



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

3139 Programa de doctorado en Medicina

**Análisis comparativo de perfiles proteómicos
endometriales y estudio del efecto disruptor
del cobre y plomo sobre la receptividad
endometrial**

Doctoranda:

Silvia Pérez Debén

Dirigida por:

Dr. Francisco Domínguez Hernández

Prof. José Alejandro Remohí Giménez

Valencia, Noviembre 2021



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

Dr. Francisco Domínguez Hernández, Doctor en Biología, Investigador principal del área de Receptividad Endometrial y Competencia Embrionaria en Fundación IVI (FIVI) y Coordinador del laboratorio de FIVI.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“Análisis comparativo de perfiles proteómicos endometriales y estudio del efecto disruptor del cobre y plomo sobre la receptividad endometrial”** ha sido realizado íntegramente por la doctoranda Silvia Pérez Debén bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 30 de Noviembre de 2021.

Fdo. Dr. Francisco Domínguez Hernández



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

Prof. José Alejandro Remohí Giménez, Catedrático en Ginecología, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor titular del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, presidente y director del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI).

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“Análisis comparativo de perfiles proteómicos endometriales y estudio del efecto disruptor del cobre y plomo sobre la receptividad endometrial”** ha sido realizado íntegramente por la doctoranda Silvia Pérez Debén bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 30 de Noviembre de 2021.

Fdo. Prof. José Alejandro Remohí Giménez

AGRADECIMIENTOS

Y por fin llegaron los “AGRADECIMIENTOS”, bien, bien y bien... No veía el fin, pero ahora sí que sí he terminado de escribir este ‘libro’ que no es poco más que el trabajo de 4 años de mi vida. No quepo en mí de la alegría al llegar a este momento, pues muchos saben lo que me ha costado terminar de escribir esta tesis. El tramo final ha sido lo peor para mí, moral y personalmente, pero no he tirado la toalla. Paradójicamente, también me recorre una sensación agridulce al saber que esta etapa ya ha acabado, que los ‘nuevos comienzos’ son difíciles y que ya echo y echaré mucho de menos mi ambiente y mi ‘gente’ del trabajo.

A lo largo de este trayecto llamado tesis, uno va superando obstáculos, enfrentándose a sentimientos contrariados y resolviendo dificultades. Inicialmente te invade la felicidad por emprender tu ‘carrera científica’, luego te surgen dudas de si estarás o no a la altura o de si quieres continuar en ella, te desanimas porque tus resultados no son lo esperado, y finalmente te reconcias con la ciencia y contigo misma, porque aunque no seas ni un Einstein, ni una Rosalind Franklin has invertido esfuerzo y dedicado tiempo en aportar tu granito de arena a la ciencia. Sin duda alguna, la tesis es una etapa decisiva en la vida de cualquier persona, en la que aparte del enriquecimiento intelectual que adquieres, maduras personal y profesionalmente.

Aunque aquí sólo se relaten los aspectos metodológicos y resultados de un trabajo de investigación, la verdad es que viene respaldado por un gran equipo de personas, llamadas familia, investigadores, amigos y compañeros, sin los cuales esto no habría sido posible y a los cuales me gustaría dedicar unas palabras de agradecimiento.

Bien es sabido que uno de mis defectos es la falta de brevedad y síntesis, pero poco podré hacer aquí para remediarlo, sobre todo teniendo en cuenta a todas las personas que han formado parte de mi vida en esta etapa. Comencemos pues definiendo la palabra ‘AGRADECER’, que no es más que sentir o mostrar gratitud por un bien recibido, un gesto o un favor. Es una emoción positiva que muestra aprecio a otra persona de quien se recibió ayuda. Tal es así, que en primer lugar me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis, el Dr. José Alejandro Remohí y el Dr. Francisco Domínguez, por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis en esta institución investigadora con gran renombre en el campo de la medicina reproductiva como es la Fundación IVI. Especial mención al Dr. Francisco Domínguez, Paco para los amigos, por supervisarme y acompañarme en el día a día, por tu siempre disposición y tu paciencia, por la confianza puesta en mí y libertad de elección que siempre me has dado y

sobre todo por los ánimos recibidos siempre. A tu lado me he sentido valorada en todo momento. Gracias.

