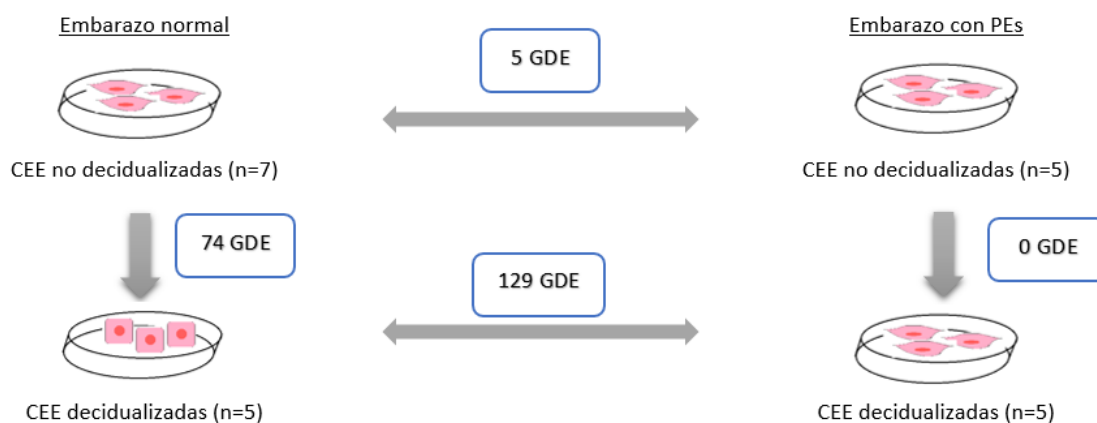


Figura 33. Ilustración que resume el hallazgo de los genes diferencialmente expresados (GDE) entre las CEE control y las PEs, tanto antes como después de la decidualización. Todo ello, con una significación estadística $p\text{-valor} < 0.05$ y una tasa de cambio mayor a 2 entre ambos grupos que se comparan: control y PEs. n del grupo control = 7; n del grupo PEs = 5

De los 5 genes diferencialmente expresados entre las células no decidualizadas de ambos grupos, destaca el *PYROXD2* (piridina nucleótido disulfido-oxidorreductasa) que se encuentra regulado al alza en el grupo PEs comparado con el control. La proteína codificada por este gen presenta actividad oxidorreductasa, implicada en el desarrollo de estrés oxidativo celular. Los genes *SLC25E2* y *SLC22A17* también se encuentran regulados al alza en PEs. Por el contrario, los genes *LDHA* (lactato deshidrogenasa A) y *PDCD5* (proteína de muerte celular programada 5, encargada de la inducción a la apoptosis) se encuentran regulados a la baja en las CEE no decidualizadas procedentes de pacientes PEs (tabla 11).

CEE no decidualizadas										Símbolo	Δ		
Embarazo normal						PEs							
9	9	9	8	9	8	10	11	11	10	PYROXD2	4		
9	10	9	9	9	9	10	12	11	11				
10	11	10	11	11	10	10	12	12	11			SLC25E2	4
16	16	16	15	16	16	16	15	15	15				
14	14	14	14	14	15	14	13	13	14				
Abundancia ARNm										SLC22A17	2		
6	7	8	9	10	11	12	13	14	16				
(log2)										LDHA	-2		
										PDCD5	-2		

Tabla 11. Resumen de los 5 GDE entre las CEE no decidualizadas de ambos grupos, el control formado por las mujeres con antecedente de embarazo normal y el de PEs formado por mujeres con el antecedente de dicha enfermedad. Δ , tasa de cambio

Sin embargo, al realizar el análisis transcriptómico una vez las CEE ya han sido sometidas a estímulo de decidualización, se evidencia una marcada diferencia entre los genes diferencialmente expresados (GDE) de ambos grupos.

En el caso de las CEE control, existen 74 GDE entre las células no decidualizadas y las decidualizadas. En la tabla subyacente (tabla 12), se muestran los 25 genes más relevantes regulados al alza durante la decidualización de las CEE control y los 25 GDE regulados a la baja durante dicho proceso. En el anexo IV se presenta el listado completo.

Embarazo normal (grupo control)												Símbolo	Δ
CEE decidualizadas					CEE no decidualizadas								
16	16	12	13	10	7	7	7	8	8	8	7	CNR1	53
16	16	12	14	12	9	10	9	12	9	12	9	IRS2	14
15	16	13	13	11	10	10	10	11	10	11	11	CHST7	10
16	16	16	13	12	11	11	10	12	11	11	11	TSC22D3	10
13	12	10	11	9	8	8	8	8	7	8	7	PRUNE2	10
12	12	7	12	9	7	7	7	7	7	8	7	ADAMTS8	8
14	14	14	12	11	9	10	10	10	11	10	10	MAOA	8
16	16	14	15	14	12	12	11	12	11	13	12	MGST1	8
12	12	11	11	9	8	8	8	8	8	10	8	FKBP5	8
12	12	10	10	8	7	7	7	8	7	7	7	SCARA5	8
12	12	11	11	10	8	8	7	9	8	9	9	ZBTB16	7
16	15	14	13	12	11	11	11	11	11	12	11	GLUL	7
10	9	13	10	9	8	7	7	7	8	7	8	SERPINA3	6
12	12	9	11	10	8	9	9	8	8	8	9	NPR1	6
13	12	11	12	11	8	10	9	9	9	11	10	LPAR1	5
10	11	13	11	13	14	14	14	14	14	13	13	GPRC5C	-4
8	8	9	9	10	12	10	10	10	12	10	11	FBXO2	-4
8	8	9	10	10	11	12	11	11	11	11	11	C1orf133	-4
8	8	10	10	10	11	12	12	11	11	12	12	TMSB15A	-5
8	8	9	9	9	10	12	11	10	12	12	11	GFRA2	-5
10	10	10	11	12	14	13	14	11	13	13	13	PRAGMIN	-6
8	8	8	9	11	10	12	11	11	12	12	12	TSPAN11	-6
8	8	9	9	10	11	12	12	11	11	12	11	CNIH3	-8
8	8	10	10	12	14	13	12	13	13	12	13	F2RL1	-9
10	11	12	12	13	15	16	16	15	15	15	12	DIO2	-9
Abundancia de ARNm													
6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
(log2)													

Tabla 12. Análisis transcriptómico de los 25 GDE más relevantes de entre los 74 totales existentes entre las CEE decidualizadas y no decidualizadas del grupo control. El color de relleno de las casillas muestra la abundancia de ARNm para cada muestra. El símbolo que representa a cada gen analizado y la tasa de cambio de expresión (Δ) para cada gen en las CEE decidualizadas respecto a las del control se muestra en las dos columnas de la derecha con codificación nominal y numérica respectivamente.

De los 74 GDE hallados, por su relación con el proceso de decidualización, destacan los siguientes genes: *CNR1* (Receptor cannabinoide cerebral 1), *IRS2* (Receptor sustrato insulina2) y *TSC22D3* (Dominio 3 de la familia de proteínas TSC22), los tres regulados al alza en las células decidualizadas respecto a las no decidualizadas del grupo control. Dichos genes son codificantes para proteínas que estimulan la proliferación celular mediante distintas rutas que confluyen inhibiendo la apoptosis. Además, de los GDE regulados al alza, también destacan los genes *CHST7* (Carbohidratosulfatotransferasa 7), *MAOA* (Monoamino oxidasa A) y *GLUL* (Glutamato-amino ligasa) ya que influyen en el crecimiento celular mediante su acción sobre vías metabólicas que implican al proceso de decidualización.

Sin embargo, los genes *ADAMTS8* (Desintegrina A y metaloproteinasa con motivo de trombospondina 8), *FBXO2* (Proteína F-Box 2), *F2RL1* (Receptor 1 F2R tripsina-like), *TMSB15A* (Timosin beta 15A), o *GFRA2* (Receptor de la familia GDNF alpha-2), entre otros, cuya función por una vía u otra es el control del crecimiento o de estimular la muerte programada, se encuentran regulados a la baja en las células decidualizadas.

En la población de CEE control no sometida a estímulo de decidualización, se evidencia un patrón transcriptómico con predominio de sobreexpresión de genes que intervienen en rutas metabólicas de estrés oxidativo, como el gen *MGST1* (MicrosomalGlutation S-transferasa1) y el gen *DIO2* (Deiodinasa de yodotironina tipo II), ambos regulados de forma opuesta a algunos genes implicados en crecimiento celular, destacando *SERPINA3* (miembro 3 de la familia serpina A) y *PRUNE2* (homólogo PRUNE 2).

Estos hallazgos transcripcionales fruto del análisis de las CEE del grupo control antes y después de la decidualización demuestran que en el estado fisiológico de decidualización, para que esta se lleve a cabo correctamente, existe un mecanismo de transcripción muy coordinado en el que se activan los genes encargados del crecimiento y metabolismo celular, y se inactivan genes que reprimen dicho desarrollo.

Retomando la figura 33, los resultados del análisis transcripcional de las CEE de las mujeres con antecedente de PEs no muestran diferencias estadísticamente significativas en la expresión de ningún gen entre ambos grupos, antes y después de la decidualización, por tanto, no existe ningún GDE destacado.

Sin embargo, la comparación transcriptómica entre las CEE decidualizadas de ambos grupos sí muestra 129 GDE destacando los 25 más frecuentes en la tabla 13 pero se proporciona la lista completa en el Anexo V.

CEE decidualizadas										Símbolo	Δ
Control					PEs						
3	4	4	4	6	11	9	9	10	9	HSD17B2	16
3	5	5	3	3	10	9	6	11	10	ANGPT2	14
3	3	6	12	9	11	13	14	9	12	NCKAP5	12
5	6	3	6	9	12	11	10	10	11	ADRA2A	12
3	4	3	5	4	9	8	7	9	10	DBC1	11
2	2	3	3	4	9	7	5	8	7	C1QTNF7	10
3	3	2	3	3	8	7	5	7	8	COL8A1	8
3	4	3	4	6	10	9	7	7	9	EGR1	8
4	4	7	6	8	10	11	9	10	9	SSTR1	8
8	9	4	11	11	12	14	13	12	13	FBXO2	8
3	3	4	4	6	8	7	8	9	9	CPE	7
2	2	3	4	5	8	7	5	7	8	C4orf49	7
2	3	2	2	3	7	6	6	5	7	GRP	7
4	5	5	6	10	11	10	9	10	9	IGFBP5	7
3	2	3	3	3	4	4	10	4	10	COCH	7
14	14	11	10	10	6	8	10	8	7	SBSN	-9
11	12	11	6	7	3	4	6	7	5	EDNRA	-9
14	14	9	10	9	5	7	9	8	5	IL1B	-9
13	14	11	11	9	5	7	10	7	5	SPARCL1	-10
13	14	10	9	8	5	5	8	6	5	SCARA5	-11
12	11	6	10	6	3	4	6	4	4	SIPA1L2	-11
13	12	3	7	3	2	2	3	2	2	CCL8	-13
14	14	12	12	10	4	7	11	7	5	P2RY14	-14
14	13	8	10	6	4	5	9	2	3	CNR1	-17
13	13	9	6	5	2	3	5	3	2	IGFBP1	-24
Abundancia de ARNm											
0	1	3	4	6	7	8	10	11	14		
(log2)											

Tabla 13. Resumen del análisis transcriptómico de los 25 GDE más relevantes de entre los 129 totales existentes entre las CEE decidualizadas procedentes de las mujeres con antecedente de PEs y del grupo control o que tuvieron un embarazo normal. El color de relleno de las casillas muestra la abundancia de ARNm para cada muestra. El símbolo que representa a cada gen analizado y su tasa de cambio de expresión (Δ) en las CEE decidualizadas respecto a los controles se representa en las dos columnas de la derecha con codificación nominal y numérica respectivamente.

Al comparar el patrón de regulación de genes en las muestras celulares ya decidualizadas, los resultados plasman mucha disparidad entre ambos grupos. Esta afirmación se sustenta, sobretodo, en la columna numérica de la derecha de la tabla, que muestra la tasa de cambio de expresión de los GDE en el grupo PEs respecto al de las mujeres que consiguieron una gestación normal.

El gen con mayor tasa de cambio de sobreexpresión en el grupo PEs es el HSD17B2 (*Estradiol 17-beta-dehidrogenasa 2*) ya que se encuentra 16 veces más expresado que en las CEEed del grupo control, donde llamativamente, presenta una regulación a la baja. Este gen participa en el desarrollo embrionario y placentario mediante su implicación en la catálisis de la interconversión de la testosterona desde la androstendiona y del estradiol desde la estrona.

El siguiente GDE con mayor sobreexpresión en PEs es el *ANGPT2* (*Angiopoyetina 2*), 14 veces más expresado en este grupo. Este gen participa en múltiples vías de formación del organismo multicelular como desarrollo neuronal o glomerular y regulación del desarrollo vascular. Otros GDE con una tasa de cambio de sobreexpresión más marcada a favor del grupo PEs son *NCKAP5* (*Proteína 5 asociada a NCK*) implicada en el desarrollo glomerular y *ADRA2A* (*Receptor adrenérgico Alpha-2A*) mediadora de la respuesta a estímulo endógeno hormonal y regulación negativa de la secreción de insulina, entre otras funciones. Ambos genes se encuentran 12 veces más expresados en el grupo PEs respecto al control, en el que presentan una regulación a la baja.

Sin embargo, atendiendo a las tasas de cambio de infraexpresión en las células decidualizadas del grupo de las PEs, destaca con mucha diferencia el *IGFBP1* (*Proteína 1 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina*), 24 veces menos expresado en este grupo. Dicho gen codifica para una proteína que regula los efectos estimuladores del crecimiento de los factores similares a la insulina alterando la unión a sus receptores correspondientes de superficie y regulando así la proliferación y migración celular.

Otros genes que también se encuentran infraexpresados en el grupo PEs son *CNR1* (*Receptor Cannabinoide cerebral 1*) 17 veces menos expresado y cuya función ya se ha mencionado con anterioridad; *SIPA1L2* (*Señal 1 asociada a la proliferación inducida como la proteína 2*) 11 veces menos expresado y encargado de regular la transducción; *IL1B* (*interleuquina 1, beta*) y *EDNRA* (*Receptor tipo A de endotelina*) ambos 9 veces menos expresados e implicados en el desarrollo e implantación embrionaria respectivamente.

1. Integración de resultados transcriptómicos

1.1. Validación de algunos genes mediante RT- PCR

Una vez finalizado el análisis transcriptómico con la técnica del microarray, los resultados evidencian diferencias estadísticamente significativas en la expresión genética entre las células endometriales de ambos grupos tras el estímulo de la decidualización in vitro. Para validar estos datos, se ha realizado una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o “en tiempo real” (RT- PCR) de cuatro genes identificados en el microarray con la finalidad de observar si su tasa de cambio con esta técnica sigue la misma tendencia que con la anterior, ya que permite valorar de forma más específica la amplificación de un determinado gen.

La selección de los genes de los cuales se han generado sus “primers” o secuencias específicas de hibridación y son los siguientes: *ALDH1A1* (Aldehído deshidrogenasa 1, miembro A1) e *IGFBP1* (Proteína 1 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina), ambos con una tasa de cambio muy disminuida en el grupo PEs con la técnica de microarrays, así como *NANOS3* (nanos Homologo 3) y *HSD17B2* (Estradiol 17-beta-dehidrogenasa 2), con una tasa de cambio aumentada respecto a las CEE control (anexo 5).

La validación del análisis transcriptómico mediante RT- PCR se plasma en la figura 34. Como se puede observar de forma gráfica y numérica, para cada gen analizado, ambas tasas de cambio siguen la misma tendencia en cuanto a expresión de ARNm, ya que tanto *ALDH1A1* como *IGFBP1* presentan una regulación a la baja o infraexpresión, mientras que *NANOS3* y *HSD17B2* se encuentran sobreexpresados en el grupo PEs en los dos casos.

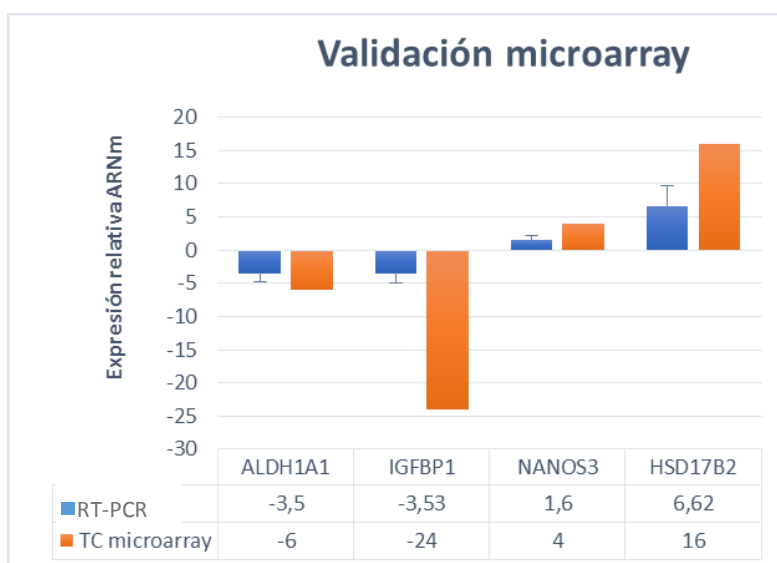


Figura 34. Validación de los resultados de microarray mediante la técnica RT- PCR. El gráfico de columnas representa los resultados de la amplificación relativa de ARNm (eje de ordenadas) para cada gen evaluado (eje de abscisa) según la técnica de microarray (naranja) o RT- PCR (azul). TC, tasa de cambio.

1.2. Análisis funcional durante la decidualización en embarazo normal

Los resultados del análisis transcriptómico, además de evidenciar la cantidad de genes diferencialmente expresados entre ambos grupos y sus tasas de cambio de expresión en las células endometriales procedentes de mujeres con PEs frente a las que alcanzaron una gestación normal o controles, tanto previa como postdecidualización, permiten discernir entre aquellos genes comprometidos en rutas de señalización que implican a la decidualización de aquellos que tienen relación con otras rutas biológicas interesantes para conocer qué ocurre en las CEE procedentes de pacientes con PEs.

Atendiendo a las vías biológicas en las que están involucrados los genes analizados en el estudio transcriptómico, y su expresión en cada una de esas rutas, los datos procedentes de las muestras de mujeres con antecedente de embarazo normal muestran una gran cantidad de procesos relevantes en la decidualización, todos ellos regulados al alza. Estos resultados se resumen en la figura 35. No hay genes infraexpresados en vías biológicas significativas para este grupo.

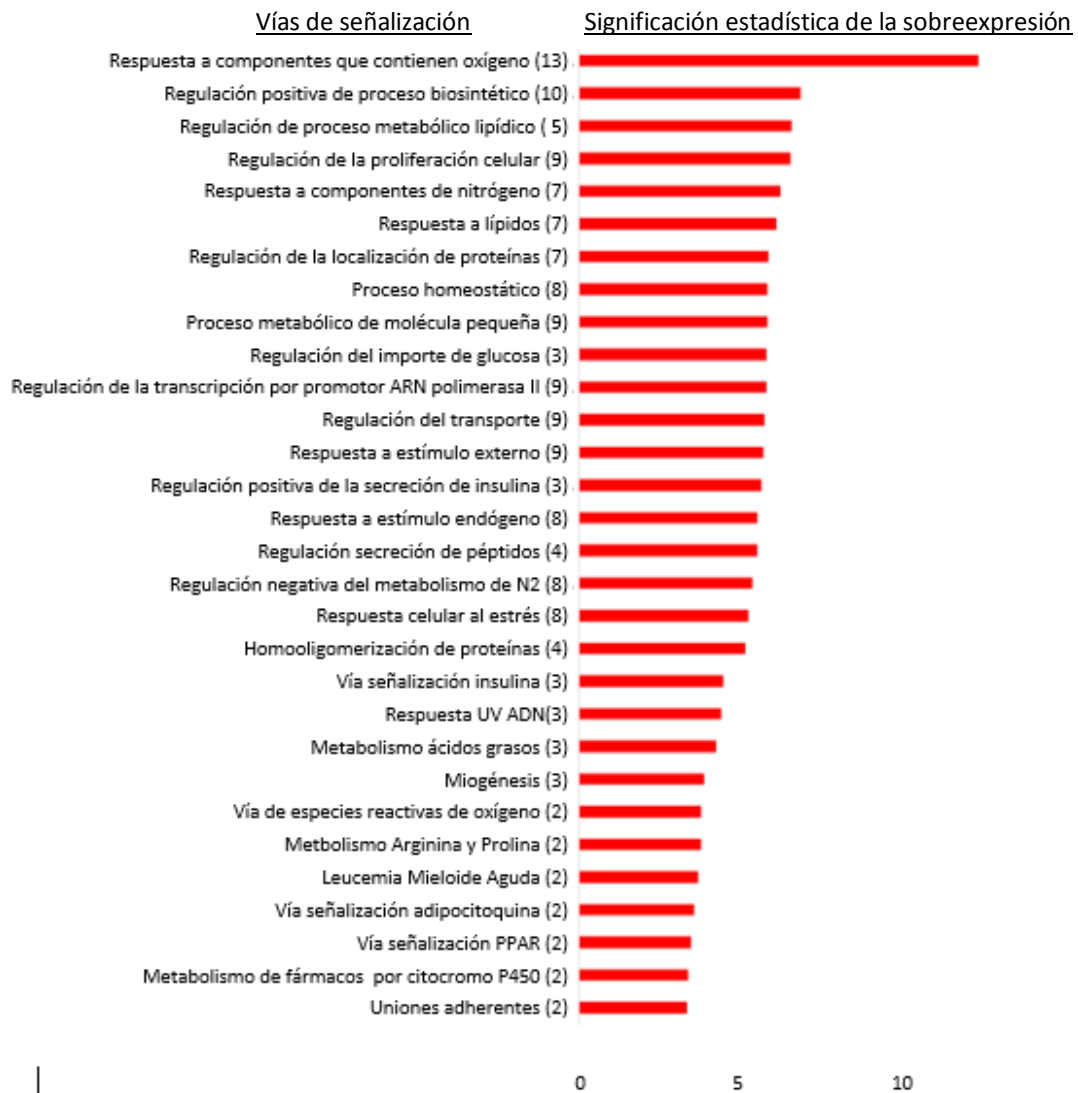


Figura 35. Representación gráfica de las rutas biológicas reguladas al alza durante la decidualización *in vitro* de las células endometriales procedentes del grupo control. En la columna de la izquierda se enumeran las vías biológicas en las que están implicados los genes estudiados y entre paréntesis la cantidad de dichos genes involucrados en cada una de ellas. En la columna de la derecha se representa con diagrama de barras horizontales la significación estadística de la sobreexpresión genética en cada una de estas vías.

De todas las vías biológicas reguladas por los genes identificados en el análisis transcriptómico de las CEE control procedente de las mujeres con gestación normal, se observan algunos procesos que son relevantes para la decidualización, incluida la regulación de las respuestas de oxígeno en la que participan 13 genes, la proliferación afectada por la sobreexpresión de 9 genes y la secreción de insulina con 3 genes implicados. La significación estadística de la sobreexpresión genética para cada una de estas rutas se muestra con un diagrama de barras horizontal en paralelo a cada una de las vías a las que se refiere,

evidenciando una mayor significación en la regulación al alza de los genes implicados en la regulación de respuesta a contenidos de oxígeno.

1.3. Análisis funcional en pacientes con preeclampsia severa (PEs)

A diferencia de las rutas biológicas donde participan los genes diferencialmente expresados de las CEE no decidualizadas comparadas con aquellas decidualizadas del grupo control en el que todas se encuentran sobrerrepresentadas, cuando se estudia el grupo PEs aparecen datos muy diferentes.

En el caso de las CEE procedentes de embarazo complicado en PEs existen vías de señalización afectadas por genes cuyos ARN mensajeros (ARNm) se encuentran regulados al alza y otros a la baja, afectando algunos de ellos a la función de decidualización (figura 36).

Entre los genes que se encuentran sobreexpresados en las CEE del grupo PEs sometidas a estímulo de decidualización in vitro destacan los que participan en rutas biológicas como la conversión hormonal (*HSD17B2*), la organización de la estructura extracelular (*LAMA5*, *SULF1* e *ITGA11*), el desarrollo vascular (*ANGPT2*, *EGR1* y *RELAXIN2*) y la respuesta a los péptidos (*KLF2*, *SSTR1* e *IGBFP5*).

Figura 36. Representación gráfica de las rutas biológicas proteica reguladas al alza y a la baja durante la decidualización in vitro de las células endometriales procedentes del grupo PEs. En la columna de la izquierda se enumeran las vías biológicas en las que están implicados los genes identificados y entre paréntesis la cantidad de dichos genes involucrados en cada una de ellas. En la columna de la derecha se representa con diagrama de barras horizontales la significación estadística de la sobreexpresión (en rojo) e infraexpresión (en azul) genética en cada una de estas vías.

Especial atención requieren las vías de señalización afectadas donde están implicados los genes cuyo ARNm ha sido identificado con una regulación a la baja dado que las moléculas codificadas desempeñan funciones importantes en el proceso de decidualización. Es el caso de IGFBP1 (Proteína 1 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina), CNR1 (Receptor Cannabinoide cerebral 1) o IL-1B (Interleuquina beta 1), que participan en varias vías como la de interacción citoquina- receptor, señalización TGF- β (factor de crecimiento transformante beta), respuesta a heridas, inflamación o a estrógenos.

Finalmente, se realiza un análisis de superposición entre los genes diferencialmente expresados de las CEE de las mujeres que tuvieron embarazos normales y aquellos que se complicaron con PEs.

Si se solapan los 42 GDE sobreexpresados en las células endometriales decidualizadas procedentes del grupo control con los 58 GDE infraexpresados en estas mismas células, pero del grupo PEs, se evidencian 15 genes que se encuentran regulados al alza en las gestaciones normales y a la baja en las células procedentes de PEs, como se puede observar en la figura 37 en la que se representan estos resultados mediante un diagrama de Venn.

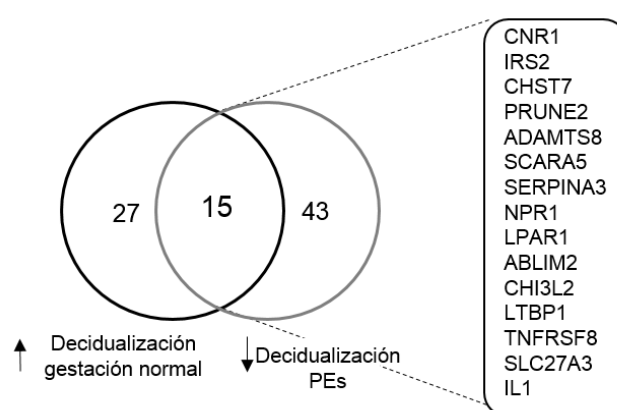


Figura 37. Diagrama de Venn en el que se representa el solapamiento entre los genes diferencialmente expresados que fueron encontrados sobreexpresados durante la decidualización in vitro de las células de mujeres que tuvieron una gestación normal e infraexpresados durante la decidualización in vitro de las células de mujeres con PEs previa.

De estos genes, destacan el receptor 1 Cannabinoide (*CNR1*), el receptor 2 al sustrato de la insulina (*IRS2*) y el receptor 1 del ácido lisofosfatídico (*LPAR1*) que codifican para moléculas de señalización, así como otros implicados en el propio proceso de decidualización, como son el miembro 2 de la familia de proteínas LIM de unión a actina (*ABLIM2*) y la proteína 1 de unión al factor de crecimiento latente beta (*LTBP1*)

Sin embargo, si se realiza el análisis de superposición de forma inversa, es decir, solapando los GDE infraexpresados en las CEE control con los GDE sobreexpresados en el análisis transcriptómico de las células de PEs que se encuentran en las mismas condiciones, existen solo 8 GDE solapados como se representa en el diagrama de Venn, plasmado en la figura 38.

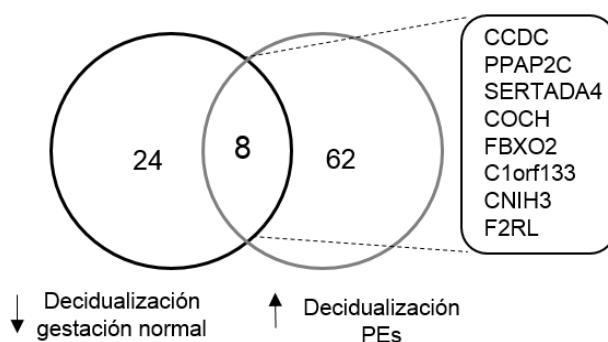


Figura 38. Diagrama de Venn en el que se representa el solapamiento entre los genes diferencialmente expresados que fueron encontrados infraexpresados en el análisis transcriptómico durante la decidualización *in vitro* de las células de mujeres que tuvieron una gestación normal y sobreexpresados durante la decidualización *in vitro* de las células de mujeres con PEs previa.

De estos 8 genes encontrados, destaca el que codifica para el factor de coagulación C homólogo, cochlina (*COCH*), implicado en la regulación de la forma o silueta celular y en la respuesta defensiva a estímulo endógeno, y el que codifica para la proteína auxiliar 3 del receptor AMPA de la familia Cornichon (*CNIH3*) implicada en rutas de señalización intracelular.

Por tanto, se podría concluir que los genes cuyos patrones de expresión son discordantes en las CEE decidualizadas de los dos grupos comparados podrían desempeñar un papel importante en la alteración funcional demostrada de la decidualización fallida *in vitro* de las células procedentes de las mujeres con PEs previa.

3. Anexina A2 (ANXA2): estudio de la expresión génica y proteica

Anexina A2 (ANXA2) es uno de los genes cuya expresión se haya desregulada en el perfil transcriptómico de las CEE decidualizadas (CEE_d) de pacientes control comparadas con PEs previa. Mediada por calcio, la proteína ANXA2 se une a los fosfolípidos de la membrana permitiendo el desencadenamiento de sus funciones, entre ellas, la regulación de la receptividad endometrial (Garrido - Gómez, 2012). Tal como se ha expuesto, el análisis transcripcional mediante microarrays realizado en las CEE decidualizadas ha mostrado una regulación negativa del ARNm de ANXA2 en el grupo de PEs (anexo V).

3.1. Validación por técnicas clásicas: RT- PCR

El estudio mediante microarray de ANXA2 en las CEE_d muestra una clara infraexpresión de ARNm en las 5 muestras procedentes de biopsias endometriales de mujeres con antecedente de PEs respecto a las de gestaciones previas normales (tabla 14). Las características basales de las pacientes se resumen en la tabla 10.

CEE decidualizadas															
Control					PEs										
N1	N2	N3	N4	N5	PEs1	PEs2	PEs3	PEs4	PEs5						
6	5	8	9	9	4	7	7	5	5						
Abundancia de ARNm															
<table border="1"> <tr> <td>4</td> <td>5</td> <td>6</td> <td>7</td> <td>8</td> <td>9</td> </tr> </table>										4	5	6	7	8	9
4	5	6	7	8	9										
(log ₂)															

ANXA2

Tabla 14. Análisis transcriptómico de ANXA2 y la expresión de ARNm en las CEE_d para cada una de las muestras del grupo control con antecedente de gestación normal (N) y del que tuvo como antecedente preeclampsia severa (PEs)

Dado que el estudio con microarrays puede ser inespecífico para valorar la expresión de ARNm de un solo gen concreto, se utiliza la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT- PCR) para corroborar estos resultados. Así pues, tal y como se observa en la figura 39 hay una regulación negativa del ARNm de ANXA2 en las CEE decidualizadas procedentes de biopsias endometriales de mujeres con embarazos previos

afectados de PEs comparado con las procedentes de mujeres control, cuya tasa de cambio obtenida en esta técnica es de -1.9.

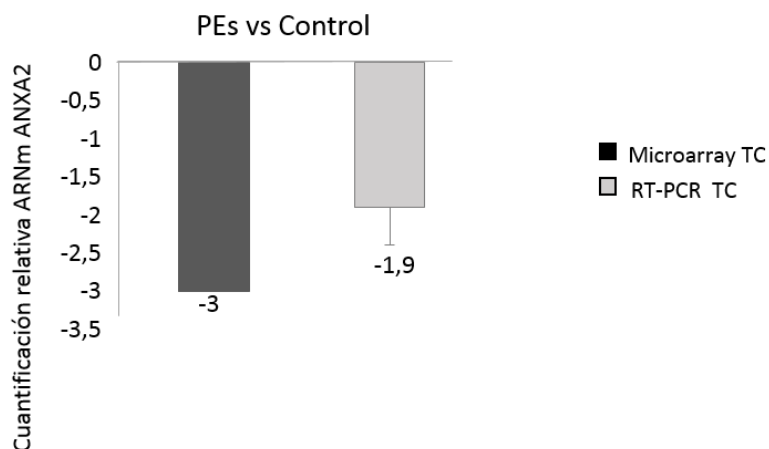


Figura 39. Diagrama de barras que muestra la validación de datos de microarrays mediante RT-PCR. Regulación baja estadísticamente significativa de la expresión de ARNm ANXA2 en las CEE decidualizadas procedentes del endometrio de mujeres con antecedente de PEs respecto a los controles de embarazos sanos. La tasa de cambio (TC) se calcula como niveles de ARNm para CEE decidualizadas de PEs (n=5) frente a control (n=5).

3.2. Análisis de la expresión intracelular de ANXA2

Como se ha demostrado científicamente, en condiciones normales, el endometrio humano sufre una regulación hormonal durante la segunda fase del ciclo menstrual necesaria para que se lleve a cabo un proceso correcto de decidualización por las CEE (Garrido-Gómez, 2012). Para valorar el papel de la Anexina A2 (ANXA2) en dicha regulación hormonal se procede a evaluar si su concentración intracelular se ve afectada por la presencia de hormonas que se conoce que participan activamente en el desencadenamiento y regulación de la decidualización de las CEE.

Para ello, se cultivan las CEE durante 5 días en tres condiciones experimentales, sin hormonas (control), medio de cultivo en estradiol (E2) y progesterona (P4) y otro enriquecido con adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y medroxiprogesterona (MPA). Tras ello, se mide la cantidad de la proteína ANXA2 mediante la técnica ELISA plasmando los resultados que se aprecian en la figura 40.

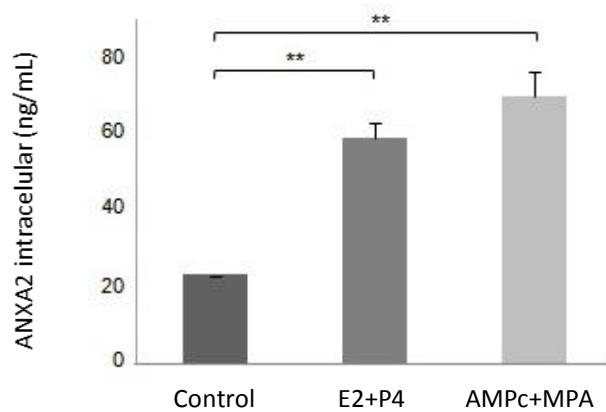


Figura 40. Niveles de proteína ANXA2 intracelular (ng/mL) medidos de CEE tratadas con estrógenos (E2) + progesterona (P4) y con adenosín monofosfato cíclico (AMPc) + medroxiprogesterona (MPA). En ambos casos, los niveles de ANXA2 intracelular ascienden en presencia hormonal. La proteína se mide con ELISA y se expresa como ng/mL (media +/- DSM, **P<0.01).

De forma estadísticamente significativa, la expresión celular total de ANXA2 aumenta en presencia de hormonas, independientemente de E2 + P4 o de AMPc + MPA, sugiriendo que los niveles de ANXA2 podrían estar involucrados en la regulación hormonal que sufren las células endometriales durante el ciclo menstrual.

Se evalúa también la expresión celular total de la proteína Anexina A2 durante la decidualización in vitro de las CEE de pacientes con PEs comparadas con pacientes control para ver si hay diferencias entre ambos grupos. Como evidencia la figura 41, los niveles de ANXA2 se encuentran más disminuidos en el grupo PEs tanto antes como después de la decidualización in vitro, de hecho no hay cambios significativos de expresión antes y después de someter a las CEE de PEs a la inducción de decidualización. Sin embargo, en el grupo control, la expresión de ANXA2 sí se ve aumentada de forma considerable y estadísticamente significativa tras el estímulo de decidualización y son significativamente más elevados en comparación con los del grupo PEs tras la decidualización.

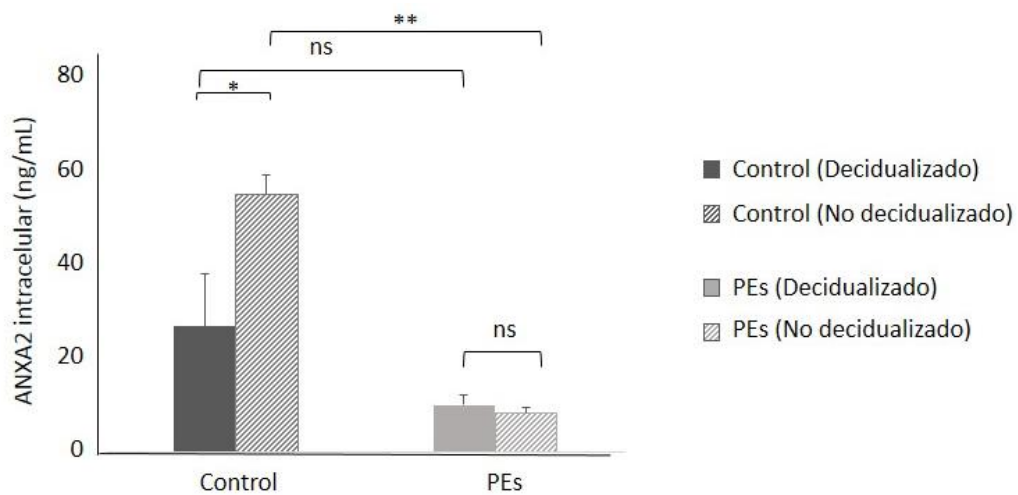


Figura 41. Niveles de proteína ANXA2 intracelular (ng/mL) en la muestra de CEE antes y después de la decidualización *in vitro* tanto de embarazos control (gris oscuro) como de los obtenidos de mujeres con PEs previa (gris claro). La proteína ANXA2 se ha medido con la técnica ELISA y se expresa como ng/mL (media +/- DSM). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns no significativo.

Por tanto, tras demostrar la importancia de ANXA2 en la correcta regulación hormonal de las CEE durante el ciclo menstrual y su disminución significativa durante la decidualización *in vitro* de las CEE del grupo PEs, podría sugerirse esta molécula como un biomarcador representativo de predicción de alteraciones en la decidualización de pacientes con preeclampsia.

4. Estudio in vitro sobre la ruta de acción de ANXA2

Como ya se ha mencionado con anterioridad, la decidualización es un proceso hormonalmente regulado que sufren las células endometriales estromales durante la segunda mitad del ciclo menstrual e implica necesariamente cambios en la morfología celular y en la secreción de moléculas para que se lleve a cabo correctamente la posterior invasión e implantación embrionaria y placentación, todo ello se encuentra alterado cuando se desarrolla una preeclampsia.

Una vez demostrado in vitro que ANXA2 tiene unos niveles de expresión alterados en muestras endometriales de pacientes con antecedentes de PEs, se va a analizar su implicación en la resistencia a la decidualización que sufren las CEE de este grupo, esperando cambios en la morfología celular y en la secreción de marcadores de dicho proceso cuando esta proteína presenta niveles disminuidos o incluso inexistentes.

Para impedir la producción de Anexina A2 in vitro, se inhibe la expresión de su ARN mensajero (ARNm) mediante ARN de interferencia o de silenciamiento (ARNi) que no es más que una secuencia de ARNm complementaria, específica y opuesta a la del ARNm ANXA2, de forma que la unión de ambas cadenas resulta en un bloqueo de la secuencia de ARNm ANXA2 y por lo tanto, en la formación de la proteína y desarrollo de sus funciones. Para asegurar especificidad de los resultados se utilizan dos controles experimentales, uno basado en el cultivo de CEE sin añadir ninguna molécula (grupo control) y otro en el que se ha introducido a las CEE una secuencia de ARNi inespecífica generada al azar sin unión a ninguna secuencia y por tanto sin efecto sobre el silenciamiento de ningún gen, para asegurar que los resultados no se ven alterados por la técnica *per se* (grupo control ARNi).

Además, para asegurar la homogeneidad de los resultados obtenidos, independientemente del número de muestras utilizadas para cada grupo, se ha medido también la expresión del gen constitutivo de la β -actina, y su posterior formación proteica, ya que se trata de un gen que se expresa siempre, independientemente de la célula analizada y la cantidad de material utilizado en el análisis.

4.1. Inhibición de ANXA2 y efecto sobre decidualización: morfología

Previamente a la decidualización, la adición in vitro de ARNi específico para ANXA2 sobre las CEE no decidualizadas y posterior análisis con RT-PCR da como resultado una disminución de hasta un 50% en la expresión de ARNm de ANXA2 frente a ambos controles (control y control ARNi), como demuestra la figura 42.

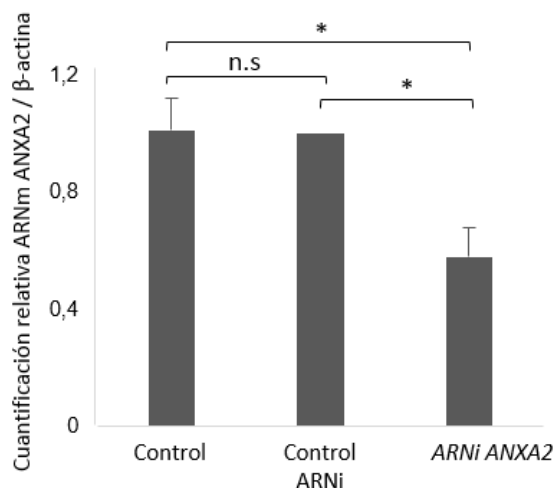


Figura 42. Evaluación del ARNm mediante RT-PCR en el grupo de CEE sin transferencia de ARNi (control), en el que se añade ARNi inespecífico (control ARNi) y en el que se transfiere ARNi ANXA2. La expresión de ARNm de este tercer grupo se encuentra disminuida a un valor relativo de 0.58, teniendo un valor de ARNm ANXA2 en el control de 1. Los valores se expresan como media \pm DSM; * $P < 0.05$ y ns no significativo

Mediante la técnica Western-Blot, se evalúa la afectación sobre la producción proteica de ANXA2 al inhibir su expresión con ARNi específico y se observa una disminución casi completa de la abundancia proteica de Anexina A2 a las 24 horas de su bloqueo genético mediante tratamiento específico con ARNi ANXA2 (figuras 43 y 44).

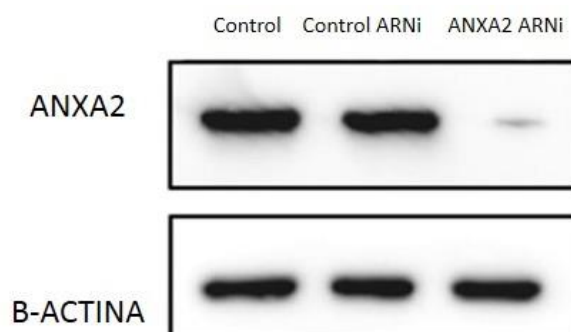


Figura 43. Estudio densitométrico mediante la técnica Western-Blot que evidencia la abundancia proteica de ANXA2 tras su bloqueo a nivel genético mediante ARNi, normalizado con β -actina (control endógeno) en los tres grupos de análisis: CEE sin ningún tratamiento (control), células a las que se añade ARNi inespecífico (control ARNi) y en el que se transfiere ARNi ANXA2.

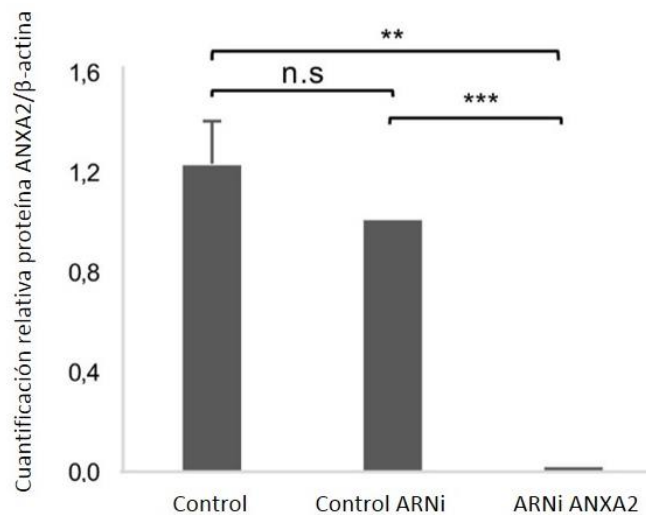


Figura 44. Cuantificación relativa de la abundancia proteica de ANXA2 a las 24h tras la inhibición de su ARNm en el grupo de CEE sin transferencia de ARNi (control), en el que se añade ARNi inespecífico (control ARNi) y en el que se transfiere ARNi ANXA2. Este gráfico muestra la densitometría de bandas proteicas obtenidas mediante western blot mostrado anteriormente para ANXA2 y relativas a la abundancia de β -actina. La producción proteica de ANXA2 en este tercer grupo es prácticamente inexistente. Los valores se expresan como media +/-DSM; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ y ns no significativo.

Una vez puesta a punto la inhibición específica de ANXA2 sobre las CEE, se observa el efecto de dicha inhibición sobre las CEE sometidas a decidualización in vitro tanto a nivel morfológico como bioquímico. Para ello, tanto a los dos grupos de CEE control como al silenciado con ARNi ANXA2 se le añade in vitro AMPc + MPA al medio condicionado y se incuban durante 5 días (Garrido- Gómez, 2017).

Pasado este período de incubación, se tiñen las CEE decidualizadas con rodamina-faloidina y se compara su morfología, frente a las CEE no decidualizadas (figura 45). Se observa claramente como las CEE decidualizadas control reorganizan su citoesqueleto de longitudinal a poligonal mientras que las CEE del grupo ARNi ANXA2 permanece inalterado, manteniendo la morfología fibroblástica característica, hecho que demuestra la resistencia a la decidualización presente en las CEE tras silenciar ANXA2 y que también está presente en las células procedentes de pacientes con preeclampsia severa previa.

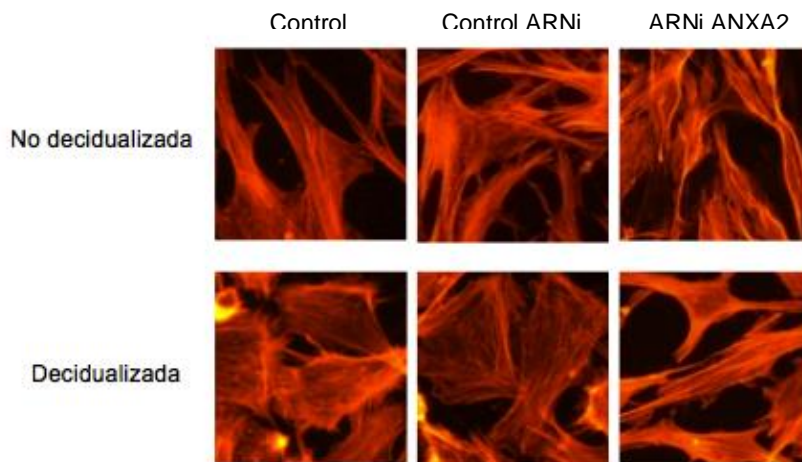


Figura 45. Cambio morfológico de las CEE antes y después de la decidualización en controles y en células silenciadas con ARNi ANXA2. El bloqueo de ANXA2 afecta a la decidualización *in vitro* de las CEE manteniendo la orientación longitudinal de los filamentos de actina. El citoesqueleto de actina F se visualiza mediante la tinción con rodamina-faloidina.

Para fortalecer esta evidencia basada en la ausencia de cambios morfológicos durante la decidualización en las CEE silenciadas para ANXA2, se analiza la relación entre la actina globular (G) monomérica libre en el citosol, la actina filamentosa (F) incorporada en el citoesqueleto y la actina total (esta última como control interno de la técnica) utilizando de nuevo la técnica Western Blot (figura 46). Este experimento se realiza con la intención de valorar la polimerización de los filamentos de actina, proceso necesario para que se lleve a cabo un adecuado cambio morfológico celular, característico de una correcta decidualización.

El análisis densitométrico del grupo control y del control con ARNi muestra una relación actina G/ actina F de 1:1 tanto en las CEE no decidualizadas como en las decidualizadas que sí que han desarrollado este proceso. Por otro lado, las CEE silenciadas con ARNi ANXA2 muestran un desbalance en esta relación a favor de la actina G citosólica libre, con una proporción de 2:1 en comparación con las CEE no decidualizadas de ambos grupos control y aproximadamente 4:1 entre las CEE decidualizadas (figura 47).

Estos hallazgos revelan un papel importante de ANXA2 en la reorganización del citoesqueleto celular durante el proceso de decidualización, ya que el silenciamiento del gen que codifica dicha proteína induce una polimerización deficiente en los filamentos de actina de las células endometriales al no poder incorporarse al citoesqueleto y quedarse libre en el citosol como actina G monomérica.