Entre mis compañeros de FIVI me gustaría dedicar un especial agradecimiento a mi buen amigo y compañero de grupo, Roberto, con el que he llegado a conectar de manera especial pese a ser muy diferentes. Gracias mi querido 'King Rober'. Tú has sido mi gran descubrimiento, mi otro yo diferente, mi pareja de laboratorio, mi gran confidente, mi cabeza pensante, mi inspiración y motivación científica en esta última etapa. Gracias por todo 'Robb', porque de ti he aprendido mucho y me has dado vidilla. Aunque llegaste a mitad de mi camino, hemos compartido muchos momentos juntos, siempre recordaré nuestras sesiones de cálculos matemáticos, y nuestros desafíos culinarios. ¡Eran lo más! Gracias por tus sabios consejos, por el buen ambiente y trabajo en equipo, por tu sutileza a la hora escoger las palabras adecuadas en cada momento y por el cariño y apoyo que me has dado. Eres único.

Especial cariño también les tengo a aquellos que comenzaron conmigo esta andadura, Nuria López, Ana Corachán, Anna Buigues, Hannes y Stefania, porque como yo empezamos en pañales y vivimos de cerca nuestra evolución. Nuria, mi pequeño saltamontes, mi compañera de piso, de trabajo y sobre todo querida amiga, gracias por haber compartido estos tres años de nuestras vidas y por la buena convivencia que hemos tenido. Sin duda alguna, una de las etapas más bonitas de mi vida. Contigo he compartido vivencias y experiencias únicas, crecido y madurado como persona y nos hemos reído mucho juntas aunque con algún que otro susto de por medio, fruto de los encuentros fortuitos en el piso, que al final han sido también motivo de risas. Es lo que tiene el tener una compañera de piso asustadiza como yo. Valoro mucho tu sinceridad y tus consejos. Te estimo mucho.

A mi guerrera y asesora personal Ana Corachán, le doy las gracias por su siempre 'objetividad política' acerca de cualquier tema, pero sobre todo por la firmeza y convicción con la que elogias y motivas a los demás, porque resaltas lo bueno y te llega de pleno. Gracias también por los momentitos personales y familiares que hemos compartido, porque han sido vía de escape en el trabajo y por haber estado pendiente de mí y asesorarme en todo aun cuando ya no estaba ahí. Gracias por cuidarme tantísimo.

A mi luchadora Anna Buigues, un modelo a seguir, un ejemplo de superación en todos los aspectos de la vida. De ti he aprendido que la fuerza hay que sacarla de donde aún no la haya. Gracias por confiar en mí, por tu bondad, apoyo, amistad y cariño que me has dado siempre. ¡Eres grande, y créetelo!

A mi belga más latino favorito, Hannes Campo, gracias por tu carisma y simpatía y por las payasadas que me han hecho reír tanto. Gracias también por tu amistad y el cariño que he recibido de ti. Has sido mi compañero de mesa durante bastante tiempo, al que he acariciado y cogido la mano cuando lo he necesitado. ¡Gracias my friend!

A Stefania, gracias por recibirme y acogerme a mi llegada a FIVI y por haberme enseñado tantas cosas. De ti he aprendido muchas cosas, más de las que te piensas y admiro la predisposición y valentía con la que afrontas cualquier reto. Como se dice en España: “sabes coger al toro por los cuernos”.

En mis agradecimientos no podía faltar el ‘trío La La La’ más carismático de FIVI compuesto por Ali, Horten y Amparo. Cada una por separado ya abarcan mucho pero juntas contagian alegría y felicidad. Ali, mi técnico de laboratorio favorita nº1, gracias por supervisarme y ayudarme en todo momento y por aconsejarme siempre con una sonrisa en la cara. Horten, mi querida ‘compi’ de inglés de los inicios y amiga del corazón. Contigo he empatizado de una manera especial y nos hemos reído mucho de mis frases célebres como: “el consumo de yogur preferentemente por la noche”, o “estamos todas, porque somos todas las que estamos”... Gracias por tu dulzura, ánimos y por sacarme una sonrisa siempre. Amparo, tú eres mi técnico de laboratorio favorita nº2, pero la primera en cuanto a ‘ligeros TOCs’. De ti he aprendido la meticulosidad y organización en el trabajo. Gracias por mantener siempre el orden en el laboratorio, por volcarte cuando he pedido y he necesitado tu ayuda y por el cariño que he recibido de ti.

Gracias también a las ‘Patris’ de FIVI, Patricia Díaz y Patricia Sebastián, por la ayuda y supervisión recibida en este trabajo. Vuestros comentarios y consejos han enriquecido los resultados de esta tesis. Gracias también por esos trayectos en coche, independientemente con una u otra y por las confidencias compartidas. Sobre todo muchas gracias por el apoyo y el cariño que me habéis dado. Gracias también a ti, Almudena, por la ayuda prestada, por tu disponibilidad y por los momentos compartidos.

Agradezco también a la “New Generation de FIVI”, Lucía, Luismi, Majo, Sara, Andrea, María, Jessi y Pepi, por todos los momentos compartidos y por hacer mi día a día mucho mejor. A mi pequeña gran Lucía, gracias por los trayectos en bus y por los ratitos compartidos en cultivos y almuerzos, porque los “bizcochos saben mejor con un vaso de leche”. Gracias por tu madurez, serenidad y cariño. Luismi y Majo, muchas gracias a ambos por ser tal como sois y por vuestro cariño. Luismi gracias por escucharme cuando lo he necesitado. Majo, tú eres la voz de FIVI, gracias por esos piropos o palabras bellas que te alegran las mañanas. Sara, un

torbellino de impetuosidad controlable. Gracias por tu personalidad y por los momentos tan buenos que nos has brindado. Andrea, fuiste la última en llegar a mi grupo de trabajo, pero has sido un gran apoyo de verdad, gracias por tu gran trabajo y tu compañerismo. María, gracias por tu serenidad y por tu lado de locura que te sale al juntarte con Jessi, por alegrarme los días y por los momentos compartidos. Jessi, tu eres mi técnico de laboratorio favorita nº3, pero la primera en locura y felicidad. Aunque contigo también he compartido mi etapa final, la verdad que tienes un carisma que alegra y contagia a todos. Gracias por ofrecerme siempre tu ayuda y por alegrarme muchos días con tu simpatía y cánticos. Nunca me olvidaré de esta estrofa que un día tarareabas en el laboratorio 'me voy a tirar del avión para llamar tu atención'... Pepi, tú eres pura alegría, gracias por tu generosidad a la hora de repartir cariño a todo el mundo, y por tu don de gentes, porque sabes hacer sentir que para ti todo el mundo es importante. Gracias también a María Cristina y a Yassmin, porque a pesar del poco tiempo compartido también han sido un gran apoyo para mí y han captado parte de mi cariño. Os deseo lo mejor en esta etapa. Tampoco me olvido de aquellos que pasaron temporalmente por motivos de prácticas o estancias por FIVI, como Gaby y Zahara, por haberme brindado su cariño y haber compartido su cultura, ni de aquellos que un día fuimos Fundación IVI-Igenomix (Alessia, Marta, Nuria B, María, Almudena, Melo, Irene, Iolanda y David) porque también habéis formado parte de esto.

Al resto de mi compañeros de FIVI, porque aunque me gustaría dedicaros unas palabras a todos, sois demasiados como para hacerlo. Escribiría otra tesis con sólo los agradecimientos. Sin embargo, colectivamente os doy a todos mil gracias porque en mayor o menor medida habéis estado ahí, y contribuido en mi paso por FIVI. Gracias a Pablo, a Alejandro, a Livia, a Indra, a Rosalba, a Sonia e Ismael; a los miembros de la UAGI (Alfredo, mi querida canaria Elena, Lorena la chica de los monos y ahora mi vecina del pueblo, Víctor, Guille, Alba, Regina y Davinia) por su gran trabajo y colaboración con los investigadores, especialmente a Alfredo por esos 'buenos días mañaneros' que despiertan a uno y por hacer de la estadística algo didácticamente entendible. Gracias también a Leo, Marcos, Inma y Carmen por la ayuda que me habéis prestado siempre. A Irene Cervelló, por su buena gestión del laboratorio y su siempre predisposición a escuchar y ayudar cuando lo necesitas. Gracias al director de FIVI, Nicolás Garrido, por su apoyo; a George Abbs, por sus divertidas clases de inglés y a mis compañeros de docencia (Alex, Luz, María y Loreto) con los que he compartido también divertidos momentos.

Fuera del ámbito de trabajo, también me gustaría agradecer a toda mi familia y mis amigos, simplemente por el hecho de estar siempre ahí y por quererme tanto. Gracias a mis amigas de toda la vida de Tenerife, mis 'superfriends' (Irene, Julia, Alejandra, Lucía R y Elena)

porque hemos crecido juntas, desde los 3 años hasta hoy, nos conocemos al dedillo y somos “todas para una y una para todas”. A mis amigas de Bioquímica, las ‘BQ’, (Lucía G, Susana, Cristina y Paloma), mi gran familia de Valencia, porque quedar con vosotras es siempre un placer, una recarga energética de pilas. Gracias por vuestro amor y apoyo incondicional y por todos los momentos bonitos que hemos vivido juntas. A mis amigas Fátima y Cristina, gracias por nuestras quedadas, viajes y experiencias vividas. Vuestro carisma, naturalidad y simpatía son un chute de aire fresco que reconforta. Sé que he estado un poco ausente pero gracias por estar ahí. Gracias a ti también María G, mi ex compi de piso, por la amistad que nos une y porque sé que siempre estarás ahí.