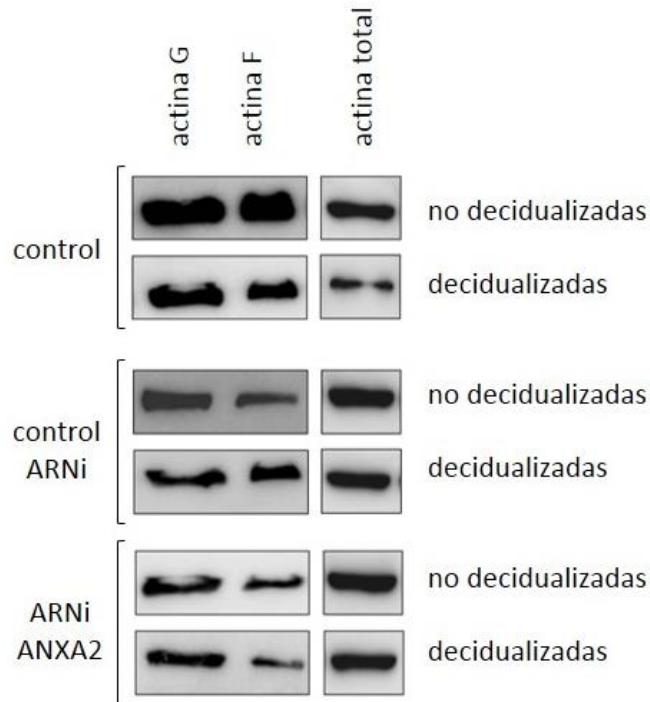


Figura 46. Relación entre la actina G libre en citoplasma, y la actina F incorporada a las fibras que constituyen el citoesqueleto mediante transferencia Western Blot tanto en las CEE no decidualizadas como en las decidualizadas de ambos grupos control y del silenciado con ARNi ANXA2.

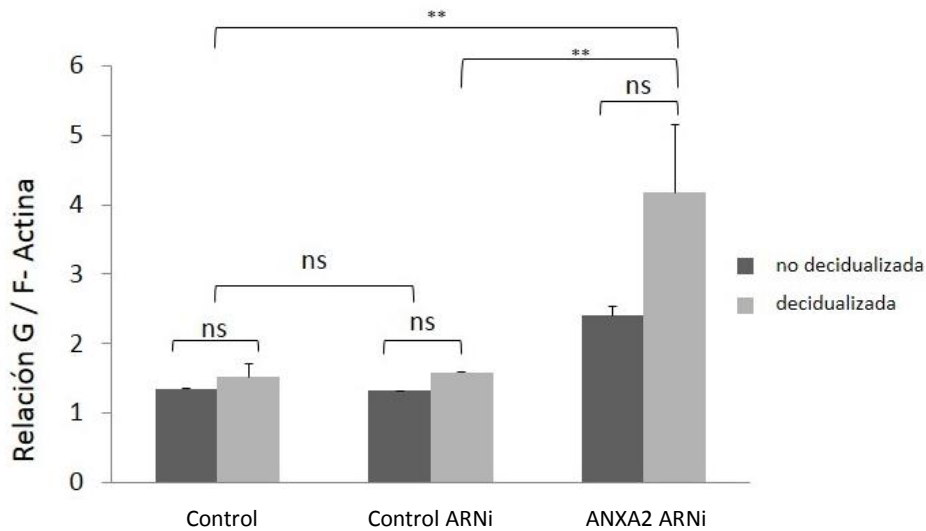


Figura 47. Relación entre la actina G libre en citoplasma, y la actina F incorporada a las fibras que constituyen el citoesqueleto tanto en las CEE no decidualizadas (gris oscuro) como en las decidualizadas (gris claro) de ambos grupos control y del silenciado con ARNi ANXA2. La proporción de actina G/actina F es prácticamente 1:1 y no significativo entre los grupos control. Sin embargo esta relación aumenta a 2:1 entre las CEE no decidualizadas del grupo silenciado con ARNi ANXA2 y los controles, y aproximadamente 4:1 entre las CEE decidualizadas. Los resultados se expresan como media +/- DSM de tres experimentos diferentes. ** P<0.01; ns no significativo.

4.2. Inhibición de ANXA2 y efecto sobre decidualización: secreción de marcadores

Durante la decidualización, como se ha resaltado con anterioridad, las CEE secretan biomarcadores como prolactina (PRL) y la proteína de unión al factor de crecimiento de la insulina (IGFBP-1) cuyos niveles se presentan elevados siempre que el proceso haya sido exitoso.

Para valorar el efecto in vitro del silenciamiento de ANXA2 sobre la secreción de ambos biomarcadores se utiliza la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) que permite medir los niveles de PRL e IGFBP-1 en los medios condicionados control, control con ARNi y ARNi ANXA2, tras inducir sus CEE a decidualización.

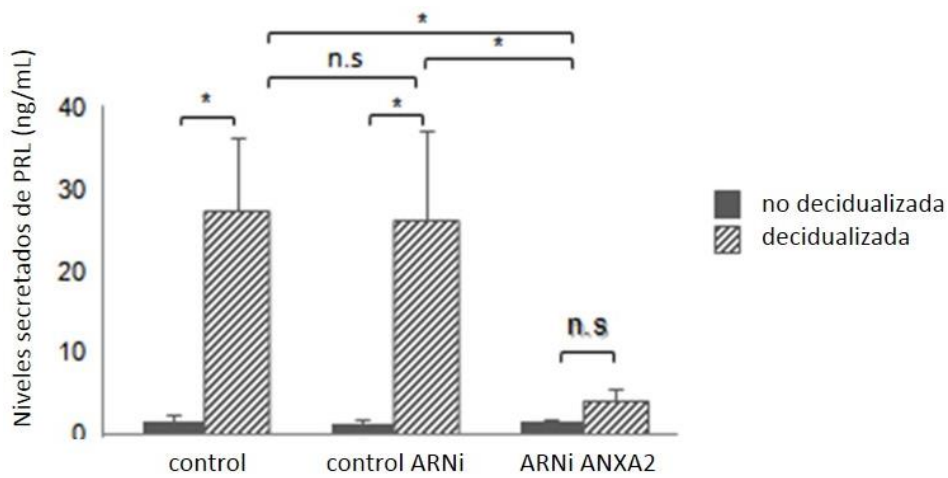


Figura 48. Valores de PRL secretados antes (gris oscuro) y después (gris con rayas) de la decidualización en los tres grupos estudiados, medidos mediante ELISA. Los valores se expresan como una media +/- DSM de tres experimentos diferentes. * $P < 0.05$; ns no significativo.

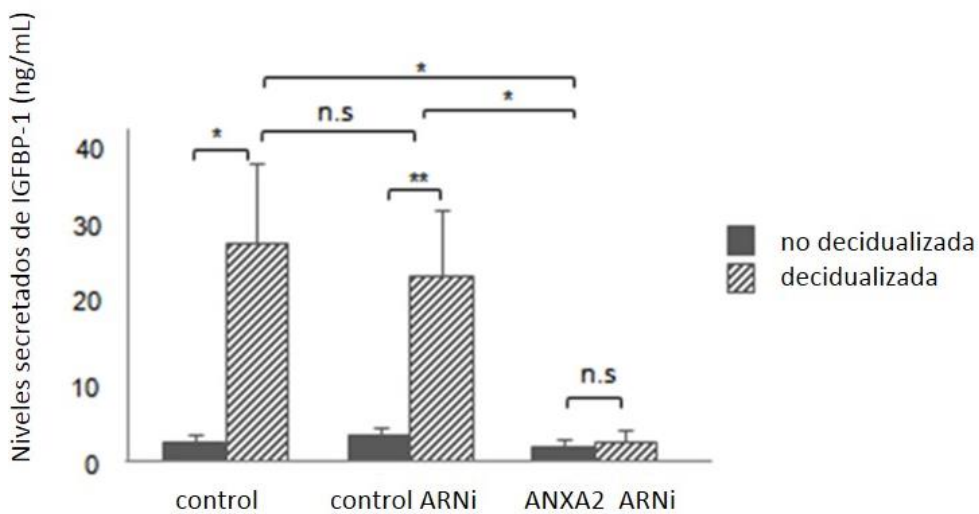


Figura 49. Valores de IGFBP-1 secretados antes (gris oscuro) y después (gris con rayas) de la decidualización en los tres grupos estudiados, medidos mediante ELISA. Los valores se expresan como una media +/- DSM de tres experimentos diferentes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ns no significativo.

Como puede apreciarse en las figuras 48 y 49, los niveles secretados in vitro de PRL y de IGFBP-1 en las CEE se elevan significativamente durante su decidualización, tanto en el grupo control como en el grupo control ARNi. Sin embargo, la concentración de estos biomarcadores en la muestra procedente de las CEE a las que se les ha silenciado ANXA2 con ARNi específico se muestran unos niveles prácticamente inalterados antes y después de la decidualización. Estos resultados pueden relacionar a ANXA2 como funcionalmente implicada en el correcto desarrollo del proceso de decidualización, no solo a nivel morfológico celular, sino también en la secreción de moléculas clave para este proceso.

5. Estudio in vivo con ratón knockout para ANXA2

Una vez demostrado el papel funcional de ANXA2 en la decidualización in vitro, se aborda ahora su función in vivo sobre dicho proceso. Para ello se utilizan ratonas ANXA2-/- (Knockout; KO) (Ling, 2004). A diferencia de la raza humana en que la decidualización de las CEE se produce mensualmente e independiente de si ha habido fecundación del óvulo, en los ratones este fenómeno solo se produce si ha habido fecundación o como consecuencia de una lesión mecánica (Wang, 2006). En los roedores hembra, el ciclo estral dura 4 o 5 días. A partir del quinto día, si ha habido fecundación, la presencia del blastocisto marca el inicio de la decidualización (día embrionario 5 o E5) que se desarrolla aproximadamente en 72 horas, considerándose esta establecida en torno al día embrionario 8 (E8) (Gellersen, 2007).

Para el experimento, se utilizan 14 ratonas hembra: 7 de ellas a las que se les silencia Anexina A2 (-/- ; KO) y 7 ratonas salvajes, que no presentan silenciamiento de ANXA2. Ambos tipos de ratonas gestan, lo cual se evalúa considerando la presencia de tapón copulatorio temprano como día embrionario 0 (E0). Un grupo de hembras se las sacrifica en E5 y E8 para valorar el proceso de decidualización alcanzado hasta la fecha (n total 8), y otro grupo en día E16 para estudiar el desarrollo placentario (n total 6).

5.1. Efecto sobre marcadores de decidualización

Para valorar in vivo los efectos del silenciamiento de ANXA2 sobre la decidualización, primero se procede a demostrar la ausencia de inmunorreactividad para PRL e IGFBP-1 en el endometrio de ratonas salvajes no gestantes (ANXA2+/+). Para ello y como muestra la figura 50, se utilizan secciones de tejido congelado de endometrio roedor no gestado disponibles en el laboratorio y se utilizan anticuerpos específicos para PRL e IGFBP-1 (ambos biomarcadores de célula endometrial decidualizada como se ha explicado con anterioridad) que han sido marcados con inmunofluorescencia (verde). Los núcleos celulares se tiñen con DAPI (azul).

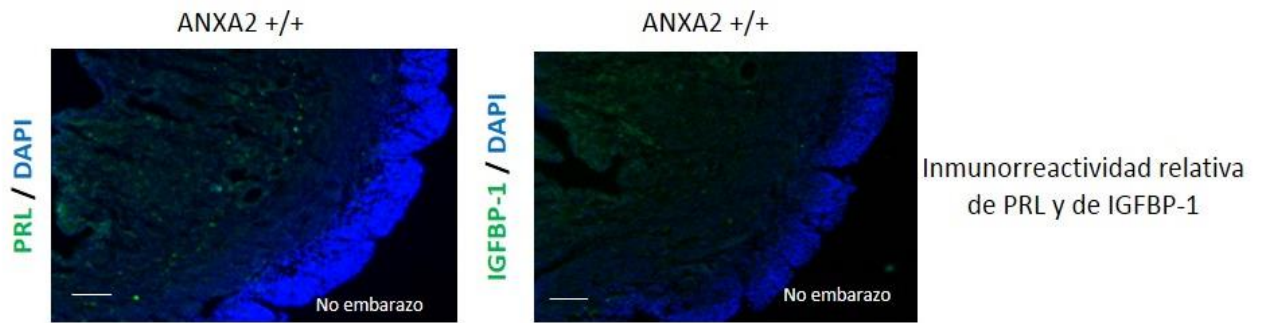


Figura 50. Secciones de endometrio uterino de ratonas no embarazadas en el que se muestra la ausencia de inmunorreactividad para PRL e IGFBP-1 (deberían teñirse en verde) mediante la tinción con anticuerpos dirigidos contra esos biomarcadores. Los núcleos celulares se han teñido de azul con DAPI. Barra de escala 100 μ m

Una vez comprobado que las células endometriales uterinas de los ratones hembra no gestantes prácticamente no presentan niveles secretados de PRL e IGFBP-1, se comprueba la expresión de ANXA2 en el útero de ratonas embarazadas en día gestacional E5, tanto ANXA2 K0 como en tipo salvaje. Como muestra la figura 51, se evidencia una gran expresión de esta proteína en el tejido placentario y decidua materna en ratones salvajes mientras que la inmunorreactividad es prácticamente indetectable en ratones ANXA2^{-/-}.

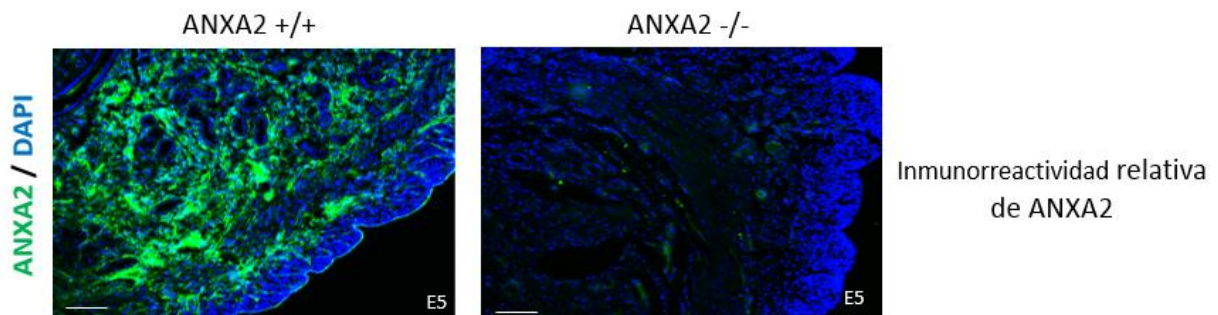
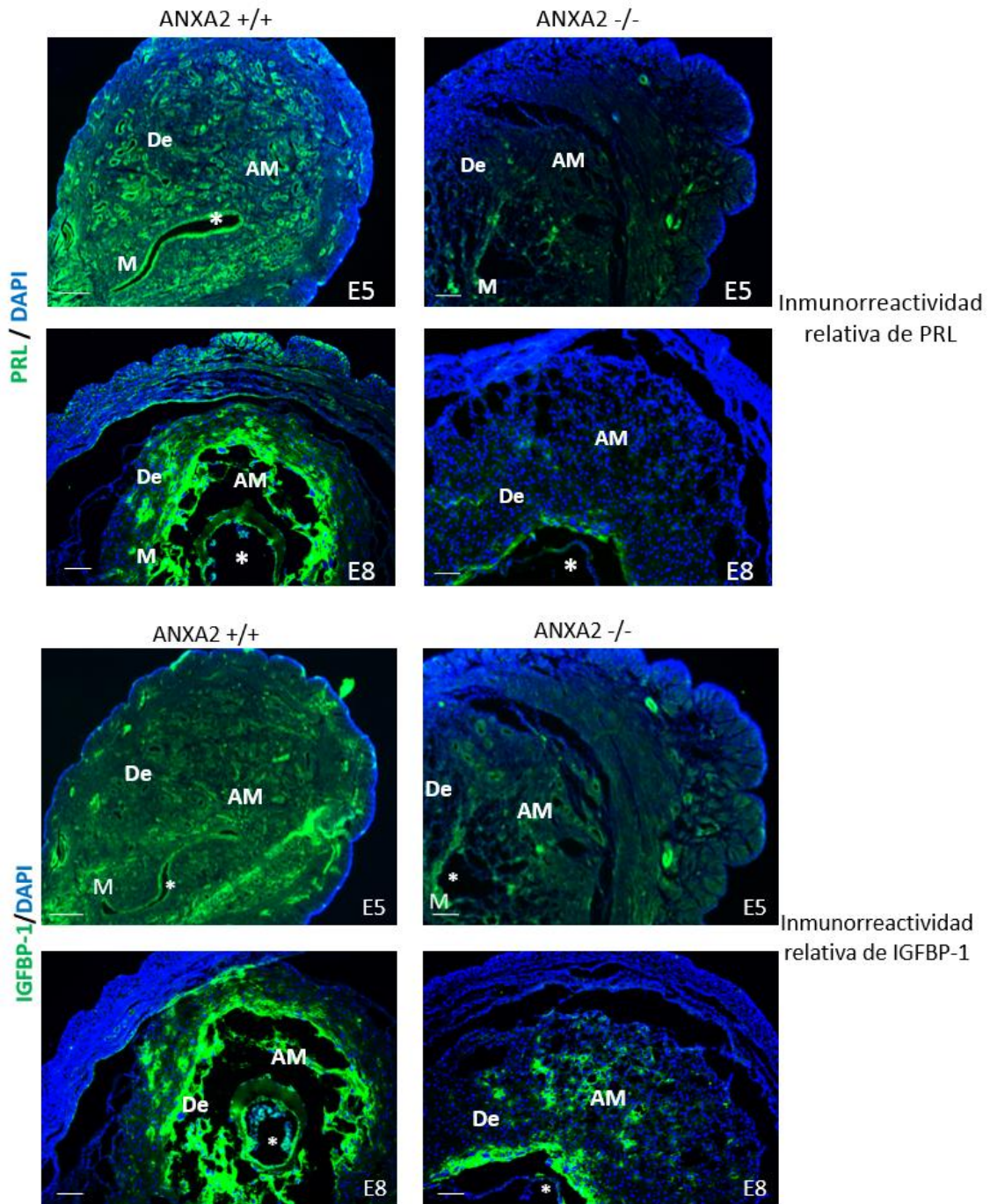


Figura 51. Secciones de tejido placentario y decidua de ratones salvajes (ANXA2^{+/+}) y silenciados para anexina A2 en el día embrionario 5 que corresponde con el inicio de la decidualización y en el que se muestra en verde la gran expresión de ANXA2 para el primer grupo, en contraste con la ausencia de inmunorreactividad para los ANXA2^{-/-}. La proteína Anexina se tiñe mediante anticuerpos dirigidos específicamente a ella. Los núcleos celulares se han teñido de azul con DAPI. Barra de escala 100 μ m

Tras ello, se analiza su estado de decidualización tanto al inicio (E5) como cuando ya está dicho proceso establecido (E8). En este caso se utilizan los ratones hembra K0 gestantes y sacrificados en esos días embrionarios y se estudia la expresión de ANXA2, de PRL y de IGFBP-1.

Los biomarcadores clásicos de decidualización, PRL e IGFBP-1, a diferencia de ANXA2, se miden en el sitio de implantación tanto al inicio de dicho proceso (E5) como al final de su establecimiento (E8). Al igual que en el estudio anterior, se tiñen los niveles de estas moléculas mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo dirigido específicamente a cada una de ellas (figuras 52 y 53).



Figuras 52 y 53. Secciones de tejido placentario y decidua de ratones salvajes (ANXA2+/+) y silenciados para anexina A2 (ANXA2-/-) y niveles de expresión de PRL (figura 52) y de IGFBP-1 (figura 53) tanto en el día embrionario 5 (E5) que corresponde con el inicio de la decidualización como en el día embrionario 8 (E8), momento en el que este fenómeno ya está establecido. En ambos casos se muestra gran expresión de estos biomarcadores para el grupo de ratones salvajes, en contraste con la baja inmunorreactividad de anti-PRL y anti-IGFBP1 para los ANXA2-/- (marcaje verde). Los biomarcadores se tiñen mediante anticuerpos dirigidos específicamente a ellos. Los núcleos celulares se han teñido de azul con DAPI.* indica embriones; AM antimesometrio; De decidua y M mesometrio. Barra de escala 100 μ m.

Los resultados de inmunofluorescencia con anticuerpos antiPRL demuestran que, en el caso de los ratones salvajes (ANXA2+/+), existe gran inmunorreactividad en el tejido placentario y en la decidua materna durante todo el proceso de decidualización. Sin embargo, en los ratones KO, dicha inmunorreactividad es prácticamente inexistente, tanto en E5 como en E8 (figura 52).

En el caso del IGFBP-1 las conclusiones extraídas de la figura 53 son prácticamente extrapolables a las de PRL, tanto para ratones salvajes como para el grupo de los silenciados en ambos días embrionarios estudiados, si bien es cierto que hay un poco más de expresión de IGFBP-1 que de PRL en E8 a nivel de la decidua materna de las hembras de ratones KO, aunque dicha diferencia no tiene ninguna significación estadística.

Por tanto, el estudio in vivo de los marcadores de decidualización demuestra que en los ratones hembra gestantes a las que previamente se les ha silenciado la expresión de ANXA2 no son capaces de secretar las biomoléculas características del proceso de decidualización y por lo tanto, no pueden llevar a cabo este proceso correctamente.

5.2. Estudio descriptivo sobre embarazo de ANXA2 KO o nulos

Como se ha mencionado anteriormente, se conoce que el ciclo reproductivo o estral del ratón hembra difiere del de la raza humana, pero su comportamiento ante el silenciamiento de ANXA2 es similar al humano, con escasez de secreción de PRL e IGFBP-1 y por tanto una decidualización alterada.

El estudio en este punto se centra en investigar si el comportamiento del embarazo de ratón imita al fenotipo de la preeclampsia severa (PEs) humana cuando se silencia la anexina A2. Para ello, se utilizan los ratones hembra salvajes ($n=3$) y los ANXA2 $^{-/-}$ ($n=3$) sacrificados en E16 y se estudia el número de sitios de implantación, el peso (gr) del sitio de implantación y el del feto y la placenta.

Iniciando el análisis por el número de sitios de implantación, la figura 54 muestra estos lugares en ambos grupos de estudio mediante gráfico de barras con una n total de 14, incluyendo ratones salvajes y silenciados para ANXA2 sacrificados en E16. Como se puede observar, no hay diferencias significativas en el número de sitios de implantación entre ambos grupos. Por tanto el silenciamiento de ANXA2 no afecta al lugar de implantación de la masa embrionaria en el modelo de ratón.

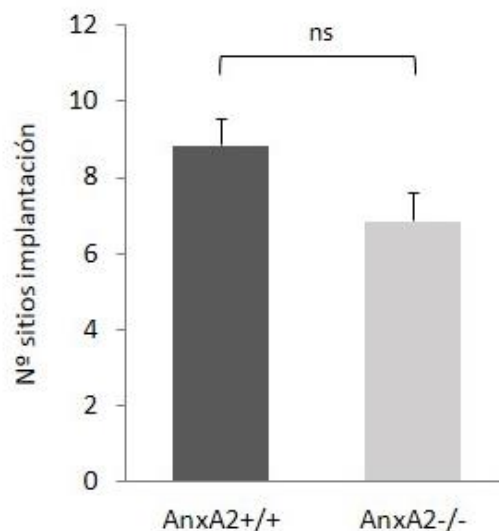


Figura 54. Número de sitios de implantación en los ratones ANXA2 +/+ (gris oscuro) y ANXA2 -/- (gris claro) a día embrionario 16 ($n=14$). No hay diferencias en el número de sitios de implantación a pesar del silenciamiento de ANXA2. Los valores se expresan como media \pm DSM; ns no significativo. Barra de escala 100 μ m

En contraste con los datos anteriores, el examen del peso del lugar de implantación expresado en gramos (gr) utilizando 6 ratones totales (3 ratones por grupo), sí muestra una clara disparidad entre ambos, de forma que los ratones ANXA2^{-/-} presentan sitios de implantación más pequeños que los ratones salvajes (figura 55).

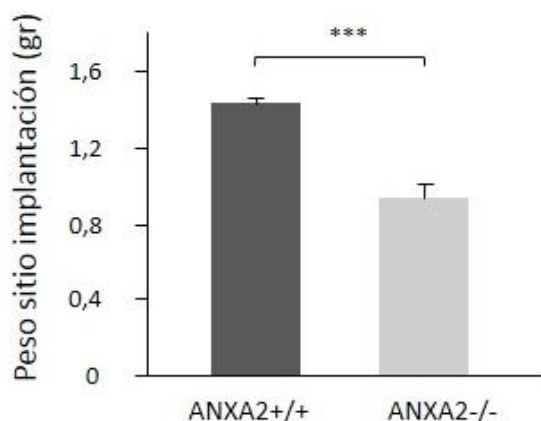


Figura 55. Peso en gramos (gr) del sitio de implantación de la masa embrionaria en los ratones ANXA2^{+/+} (gris oscuro) y ANXA2^{-/-} (gris claro) a día embrionario 16 (n=3/grupo). Los ratones hembra gestantes con silenciamiento de ANXA2 presentan un menor tamaño significativo del lugar donde se implanta el embrión ratón. Los valores se expresan como media +/- DSM; ***P<0.001. Barra de escala

Hasta aquí, queda de manifiesto que, si bien el bloqueo de la expresión de ANXA2 en ratones hembra gestantes no varía el lugar de implantación de la masa embrionaria respecto a los ratones que sí expresan dicha proteína, este sitio presenta un menor peso en aquellos roedores que no son capaces de expresar ANXA2, por lo que la presencia de esta molécula influye, no solo para que la deciduización se realice de forma correcta sino también para que la implantación se lleve a cabo con normalidad.

Se analiza ahora el posible efecto que puede tener el bloqueo de anexina A2 sobre el desarrollo fetal y embrionario. Para ello, lo primero que se realiza es un estudio macroscópico de placenta y feto de 6 roedores hembra gestantes en E16, fijados previamente con paraformaldehído tamponado al 4%, como muestra la figura 56.

El estudio del peso placentario de los ratones gestantes sacrificados en E16 se detalla en la figura 57 y encuentra que los roedores ANXA2^{-/-} presentan unos pesos significativamente menores que los de los ratones ANXA2^{+/+}. Este mismo hallazgo aparece tras el examen del peso fetal, que también es menor en los ratones silenciados para anexina A2 (figura 58).

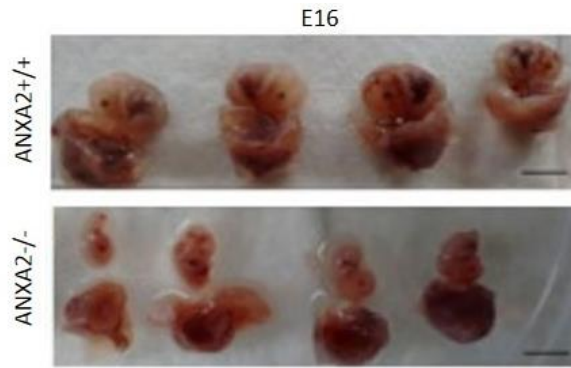


Figura 56. Imágenes del aspecto macroscópico de fetos y placentas de ratones ANXA2+/+ (arriba) y ANXA2-/- (abajo). N=6 (n=3 ratonas/grupo). Visualmente se observa como el tejido embrio-placentario presenta menor tamaño en el grupo de ratones silenciados para anexina A2.

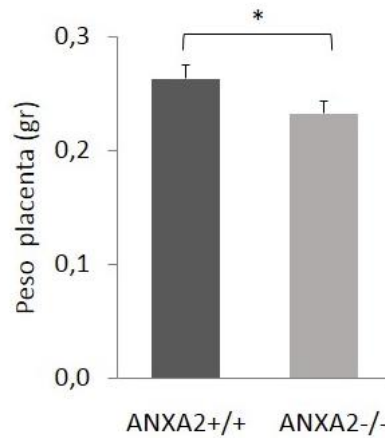


Figura 57. Peso en gramos (gr) del tejido placentario en los ratones ANXA2 +/+ (gris oscuro) y ANXA2 -/- (gris claro) a día embrionario 16 (n=3/grupo). Los ratones hembra gestantes con silenciamiento de ANXA2 presentan placentas significativamente más pequeñas. Los valores se expresan como media +/- DSM; * P<0.05. Barra de escala 100µm

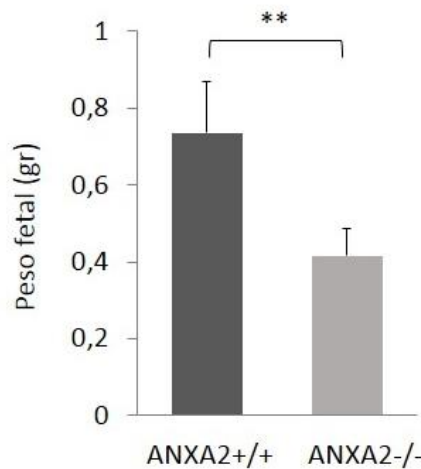


Figura 58. Peso en gramos (gr) del tejido fetal en los ratones ANXA2 +/+ (gris oscuro) y ANXA2 -/- (gris claro) a día embrionario 16 (n=3/grupo). Los ratones hembra gestantes con silenciamiento de ANXA2 presentan fetos significativamente más pequeños que aquellos que no han sido manipulados. Los valores se expresan como media +/- DSM; * P<0.05. Barra de escala 100µm

Como conclusión de este punto de estudio se puede manifestar que la inhibición de anexina A2 en ratones hembra gestantes produce restricción de crecimiento placentario y fetal que recuerda al fenotipo de crecimiento intrauterino restringido humano (CIR) que con frecuencia se asocia a la preeclampsia severa en nuestra raza.

5.3. Características relacionadas con la placentación.

Se investiga ahora el posible efecto del silenciamiento de anexina A2 sobre la placentación en roedores, posteriormente a la implantación. Para llevar a cabo este estudio se sacrifican 6 ratones hembra ANXA2^{-/-} y ANXA2^{+/+} gestantes en el día embrionario 16 y observa detalladamente el sitio de implantación, primero el efecto sobre el propio tejido mediante un análisis histológico de la zona con tinción hematoxilina-eosina y posteriormente el efecto sobre la vascularización local placentaria utilizando inmunofluorescencia.

El examen tisular a nivel histológico utilizando la tinción con hematoxilina- eosina procedente del útero de las hembras de ratón ANXA2^{-/-} revela una profunda degradación del tejido placentario y la formación de abundantes vacuolas intercelulares en comparación con la imagen histológica placentaria procedente de los ratones ANXA2^{+/+}, siendo todo ello signo de destrucción epitelial a nivel de la interfaz materno-fetal (figura 59).

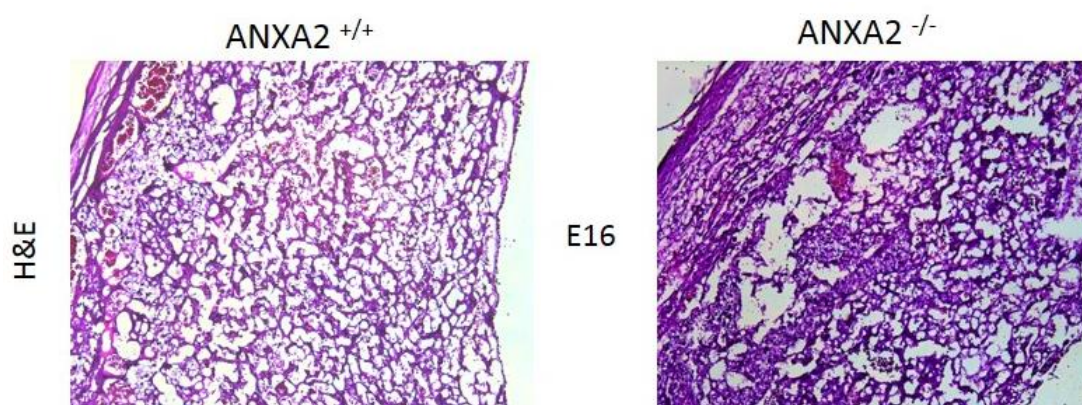


Figura 59. Tinción con hematoxilina- eosina (H&E) de secciones a través del sitio de implantación de ratones ANXA2^{+/+} y ANXA2^{-/-} que muestran la estructura de la interfaz materno-fetal en ambos grupos. Los ratones ANXA2^{-/-} presentan mayor cantidad de necrosis y deterioro vacuolar, ambos signos de degradación tisular local.

Como se ha mencionado anteriormente, para el estudio de la posible afectación del silenciamiento de ANXA2 sobre la vascularización placentaria se utiliza la técnica de inmunofluorescencia con anticuerpos anti-CD31 y anti-factor de Von Willebrand (FvW) dirigidos hacia la interfaz materno-fetal de ratones hembra ANXA2^{-/-} gestantes sacrificados en día embrionario 16.

CD31 es una proteína transmembrana presente en las células endoteliales e implicada en la unión entre ellas y con linfocitos. Se expresa en todos los endotelios continuos como arterias, arteriolas, vénulas, venas o capilares sinusoidales, por lo que considera un marcador de angiogénesis. El factor de Von Willebrand (FvW) es una glicoproteína producida por el endotelio, presente en el flujo sanguíneo, que interviene en la hemostasia primaria junto a la fibronectina permitiendo que las plaquetas se unan de manera estable a la superficie del vaso roto, favoreciendo por tanto la agregación plaquetaria. El déficit de ambos marcadores en el tejido placentario se encuentra presente en mujeres con preeclampsia (Liu, 2015; Uras, 2012).

El estudio de inmunofluorescencia sobre la interfaz materno-fetal de 6 ratones ANXA2^{+/+} y ANXA2^{-/-} en E16 mediante anticuerpos antiCD31 marcados con reactivo de color verde muestra una disminución de inmunorreactividad local muy clara en los ratones con silenciamiento de ANXA2, como demuestra la figura 60. Los núcleos celulares se marcan con el reactante DAPI que los tiñe de color azul.

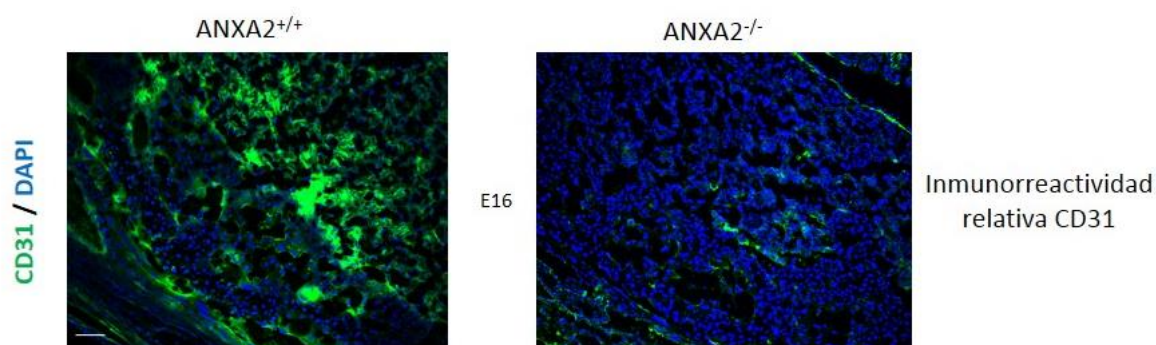


Figura 60. Secciones de interfaz materno-fetal de ratones salvajes (ANXA2^{+/+}) y silenciados para anexina A2 (ANXA2^{-/-}) en día 16 embrionario (E16) a los que se les ha añadido como inmunorreactante el anticuerpo anti CD31 unido a fluorescente alexafluor, en verde (n=6). Los núcleos celulares se tiñen con el reactivo DAPI (azul). Se observa inmunorreactividad marcada antiCD31 en tejido placentario y decidua de los ratones ANXA2^{+/+} mientras que prácticamente es inexistente en el caso de los ratones ANXA2^{-/-}. Barra de escala 100 μ m.

La inmunorreactividad para el FvW muestra resultados similares a las del CD31, es decir, tras aplicar la tinción de inmunofluorescencia a las secciones del sitio de implantación representativos de ratones ANXA2^{+/+} y ANXA2^{-/-} en día embrionario E16, hay una intensa actividad reactiva de los antiFvW sobre la interfaz materno-fetal de los ratones salvajes, representado en color verde, mientras que en el caso de los ratones silenciados para ANXA2, esta es prácticamente inexistente. Estos hallazgos se detallan en la figura 61.

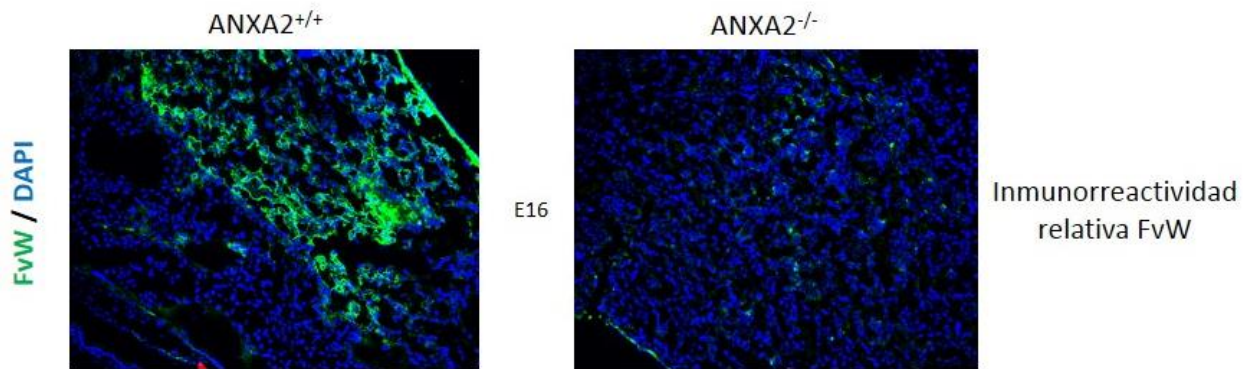


Figura 61. Secciones de interfaz materno-fetal de ratones salvajes (ANXA2^{+/+}) y silenciados para anexina A2 (ANXA2^{-/-}) en día 16 embrionario (E16) a los que se les ha añadido como inmunorreactante el anticuerpo dirigido al factor de Von Willebrand (FvW) unido a fluorescente que permite marcaje en color verde (n=6). Los núcleos celulares se tiñen con el reactivo DAPI plasmado en azul. Se observa inmunorreactividad marcada anti-FvW en tejido placentario y decidua de los ratones ANXA2^{+/+} mientras que prácticamente se muestra ausente en el caso de los ratones ANXA2^{-/-}. Barra de escala 100 μ m.

Por tanto, queda demostrado el modelo in vivo en el ratón de que el silenciamiento de ANXA2 afecta a la decidualización endometrial convirtiéndola en defectuosa, a la placentación, con alteración y limitación de su vascularización local así como al desarrollo feto-placentario produciendo un fenotipo similar al que se observa en el crecimiento intrauterino restringido (CIR), asociado frecuentemente a la preeclampsia severa.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

9. Resistencia a la decidualización in vitro en mujeres con antecedentes de PEs	163
10. Análisis transcripcional de las CEE decidualizadas in vitro procedentes de embarazo con PEs previa	165
11. Expresión reducida de anexina A2 durante la decidualización in vitro en CEE de mujeres con PEs	166
12. Mimetización de la decidualización anómala mediante silenciamiento de ANXA2.....	168
13. Papel in vivo de ANXA2 sobre la decidualización y desarrollo placentario	170
14. Implicaciones clínicas de los resultados	173
15. Implicaciones de los resultados en investigación	175
16. Fortalezas y limitaciones del proyecto de investigación actual	177

DISCUSIÓN

La preeclampsia (PE) supone una de las enfermedades obstétricas actuales con más prevalencia (2%-5%) y complicaciones materno-fetales y neonatales en la práctica clínica habitual, con los consecuentes costes económicos y recursos sanitarios empleados que derivan de su abordaje (Brosens, 2011; Poon, 2019).

En condiciones normales, durante la placentación y posterior desarrollo de la gestación, el flujo sanguíneo del torrente materno que alcanza la interfaz maternofetal y posterior lugar de formación de la placenta está determinado por el tamaño del lecho placentario. Dicha zona uterina en que se desarrolla la placenta presenta una irrigación útero-placentaria determinada por el número de arterias espirales que están en comunicación con el espacio intervelloso, y por la remodelación de estas arterias por parte del trofoblasto invasor.

En la preeclampsia se ha descrito y demostrado un proceso anómalo denominado *teoría de la mala placentación*, que consiste en la existencia de una incorrecta transformación de dichas arterias espirales expresada por una remodelación arterial deficiente a nivel del segmento miometrial superficial implicado, derivado de una invasión incorrecta del citotrofoblasto (CTB) sobre la decidua materna. Este acontecimiento desencadena una mala regulación del flujo sanguíneo útero-placentario con el consecuente desarrollo placentario inadecuado en aquellas mujeres con una predisposición individual al desarrollo de la enfermedad (Menkhorst, 2014). Sin embargo, se ha comprobado que la capacidad de invasión del CTB está muy influenciada por factores paracrinos, siendo la decidua la principal candidata a generar un microambiente que regule dicho fenómeno (Zhou, 2013). Este hallazgo lleva a pensar que puede haber una contribución materna a la etiopatogenia de la PE, incrementando así la atención que hasta ahora se centraba más en el posible origen embrionario.

La finalidad de la tesis doctoral actual es el estudio y conocimiento de la participación materna en la patogenia de la enfermedad, identificando los posibles factores paracrinos endometriales que condicionan la profundidad de invasión trofoblástica considerada hasta ahora como el punto inicial del origen de la enfermedad. Por ello, se ha centrado en el estudio de las células endometriales estromales (CEE) aisladas del endometrio de mujeres con antecedentes de gestación sana y de complicadas con preeclampsia severa (PEs) como material biológico sobre el que se van a utilizar los recursos de laboratorios, ómicos y bioinformáticos para averiguar su función regulando este proceso.

La justificación de utilizar las CEE en estudios ómicos con la finalidad de comprobar la posible contribución materna en la PE se basa en estudios epidemiológicos que han demostrado que el hecho de presentar antecedentes maternos de la enfermedad supone un riesgo 24-243% mayor de desarrollarla, sin que afecte la herencia familiar paterna (Boyd, 2013).

1. Resistencia a la decidualización in vitro en mujeres con antecedentes de PEs

La primera parte del proyecto en basa en reproducir in vitro el proceso de la decidualización mediante inducción hormonal de las CEE obtenidas tanto de mujeres con antecedentes de gestación normal como de las que sufrieron PEs, todo ello con la intención de demostrar la hipótesis de que existe una resistencia a la decidualización en este segundo grupo.

Para reproducir in vitro el modelo de decidualización se ha utilizado el protocolo que añade medroxiprogesterona (MPA) y adenosín monofosfato cíclico (AMPc) al medio condicionado de las CEE durante 5 días de cultivo posterior (Brar, 1997). Este diseño supone una herramienta ampliamente utilizada en los estudios de investigación para el análisis de la decidualización in vitro humana, ya que reproduce con mucha cercanía el proceso que ocurre in vivo. Una vez finalizado el tiempo de cultivo se valora los cambios en la morfología celular estudiando la reorganización del citoesqueleto, así como la secreción bioquímica de marcadores conocidos de decidualización humana, como son la prolactina (PRL) y el factor 1 de crecimiento similar a la proteína de unión a la insulina (IGFBP-1) (Ihnatovych, 2009).

El resultado del estudio demuestra una decidualización defectuosa o deficiente en las CEE procedentes de las mujeres con diagnóstico de PEs previa plasmado por la ausencia de la estructura fenotípica característica de célula decidualizada, quedando por tanto células fusiformes con núcleos elongados de aspecto fusiforme, así como una escasa concentración de PRL e IGFBP-1 en el medio tras los 5 días de cultivo. En contraste con lo que ocurre durante un proceso de decidualización exitoso donde las células alcanzan un aspecto morfológico característico por su aspecto redondeado y agrandado, y se caracterizan por la notable secreción de moléculas tales como PRL e IGFBP-1, que son claves en dicho proceso.

La decidualización es un proceso dinámico de transformación de las CEE con la finalidad de regular y a su vez limitar, el impacto de la invasión del trofoblasto (TFB). Los defectos de este proceso se han asociado a efectos adversos gestacionales como crecimiento intrauterino restringido (CIR), rotura prematura de membranas pretérmino, parto prematuro o preeclampsia, como ya demostraron estudios anteriores (Cha, 2012).

El control de la invasión trofoblástica por las CEE decidualizadas es una función ya conocida, dado que dichas células transformadas suponen una fuente de citoquinas y factores de crecimiento necesarios para una correcta invasión embrionaria (Finn, 1997). Por tanto, ante una decidualización defectuosa, el CTB no es capaz de realizar una correcta placentación con invasión en profundidad de la decidua, dado que no se encuentra con un ambiente paracrino

adecuado para ese fin. Por lo tanto, la decidualización fallida restringe la profundidad de la invasión del CTB, pero no evita totalmente su avance debido a la naturaleza altamente invasiva de esta población celular (Fisher, 1989), como muestra la implantación embrionaria en lugares ectópicos, de forma que el embarazo se mantiene pero termina en PE. La rotura del hasta ahora establecido y necesario binomio embrión-decidua, abre paso a la hipótesis de que la contribución materna a la etiopatogenia de la PEs pudiera ser el primer escalón en la cadena de acontecimientos que llevan al desarrollo de los signos y síntomas de la enfermedad.

No obstante esta suposición no puede darse por establecida ya que, basándose en datos epidemiológicos, existen mujeres con antecedentes de PEs que desarrollan gestaciones posteriores de curso normal y otras con antecedentes de partos normales que debutan con fenotipo de enfermedad severa en el embarazo, siempre manteniendo la misma pareja sexual. Estos hechos hacen pensar que todavía quedan sucesos etiológicos desconocidos que hacen susceptible o resistente al endometrio a las alteraciones de la decidualización.

En el caso de las mujeres que desarrollan PEs teniendo antecedentes de gestaciones normales, se especula que un posible origen del inicio de esta enfermedad se deba a la edad materna en que se inicia la gestación como causa primaria, debido a un deterioro de los fibroblastos citoesqueléticos en su capacidad para decidualizar o bien de forma secundaria a una cesárea previa (Cho, 2015) u obesidad (Boghossian, 2014). Otra posible explicación al desarrollo de PEs en mujeres con antecedentes de gestaciones de curso normal ha sido la teoría inmunológica. Se ha descrito que la exposición a antígenos (Ag) paternos diferentes supone un factor de riesgo para el desarrollo de PEs en múltiparas, cifrando este riesgo en 2,75 (RR: 2,75, IC 95% [1,33-5,68] (Bandoli, 2013). En el presente estudio esta teoría no sirve para explicar el hallazgo dado que todas las gestaciones complicadas con PEs seleccionadas proceden del mismo progenitor que las anteriores o sucesivas.

En el caso de las mujeres que ya han desarrollado PEs en embarazos anteriores y vuelven a gestar está documentado que las gestaciones sucesivas son, con más frecuencia, embarazos de curso normal aunque están documentadas tasas de recurrencia de PEs de hasta el 65% (Sibai, 1991). Este suceso podría deberse a que algunas mujeres, tras el parto que aconteció con PEs, podrían regenerar un endometrio más normal durante la remodelación extensa endometrial que se produce una vez superado el alumbramiento y, por tanto, podrían ser embarazos candidatos a estar asociados con una placentación defectuosa en lugar de una decidualización anómala.

2. Análisis transcripcional de las CEE decidualizadas in vitro procedentes de embarazo con PEs previa

La segunda parte del proyecto de investigación basada en el estudio del perfil transcripcional global de las células endometriales estromales (CEE) procedentes de mujeres con antecedentes de PEs antes y después de la decidualización y sus diferencias de expresión respecto a los controles normales, muestra resultados concordantes con la hipótesis de trabajo que atribuye una contribución materna a la patología de la PEs mediante una resistencia a la decidualización de dichas células.

Previamente a la inducción de la decidualización in vitro, los resultados del análisis de microarrays muestran transcriptomas de las CEE casi idénticos cuando se comparan células procedentes de mujeres con embarazo previo sano o afectado con PEs. Sin embargo, tras 5 días de cultivo con inductores de la decidualización, las CEE del grupo PEs muestran un transcriptoma inerte, es decir, no se identifica ningún gen diferencialmente expresado al comparar la situación previa y posterior a decidualizar, lo que se traduce en una ausencia de diferenciación celular.

El perfil transcripcional global identifica 129 genes diferencialmente expresados (GDE) entre CEE decidualizadas procedentes de embarazo previo afectado con PEs comparado con embarazo previo sano. Llamativamente, el 20% (22 de 129) de estos genes están regulados inversamente en la situación de gestación normal comparada con lo que ocurre en el caso de PEs, sugiriendo que estos genes desempeñan funciones en rutas biológicas que juegan un papel importante para el desarrollo de una decidualización normal. Algunas de estas rutas en las que están implicados dichos genes son la respuesta al oxígeno y a la inflamación, respuesta a heridas, organización de la estructura extracelular, el desarrollo de tejidos, la transición mesenquimal y la motilidad celular.

Los hallazgos de análisis de microarrays muestran una decidualización deficiente que no solo es evidente durante la gestación complicada con PEs sino que persiste durante años. Estos resultados desafían el concepto de que la PEs es un trastorno de los primeros embarazos y podrían reforzar la teoría planteada en el punto anterior de porqué las mujeres con antecedentes de PEs son más propensas a una recurrencia posterior aunque queda por determinar si este defecto de decidualización traducido a nivel transcriptómico es heredado y/o heredable a generaciones futuras.