A mi ‘señorito’ Julio, gracias por un día habernos conocido, porque juntos formamos un buen tándem, hasta cuándo, no se puede saber, pero lo que sí sé es que me haces FELIZ. Gracias por tu apoyo, confianza y comprensión y por la estupenda familia que tienes, que me hacen sentir una más.

A mi querido yayo Manolo, el patriarca de la familia, mi gran referente en la vida. Gracias por tu sabiduría y por ese carisma y poder cautivador que te caracteriza, porque siempre has tenido unas bonitas palabras para tus nietos, una imaginación bárbara a la hora de entretenernos a todos nosotros de pequeños, y porque nos has enseñado el valor del amor en la familia. Gracias porque a tus 98 años aún te sigues preocupando por mí e interesándote por como tú las llamas “mis labores científicas”.

Finalmente y mi mayor GRACIAS, va dedicado a mis padres y a mi hermano Juanjo, por ser la mejor familia que he podido tener. Gracias papis por haberme educado como lo habéis hecho, por el amor que me dais siempre y por toda la felicidad compartida. Gracias a vosotros soy la persona que soy. Os quiero muchísimo, hasta el infinito y más allá.

GRACIAS A TODOS PORQUE ME HE SENTIDO MUY QUERIDA

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en los laboratorios de la Fundación IVI, gracias a la ayuda para la Formación de Profesor Universitario (FPU) de carácter predoctoral, del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU14/03136) y a las ayudas Acción Estratégica de Salud del Instituto de Salud Carlos III (PI 12/00450 y PI 17/00931). Agradecemos también al Servicio de Proteómica de la Universidad de Valencia (SCSIE), miembro de la Proteored, PRB3-ISCI, y apoyado por la subvención PT17/0019.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. El endometrio y el ciclo menstrual	4
2. Receptividad endometrial y decidualización	8
3. Estudio de la receptividad endometrial	11
3.1 Estudio de la receptividad endometrial. Era pre-ómicas	11
3.2 Estudio de la receptividad endometrial. La era de las -ómicas	16
4. Receptividad endometrial defectiva	31
4.1 Fallo de implantación recurrente (RIF). Definición y evolución del RIF de origen endometrial	31
4.2 Refractoriedad endometrial causada por un DIU (DIU de Cobre)	33
5. Proteómica cuantitativa. Aproximaciones	35
5.1 Métodos basados en espectrometría de masas o ‘shotgun proteomics’	38
6. El sistema endocrino y los disruptores endocrinos	43
7. Consecuencias en la fertilidad femenina por la exposición a EDCs	49
8. Metales pesados. Definición, fuentes de contaminación ambiental y exposición humana	51
8.1 Mecanismos de acción de los metales pesados sobre la salud humana	54
8.2 Metales pesados con capacidad EDCs sobre el sistema reproductor femenino	56
8.3 El cobre y el plomo, potenciales disruptores endocrinos	58
II. HIPÓTESIS	61
III. OBJETIVOS	62
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	63
1. Materiales y métodos parte I: estudio proteómico de la receptividad endometrial	63
1.1 Tamaño muestral y criterios de inclusión/exclusión.....	63
1.2 Diseño experimental	66
1.3 Metodología del iTRAQ	69
1.4 Enriquecimiento funcional de las proteínas diferencialmente expresadas y redes de correlación.....	72
1.5 Validación de tres proteínas diferencialmente expresadas del iTRAQ (PLSL, TRFL y LYSC) por western blot	73