3. Expresión reducida de ANXA2 durante la decidualización in vitro en CEE de mujeres con PEs

Anexina A2 (ANXA2), presente en la mayoría de tipos celulares, es una proteína de unión a fosfolípidos regulada por calcio cuya concentración aumenta de manera significativa durante la fase secretora media y tardía del ciclo menstrual humano. En la actualidad se ha demostrado que la ANXA2 es la clave para la adquisición de la receptividad regulada por el epitelio endometrial modulado por la reorganización de los filamentos de actina, durante el periodo ventana de implantación (Garrido-Gómez, 2012).

ANXA2 tiene un papel esencial en la modulación del citoesqueleto de actina, encargándose de funciones dinámicas de la membrana plasmática como la motilidad y propagación celular o el cierre de heridas (Hayes, 2006; Babbitt, 2007). Además, participa en procesos secretores, liberación de prolactina y la formación de prostaglandinas (Sun, 1996). La vinculación de ANXA2 a la ruta RhoA / ROCK le permite regular la adhesión celular, la migración de células epiteliales y el crecimiento de trofoblasto (Garrido-Gómez, 2012). El complejo ANXA2 / S100A10 tiene un papel importante en la interacción célula-célula, el transporte y secreción intracelular y la regulación de las proteasas de la superficie celular, lo que implica que puede contribuir en la placentación y la remodelación vascular en diferentes partes de la placenta (Abd El-Aleem, 2018).

Dada la importancia de ANXA2 en la remodelación de los filamentos de actina y la regulación de los procesos intracelulares y secretores, que son la base del proceso de decidualización de las CEE (Dunn, 2003), una parte del estudio actual va destinada a conocer la función de esta proteína en las CEE de embarazos afectados con una PEs previa durante la decidualización in vitro, así como el efecto que produce su silenciamiento sobre este proceso biológico de transformación celular.

Otros alegatos a favor de la relación entre ANXA2 y la alteración de la decidualización endometrial humana que se observa en la PEs están relacionados con el proceso de fibrinólisis, cuya disminución es característica de esta enfermedad y de otros síndromes no obstétricos como el síndrome antifosfolípido, muy asociado con la esterilidad, abortos de repetición y muertes fetales intraútero (Ling, 2004). ANXA2 actúa como co-receptor y activador tisular del plasminógeno, generando un incremento de plasmina en la superficie celular que activa la fibrinólisis (Bharadwaj, 2013).

Además, se han detectado altos niveles de anticuerpos anti-ANXA2 en suero (Salle, 2016) y en placentas (Cesarman-Maus, 2006) procedentes de gestaciones con PE, tejido en el que también se ha demostrado una menor expresión de ARNm de ANXA2 (Xin, 2012). Estos datos apuntan a que ANXA2 juega un posible papel importante en los mecanismos tromboticos placentarios y la enfermedad vascular característica de la PEs. Por todo ello, es razonable suponer que la deficiencia de ANXA2 en humanos es fisiopatológica en PE.

El análisis transcriptómico identifica el gen ANXA2 incluido dentro de los 129 GDE, encontrando su infraexpresión en las CEE decidualizadas (CEE_d) procedentes del grupo PEs en comparación con los resultados de dichas células en el grupo de mujeres con embarazos previos normales. Para verificar la infraexpresión del gen de ANXA2 en el estudio de microarrays se realiza una RT-PCR que plasma en sus resultados una baja regulación significativa de este gen en las CEE decidualizadas in vitro procedentes de mujeres con antecedentes de PEs.

El objetivo del estudio ha sido conocer la relación existente entre ANXA2 y la resistencia a la decidualización que presentan las mujeres con PEs. Se realiza una cuantificación intracelular de la proteína ANXA2 in vitro antes y después de inducir a las CEE a decidualizarse mediante la adición de MPA y AMPc con posterior cultivo durante 5 días, usando para ello la técnica ELISA. En las muestras control se observa un incremento de la proteína en las CEE decidualizadas respecto a las CEE basales, dato que ya se esperaba obtener por estar documentado en estudios previos de decidualización in vitro humana (Garrido-Gómez, 2011). Sin embargo, la cuantificación de ANXA2 en las CEE del grupo PEs exhibe una marcada infraexpresión de la proteína, tanto antes como después de inducir la decidualización, de hecho ambos niveles son prácticamente idénticos. Resulta llamativo y destacable que las CEE procedentes del grupo PEs sin decidualizar ya presentan concentraciones más disminuidas de la proteína respecto a las CEE del grupo control con gestaciones de curso normal.

Estos datos corroboran los resultados transcriptómicos, por lo que queda demostrado que la disminución de la expresión de ANXA2 en las CEE supone una alteración en su proceso de decidualización. Aunque no se puede asegurar que sea la única molécula implicada en este proceso, ANXA2 podría suponer un biomarcador predictivo de una decidualización anómala en pacientes con PEs.

4. Mimetización de la decidualización anómala mediante el silenciamiento de ANXA2

Dado que hasta la fecha el proceso por el cual ANXA2 interviene en la decidualización endometrial humana es desconocido, se pretende averiguar el papel mecanicista que ejerce esta proteína sobre el proceso biológico.

Para ello se utiliza un silenciamiento genético del ARN mensajero (ARNm) ANXA2 mediante ARN pequeño de interferencia o de silenciamiento (ARNi) formada por una secuencia de ARNm complementaria, específica y opuesta a la del ARN mensajero de ANXA2, de forma que la unión de ambas cadenas resulta en un bloqueo específico de la secuencia de ARNm de este gen y por lo tanto, en la formación de la proteína y desarrollo de sus funciones. Esta intervención se realiza con el objetivo de suprimir al máximo la expresión de esta proteína en las CEE de muestras sanas y de PEs, para valorar si modifica el desarrollo de una correcta decidualización in vitro de las CEE, conociendo la gran importancia de esta proteína para el desarrollo del proceso de decidualización.

Cuando estas CEE silenciadas para ANXA2 se someten al proceso de inducción in vitro de decidualización y se comparan con células control que no han sido manipuladas con ARNi, o se han utilizado ARNi no específicos que no inducen a silenciamiento de ningún gen concreto, usado como control interno de la técnica, se muestra como las CEE silenciadas para ANXA2 no son capaces de expresar el gen ni la proteína ANXA2 intracelularmente, validado mediante RT-PCR y ELISA, ni tampoco de llevar a cabo los cambios morfológicos y bioquímicos celulares característicos del proceso de decidualización. Con más detalle, las CEE silenciadas para ANXA2, tras ser sometidas al estímulo hormonal de decidualización, no son capaces de transformar su estructura fusiforme en poligonal ni de secretar PRL e IGFBP-1 al medio. Además, para valorar la polimerización de los filamentos de actina, proceso necesario para un adecuado cambio morfológico celular, se analiza la relación entre la actina globular monomérica libre en el citosol, la actina filamentosa incorporada en el citoesqueleto y la actina total (esta última como control interno) utilizando la técnica Western Blot y se evidencia como las CEE silenciadas con ARNi ANXA2 muestran un desbalance en esta relación a favor de la actina globular citosólica libre respecto a los controles.

Obtenidos estos resultados tras el silenciamiento de la expresión de ANXA2 se confirma la participación de esta proteína en el proceso de decidualización humano y se abre la hipótesis a que su intervención en esta transformación celular se deba sobretodo al importante papel que desarrolla en la reorganización del citoesqueleto celular durante el proceso de la

decidualización, aunque no se puede asociar su mecanismo de acción exclusivamente a esta función ya que está demostrado su participación en procesos de secreción de PRL o modificación de la actividad fibrinolítica, ambos presentes en el desarrollo de PEs.

5. Papel in vivo de ANXA2 sobre la deciduación y desarrollo placentario

Una vez demostrada la aparición de una resistencia a la deciduación in vitro como factor patogénico de la PEs que además se mantiene años después de la resolución de la enfermedad, y la contribución de ANXA2 en el desarrollo de dicha resistencia cuando su expresión y por tanto sus niveles proteicos se alteran in vitro, se plantea como siguiente paso a estudio en este proyecto si estos efectos sobre este proceso también se reproducen cuando se utiliza un modelo in vivo, en este caso el de ratón.

La deciduación espontánea que tiene lugar cada ciclo menstrual independientemente de que haya gestación seguida de la caída súbita de progesterona que produce el desprendimiento del endometrio, es una característica importante en las especies que menstrúan, como la raza humana. Sin embargo el endometrio de mamíferos no menstruantes se deciduiza solo si hay contacto entre un embrión y el útero, es decir, después de la implantación. Por lo tanto, en humanos es la decidua la que controla la concepción y el curso del embarazo mientras que en especies no menstruantes el embrión toma el mando de este proceso, como lo demuestra la implantación tardía en ratones (Das, 1999). Concretamente, en esta raza, la deciduación solo se produce si ha habido fecundación o como consecuencia de una lesión mecánica del tejido (Wang, 2006). El ciclo estral de los ratones hembra dura 4 o 5 días. A partir del quinto día, si ha habido fecundación, la presencia del blastocisto marca el inicio de la deciduación (día embrionario 5 o E5) que se desarrolla aproximadamente en 72 horas, considerándose esta establecida en torno al día embrionario 8 (E8) (Gellersen, 2007).

El experimento se lleva a cabo mediante el uso de ratones Knockout (KO) o nulos, es decir, manipulados para silenciar la expresión de ANXA2 (ANXA2^{-/-}), y ratones control o salvajes (ANXA2^{+/+}) todos ellos cedidos por el laboratorio de Katherine Hajjar (*Weill Cornell Institute, NY*). Se gestan 14 ratones de los cuales 8 se sacrifican en día embrionario E5 y E8 para estudios de deciduación y el resto en día E16 para valorar la placentación. Se hace hincapié en que todos los procedimientos en los que se han empleado animales han obtenido la aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales.

Mediante el estudio de inmunofluorescencia se ha podido demostrar que los niveles de PRL e IGFBP-1 en tejidos deciduales se encuentran claramente disminuidos en los ratones hembra ANXA2^{-/-}, lo que manifiesta un defecto de deciduación in vivo a pesar de que sean fértiles. Estos datos se correlaciona con algunos estudios de deciduación in vitro que hallaron

una disminución de estos biomarcadores en las CEE decidualizadas de sujetos con antecedentes de preeclampsia severa (Garrido-Gómez, 2017).

En la literatura, no se ha encontrado ningún estudio previo que haya evaluado el peso de los fetos procedentes de ratones silenciados para ANXA2. Sin embargo, sí está reportado tamaños o número de ratones de camada normales en este grupo (Ling, 2004). Curiosamente, en el mismo estudio se describe una reducción significativa en el peso del 10-13% en parejas de camadas alimentadas ad libitum desde los 2 meses hasta el primer año de vida. Estos últimos datos concuerdan con los del trabajo actual en el que se halla una reducción significativa del peso fetal, placentario, y del sitio de implantación durante la gestación de los ratones ANXA2^{-/-}, sin encontrar diferencias en el número de lugares de implantación entre los ratones salvajes gestantes y los silenciados para ANXA2. Estos hallazgos demuestran que la ausencia de ANXA2 está relacionada con el crecimiento intrauterino restringido (CIR) y el deterioro de la función placentaria, sugiriendo además, un papel etiológico de esta proteína en la alteración que sufren las CEE durante la decidualización humana de pacientes con PEs, proceso en el que la expresión de ANXA2 se encuentra frecuentemente reducida.

Evaluando ahora el papel in vivo del silenciamiento de ANXA2 sobre la placentación, y de acuerdo con los hallazgos en el tejido placentario obtenido durante el estudio de los ratones ANXA2^{-/-} sacrificados en E16, estos muestran mayor daño placentario así como un desarrollo vascular deteriorado, demostrado mediante la degradación tisular y vacuolización local en los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina y por la disminución de CD31 y Factor de Von Willebrand (FvW) en el análisis de inmunofluorescencia local.

CD31 o también denominado *molécula de adhesión plaquetar y de células endoteliales (PECAM1)* es un marcador de célula endotelial que se localiza en la superficie de estas células y que está implicado en la angiogénesis por lo que se utiliza comúnmente como marcador de agresividad tumoral y su falta de expresión en los tejidos de la decidua y la placenta se ha asociado con PE (Liu, 2015; Uras, 2012). El factor de Von Willebrand (FvW) es una glucoproteína que circula libremente por el torrente sanguíneo y se encarga, junto a la fibronectina de mediar la adhesión y posterior agregación plaquetaria de forma estable al subendotelio de un vaso dañado, por lo que juega un papel primordial en el desarrollo de la hemostasia primaria. Además, en la población sana, sus niveles se correlacionan directamente con el riesgo de trombosis e inversamente con el riesgo de sangrado (Peyvandi, 2011). Ambos marcadores aparecen significativamente reducidos en los lugares de implantación de ratones KO (Anxa2^{-/-}

), sugiriendo una hemostasia defectuosa en la interfaz materno-fetal, característica básica de la preeclampsia (Roberts, 1991; Vinnars, 2011).

Conjuntamente, estos datos sugieren que la ausencia de ANXA2 altera los mecanismos que regulan el proceso de decidualización in vivo, lo que respalda un papel importante de ANXA2 en el desarrollo de la decidualización y la placentación.

6. Implicaciones clínicas de los resultados

Actualmente, la patogenia de la PE sigue siendo incierta y la única arma presumiblemente profiláctica disponible es el ácido acetil salicílico (AAS o aspirina) que, a dosis bajas, ha sugerido ser efectiva en la prevención de la preeclampsia prematura en subgrupos de mujeres candidatas por su historial médico y obstétrico (Roberge, 2017; Wright, 2019). El ensayo *ASPREE*, siglas procedentes en inglés de “*Combined Multimarker Screening and Randomized Patient Treatment with Aspirin for Evidence-Based Preeclampsia Prevention*”, estudio multicéntrico, doble ciego, con intención de tratar, realizado en 1776 mujeres con alto riesgo de PE detectadas en el primer trimestre mediante la presencia de una combinación de biomarcadores y asignadas al azar a recibir aspirina 150mg nocturna o placebo durante las 11-14 semanas de gestación y hasta la semana 36, demostró una reducción sustancial de la tasa de preeclampsia prematura en el grupo del fármaco (aspirina: 1,6% frente a placebo: 4,3%) (Rolnik, 2017).

Respecto a las medidas terapéuticas clínicas disponibles en la actualidad, la única que ha demostrado hasta la fecha ser útil para resolver la PE, sobretudo el subtipo severo, es el alumbramiento o parto de la placenta, pero se podría plantear la eliminación de la decidua durante el periodo de postparto inmediato mediante un legrado uterino ya que, como se ha demostrado en el proyecto actual, el defecto de decidualización en las mujeres con PEs persiste durante años después del debut y resolución de la enfermedad. El legrado postparto ayuda a la resolución de los signos de PEs y disminuye más rápidamente la presión arterial media aumentando también el recuento de plaquetas (Ragab, 2013). Además, esta intervención quirúrgica exagera la disminución de los niveles circulantes de sFlt-1 (Ossada, 2016), biomarcador relacionado mecánicamente con los signos de PEs (Maynard, 2003) y que en el modelo de ratón, su sobreexpresión por las células deciduales reproduce en ellos un síndrome similar a la PE (Fan, 2014).

La atención preconcepcional tiene como objetivo identificar y modificar los factores de riesgo médicos y sociales para optimizar los resultados reproductivos antes del embarazo, tanto para la madre como para el feto. Actualmente no se dispone de ninguna herramienta pregestacional para identificar mujeres que pudieran ser candidatas a padecer PE, sobretudo en el caso de severidad debido a las consecuencias materno-fetales de su aparición.

Los resultados de los análisis realizados en el presente estudio demuestran, no solo una decidualización alterada en mujeres con PEs, sino que este defecto persiste durante años

después de la resolución de la enfermedad. Esta afirmación desafía el concepto de que la PE es una enfermedad principalmente de los primeros embarazos y proporciona una posible explicación al aumento de recurrencias de PE en posteriores gestaciones de mujeres que ya han padecido previamente la enfermedad. Por lo tanto, los datos hallados abren la puerta a nuevos campos de diagnóstico precoz e incluso preventivos ya que podría realizarse una biopsia endometrial pregestacional y en fase secretora a aquellas mujeres con antecedentes o factores de alto riesgo de PE para determinar la presencia de biomarcadores de decidualización como IGFBP-1 y PRL, o bien mediante análisis transcriptómicos podrían basarse en una firma de expresión génica utilizando otros ARNm mal regulados como biomarcadores que permitiría un diagnóstico prospectivo del defecto de decidualización.

La asociación patogénica encontrada entre los niveles de ANXA2 y el defecto de decidualización podrían explicar la invasión superficial decidual por parte del citotrofoblasto debido a que no se encuentra en un entorno materno adecuado para realizar dicha acción, y ello traería como consecuencia la aparición de complicaciones de inicio tardío durante el embarazo, como la PE. Por ello el conocimiento del vínculo mecanicista entre ANXA2 y la resistencia a la decidualización también podría ser de utilidad en el desarrollo de estrategias diagnósticas pregestacionales contra la PE basadas en el uso de ANXA2 como biomarcador de dicha alteración endometrial. Un ejemplo de ello sería la medición de los niveles de esta proteína en el líquido endometrial a las mujeres con riesgo de desarrollar la enfermedad, bien directamente del fluido endometrial o del medio condicionado tras separar células endometriales estromales e inducir las a decidualización *in vitro*. Esta simple prueba podría permitir la evaluación del riesgo pregestacional de desarrollar PEs y abre un nuevo abanico de posibilidades para el avance terapéutico enfocado en mejorar la decidualización.

7. Implicaciones de los resultados en investigación

A partir de los resultados obtenidos en el proyecto de investigación actual mediante el análisis transcriptómico global de las CEE antes y después de la inducción a la decidualización in vitro y las consecuencias sobre estas células de bloquear la expresión de ANXA2 in vitro e in vivo, se puede proponer un nuevo modelo basado en una posible contribución materna a la etiopatogenia de la PEs debido a una decidualización alterada y una placentación anómala como consecuencia, en parte, del déficit de ANXA2. Además la resistencia a la decidualización persiste años después del debut de la patología lo que concuerda con la relación existente entre la PEs y la tasa elevada de recurrencia en gestaciones posteriores, sin haber podido demostrar hasta el momento actual que exista un componente hereditario.

Este modelo planteado puede resultar útil para investigar el riesgo de desarrollar, no solo preeclampsia severa, sino también otras complicaciones gestacionales relacionadas con la resistencia a la decidualización o con una mala placentación, como el crecimiento intrauterino restringido (CIR), abortos de repetición o el parto prematuro. Esta medida podría llevarse a cabo mediante la detección pregestacional de biomarcadores de decidualización como PRL e IGFBP-1 o la propia proteína ANXA2, todas ellas obtenidas directamente en el fluido endometrial con una biopsia durante la fase secretora o del medio de cultivo tras inducir a decidualización in vitro a las CEE de dicha muestra.

Aunque no se haya podido demostrar que la PEs tenga un componente hereditario claro, sí es cierto que los estudios epidemiológicos sugieren dicha contribución materna que se propone en el presente estudio a la etiología de la PE ya que antecedentes maternos de PE incrementan el riesgo de desarrollar este síndrome en 24-243%, hecho que no ocurre si los antecedentes son de origen paterno (Boyd, 2013). Se ha sugerido un vínculo entre la PEs en primigestas y una reducción en las tasas de infertilidad, aunque esta relación no ha podido demostrarse dado que las mujeres que experimentan dicha complicación en el primer embarazo presentan menos posibilidades de intentar otro embarazo, por las secuelas médicas o psicológicas de la enfermedad o por el riesgo de que aparezca una complicación más grave en las sucesivas gestaciones (Hernández-Díaz, 2009). Sin embargo, la asociación entre PEs recurrente y un intervalo intergestacional más largo podría hacer pensar en la existencia de una subfertilidad en este grupo (Cormick, 2016).

Todos estos datos epidemiológicos en torno a la relación entre PEs e infertilidad podrían sugerir el desarrollo de una herramienta diagnóstica prospectiva cuyo objetivo sea la detección

de un defecto de decidualización, no solo sería útil para el descubrimiento de mujeres candidatas al desarrollo de una PE durante el futuro embarazo, sino que esta prueba abriría nuevas líneas de investigación en el campo de la reproducción, por la asociación con dicho defecto de decidualización favoreciendo a un subgrupo de pacientes afectadas por un espectro de trastornos reproductivos que se manifiestan con infertilidad como abortos de repetición o fallos de implantación. Otro grupo de pacientes a las que se les podría valorar el beneficio prospectivo de un posible tratamiento para la infertilidad son aquellas mujeres afectadas de endometriosis que muestran una resistencia a la decidualización subyacente.

Gracias a la tecnología de microarrays utilizada en el presente estudio y los resultados aportados tras el análisis transcriptómico global de las células estromales endometriales antes y después de la decidualización, esta nueva técnica podría basarse en la creación de una firma de expresión génica utilizando como biomarcadores la PRL e IGFBP-1 por ser los más conocidos y asociados a la decidualización, o bien los genes identificados cuya regulación es anómala en PEs hallados en los resultados que se presentan en el estudio actual, tales como *CNR1* o *IL-1B*, entre otros.

Todas estas pruebas de detección precoz propuestas, en el caso de conseguir su creación, podrían abrir nuevas puertas a posibles herramientas de intervención terapéutica que involucrarán tratamientos farmacológicos o intervencionistas cuyo objetivo común sería la restauración de un fenotipo decidual normal pregestacional.

8. Fortalezas y limitaciones del proyecto de investigación actual

El presente estudio demuestra una resistencia a la decidualización in vitro en mujeres con antecedentes de PEs que se mantiene durante años después de la resolución de la enfermedad, así como la implicación mecanicista de la proteína ANXA2 en este defecto decidual y en una consecuente placentación anómala.

Investigaciones anteriores ya habían demostrado las bases del funcionamiento del proceso de decidualización mediante estudios proteómicos y secretómicos (Aghajanova, 2010; Garrido-Gómez, 2011), pero el presente estudio es el primero en demostrar una decidualización deficiente en PEs basado en los resultados del análisis transcriptómico global. Este hallazgo plasma la posibilidad de que dicha resistencia a la decidualización no solo aparezca durante la gestación donde manifiesta la enfermedad, sino que se mantiene durante años en los sucesivos ciclos endometriales por la regulación anómala en la expresión de genes importantes implicados en dicho proceso, abriendo puertas a nuevas líneas de investigación para el desarrollo de estrategias diagnóstico-terapéuticas frente a esta enfermedad.

Este estudio fortalece las nuevas corrientes de investigación en torno a la etiopatogenia de la PEs, demostrando que la contribución materna en el desarrollo de la enfermedad juega un papel importante frente a las clásicas teorías de que el inicio de la enfermedad venía marcado por una invasión superficial del trofoblasto embrionario, el cual también ocurre, pero se postula que es debido al microambiente materno hostil en el que se encuentra cuando pretende invadir la decidua.

Además, los resultados de este estudio no solo contribuyen a mejorar el conocimiento de la etiopatogenia de la PEs sino que también pueden extrapolarse a ampliar la comprensión de otras patologías englobadas dentro de la teoría de una resistencia a la decidualización, como fallos de implantación, infertilidad de origen endometrial o incluso la endometriosis que afecta al endometrio-miometrio, o bien aquellas patologías gestacionales cuya etiopatogenia encajaría con una mala placentación tales como el parto prematuro o el aborto espontáneo.

El conocimiento del funcionamiento de ANXA2 y su expresión génica presenta en la actualidad muchas líneas de investigación abiertas ya que no solo se implica en la etiopatogenia de la PEs sino que su mala regulación está relacionada con procesos reproductivos fisiológicos como la invasión embrionaria, fenómenos patológicos como la endometriosis (Fowler, 2007), o incluso en procesos oncológicos como la invasión y metástasis tisular de las células cancerígenas.

El estudio transcriptómico del endometrio en mujeres con PEs del trabajo actual destaca, entre otros genes con una expresión anómala, el que codifica para la proteína anexina A2 (ANXA2) cuyo bloqueo o silenciamiento ha demostrado estar implicado *in vitro* e *in vivo* con una decidualización endometrial defectuosa y una mala placentación. Este hallazgo ha llevado a plantear la posibilidad de utilizar esta molécula como un biomarcador potencial para el desarrollo de herramientas diagnóstico-terapéuticas enfocadas a conocer de forma prospectiva la aparición de la PEs en mujeres de alto riesgo e incluso prevenirla o tratarla con fármacos que actúen a su nivel de acción, así como también ampliar el uso de este posible nuevo enfoque a otras patologías ya mencionadas que se asocian con la resistencia a la decidualización o una mala placentación de causa endometrial.