1.6	Caracterización de la expresión de PLSL, TRFL y LYSC en tejido endometrial por inmunohitoquímica	75
1.7	Estadística.....	76
2.	Materiales y métodos parte II: El Cu y el Pb y su papel disruptor en la función endometrial.....	78
2.1	Reclutamiento de pacientes y recogida de muestras endometriales	78
2.2	Aislamiento y cultivo primario de células estromales y epiteliales endometriales humanas.....	78
2.3	Caracterización de la pureza/homogeneidad de las poblaciones celulares ESCs y EECs por medio de inmunofluorescencia de Vimentina, Citoqueratina 18 y CD45	80
2.4	Preparación de las soluciones de las sales metálicas de Cobre y Plomo	81
2.5	Ensayo de viabilidad celular en ESCs y EECs expuestas al Cu y Pb	82
2.6	Decidualización in vitro de ESCs primarias expuestas a cobre y plomo.....	83
2.7	Chequeo o comprobación del proceso de decidualización	84
2.8	Aislamiento celular del RNA y RT-qPCR de PRL, ER α , PR y HOXA10	86
2.9	Ensayos Ki67 y TUNEL de las ESCs tras el proceso de decidualización en presencia de Cu y Pb.....	88
2.10	Medición de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en ESCs expuestas a Cu y Pb (ensayo ROS)	89
2.11	Cultivo celular de los esferoides JAR y ensayo de adhesión	91
2.12	Ensayo de migración de las EECs (ensayo 'wound healing' o cicatrización de la herida)	92
2.13	Análisis estadístico	93
V.	RESULTADOS.....	95
1.	Resultados parte I: Estudio proteómico de la receptividad endometrial.....	95
1.1	El análisis iTRAQ desvela cambios en el número y la abundancia de las proteínas detectadas en las diferentes condiciones endometriales (mujeres fértiles, pacientes con RIF y mujeres portadoras de un DIU-Cu).....	95
1.2	Validación por western blot de la plastina 2, lisozima y lactotransferrina:	99

1.3	El análisis proteómico cuantitativo del iTRAQ muestra perfiles proteómicos diferenciales en RIF frente a DIU, y en Fértil frente a DIU, pero no en RIF frente a donantes fértiles	102
1.4	El análisis funcional in silico muestra rutas KEGG específicas para las comparaciones Fértil frente a DIU y RIF frente a DIU	114
1.5	Las redes de correlación de la PDEs para las comparaciones Fértil frente a DIU y RIF frente a DIU muestran nuevas asociaciones de proteínas.....	117
1.6	Inmunolocalización y caracterización de PLSL, LYSC y TRFL a través del ciclo endometrial	123
2.	Resultados parte II: El Cu y el Pb y su papel disruptor en la función endometrial.....	128
2.1	Análisis de la pureza de los cultivos primarios de ESCs y EECs procedentes de biopsias endometriales humanas	128
2.2	La exposición a Cu y Pb altera la viabilidad de las ESCs y EECs	130
2.3	La exposición a Cu y Pb inhibe la decidualización in vitro de las ESCs	131
2.4	El Cu y Pb alteran la expresión de los genes ER α , PR y HOXA10 durante el proceso de decidualización	135
2.5	La exposición a Cu y Pb incrementa de manera leve la apoptosis en dESCs	137
2.6	La exposición a Cu y Pb altera el estado proliferativo de las ESCs durante la decidualización.....	140
2.7	La exposición a Cu y Pb afecta a la adhesión trofoblástica de las EECs	143
2.8	La exposición a Cu y Pb altera la capacidad de migración de las EECs	143
2.9	La exposición a Cu y Pb no altera el estado ROS de las ESCs	145
VI.	DISCUSIÓN	147
1.	Discusión parte I: Estudio proteómico de la receptividad endometrial	147
1.1	Transcriptómica y proteómica, dos aproximaciones complementarias, pero no comparables en el estudio de la receptividad endometrial.....	147
1.2	La plastina 2, la lactotransferrina y la lisozima en el endometrio y sus posibles roles en la receptividad endometrial	150
1.3	La dualidad del RIF y las limitaciones del estudio	152
1.4	Ahondando en las rutas funcionales con potencial implicación en la receptividad endometrial.....	154

2. Discusión parte II: El Cu y el Pb y su papel disruptor en la función endometrial	158
VII. CONCLUSIONES	166
VIII. BIBLIOGRAFÍA	168
IX. ANEXOS	191

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
As	Arsénico
BPA	Bisfenol A
BSA	Bovine serum albumin (albúmina de suero bovino)
Cd	Cadmio
cDNA	Complementary DNA (ADN complementario)
Co	Cobalto
COX-2	Ciclooxigenasa 2
cPLA2α	Fosfolipasa A2
Cr	Cromo
CSF1	Colony stimulating factor-1 (factor estimulante de colonia 1)
Cu	Cobre
2D-DIGE	Bidimensional differential in gel electrophoresis (Electroforesis en gel diferencial bidimensional)
2DE	Bidimensional gel electrophoresis (Electroforesis en gel bidimensional)
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole (4',6-Diamino 2-Fenil-indol)
DC	Día del ciclo
DCFDA	2',7'-diclorofluoresceína diacetato
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DEHP	Di(2-etilhexil) ftalato
DES	Diestrilbestrol
dESCs	Decidualized endometrial stromal cells (células endometriales estromales decidualizadas)
DIU	Dispositivo intrauterino
DIU-Cu	DIU de cobre
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco)
DO	Día de la ovulación
dUTP	Deoxyuridine Triphosphate (deoxiuridina trifosfato)
E2	Estradiol, 17 β -estradiol
EDCs	Endocrine-Disrupting Chemicals (disruptores endocrinos)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etilendiaminotetraacético)