Y no solo se ha propuesto ANXA2 como biomarcador de fallo de decidualización, sino que también se ha encontrado útil, a raíz de los resultados obtenidos, la PRL, el IGFBP-1 o incluso cualquier gen cuyo ARNm manifiesta una regulación alterada en el análisis transcriptómico durante la decidualización del endometrio procedente de una PEs previa, ya que permitiría el desarrollo de una firma de expresión génica útil en el diagnóstico prospectivo de dicha enfermedad. De todas formas, el hallazgo de múltiples factores que pueden utilizarse como biomarcadores no permite asegurar con certeza que la alteración en la regulación de ANXA2 sea la única causa que precipite los sucesos que llevan a una decidualización anómala. Hay que tener en cuenta que la firma transcriptómica que se ha visto asociada a la resistencia en la decidualización endometrial no solo mostraba una mala regulación del ARNm ANXA2 sino que implicaba a 129 genes más por lo que cualquiera de ellos podría desencadenar el mismo fenotipo asociado a PEs, e incluso podrían aparecer más vías implicadas en el desencadenamiento de las manifestaciones de la enfermedad que no incluyan la ruta endometrial, por lo que la contribución materna a la PEs podría implicar otros procesos que van más allá de un defecto de decidualización. Resultan necesarias investigaciones adicionales basadas en el fenotipo de una resistencia a la decidualización para llegar a comprender completamente la contribución materna a la etiología de la PEs.

De los estudios *in vitro* realizados tanto para demostrar la resistencia a la decidualización como la implicación de ANXA2 en dicho defecto hay que resaltar la limitación del tamaño muestral para poder extrapolar los resultados a la población general ya que no podría asegurarse una homogeneidad total de los grupos analizados, si bien es cierto que los criterios de inclusión y exclusión están muy bien definidos y se han cumplido en todos los casos. La limitación del tamaño muestral se debe, como se ya se ha descrito ampliamente en el apartado de material y métodos, a la dificultad de reclutar mujeres que cumplan todos los criterios de

inclusión y exclusión y que acepten y soporten la realización de una biopsia endometrial, así como las dificultades aparecidas durante la extracción del material y el traslado y procesamiento de la muestra. A pesar de todo, los resultados obtenidos son muy acordes a los descritos en otras investigaciones similares, que han utilizado mayores tamaños muestrales.

Otro punto a tener en cuenta es que el modelo de inhibición de ANXA2 in vivo para demostrar el efecto decidualización alterada y la placentación anómala, se desarrolla mediante la manipulación génica de roedores, los cuales presentan un ciclo endometrial y de fecundación diferente al de la raza humana. Los ratones hembra no menstrúan y su ciclo estral dura 4-5 días, produciéndose el fenómeno de decidualización sólo si previamente ha habido fecundación, o una agresión mecánica y si esta no se produce la capa decidua se reabsorbe, mientras que la raza humana tiene un ciclo endometrial cíclico mensual, con la inducción a la decidualización endometrial en todos los ciclos, independientemente de si ha habido o no fecundación y se expulsa con la menstruación en caso de que no haya habido implantación embrionaria previa. Por ello, a pesar de que los resultados obtenidos en el modelo in vivo de ratón han demostrado que un déficit de ANXA2 conlleva un defecto de decidualización y una mala placentación aumentando la tasa de fetos y placentas de tamaños más pequeños, estos resultados no pueden extrapolarse directamente y desarrollar herramientas para la detección o tratamiento de la PEs en mujeres afectadas por esta enfermedad u otra patología gestacional en la que se implica un fallo de placentación (CIR, PPT) sin haber realizado investigaciones previas en la raza humana que corroboren estos resultados.

Una vez definidas las fortalezas y limitaciones que presenta el estudio actual, se presenta por tanto un proyecto de investigación cuyos resultados ofrecen un nuevo modelo de posible contribución materna a la etiopatogenia de la preeclampsia severa mediante una resistencia a la decidualización del endometrio humano que presenta un perfil transcriptómico de expresión génica en la que se ven afectados 129 genes implicados en dicho proceso, así como la posibilidad de que ANXA2 pueda colaborar como biomarcador en el desarrollo de nuevas líneas de investigación enfocadas al diagnóstico, tratamiento o prevención de esta enfermedad obstétrica con tanta morbilidad y mortalidad materno-fetal.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Las células endometriales de las mujeres con antecedentes de preeclampsia severa presentan una resistencia a la decidualización, demostrado mediante marcadores bioquímicos y fenotípicos.
- La decidualización deficiente está presente durante meses o incluso años después de una gestación complicada con preeclampsia severa.
- El perfil transcripcional global del endometrio afectado por un antecedente de preeclampsia severa muestra 129 genes diferencialmente expresados respecto al de mujeres con gestaciones previas normales sugiriendo una implicación clave en el proceso de decidualización.
- El gen que codifica para la proteína ANXA2 es uno de los genes que se encuentran afectados en el análisis transcriptómico del endometrio con antecedentes de PEs, cuya expresión se ve reducida durante la decidualización in vitro de las células endometriales de este grupo de pacientes comparado con pacientes con embarazo sano previo
- El bloqueo de la expresión de ANXA2 con ARN de interferencia específico en las células endometriales ha demostrado, in vitro e in vivo, reproducir una resistencia a la decidualización endometrial impidiendo una transformación morfológica y la secreción de biomarcadores como PRL e IGFBP.
- El déficit de ANXA2 in vivo en el modelo de ratón también se asocia con una mala placentación demostrado por una disminución del peso del sitio de implantación, del feto y de la placenta, y con alteraciones vasculares locales del lecho placentario por la disminución de los marcadores CD31 y FvW, ambos participantes en la angiogénesis y la hemostasia primaria respectivamente. Este hallazgo podría estar relacionado con otras enfermedades gestacionales relacionadas con una mala placentación como crecimiento intrauterino restringido, o parto prematuro.
- A pesar de que la etiología de la preeclampsia continúa siendo desconocida en la actualidad, queda demostrado en este estudio el papel central de la participación materna en su etiopatogenia que genera un microambiente hostil para la invasión del trofoblasto embrionario, contribuyendo por tanto al desarrollo de una placentación anómala.

- Se sugiere que la evaluación de ANXA2 a nivel materno puede ser una herramienta para nuevas intervenciones diagnósticas y/o terapéuticas en la preeclampsia, así como el uso de otros biomarcadores como PRL, IGFBP1 o incluso los ARNm de los 129 genes diferencialmente expresados durante la decidualización de pacientes con preeclampsia severa comparado con pacientes con embarazo previo sano. El legrado postparto, con la consecuente eliminación de la decidua también podría contribuir como tratamiento, aunque se desconoce si la regeneración endometrial presentará el mismo defecto, dado que no se ha podido demostrar un componente genético hereditario.
- Se propone una nueva línea de investigación dirigida al desarrollo de una firma de expresión génica asociada a la decidualización defectuosa que acontece en la preeclampsia severa y que pudiera ser detectada mediante un análisis de una biopsia endometrial, o en la situación más idónea, mediante un análisis sanguíneo en población considerada de alto riesgo, antes del ciclo de concepción de un embarazo que desarrollará en un futuro la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

Abalos, E., Cuesta, C., Grosso, A. L., Chou, D., & Say, L. (2013). Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: A systematic review. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 170(1), 1-7

Abd El-Aleem, S. A., & Dekker, L. V. (2018). Assessment of the cellular localisation of the annexin A2/S100A10 complex in human placenta. *Journal of Molecular Histology*, 49(5), 531-543.

Aghajanova, L., Hamilton, A. E., & Giudice, L. C. (2008). Uterine receptivity to human embryonic implantation: Histology, biomarkers, and transcriptomics. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19(2), 204-211.

Al-Nasiry, S., Vercruyse, L., Hanssens, M., Luyten, C., & Pijnenborg, R. (2009). Interstitial trophoblastic cell fusion and E-cadherin immunostaining in the placental bed of normal and hypertensive pregnancies. *Placenta*, 30(8), 719-725.

Al-Safi, Z., Imudia, A. N., Filetti, L. C., Hobson, D. T., Bahado-Singh, R. O., & Awonuga, A. O. (2011). Delayed postpartum preeclampsia and eclampsia: Demographics, clinical course, and complications. *Obstetrics and Gynecology*, 118(5), 1102-1107.

American College of Obstetricians and Gynecologists, & Task Force on Hypertension in Pregnancy. (2013). Hypertension in pregnancy. Report of the american college of obstetricians and gynecologists' task force on hypertension in pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*, 122(5), 1122-1131.

Ananth, C. V., Keyes, K. M., & Wapner, R. J. (2013). Pre-eclampsia rates in the united states, 1980-2010: Age-period-cohort analysis. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 347, f6564.

Aplin, J. D. (2000). Hypoxia and human placental development. *The Journal of Clinical Investigation*, 105(5), 559-560.

Babbin, B. A., Parkos, C. A., Mandell, K. J., Winfree, L. M., Laur, O., Ivanov, A. I., & Nusrat, A. (2007). Annexin 2 regulates intestinal epithelial cell spreading and wound closure through rho-related signaling. *The American Journal of Pathology*, 170(3), 951-966.

Ball, E., Bulmer, J. N., Ayis, S., Lyall, F., & Robson, S. C. (2006). Late sporadic miscarriage is associated with abnormalities in spiral artery transformation and trophoblast invasion. *The Journal of Pathology*, *208*(4), 535-542.

Bandoli, G., Lindsay, S., Johnson, D. L., Kao, K., Luo, Y., & Chambers, C. D. (2012). Change in paternity and select perinatal outcomes: Causal or confounded? *Journal of Obstetrics and Gynaecology: The Journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*, *32*(7), 657-662.

Barker, D. J., Lampl, M., Roseboom, T., & Winder, N. (2012). Resource allocation in utero and health in later life. *Placenta*, *33 Suppl 2*, e30-4.

Bartsch, E., Medcalf, K. E., Park, A. L., Ray, J. G., & High Risk of Pre-eclampsia Identification Group. (2016). Clinical risk factors for pre-eclampsia determined in early pregnancy: Systematic review and meta-analysis of large cohort studies. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *353*, i1753.

Bdolah, Y., Lam, C., Rajakumar, A., Shivalingappa, V., Mutter, W., Sachs, B., Karumanchi, S. A. (2008). Twin pregnancy and the risk of preeclampsia: Bigger placenta or relative ischemia? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *198*(4), 428.e1-428.e6.

Bellamy, L., Casas, J. P., Hingorani, A. D., & Williams, D. J. (2007). Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: Systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *335*(7627), 974.

Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., & Golani, I. (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behavioural Brain Research*, *125*(1-2), 279-284.

Berti, C., Cetin, I., Agostoni, C., Desoye, G., Devlieger, R., Emmett, P., Koletzko, B. (2016). Pregnancy and infants' outcome: Nutritional and metabolic implications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*(1), 82-91.

Beyerlein, A., Schiessl, B., Lack, N., & von Kries, R. (2009). Optimal gestational weight gain ranges for the avoidance of adverse birth weight outcomes: A novel approach. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *90*(6), 1552-1558.

Bharadwaj, A., Bydoun, M., Holloway, R., & Waisman, D. (2013). Annexin A2 heterotetramer: Structure and function. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(3), 6259-6305.

Boghossian, N. S., Yeung, E., Mendola, P., Hinkle, S. N., Laughon, S. K., Zhang, C., & Albert, P. S. (2014). Risk factors differ between recurrent and incident preeclampsia: A hospital-based cohort study. *Annals of Epidemiology*, 24(12), 871-7e3.

Bokslag, A., van Weissenbruch, M., Mol, B. W., & de Groot, C. J. (2016). Preeclampsia; short and long-term consequences for mother and neonate. *Early Human Development*, 102, 47-50.

Boyd, H. A., Tahir, H., Wohlfahrt, J., & Melbye, M. (2013). Associations of personal and family preeclampsia history with the risk of early-, intermediate- and late-onset preeclampsia. *American Journal of Epidemiology*, 178(11), 1611-1619.

Brar, A. K., Frank, G. R., Kessler, C. A., Cedars, M. I., & Handwerger, S. (1997). Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. *Endocrine*, 6(3), 301-307.

Brosens, I., Pijnenborg, R., Vercruyse, L., & Romero, R. (2011). The "great obstetrical syndromes" are associated with disorders of deep placentation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 204(3), 193-201.

Brown, M. A., Magee, L. A., Kenny, L. C., Karumanchi, S. A., McCarthy, F. P., Saito, S. International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). (2018). Hypertensive disorders of pregnancy: ISSHP classification, diagnosis, and management recommendations for international practice. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 72(1), 24-43

Bulmer, J. N., & Lash, G. E. (2005). Human uterine natural killer cells: A reappraisal. *Molecular Immunology*, 42(4), 511-521.

Burke, S. D., Zsengeller, Z. K., Khankin, E. V., Lo, A. S., Rajakumar, A., DuPont, J. Karumanchi, S. A. (2016). Soluble fms-like tyrosine kinase 1 promotes angiotensin II sensitivity in preeclampsia. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(7), 2561-2574.

Burton, G. J. (2009). Oxygen, the janus gas; its effects on human placental development and function. *Journal of Anatomy*, 215(1), 27-35.

Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25(3), 287-299.

Cadavid, A. P. (2017). Aspirin: The mechanism of action revisited in the context of pregnancy complications. *Frontiers in Immunology*, *8*, 261.

Cao, T. C., Thirkill, T. L., Wells, M., Barakat, A. I., & Douglas, G. C. (2008). Trophoblasts and shear stress induce an asymmetric distribution of icam-1 in uterine endothelial cells. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, *59*(2), 167-181.

Carson, D. D., Bagchi, I., Dey, S. K., Enders, A. C., Fazleabas, A. T., Lessey, B. A., & Yoshinaga, K. (2000). Embryo implantation. *Developmental Biology*, *223*(2), 217-237.

Cassell, K. A., O'connell, C. M., & Baskett, T. F. (2004). The origins and outcomes of triplet and quadruplet pregnancies in nova scotia: 1980 to 2001. *American Journal of Perinatology*, *21*(8), 439-445.

Cesarman-Maus, G., Rios-Luna, N. P., Deora, A. B., Huang, B., Villa, R., Cravioto Mdel, C., Hajjar, K. A. (2006). Autoantibodies against the fibrinolytic receptor, annexin 2, in antiphospholipid syndrome. *Blood*, *107*(11), 4375-4382.

Cha, J., Sun, X., & Dey, S. K. (2012). Mechanisms of implantation: Strategies for successful pregnancy. *Nature Medicine*, *18*(12), 1754-1767.

Chaiworapongsa, T., Romero, R., Espinoza, J., Bujold, E., Mee Kim, Y., Goncalves, L. Edwin, S. (2004). Evidence supporting a role for blockade of the vascular endothelial growth factor system in the pathophysiology of preeclampsia. Young investigator award. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *190*(6), 1541-7; discussion 1547-50.

Chakraborty, C., Gleeson, L. M., McKinnon, T., & Lala, P. K. (2002). Regulation of human trophoblast migration and invasiveness. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *80*(2), 116-124.

Cho, G. J., Kim, L. Y., Min, K. J., Sung, Y. N., Hong, S. C., Oh, M. J., Kim, H. J. (2015). Prior cesarean section is associated with increased preeclampsia risk in a subsequent pregnancy. *BMC Pregnancy and Childbirth*, *15*, 24-015-0447-x.

Crossen, J. S., ter Riet, G., Mol, B. W., van der Post, J. A., Leeflang, M. M., Meads, C. A., Khan, K. S. (2009). Are tests for predicting pre-eclampsia good enough to make screening viable? A

review of reviews and critical appraisal. *Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica*, 88(7), 758-765.

Coelho, T. M., Sass, N., Camano, L., Moron, A. F., Mattar, R., Stavale, J. Nogueira Neto, J. (2006). Microvessel density in the placental bed among preeclampsia patients. *Sao Paulo Medical Journal = Revista Paulista De Medicina*, 124(2), 96-100.

Committee opinion no. 638: First-trimester risk assessment for early-onset preeclampsia. (2015). *Obstetrics and Gynecology*, 126(3), e25-7.

Coomarasamy, A., Honest, H., Papaioannou, S., Gee, H., & Khan, K. S. (2003). Aspirin for prevention of preeclampsia in women with historical risk factors: A systematic review. *Obstetrics and Gynecology*, 101(6), 1319-1332.

Cormick, G., Betran, A. P., Ciapponi, A., Hall, D. R., Hofmeyr, G. J., & calcium and Pre-eclampsia Study Group. (2016). Inter-pregnancy interval and risk of recurrent pre-eclampsia: Systematic review and meta-analysis. *Reproductive Health*, 13(1), 83-016-0197-x.

Craven, C. M., Morgan, T., & Ward, K. (1998). Decidual spiral artery remodelling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts. *Placenta*, 19(4), 241-252.

Cunningham, F. G., & Lindheimer, M. D. (1992). Hypertension in pregnancy. *The New England Journal of Medicine*, 326(14), 927-932.

Das, S. K., Lim, H., Paria, B. C., & Dey, S. K. (1999). Cyclin D3 in the mouse uterus is associated with the decidualization process during early pregnancy. *Journal of Molecular Endocrinology*, 22(1), 91-101.

Dassah, M., Almeida, D., Hahn, R., Bonaldo, P., Worgall, S., & Hajjar, K. A. (2014). Annexin A2 mediates secretion of collagen VI, pulmonary elasticity and apoptosis of bronchial epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 127(Pt 4), 828-844.

Degner, K., Magness, R. R., & Shah, D. M. (2017). Establishment of the human uteroplacental circulation: A historical perspective. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 24(5), 753-761.

Dekker, G. A., & Sibai, B. M. (1998). Etiology and pathogenesis of preeclampsia: Current concepts. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 179(5), 1359-1375.

Dey, S. K., Lim, H., Das, S. K., Reese, J., Paria, B. C., Daikoku, T., & Wang, H. (2004). Molecular cues to implantation. *Endocrine Reviews*, *25*(3), 341-373.

Dimitriadis, E., Robb, L., Liu, Y. X., Enders, A. C., Martin, H., Stoikos, C., Salamonsen, L. A. (2003). IL-11 and IL-11R α immunolocalisation at primate implantation sites supports a role for IL-11 in placentation and fetal development. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, *1*, 34.

Dominguez, F., Garrido-Gomez, T., Lopez, J. A., Camafeita, E., Quinonero, A., Pellicer, A., & Simon, C. (2009). Proteomic analysis of the human receptive versus non-receptive endometrium using differential in-gel electrophoresis and MALDI-MS unveils stathmin 1 and annexin A2 as differentially regulated. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *24*(10), 2607-2617.

Dong, Z., Yao, M., Zhang, H., Wang, L., Huang, H., Yan, Yao, D. (2014). Inhibition of annexin A2 gene transcription is a promising molecular target for hepatoma cell proliferation and metastasis. *Oncology Letters*, *7*(1), 28-34.

Duley, L. (2009). The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Seminars in Perinatology*, *33*(3), 130-137.

Dunn, C. L., Kelly, R. W., & Critchley, H. O. (2003). Decidualization of the human endometrial stromal cell: An enigmatic transformation. *Reproductive Biomedicine Online*, *7*(2), 151-161.

Dvorak, H. F. (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *20*(21), 4368-4380.

Fan, X., Rai, A., Kambham, N., Sung, J. F., Singh, N., Petitt, Nayak, N. R. (2014). Endometrial VEGF induces placental sFLT1 and leads to pregnancy complications. *The Journal of Clinical Investigation*, *124*(11), 4941-4952.

Figueras, F., & Gardosi, J. (2011). Intrauterine growth restriction: New concepts in antenatal surveillance, diagnosis, and management. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *204*(4), 288-300.

Finn, C. A., & Martin, L. (1974). The control of implantation. *Journal of Reproduction and Fertility*, *39*(1), 195-206.

Fisher, S. J. (2015). Why is placentation abnormal in preeclampsia? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 213(4 Suppl), S115-22. doi:10.1016/j.ajog.2015.08.042 [doi]

Fisher, S. J., Cui, T. Y., Zhang, L., Hartman, L., Grahl, K., Zhang, G., Damsky, C. H. (1989). Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells in vitro. *The Journal of Cell Biology*, 109(2), 891-902.

Fowler, P. A., Tattum, J., Bhattacharya, S., Klonisch, T., Hombach-Klonisch, S., Gazvani, Cash, P. (2007). An investigation of the effects of endometriosis on the proteome of human eutopic endometrium: A heterogeneous tissue with a complex disease. *Proteomics*, 7(1), 130-142.

Fox, A., McHugh, S., Browne, J., Kenny, L. C., Fitzgerald, A., Khashan, A., Kearney, P. M. (2017). Estimating the cost of preeclampsia in the healthcare system: Cross-sectional study using data from SCOPE study (screening for pregnancy end points). *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 70(6), 1243-1249.

Franz, M. B., Andreas, M., Schiessl, B., Zeisler, H., Neubauer, A., Kastl, S. Gottsauner-Wolf, M. (2009). NT-proBNP is increased in healthy pregnancies compared to non-pregnant controls. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*, 88(2), 234-237.

Franz, M. B., Lack, N., Schiessl, B., Mylonas, I., Friese, K., & Kainer, F. (2009). Stillbirth following previous cesarean section in Bavaria/Germany 1987-2005. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 279(1), 29-36.

Garrido-Gomez, T., Dominguez, F., Lopez, J. A., Camafeita, E., Quinonero, A., Martinez-Conejero, J. Simon, C. (2011). Modeling human endometrial decidualization from the interaction between proteome and secretome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(3), 706-716.

Garrido-Gomez, T., Dominguez, F., Quinonero, A., Diaz-Gimeno, P., Kapidzic, M., Gormley, Simon, C. (2017). Defective decidualization during and after severe preeclampsia reveals a possible maternal contribution to the etiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(40), E8468-E8477.

Garrido-Gomez, T., Dominguez, F., Quinonero, A., Estella, C., Vilella, F., Pellicer, A., & Simon, C. (2012). Annexin A2 is critical for embryo adhesiveness to the human endometrium by RhoA activation through F-actin regulation. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(9), 3715-3727.

Garrido-Gomez, T., Ruiz-Alonso, M., Blesa, D., Diaz-Gimeno, P., Vilella, F., & Simon, C. (2013). Profiling the gene signature of endometrial receptivity: Clinical results. *Fertility and Sterility*, *99*(4), 1078-1085.

Gaugler-Senden, I. P., Berends, A. L., de Groot, C. J., & Steegers, E. A. (2008). Severe, very early onset preeclampsia: Subsequent pregnancies and future parental cardiovascular health. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, *140*(2), 171-177.

Gellersen, B., Brosens, I. A., & Brosens, J. J. (2007). Decidualization of the human endometrium: Mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Seminars in Reproductive Medicine*, *25*(6), 445-453.

Gellersen, B., & Brosens, J. (2003). Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: A decidualizing affair. *The Journal of Endocrinology*, *178*(3), 357-372.

Gellersen, B., & Brosens, J. J. (2014). Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocrine Reviews*, *35*(6), 851-905.

Gellersen, B., Reimann, K., Samalecos, A., Aupers, S., & Bamberger, A. M. (2010). Invasiveness of human endometrial stromal cells is promoted by decidualization and by trophoblast-derived signals. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *25*(4), 862-873.

Ghulmiyyah, L., & Sibai, B. (2012). Maternal mortality from preeclampsia/eclampsia. *Seminars in Perinatology*, *36*(1), 56-59.

Gormley, M., Ona, K., Kapidzic, M., Garrido-Gomez, T., Zdravkovic, T., & Fisher, S. J. (2017). Preeclampsia: Novel insights from global RNA profiling of trophoblast subpopulations. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *217*(2), 200.e1-200.e17.

Granger, J. P., Alexander, B. T., Bennett, W. A., & Khalil, R. A. (2001). Pathophysiology of pregnancy-induced hypertension. *American Journal of Hypertension*, *14*(6 Pt 2), 178S-185S.

Hansen, M. D., Ehrlich, J. S., & Nelson, W. J. (2002). Molecular mechanism for orienting membrane and actin dynamics to nascent cell-cell contacts in epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(47), 45371-45376.

Hartley, J. D., Ferguson, B. J., & Moffett, A. (2015). The role of shed placental DNA in the systemic inflammatory syndrome of preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *213*(3), 268-277.

Hayes, M. J., Shao, D., Bailly, M., & Moss, S. E. (2006). Regulation of actin dynamics by annexin 2. *The EMBO Journal*, *25*(9), 1816-1826.

Hempstock, J., Jauniaux, E., Greenwold, N., & Burton, G. J. (2003). The contribution of placental oxidative stress to early pregnancy failure. *Human Pathology*, *34*(12), 1265-1275.

Henderson, J. T., Thompson, J. H., Burda, B. U., & Cantor, A. (2017). Preeclampsia screening: Evidence report and systematic review for the US preventive services task force. *Jama*, *317*(16), 1668-1683.