EECs	Endometrial epithelial cells (células endometriales epiteliales)
EGF	Epidermal growth factor (Factor de crecimiento epidérmico)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
EPA	Environmental Protection Agency (agencia de protección mediambiental de Estados Unidos)
ERA	Endometrial receptivity array (Array de receptividad endometrial)
ER_α/ER1	Estrogen receptor alpha/1 (Receptor de estrógeno alFA/Receptor de estrógeno 1)
ES	Early secretory phase (fase secretora temprana)
ESCs	Endometrial stromal cells (células endometriales estromales)
ESI	Electrospray ionization (ionización por electrospray)
FA	Formic acid (ácido fórmico)
F-actin	Filamentos de actina
FDR	False discovery rate (tasa de falsos positivos o tasa de descubrimientos falsos)
Fe	Hierro
FIV	Fecundación <i>in vitro</i>
FSH	Follicle-stimulating hormone (Hormona folículo estimulante)
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa)
Genes HOX	Genes homeobox
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone (Hormona liberadora de gonadotropina)
GO	Gene Ontology
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HB-EGF	Heparin-binding epidermal growth factor (Factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina)
hCG	Human chorionic gonadotropin (gonadotropina coriónica humana)
Hg	Mercurio
HPLC	High performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta eficacia)
IARC	International agency for research on cancer (agencia internacional para la investigación del cáncer)
ICAT	Etiqueta de afinidad codificado por isótopo
IEF	Isoelectroenfoque

IGFBP-1	Insulin-like growth factor binding protein 1 (Proteína 1 de unión al factor de crecimiento tipo insulina)
IHC	Immunohistochemistry (Inmunohistoquímica)
IL-11	Interleuquina 11
IL-8	Interleuquina 8
IMC	Índice de masa corporal
IPG	Immobilized pH gradient (gradiente de pH inmovilizado)
iTRAQ	Isobaric tags for relative and absolute quantitation (etiquetas isobáricas para la cuantificación relativa y absoluta)
KEEG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
LH	Luteinizing hormone (Hormona luteinizante)
LH+7	Día 7 después del pico de LH
LIF	Factor inhibidor de leucemia
LYSC	Lisozima
m/z	Relación masa/carga
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of fly (ionización por desorción laser asistida en matriz - tiempo de vuelo)
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
Mg	Magnesio
MMP-2	Metaloproteinasa 2
MMTS	Metil metanotiosulfonato
MP	Midproliferative phase (fase proliferativa media)
mRNA	messenger ribonucleic acid (ARN mensajero)
MS	Mass spectrometry (espectrometría de masas)
MTX	Metoxicloro
ndESCs	Non-decidualized Endometrial stromal cells (células endometriales estromales no decidualizadas)
NGS	Normal goat serum (suero normal de cabra)
Ni	Níquel
OD	Optical density (densidad óptica)
OMS	Organización mundial de la salud
P+5	Quinto día de la administración de progesterona
P4	Progesterona
Pb	Plomo

PBDE	Polibromodifenil éteres
PBS	Phosphate buffered saline (tampón fosfato salino)
PBS-T	Phosphate buffered saline with tween 20 (solución salina tamponada con fosfato-tween)
PCA	Principal component assay (análisis de componentes principales)
PCBs	Policlorobifenilos
PDEs	Proteínas diferencialmente expresadas
PFA	Paraformaldehído
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGS	Preimplantational genetic screening (Cribado genético preimplantacional)
pi	Punto isoeléctrico
PKA	Proteína quinasa A
PLSL	Plastina 2
PMF	Huella peptídica
PR	Progesterone receptor (Receptor de progesterona)
PRL	Prolactina
PVDF	Polyvinylidene difluoride (fluoruro de polivinilideno)
QqTOF	Analizador triple cuadruplo/TOF
RIF	Recurrent implantation failure (fallo de implantación recurrente)
ROS	Reactive oxygen species (especies reactivas del oxígeno)
RT-qPCR	Real time-quantitative polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real)
SBF	Suero bovino fetal
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio)
Se	Selenio
SILAC	Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (etiquetado isotópico estable por aminoácidos en cultivo celular)
SVM	Support vector machine (aprendizaje automático)
TBHP	Tert-butyl hydroperoxide (Peróxido de tertbutilo)
TCA	Tricloroacetic acid (ácido tricloroacético)
TCDD	Tetracloro dibenzodioxina
TCEP	Tris(2-carboxietil)fosfina
TEAB	Triethylammonium bicarbonate (tampón bicarbonato de trietilamonio)
TFA	Trifluoroacetic acid (ácido trifluoroacético)