Hermes, W., Franx, A., van Pampus, M. G., Bloemenkamp, K. W., Bots, M. L., van der Post, J. A. de Groot, C. J. (2013). Cardiovascular risk factors in women who had hypertensive disorders late in pregnancy: A cohort study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *208*(6), 474.e1-474.e8.

Hernandez-Diaz, S., Toh, S., & Cnattingius, S. (2009). Risk of pre-eclampsia in first and subsequent pregnancies: Prospective cohort study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *338*, b2255.

Horcajadas, J. A., Pellicer, A., & Simon, C. (2007). Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: New times, new opportunities. *Human Reproduction Update*, *13*(1), 77-86.

Huang, J., Xue, M., Zhang, J., Yu, H., Gu, Y., Du, Zhang, Y. (2019). Protective role of GPR120 in the maintenance of pregnancy by promoting decidualization via regulation of glucose metabolism. *Ebiomedicine*, *39*, 540-551.

Ihnatovych, I., Livak, M., Reed, J., de Lanerolle, P., & Strakova, Z. (2009). Manipulating actin dynamics affects human in vitro decidualization. *Biology of Reproduction*, *81*(1), 222-230.

Irwin, J. C., Utian, W. H., & Eckert, R. L. (1991). Sex steroids and growth factors differentially regulate the growth and differentiation of cultured human endometrial stromal cells. *Endocrinology*, *129*(5), 2385-2392.

Jauniaux, E., Gulbis, B., & Burton, G. J. (2003). The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the foetus--a review. *Placenta*, *24 Suppl A*, S86-93.

Jones, R. L., Findlay, J. K., Farnworth, P. G., Robertson, D. M., Wallace, E., & Salamonsen, L. A. (2006). Activin A and inhibin A differentially regulate human uterine matrix metalloproteinases: Potential interactions during decidualization and trophoblast invasion. *Endocrinology*, *147*(2), 724-732.

Kao, L. C., Tulac, S., Lobo, S., Imani, B., Yang, J. P., Germeyer, A., Giudice, L. C. (2002). Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology*, *143*(6), 2119-2138.

Karumanchi, S. A., Maynard, S. E., Stillman, I. E., Epstein, F. H., & Sukhatme, V. P. (2005). Preeclampsia: A renal perspective. *Kidney International*, *67*(6), 2101-2113.

Kaufmann, P., Black, S., & Huppertz, B. (2003). Endovascular trophoblast invasion: Implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biology of Reproduction*, *69*(1), 1-7.

Khong, T. Y., De Wolf, F., Robertson, W. B., & Brosens, I. (1986). Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, *93*(10), 1049-1059.

Kim, S. H., Jung, S. H., Chung, H., Jo, D. I., Kim, C. K., Park, S. H., Kim, B. (2014). Annexin A2 participates in human skin keloid formation by inhibiting fibroblast proliferation. *Archives of Dermatological Research*, *306*(4), 347-357.

Kwon, M., MacLeod, T. J., Zhang, Y., & Waisman, D. M. (2005). S100A10, annexin A2, and annexin a2 heterotetramer as candidate plasminogen receptors. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, *10*, 300-325.

Lain, K. Y., & Roberts, J. M. (2002). Contemporary concepts of the pathogenesis and management of preeclampsia. *Jama*, *287*(24), 3183-3186.

Lambropoulou, M., Tamiolakis, D., Venizelos, J., Liberis, V., Galazios, G., Tsikouras, Papadopoulos, N. (2006). Imbalance of mononuclear cell infiltrates in the placental tissue from fetuses after spontaneous abortion versus therapeutic termination from 8th to 12th weeks of gestational age. *Clinical and Experimental Medicine*, *6*(4), 171-176.

Levine, R. J., Maynard, S. E., Qian, C., Lim, K. H., England, L. J., Yu, K. F., Karumanchi, S. A. (2004). Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *The New England Journal of Medicine*, 350(7), 672-683.

Levine, R. J., Qian, C., Maynard, S. E., Yu, K. F., Epstein, F. H., & Karumanchi, S. A. (2006). Serum sFlt1 concentration during preeclampsia and mid trimester blood pressure in healthy nulliparous women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 194(4), 1034-1041.

Levine, R. J., Vatten, L. J., Horowitz, G. L., Qian, C., Romundstad, P. R., Yu, K. F., Karumanchi, S. A. (2009). Pre-eclampsia, soluble fms-like tyrosine kinase 1, and the risk of reduced thyroid function: Nested case-control and population based study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 339, b4336.

Li, G., Huang, W., Xia, Q., Yang, K., Liu, R., Zhu, H., & Jiang, W. (2008). Role of uterine natural killer cells in angiogenesis of human decidua of the first-trimester pregnancy. *Science in China. Series C, Life Sciences*, 51(2), 111-119.

Lima, P. D., Zhang, J., Dunk, C., Lye, S. J., & Croy, B. A. (2014). Leukocyte driven-decidual angiogenesis in early pregnancy. *Cellular & Molecular Immunology*, 11(6), 522-537.

Ling, Q., Jacovina, A. T., Deora, A., Febbraio, M., Simantov, R., Silverstein, R. Hajjar, K. A. (2004). Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(1), 38-48.

Liu, H., Li, Y., Zhang, J., Rao, M., Liang, H., & Liu, G. (2015). The defect of both angiogenesis and lymphangiogenesis is involved in preeclampsia. *Placenta*, 36(3), 279-286.

Liu, W., & Hajjar, K. A. (2016). The annexin A2 system and angiogenesis. *Biological Chemistry*, 397(10), 1005-1016.

Luo, M., & Hajjar, K. A. (2013). Annexin A2 system in human biology: Cell surface and beyond. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 39(4), 338-346.

Lyall, F. (2005). Priming and remodelling of human placental bed spiral arteries during pregnancy--a review. *Placenta*, 26 Suppl A, S31-6.

Lykke, J. A., Langhoff-Roos, J., Sibai, B. M., Funai, E. F., Triche, E. W., & Paidas, M. J. (2009). Hypertensive pregnancy disorders and subsequent cardiovascular morbidity and type 2 diabetes mellitus in the mother. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *53*(6), 944-951.

Mabuchi, A., Yamamoto, R., Ishii, K., Kakubari, R., Takaoka, S., Muto, H., & Mitsuda, N. (2016). Significance of high-normal blood pressure during early second trimester for predicting the onset of hypertensive disorders in pregnancy. *Hypertension in Pregnancy*, *35*(2), 234-241.

MackAy, A. P., Berg, C. J., Liu, X., Duran, C., & Hoyert, D. L. (2011). Changes in pregnancy mortality ascertainment: United states, 1999-2005. *Obstetrics and Gynecology*, *118*(1), 104-110.

Magee, L. A., Pels, A., Helewa, M., Rey, E., von Dadelszen, P., & SOGC Hypertension Guideline Committee. (2014). Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy: Executive summary. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada: JOGC = Journal d'Obstetrique Et Gynecologie Du Canada: JOGC*, *36*(7), 575-576.

Maggard, M. A., Yermilov, I., Li, Z., Maglione, M., Newberry, S., Suttorp, Shekelle, P. G. (2008). Pregnancy and fertility following bariatric surgery: A systematic review. *Jama*, *300*(19), 2286-2296.

Martin, A. S., Monsour, M., Kawwass, J. F., Boulet, S. L., Kissin, D. M., & Jamieson, D. J. (2016). Risk of preeclampsia in pregnancies after assisted reproductive technology and ovarian stimulation. *Maternal and Child Health Journal*, *20*(10), 2050-2056.

Maruyama, T., & Yoshimura, Y. (2008). Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium. *Endocrine Journal*, *55*(5), 795-810.

Masoudian, P., Nasr, A., de Nanassy, J., Fung-Kee-Fung, K., Bainbridge, S. A., & El Demellawy, D. (2016). Oocyte donation pregnancies and the risk of preeclampsia or gestational hypertension: A systematic review and metaanalysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *214*(3), 328-339.

Matsuo, K., Kooshesh, S., Dinc, M., Sun, C. C., Kimura, T., & Baschat, A. A. (2007). Late postpartum eclampsia: Report of two cases managed by uterine curettage and review of the literature. *American Journal of Perinatology*, *24*(4), 257-266.

Maynard, S. E., Min, J. Y., Merchan, J., Lim, K. H., Li, J., Mondal, Karumanchi, S. A. (2003). Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(5), 649-658.

Meads, C. A., Crossen, J. S., Meher, S., Juarez-Garcia, A., ter Riet, G., Duley, Khan, K. S. (2008). Methods of prediction and prevention of pre-eclampsia: Systematic reviews of accuracy and effectiveness literature with economic modelling. *Health Technology Assessment (Winchester, England)*, 12(6), iii-iv, 1-270.

Medina, I., Carbonell, J., Pulido, L., Madeira, S. C., Goetz, S., Conesa, Dopazo, J. (2010). Babelomics: An integrative platform for the analysis of transcriptomics, proteomics and genomic data with advanced functional profiling. *Nucleic Acids Research*, 38(Web Server issue), W210-3.

Meekins, J. W., Pijnenborg, R., Hanssens, M., McFadyen, I. R., & van Asshe, A. (1994). A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 101(8), 669-674.

Menkhorst, E., Koga, K., Van Sinderen, M., & Dimitriadis, E. (2014). Galectin-7 serum levels are altered prior to the onset of pre-eclampsia. *Placenta*, 35(4), 281-285.

Merviel, P., Lourdel, E., Cabry, R., Boulard, V., Brzakowski, M., Demailly, Devaux, A. (2009). Physiopathology of human embryonic implantation: Clinical incidences. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 47(5), S25-34.

Morel, O., Grange, G., Fresson, J., Schaaps, J. P., Foidart, J. M., Cabrol, D., & Tsatsaris, V. (2011). Vascularization of the placenta and the sub-placental myometrium: Feasibility and reproducibility of a three-dimensional power doppler ultrasound quantification technique. A pilot study. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 24(2), 284-290.

Mori, M., Bogdan, A., Balassa, T., Csabai, T., & Szekeres-Bartho, J. (2016). The decidua-the maternal bed embracing the embryo-maintains the pregnancy. *Seminars in Immunopathology*, 38(6), 635-649.

Motta, B., Nageli, F., Nageli, C., Solari-Basano, F., Schiessl, B., Deplazes, P., & Schnyder, M. (2014). Epidemiology of the eye worm *thelazia callipaeda* in cats from southern switzerland. *Veterinary Parasitology*, *203*(3-4), 287-293.

Motta, B., Schnyder, M., Basano, F. S., Nageli, F., Nageli, C., Schiessl, Otranto, D. (2012). Therapeutic efficacy of milbemycin oxime/praziquantel oral formulation (milbemax(R)) against *thelazia callipaeda* in naturally infested dogs and cats. *Parasites & Vectors*, *5*, 85-3305-5-85.

Munro, S. K., Farquhar, C. M., Mitchell, M. D., & Ponnampalam, A. P. (2010). Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle. *Molecular Human Reproduction*, *16*(5), 297-310.

Nagamatsu, T., Fujii, T., Kusumi, M., Zou, L., Yamashita, T., Osuga, Taketani, Y. (2004). Cytotrophoblasts up-regulate soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression under reduced oxygen: An implication for the placental vascular development and the pathophysiology of preeclampsia. *Endocrinology*, *145*(11), 4838-4845.

Navaratnam, K., Alfirevic, Z., Baker, P. N., Glud, C., Gruttner, B., Kublickiene, Kenny, L. C. (2013). A multi-centre phase IIa clinical study of predictive testing for preeclampsia: Improved pregnancy outcomes via early detection (IMPROVED). *BMC Pregnancy and Childbirth*, *13*, 226-2393-13-226.

Nevis, I. F., Reitsma, A., Dominic, A., McDonald, S., Thabane, L., Akl, E. Garg, A. X. (2011). Pregnancy outcomes in women with chronic kidney disease: A systematic review. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, *6*(11), 2587-2598.

Nilsson, E., Salonen Ros, H., Cnattingius, S., & Lichtenstein, P. (2004). The importance of genetic and environmental effects for pre-eclampsia and gestational hypertension: A family study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, *111*(3), 200-206.

Noyes, R. W., Hertig, A. T., & Rock, J. (1975). Dating the endometrial biopsy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *122*(2), 262-263.

O'Brien, T. E., Ray, J. G., & Chan, W. S. (2003). Maternal body mass index and the risk of preeclampsia: A systematic overview. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, *14*(3), 368-374.

Ossada, V., Jank, A., & Stepan, H. (2016). The impact of uterine curettage postpartum on maternal sFlt-1 concentration. *Journal of Perinatal Medicine*, 44(3), 351-354.

Peng, M., Yu, L., Ding, Y. L., & Zhou, C. J. (2008). Trophoblast cells invading the placenta bed and change of spiral arteries and microvessels in pre-eclampsia. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal of Central South University. Medical Sciences*, 33(2), 121-129.

Peyvandi, F., Garagiola, I., & Baronciani, L. (2011). Role of von willebrand factor in the haemostasis. *Blood Transfusion = Trasfusione Del Sangue*, 9 Suppl 2, s3-8.

Phipps, E. A., Thadhani, R., Benzing, T., & Karumanchi, S. A. (2019). Pre-eclampsia: Pathogenesis, novel diagnostics and therapies. *Nature Reviews. Nephrology*, 15(5), 275-289.

Pijnenborg, R., Vercruyssen, L., & Hanssens, M. (2006). The uterine spiral arteries in human pregnancy: Facts and controversies. *Placenta*, 27(9-10), 939-958.

Poon, L. C., Shennan, A., Hyett, J. A., Kapur, A., Hadar, E., Divakar, H., Hod, M. (2019). The international federation of gynecology and obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 145 Suppl 1, 1-33.

Rabaglino, M. B., Post Uiterweer, E. D., Jeyabalan, A., Hogge, W. A., & Conrad, K. P. (2015). Bioinformatics approach reveals evidence for impaired endometrial maturation before and during early pregnancy in women who developed preeclampsia. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 65(2), 421-429.

Ragab, A., Goda, H., Raghieb, M., Barakat, R., El-Samanoudy, A., & Badawy, A. (2013). Does immediate postpartum curettage of the endometrium accelerate recovery from preeclampsia-eclampsia? A randomized controlled trial. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 288(5), 1035-1038.

Rajakumar, A., Doty, K., Daftary, A., Harger, G., & Conrad, K. P. (2003). Impaired oxygen-dependent reduction of HIF-1 α and -2 α proteins in pre-eclamptic placentae. *Placenta*, 24(2-3), 199-208.

Ramathal, C. Y., Bagchi, I. C., Taylor, R. N., & Bagchi, M. K. (2010). Endometrial decidualization: Of mice and men. *Seminars in Reproductive Medicine*, 28(1), 17-26.

Rana, S., Powe, C. E., Salahuddin, S., Verlohren, S., Perschel, F. H., Levine, R., Karumanchi, S. A. (2012). Angiogenic factors and the risk of adverse outcomes in women with suspected preeclampsia. *Circulation*, 125(7), 911-919.

Red-Horse, K., Zhou, Y., Genbacev, O., Prakobphol, A., Foulk, R., McMaster, M., & Fisher, S. J. (2004). Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(6), 744-754.

Redman, C. W., & Sargent, I. L. (2005). Latest advances in understanding preeclampsia. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5728), 1592-1594.

Reyna-Villasmil E, & Briceño Pérez C, Santos-Bolívar J. (2015). Invasión trofoblástica en el embarazo normal (II): Placentación profunda.4, 27-37.

Roberge, S., Nicolaidis, K., Demers, S., Hyett, J., Chaillet, N., & Bujold, E. (2017). The role of aspirin dose on the prevention of preeclampsia and fetal growth restriction: Systematic review and meta-analysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 216(2), 110-120.e6.

Roberts, J. M., Taylor, R. N., & Goldfien, A. (1991). Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia. *American Journal of Hypertension*, 4(8), 700-708.

Rolnik, D. L., Wright, D., Poon, L. C., O'Gorman, N., Syngelaki, A., de Paco Matallana, Nicolaidis, K. H. (2017). Aspirin versus placebo in pregnancies at high risk for preterm preeclampsia. *The New England Journal of Medicine*, 377(7), 613-622.

Saftlas, A. F., Beydoun, H., & Triche, E. (2005). Immunogenetic determinants of preeclampsia and related pregnancy disorders: A systematic review. *Obstetrics and Gynecology*, 106(1), 162-172.

Salha, O., Sharma, V., Dada, T., Nugent, D., Rutherford, A. J., Tomlinson, A., Walker, J. J. (1999). The influence of donated gametes on the incidence of hypertensive disorders of pregnancy. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 14(9), 2268-2273.

Salle, V., Schmidt, J., Smail, A., Maziere, C., Conte, M. A., Brule, Duhaut, P. (2016). Antibodies directed against annexin A2 and obstetric morbidity. *Journal of Reproductive Immunology*, 118, 50-53.

Schiessl, B. (2009). Pregnancy screening in germany. [Schwangerenvorsorge in Deutschland] *Gynakologisch-Geburtshilfliche Rundschau*, 49(4), 287-291.

Schiessl, B., Beyerlein, A., Lack, N., & von Kries, R. (2009). Temporal trends in pregnancy weight gain and birth weight in bavaria 2000-2007: Slightly decreasing birth weight with increasing weight gain in pregnancy. *Journal of Perinatal Medicine*, 37(4), 374-379.

Schiessl, B., Innes, B. A., Bulmer, J. N., Otun, H. A., Chadwick, T. J., Robson, S. C., & Lash, G. E. (2009). Localization of angiogenic growth factors and their receptors in the human placental bed throughout normal human pregnancy. *Placenta*, 30(1), 79-87.

Schiff, E., Barkai, G., Ben-Baruch, G., & Mashiach, S. (1990). Low-dose aspirin does not influence the clinical course of women with mild pregnancy-induced hypertension. *Obstetrics and Gynecology*, 76(5 Pt 1), 742-744.

Sibai, B. M. (1988). Pitfalls in diagnosis and management of preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 159(1), 1-5.

Sibai, B. M. (2004). Magnesium sulfate prophylaxis in preeclampsia: Lessons learned from recent trials. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 190(6), 1520-1526.

Sibai, B. M., Mercer, B., & Sarinoglu, C. (1991). Severe preeclampsia in the second trimester: Recurrence risk and long-term prognosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 165(5 Pt 1), 1408-1412.

Simeone, S., Serena, C., Rambaldi, M. P., Marchi, L., Mello, G., & Mecacci, F. (2016). Risk of preeclampsia and obstetric outcome in donor oocyte and autologous in vitro fertilization pregnancies. *Minerva Ginecologica*, 68(1), 9-14.

Skjaerven, R., Vatten, L. J., Wilcox, A. J., Ronning, T., Irgens, L. M., & Lie, R. T. (2005). Recurrence of pre-eclampsia across generations: Exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 331(7521), 877.

Skjaerven, R., Wilcox, A. J., & Lie, R. T. (2002). The interval between pregnancies and the risk of preeclampsia. *The New England Journal of Medicine*, *346*(1), 33-38.

Smith, S. D., Dunk, C. E., Aplin, J. D., Harris, L. K., & Jones, R. L. (2009). Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *The American Journal of Pathology*, *174*(5), 1959-1971.

Stegers, E. A., von Dadelszen, P., Duvekot, J. J., & Pijnenborg, R. (2010). Pre-eclampsia. *Lancet (London, England)*, *376*(9741), 631-644.

Sun, M., Liu, Y., & Gibb, W. (1996). Distribution of annexin I and II in term human fetal membranes, decidua and placenta. *Placenta*, *17*(2-3), 181-184.

Thadhani, R., Hagmann, H., Schaarschmidt, W., Roth, B., Cingoz, T., Karumanchi, S. Benzing, T. (2016). Removal of soluble fms-like tyrosine kinase-1 by dextran sulfate apheresis in preeclampsia. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, *27*(3), 903-913.

Thornton, C., Dahlen, H., Korda, A., & Hennessy, A. (2013). The incidence of preeclampsia and eclampsia and associated maternal mortality in australia from population-linked datasets: 2000-2008. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *208*(6), 476.e1-476.e5.

Tong, S., Mol, B. W., & Walker, S. P. (2017). Preventing preeclampsia with aspirin: Does dose or timing matter? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *216*(2), 95-97.

Tsatsaris, V., Goffin, F., & Foidart, J. M. (2004). Circulating angiogenic factors and preeclampsia. *The New England Journal of Medicine*, *350*(19), 2003-4; author reply 2003-4.

Uras, N., Oguz, S. S., Zergeroglu, S., Akdag, A., Polat, B., Dizdar, E. A., & Dilmen, U. (2012). CD31 and factor VIII in angiogenesis of normal and pre-eclamptic human placentas. *Journal of Obstetrics and Gynaecology: The Journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*, *32*(6), 533-536.

Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y., Karumanchi, S. A. (2006). Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nature Medicine*, *12*(6), 642-649.

Vinnars, M. T., Nasiell, J., Ghazi, S., Westgren, M., & Papadogiannakis, N. (2011). The severity of clinical manifestations in preeclampsia correlates with the amount of placental infarction. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*, *90*(1), 19-25.

Walker, J. J. (2000). Pre-eclampsia. *Lancet (London, England)*, *356*(9237), 1260-1265.

Wang, H., & Dey, S. K. (2006). Roadmap to embryo implantation: Clues from mouse models. *Nature Reviews.Genetics*, *7*(3), 185-199.

Wenzel, K., Rajakumar, A., Haase, H., Geusens, N., Hubner, N., Schulz, Dechend, R. (2011). Angiotensin II type 1 receptor antibodies and increased angiotensin II sensitivity in pregnant rats. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *58*(1), 77-84.

Whitley, G. S., & Cartwright, J. E. (2010). Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: Lessons from the cardiovascular field. *Placenta*, *31*(6), 465-474.

WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. Guideline: Calcium Supplementation in pregnant Women. Geneva: World Health Organization; 2013

Widmer, M., Villar, J., Benigni, A., Conde-Agudelo, A., Karumanchi, S. A., & Lindheimer, M. (2007). Mapping the theories of preeclampsia and the role of angiogenic factors: A systematic review. *Obstetrics and Gynecology*, *109*(1), 168-180.

Wright, D., & Nicolaides, K. H. (2019). Aspirin delays the development of preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *220*(6), 580.e1-580.e6.

Wright, D., Rolnik, D. L., Syngelaki, A., de Paco Matallana, C., Machuca, M., de Alvarado, Nicolaides, K. H. (2018). Aspirin for evidence-based preeclampsia prevention trial: Effect of aspirin on length of stay in the neonatal intensive care unit. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *218*(6), 612.e1-612.e6.

Xin, H., Zhang, Y., Wang, H., & Sun, S. (2012). Alterations of profibrinolytic receptor annexin A2 in pre-eclampsia: A possible role in placental thrombin formation. *Thrombosis Research*, *129*(5), 563-567.

Yen, C. F., Kim, S. H., Liao, S. K., Atabekoglu, C., Uckac, S., Arici, Kayisli, U. A. (2017). Increased expression of integrin-linked kinase during decidualization regulates the morphological transformation of endometrial stromal cells. *Fertility and Sterility*, *107*(3), 803-812.

Zeisler, H., Llurba, E., Chantraine, F., Vatish, M., Staff, A. C., Sennstrom, Verlohren, S. (2016). Predictive value of the sFlt-1: PlGF ratio in women with suspected preeclampsia. *The New England Journal of Medicine*, 374(1), 13-22.

Zera, C. A., Seely, E. W., Wilkins-Haug, L. E., Lim, K. H., Parry, S. I., & McElrath, T. F. (2014). The association of body mass index with serum angiogenic markers in normal and abnormal pregnancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 211(3), 247.e1-247.e7.

Zhou, Y., Bellingard, V., Feng, K. T., McMaster, M., & Fisher, S. J. (2003). Human cytotrophoblasts promote endothelial survival and vascular remodeling through secretion of Ang2, PlGF, and VEGF-C. *Developmental Biology*, 263(1), 114-125.

Zhou, Y., Damsky, C. H., & Fisher, S. J. (1997). Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *The Journal of Clinical Investigation*, 99(9), 2152-2164.

Zhou, Y., Gormley, M. J., Hunkapiller, N. M., Kapidzic, M., Stolyarov, Y., Feng, Fisher, S. J. (2013). Reversal of gene dysregulation in cultured cytotrophoblasts reveals possible causes of preeclampsia. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(7), 2862-2872.

Zybina, T. G., Frank, H. G., Biesterfeld, S., & Kaufmann, P. (2004). Genome multiplication of extravillous trophoblast cells in human placenta in the course of differentiation and invasion into endometrium and myometrium. II. Mechanisms of polyploidization. *Tsitologija*, 46(7), 640-648.