TRA	Técnicas de reproducción asistida / Tratamientos de reproducción asistida
TRFL	Lactotransferrina
TRH	Terapia de reemplazo hormona
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labelling (Etiquetado de los extremos de las mellas por medio de la deoxiribonucleótido transferasa de dUTP)
WB	Western blot
WOI	Window of implantation (ventana de implantación)
Zn	Zinc

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1	El útero y partes del endometrio	4
Figura 2	Fases del ciclo endometrial y su regulación hormonal	7
Figura 3	Esquema del proceso de decidualización	10
Figura 4	Criterios de Noyes	13
Figura 5	Patrón de expresión de las integrinas $\alpha 1$, $\beta 3$ y $\alpha 4$ durante el ciclo menstrual	15
Figura 6	Aproximaciones para el descubrimiento de marcadores para la receptividad endometrial	17
Figura 7	El perfil transcriptómico endometrial a lo largo del ciclo menstrual	22
Figura 8	Determinación personalizada de la ventana de implantación con la herramienta ERA	23
Figura 9	La complejidad del proteoma	25
Figura 10	Aproximaciones proteómicas	37
Figura 11	Partes del reactivo iTRAQ	42
Figura 12	Pasos de un experimento de iTRAQ	43
Figura 13	Estructura química de los principales EDCs y del estrógeno natural, 17β -estradiol	45
Figura 14	Ejemplos de curvas dosis-respuesta	48
Figura 15	Esquema de las fuentes de exposición y vías de entrada en los seres humanos	53
Figura 16	Esquema de la inducción de estrés oxidativo por parte de los metales pesados, al alterar el equilibrio celular entre la producción de ROS y la de antioxidantes	55
Figura 17	Esquema gráfico del diseño experimental de la preparación de muestras, análisis e interpretación de los datos proteómicos para la cuantificación iTRAQ	68
Figura 18	Esquema de la obtención y separación de las ESCs y EECs a partir de biopsias endometriales por sedimentación gravitacional y ensayos funcionales llevados a cabo con cada fracción celular	80
Figura 19	Diagrama para el ensayo MTS para las ESCs y para las EECs expuestas a Cu y Pb	83
Figura 20	Diagrama para el ensayo de decidualización in vitro de las ESCs en presencia de Cu y Pb	84
Figura 21	Diagrama para el ensayo ROS en ESCs expuestas a Cu y Pb	90
Figura 22	Diagrama para el ensayo de adhesión trofoblástica sobre monocapa de EECs expuestas a Cu y Pb	92
Figura 23	Diagrama para el ensayo de 'Wound Healing' con EECs expuestas a Cu y Pb	93
Figura 24	Normalización por el método de los cuantiles para los valores de abundancia de las 1.889 proteínas	96
Figura 25	Corrección del 'batch effect'	98
Figura 26	Análisis PCA de los perfiles endometriales de expresión proteica para las condiciones Fértil, DIU y RIF	99
Figura 27	Resultados de los Fold changes del iTRAQ para la PLSL, TRFL y LYSC	100
Figura 28	Validación de la Plastina 2 (PLSL) por western blot	101