ANEXOS

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Versión de la HIP: 2016/0042	Fecha de la versión: 04/02/2016
Investigador Principal: Laura Rubert Torró, Servicio de Obstetricia, Ginecología y Reproducción Laurarubert.lrt@gmail.com	
CENTRO: H.U.P. La Fe	
Título del proyecto de investigación: <i>“Decidualización defectuosa durante y después de un embarazo con preeclampsia revela la contribución materna en la etiología de la enfermedad”</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 Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico la Fe.

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.

3. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

El estudio en el que se le propone participar consiste en la realización de estudios de laboratorio, transcriptómicos y bioinformáticos a partir de muestras endometriales obtenidas de mujeres

que presenten antecedentes de preeclampsia severa para compararlas con las mismas muestras de mujeres con gestaciones previas normales, todo ello con el objetivo de demostrar una posible alteración morfológica, bioquímica y genética de las células estromales endometriales durante el proceso de decidualización, cuyo desarrollo normal es necesario para que el blastocito se implante correctamente y la placentación se realice en profundidad.

La preeclampsia es una enfermedad gestacional que se desarrolla, fundamentalmente durante la segunda mitad del embarazo (aunque existen manifestaciones precoces y tras el parto) grave, que puede poner en riesgo, con mayor frecuencia, la vida materna pero también la fetal si no se finaliza la gestación. Su etiología actual es desconocida pero en los últimos años se ha incrementado la creencia científica de que las células del endometrio no son capaces de prepararse adecuadamente para recibir al blastocisto y por lo tanto su implantación uterina es superficial y el desarrollo de la placenta (placentación) se realiza de forma anómala.

Todos estos cambios son responsables de los síntomas que aparecen en esta enfermedad, destacando: la elevación de la tensión arterial materna, pérdida aumentada de proteínas por la orina, fallo renal, edemas en miembros inferiores, edema agudo de pulmón... o también complicaciones más graves como hemorragias cerebrales o la eclampsia (convulsiones generalizadas coincidentes con la elevación de la tensión arterial), todas ellas pueden terminar con la vida de la paciente en poco tiempo. La preeclampsia también puede afectar al feto de forma secundaria produciendo defectos en su crecimiento, partos pretérmino o incluso muerte fetal intraútero.

Actualmente, la única medida terapéutica que consigue disminuir drásticamente la sintomatología derivada de la preeclampsia es la finalización del embarazo, pero no siempre esto es posible ya que en ocasiones, la enfermedad aparece antes de que el parto asegure el bienestar del recién nacido, por lo que en estos casos se administra tratamiento con medicamentos aunque no siempre se consigue dicho control.

El estudio actual tiene como objetivo, demostrar una contribución materna en la causa y desencadenamiento de la preeclampsia severa por alteración del proceso de decidualización en el endometrio humano, identificando *in vitro* e *in vivo* (con modelo de ratón) las posibles diferencias en las células endometriales que acontecen al inducir dicha decidualización en mujeres que previamente han sufrido preeclampsia severa en gestaciones anteriores comparado con los que ocurren en las células de mujeres con antecedentes de gestaciones sanas. Además se prestará atención a los hallazgos que puedan aparecer sobre anexina A2, por su posible implicación en las diferencias de decidualización entre ambos grupos.

Para llevar a cabo el estudio, se pretende reclutar mujeres en edad reproductiva (18-42 años) con antecedente de preeclampsia grave precoz y mujeres con partos normales acontecidos entre 1 a 5 años previos. Las mujeres no deben padecer ninguna enfermedad uterina ni deben llevar tratamiento anticoagulante o anticonceptivos en los tres meses previos a la cita.

Se citará a las pacientes una sola vez entre el día 15-19 de su ciclo menstrual y se tomará una muestra de la capa interna del útero (endometrio) que se remitirá al laboratorio para la realización de las pruebas pertinentes.

El único efecto secundario a la toma de la muestra es un escaso sangrado que se cede en pocos minutos y dolor leve similar al menstrual, en el momento de la toma que cede tras el

procedimiento, pero que en caso de persistir ligeramente, alivia con calmantes orales habituales.

La paciente podrá irse a casa tras 10-15 minutos de la toma de la muestra ya que no supone un proceso agresivo o que requiera vigilancia posterior. Además se les indicará donde pueden dirigirse en caso de eventualidad o deseo de mayor información.

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

La participación en este estudio, en caso de concluir con resultados significativos y de trascendencia clínica, puede aportar beneficios para las mujeres que desean quedarse embarazadas y desconocen su riesgo actual de padecer la enfermedad, o bien para aquellas que ya la han padecido y desean saber el riesgo de que se reproduzca en un futuro embarazo. Además, el hecho de poder disponer de marcadores de detección precoz de la preeclampsia facilitarían el seguimiento gestacional más exhaustivo de estas mujeres e incluso desarrollar alguna estrategia de prevención de la enfermedad.

En caso de que el resultado no aporte conclusiones clínicas trascendentales, el hecho de participar también aporta cierto beneficio a la paciente ya que se le realiza una revisión ginecológica en la misma visita y permite, por tanto, la detección de cualquier patología que pudiera presentar.

Las participantes deben ser conscientes que puede que este no les aporte ningún beneficio ya que en caso de ser mujeres sanas con revisión ginecológica reciente y normal, el hecho de participar en el estudio no les mejora el grado o calidad de la asistencia clínica anterior.

Las mujeres que acepten participar en el estudio no van a padecer ningún efecto secundario ni riesgo atribuible a la toma de la muestra endometrial, salvo un ocasional y escaso spotting que cede en pocos minutos, debido a que el aspirado endometrial es un proceso que se realiza de forma rutinaria en las consultas de ginecología y no supone un acto agresivo.

5. TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS:

En la actualidad no se dispone de tratamiento eficaz para prevenir ni combatir la enfermedad salvo la finalización de la gestación, que tampoco resulta efectiva en algunas ocasiones. Si la preeclampsia aparece en estadios precoces del embarazo se intentan controlar los síntomas más frecuentes mediante tratamiento farmacológico buscando un equilibrio entre el avance de la sintomatología y la edad gestacional.

Las participantes no deben sufrir efectos secundarios tras la obtención de la muestra (salvo leve spotting postaspirado) ya que no supone un procedimiento agresivo y pueden realizar vida

normal tras la visita. Si presentan dudas al respecto o se desea más información, puede contactar con el médico del estudio.

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 Dra. Laura Rubert Torró en el número de teléfono 693495733

7. CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes, se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y 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. Los datos serán disociados y el responsable del registro será el investigador principal Dra. Rubert)

Sólo se tramitarán a terceros 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 endometriales recogidas se remitirán por correo directo al laboratorio de la Fundación IVI situado en el campus de Burjasot, donde quedarán registradas y custodiadas por el personal del centro durante un periodo de 5 años.

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

MODELO DE CONSENTIMIENTO POR ESCRITO

Título del estudio: ***“Decidualización defectuosa durante y después de un embarazo con preeclampsia revela la contribución materna en la etiología de la enfermedad”***

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: *Laura Rubert Torró / 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:

Nombre:

Fecha:

Fecha:

ANEXO III

	CONTROL (n=13)	PREECLAMPSIA GRAVE (n=13)	p**
Edad materna a la toma de biopsia (años)	38 (0.8)	35 (1.4)	> 0.05
Paridad (n promedio)	1.5 (0.2)	1.8 (0.2)	
- Primípara (n total)	8	5	>0.05
- Multípara (n total)	5	8	
Intervalo de tiempo entre último embarazo y la biopsia (años)	4 (1.2)	2 (0.3)	>0.05
Edad gestacional finalización embarazo (semanas)	39 (0.27)	34 (1.00)	<0.001
Peso recién nacido (gramos)	3250 (111.36)	1844 (190.9)	<0.001
Peso placenta (gramos)	712	596	
Tensión arterial sistólica (mmHg)	122 (2.48)	162 (2.7)	<0.001
Tensión arterial diastólica (mmHg)	74 (1.72)	101 (2.9)	<0.001
Proteinuria (-/+ /++)	0 o ND	268 (226.54)	<0.001
Hemoglobina (gr/dL)	13 (1.15)	12 (1.68)	>0.05
Plaquetas ($\times 10^3$)	215.154 (59.485)	161.077 (73.658)	<0.05
Fibrinógeno (mg/dL)	570 (68.38)	523 (89.37)	>0.05
GOT (U/L)	20 (7.02)	101 (157.17)	>0.05
GPT (U/L)	16 (1.5)	88 (125.4)	<0.05
Proteínas totales (mg/dL)	6.88 (0.46)	5.53 (0.60)	<0.001

Características principales de las pacientes que se incluyeron en el estudio y fueron sometidas a biopsia endometrial (n=13/grupo). Los resultados se muestran mediante promedios y desviación estándar de la media utilizando T- student. mmHg: milímetros de mercurio; mg/dL: miligramos por decilitro; U/L: unidades por litro; g: gramos; 1+:30-100mg/dL; 2+: 100-300mg/dL; 3+: 300-1000mg/dL; ** Media \pm DSM (Desviación estándar de la media).

ANEXO IV

Embarazo normal													Símbolo	Δ
CEE decidualizadas					CEE no decidualizadas									
16	16	12	13	10	7	7	7	8	8	8	7	CNR1	53	
16	16	12	14	12	9	10	9	12	9	12	9	IRS2	14	
15	16	13	13	11	10	10	10	11	10	11	11	CHST7	10	
16	16	16	13	12	11	11	10	12	11	11	11	TSC22D3	10	
13	12	10	11	9	8	8	8	8	7	8	7	PRUNE2	10	
12	12	7	12	9	7	7	7	7	7	8	7	ADAMTS8	8	
14	14	14	12	11	9	10	10	10	11	10	10	MAOA	8	
16	16	14	15	14	12	12	11	12	11	13	12	MGST1	8	
12	12	11	11	9	8	8	8	8	8	10	8	FKBP5	8	
12	12	10	10	8	7	7	7	8	7	7	7	SCARA5	8	
12	12	11	11	10	8	8	7	9	8	9	9	ZBTB16	7	
16	15	14	13	12	11	11	11	11	11	12	11	GLUL	7	
10	9	13	10	9	8	7	7	7	8	7	8	SERPINA3	6	
12	12	9	11	10	8	9	9	8	8	8	9	NPR1	6	
13	12	11	12	11	8	10	9	9	9	11	10	LPAR1	5	
9	10	12	10	9	8	7	8	8	7	8	8	APOD	5	
11	11	10	8	9	8	8	8	7	8	8	8	ABLIM2	4	
10	10	9	10	9	8	8	7	7	8	7	8	CHI3L2	4	
15	14	13	13	13	11	11	11	11	11	12	13	PDLIM1	4	
13	13	11	11	12	10	10	10	9	9	10	11	PID1	4	
10	10	9	9	8	7	7	8	7	7	8	7	TIMP4	3	
13	13	12	12	10	10	10	10	10	10	11	10	ACSL1	3	
10	9	10	10	9	8	8	7	8	8	8	8	LTBP1	3	
10	10	8	11	9	8	8	8	8	8	8	9	TNFRSF8	3	
11	11	10	12	10	9	10	10	9	9	10	10	SLC27A3	3	
16	16	15	16	14	14	14	14	13	14	14	13	TCEAL4	3	
14	14	13	13	13	12	11	12	11	12	13	12	ITPKC	3	
13	12	13	13	12	11	11	11	12	11	12	12	JDP2	3	
10	10	10	9	8	8	8	9	8	8	8	8	DEFB124	2	
9	9	10	9	8	8	7	7	8	8	8	8	IL1R2	2	
14	14	13	14	13	12	13	12	12	12	13	13	NFE2L1	2	
12	12	12	11	11	10	11	10	11	10	11	11	ARHGEF19	2	
13	13	13	13	12	11	12	12	12	12	12	12	FLOT1	2	
11	11	10	10	10	9	9	9	9	10	9	9	CD302	2	
11	11	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	C9orf21	2	
9	9	8	8	8	7	7	7	8	8	8	8	TCF7L2	2	
12	11	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	TCEAL1	2	
10	10	9	9	9	8	9	8	8	8	9	8	SOAT1	2	
9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	7	GCNT1	2	

14	13	14	14	13	13	13	13	13	13	13	12	MORF4L2	2
9	8	8	8	8	8	7	7	7	7	7	8	SORBS1	2
9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	9	ENST00000377277	2
15	15	15	15	15	14	14	14	14	14	15	14	PDCD5	-2
8	8	8	8	8	7	7	7	7	7	7	7	GYPE	-2
8	8	8	7	7	8	8	8	8	8	8	8	NCRNA00203	-2
13	12	13	12	13	13	13	13	13	13	13	13	MPG	-2
7	7	8	8	7	8	8	8	8	8	8	8	CCDC136	-2
9	9	9	9	9	10	10	10	10	9	10	9	PPAP2C	-2
10	9	10	9	10	10	11	10	11	11	10	10	RALGDS	-2
8	7	9	8	8	9	9	9	9	9	9	8	ABCB4	-2
8	9	9	8	9	9	10	10	10	10	9	10	GPC2	-2
7	8	8	8	8	8	9	9	9	8	9	9	SBK1	-2
11	11	11	12	12	13	13	13	12	13	13	13	TRO	-2
10	11	11	11	11	12	12	12	12	13	13	11	TSPAN6	-2
10	10	10	10	8	10	11	11	10	11	11	11	DOCK6	-3
11	11	12	11	12	13	12	12	13	13	12	13	GNB1L	-3
9	10	10	10	11	11	12	12	12	11	11	11	SOX4	-3
8	8	8	9	10	10	10	10	9	9	10	11	ZSWIM4	-3
11	11	11	11	12	14	13	13	13	13	12	13	PODXL	-3
7	8	8	8	9	10	10	10	9	11	9	9	SERTAD4	-3
8	9	9	9	10	10	11	11	10	12	11	10	LMO2	-3
12	12	11	12	14	13	14	14	14	14	13	14	FOXL2	-3
8	8	9	9	10	11	10	10	10	10	11	11	AFAP1L2	-3
8	8	8	8	10	10	10	10	9	10	11	10	COCH	-3
10	11	13	11	13	14	14	14	14	14	13	13	GPRC5C	-4
8	8	9	9	10	12	10	10	10	12	10	11	FBXO2	-4
8	8	9	10	10	11	12	11	11	11	11	11	C1orf133	-4
8	8	10	10	10	11	12	12	11	11	12	12	TMSB15A	-5
8	8	9	9	9	10	12	11	10	12	12	11	GFRA2	-5
10	10	10	11	12	14	13	14	11	13	13	13	PRAGMIN	-6
8	8	8	9	11	10	12	11	11	12	12	12	TSPAN11	-6
8	8	9	9	10	11	12	12	11	11	12	11	CNIH3	-8
8	8	10	10	12	14	13	12	13	13	12	13	F2RL1	-9
10	11	12	12	13	15	16	16	15	15	15	12	DIO2	-9
Abundancia de ARNm													
6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
(log2)													

Perfil transcripcional global revela cambios en la expresión de genes durante la decidualización in vitro de CEE de mujeres con gestación previa sana, identificando 74 GDE. El color de relleno de las casillas muestra la abundancia de ARNm para cada muestra. El símbolo que representa a cada gen analizado y su tasa de cambio de expresión (Δ) en las CEE decidualizadas respecto a las del control se muestra en las dos columnas de la derecha con codificación nominal y numérica respectivamente.

ANEXO V

CEE decidualizadas										Símbolo	Δ
Gestación normal					PEs						
3	4	4	4	6	11	9	9	10	9	HSD17B2*	16
3	5	5	3	3	10	9	6	11	10	ANGPT2	14
3	3	6	12	9	11	13	14	9	12	NCKAP5	12
5	6	3	6	9	12	11	10	10	11	ADRA2A	12
3	4	3	5	4	9	8	7	9	10	DBC1	11
2	2	3	3	4	9	7	5	8	7	C1QTNF7	10
3	3	2	3	3	8	7	5	7	8	COL8A1	8
3	4	3	4	6	10	9	7	7	9	EGR1	8
4	4	7	6	8	10	11	9	10	9	SSTR1	8
8	9	4	11	11	12	14	13	12	13	FBXO2	8
3	3	4	4	6	8	7	8	9	9	CPE	7
2	2	3	4	5	8	7	5	7	8	C4orf49	7
2	3	2	2	3	7	6	6	5	7	GRP	7
4	5	5	6	10	11	10	9	10	9	IGFBP5	7
3	2	3	3	3	4	4	10	4	10	COCH	7
2	3	3	7	5	8	7	6	10	8	ARHGDIB	6
4	5	8	9	10	11	11	11	10	11	SCG5	6
3	2	3	3	4	8	6	6	8	6	ITGA11	6
5	5	9	7	9	11	11	10	11	10	SLC35F3	6
3	3	3	3	5	8	8	5	7	7	RLN2	6
3	3	3	4	5	8	9	7	6	6	COL14A1	6
5	5	3	6	7	9	9	8	9	9	CLIC3	6
8	5	3	6	9	11	11	8	9	11	TMEM25	6
7	7	3	6	7	9	9	8	9	10	CCDC81	5
5	4	2	6	4	8	8	8	6	7	MYCN	5
2	3	2	3	4	8	6	5	6	5	SLITRK6	5
4	3	2	6	8	7	8	8	7	8	TTR	5
5	6	3	5	7	9	9	8	7	8	ISM1	5
3	4	3	4	4	9	6	5	7	7	PITX1	5
5	5	7	7	9	11	9	10	10	10	SULF1	5
3	3	5	5	8	8	7	7	9	8	OXTR	4
3	3	4	4	5	8	6	4	8	7	AADAC	4
3	3	4	4	4	7	6	8	6	5	MEST	4
4	2	3	3	5	8	8	6	6	5	C17orf107	4
5	6	5	8	10	10	10	10	9	10	CNIH3	4
3	3	4	8	5	8	7	9	5	8	HMCN1	4
2	2	5	5	6	7	8	6	8	6	C1orf133	4
4	4	3	5	6	6	9	8	8	5	MYLK	4
6	7	4	4	3	9	7	8	6	8	CLEC3B	4

3	3	2	4	3	5	7	7	5	5	F2RL2	4
4	4	3	4	3	8	6	5	6	8	ADAMTS19	4
4	4	4	6	6	8	8	7	8	7	ATCAY	4
3	3	2	2	3	6	5	3	7	6	BDNF	4
5	6	5	6	7	9	9	8	9	8	DUSP6	4
2	2	2	2	2	5	4	4	4	7	KLF2	4
2	2	2	3	4	7	5	6	4	6	REEP2	4
2	2	3	4	5	6	6	6	7	6	DENND2A	4
4	3	4	4	5	7	8	6	7	7	LPL	4
2	2	2	3	3	6	5	4	4	7	KRTAP17-1	4
4	5	5	7	9	8	9	9	9	9	LOXL4	4
3	4	3	4	6	7	6	6	6	7	NANOS3*	4
3	5	8	3	7	8	9	9	7	7	OLFML1	4
2	2	6	6	6	8	8	7	5	7	C14orf37	4
4	5	4	5	6	8	7	7	9	8	ENST00000313664	4
2	2	2	2	3	7	3	3	5	6	LAMA5	4
2	2	3	4	6	6	6	4	9	5	LYPD1	4
3	3	2	6	4	5	5	6	7	6	GBP2	4
1	2	2	3	4	5	6	5	4	6	FAM19A2	4
2	2	2	3	2	4	3	4	8	5	SERTAD4	4
2	2	2	2	4	6	6	3	4	6	CHODL	4
2	2	1	2	1	4	5	1	5	5	ERAP2	4
2	2	2	3	2	6	4	3	5	5	ERP27	4
3	3	3	2	3	7	7	3	2	6	FAM38B	3
3	4	4	3	4	5	6	4	8	7	GALNT14	3
3	3	2	3	3	6	6	4	5	5	LOC728392	3
2	2	3	4	4	6	5	4	7	5	PDGFD	3
3	2	2	3	3	7	5	4	4	5	FAT1	3
2	2	2	2	2	7	4	4	4	4	TNFRSF10C	3
0	3	2	3	4	5	5	4	4	5	EHD3	3
1	2	2	3	4	5	5	5	6	4	MFAP2	3
2	3	3	2	2	5	5	5	5	4	MRVI1	3
3	4	7	5	5	2	3	3	2	3	TNFAIP6	-3
7	6	5	4	3	3	3	3	3	3	FST	-3
5	5	3	6	6	2	3	4	3	3	DMKN	-3
6	5	8	9	9	4	7	7	5	5	ANXA2	-3
6	7	5	3	2	2	2	2	2	3	DES	-3
6	6	3	7	5	3	2	4	3	2	EFEMP1	-3
8	7	5	4	5	3	3	3	4	3	RGS20	-3
9	8	4	5	5	3	3	3	5	4	CA12	-3
5	5	9	4	3	3	2	3	2	2	GGT5	-3
5	5	4	5	4	2	2	3	2	2	ENST00000380464	-4
7	7	4	6	4	2	2	4	2	3	LTBP1	-4

9	7	8	7	7	4	4	5	6	5	C6orf176	-4
6	5	3	8	4	2	2	4	2	2	TNFRSF8	-4
9	10	7	7	8	5	6	7	4	5	BAIAP2L2	-4
6	5	4	6	4	2	2	3	1	2	LSAMP	-4
9	8	7	10	3	3	4	7	4	4	DDIT4	-4
7	7	6	3	4	2	3	3	2	3	RHOU	-4
10	10	7	7	7	5	4	6	5	6	IRS2	-4
7	9	2	2	5	2	2	2	2	2	EDNRB	-4
6	7	3	5	6	2	2	2	2	2	COL15A1	-5
8	8	7	7	6	3	5	6	3	3	DCN	-5
10	10	10	10	11	5	7	9	9	5	WNT6	-5
10	9	4	6	4	3	3	3	3	4	LPAR1	-5
7	6	12	10	9	6	6	6	6	4	RGS16	-5
12	13	11	11	10	6	7	11	9	7	KCNJ8	-5
9	9	5	7	5	2	3	5	4	3	ABLIM2	-5
8	8	4	10	8	3	4	9	3	3	LRRC15	-5
10	10	4	5	5	2	2	5	4	3	CRLF1	-5
10	9	7	9	7	4	5	7	4	4	RASL11B	-5
10	9	5	7	4	3	4	5	2	3	CFD	-5
9	9	5	6	5	2	2	5	4	3	GAL	-6
9	11	9	6	4	4	3	6	4	4	ALDH1A1*	-6
9	8	2	8	4	2	2	4	3	2	PRUNE2	-6
6	7	8	7	6	2	3	6	5	0	NPR1	-6
11	11	9	9	7	5	4	9	7	4	RASGRP2	-6
7	10	3	4	5	2	2	3	3	2	CHI3L2	-6
5	5	11	6	4	2	2	3	2	2	RSPO3	-6
11	11	7	8	7	5	5	6	6	5	C10orf10	-6
14	14	9	11	8	6	8	10	7	7	TMEM132C	-6
10	10	2	6	6	3	2	4	3	3	PPAP2B	-7
6	6	10	4	6	2	2	3	4	2	NKAIN1	-7
8	8	10	7	6	4	3	5	4	3	ADAMTS8	-7
5	4	6	5	7	1	1	2	1	2	IL15	-7
9	8	5	6	2	2	2	3	2	2	SLC7A2	-7
14	14	12	12	12	6	8	11	10	7	SERPINA3	-8
5	8	11	5	12	2	4	5	7	2	NPTX1	-8
12	12	13	8	9	5	6	8	8	6	CHST7	-9
14	14	10	10	10	5	7	9	8	7	GALNTL2	-9
14	14	11	10	10	6	8	10	8	7	SBSN	-9
11	12	11	6	7	3	4	6	7	5	EDNRA	-9
14	14	9	10	9	5	7	9	8	5	IL1B	-9
13	14	11	11	9	5	7	10	7	5	SPARCL1	-10
13	14	10	9	8	5	5	8	6	5	SCARA5	-11
12	11	6	10	6	3	4	6	4	4	SIPA1L2	-11

13	12	3	7	3	2	2	3	2	2	CCL8	-13
14	14	12	12	10	4	7	11	7	5	P2RY14	-14
14	13	8	10	6	4	5	9	2	3	CNR1	-17
13	13	9	6	5	2	3	5	3	2	IGFBP1*	-24
Abundancia de ARNm											
0	1	3	4	6	7	8	10	11	14		
(log2)											

Perfil transcripcional global revela defectos en la expresión de genes durante la decidualización in vitro de CEE aisladas de mujeres con PEs identificando 129 GDE entre las CEE decidualizadas procedentes de las mujeres con antecedente de PEs y del grupo control o que tuvieron un embarazo normal. El color de relleno de las casillas muestra la abundancia de ARNm para cada muestra. El símbolo que representa a cada gen analizado y su tasa de cambio de expresión (Δ) en las CEE decidualizadas respecto a los controles se representa en las dos columnas de la derecha con codificación nominal y numérica respectivamente. * corresponde a los genes cuya expresión fue utilizada para validación mediante RT-PCR.