Figura 29	Validación de la Lactotransferrina (TRFL) por western blot	101
Figura 30	Validación de la Lisozima (LYSC) por western blot	102
Figura 31	Diagrama de Venn para la comparación de las proteínas diferencialmente expresadas identificadas en ambas comparaciones Fértil frente a DIU y RIF frente a DIU	111
Figura 32	Análisis funcional KEGG de las comparaciones de los grupos Fértil y RIF frente al de mujeres con DIU	115
Figura 33	Diagrama de Venn para el análisis funcional KEGG	116
Figura 34	Red funcional integrada para las rutas KEGG significativas obtenidas en las comparaciones Fértil frente a DIU y RIF frente a DIU	117
Figura 35	Redes de correlación para las condiciones Fértil y DIU generadas a partir de las 133 PDEs de la comparación Fértil frente a DIU	119
Figura 36	Redes de correlación para las condiciones endometriales DIU y RIF generadas a partir de las 158 PDEs de la comparativa RIF frente a DIU	120
Figura 37	Red de correlación para la condición DIU en base a la categoría 'procesos biológicos' del Gene Ontology (GO) para la comparativa Fértil frente a DIU	122
Figura 38	Red de correlación para la condición DIU en base a la categoría 'procesos biológicos' del Gene Ontology (GO) para la comparativa RIF frente a DIU	123
Figura 39	Inmunolocalización de la plastina 2 a través del ciclo endometrial	125
Figura 40	Inmunolocalización de la lisozima a través del ciclo endometrial	126
Figura 41	Inmunolocalización de la lactotransferrina a través del ciclo endometrial	127
Figura 42	Análisis por inmunofluorescencia de la pureza de los cultivos primarios de EECs y ESCs	129
Figura 43	Efecto del Cu y Pb sobre la viabilidad de las ESCs y EECs	131
Figura 44	La decidualización in vitro de las ESCs se ve inhibida en presencia de Cu y Pb	133
Figura 45	Disposición de los filamentos de actina del citoesqueleto de las ndESCs y dESCs en presencia de Cu y Pb	134
Figura 46	Efecto de la exposición al Cu y Pb sobre la expresión génica de los receptores esteroideos (ER α y PR) y del gen HOXA10 durante la decidualización	136
Figura 47	Análisis de la apoptosis en ESCs expuestas a Cu o Pb durante la decidualización por medio de un ensayo TUNEL	138
Figura 48	Apoptosis en ESCs expuestas a Cu o Pb durante la decidualización por medio de un ensayo TUNEL	139
Figura 49	Inmunocitoanálisis del marcador de proliferación nuclear fluorescente Ki67 para el estudio del estado proliferativo de las ESCs expuestas a Cu y Pb durante la decidualización	141
Figura 50	Estudio del estado proliferativo de las ESCs expuestas a Cu y Pb durante la decidualización mediante el marcador de proliferación celular fluorescente Ki67	142
Figura 51	La exposición a Cu y Pb afecta a la adhesión de los esferoides JAR a las EECs	143
Figura 52	Efecto del Cu y Pb en la reconstrucción/cicatrización de la capa epitelial endometrial	144
Figura 53	Medición de la producción de ROS en ESCs expuestas a Cu o Pb	146

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1	Marcadores moleculares y celulares de la receptividad endometrial	15
Tabla 2	Lista de trabajos de transcriptómica endometrial en medicina reproductiva	19-21
Tabla 3	Análisis proteómicos de tejido endometrial humano en distintas fases del ciclo menstrual	27-30
Tabla 4	Principales usos y fuentes de exposición de los EDCs	46
Tabla 5	Efectos de los EDCs en el sistema reproductivo femenino (modelo animal)	50-51
Tabla 6	Efectos de los EDCs en el sistema reproductivo femenino (modelo humano)	51
Tabla 7	Características clínicas de las pacientes del estudio	65-65
Tabla 8	Primers usados para la RT-qPCR	88
Tabla 9	133 proteínas diferencialmente expresadas para la comparación Fértil frente a DIU	103-106
Tabla 10	158 proteínas diferencialmente expresadas para la comparativa RIF frente a DIU	107-110
Tabla 11	54 proteínas diferencialmente expresadas comunes a DIU frente a Fértil y DIU frente a RIF	111-113

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La implantación embrionaria es el paso previo y crítico para el desarrollo de un embarazo y depende principalmente de tres factores: la calidad embrionaria, la receptividad del endometrio y la comunicación bidireccional entre ambas partes. Por un lado, el embrión debe ser viable y llegar en un estadio de desarrollo adecuado, de blastocisto temprano, a la cavidad uterina durante la ventana de implantación putativa (WOI, del inglés *Window of implantation*), único momento del ciclo endometrial en el que el endometrio es receptivo, quedando esta limitada a la fase secretora media. Posteriormente, el embrión y el endometrio necesitan llevar a cabo una compleja y sincronizada comunicación bidireccional en la que numerosas citoquinas, factores de crecimiento, proteínas, receptores y mediadores están involucrados, de la cual dependerá que el embrión implante o no. Si esta coordinación ocurre fuera de fase, la implantación falla o se vuelve defectiva. En humanos, este proceso falla de manera frecuente, presentando una tasa de embarazo espontánea (tasa de implantación por ciclo natural) baja de aproximadamente un 30%, y el 75% de los embarazos fallidos se considera que se deben a un fallo de implantación (Norwitz *et al.*, 2001). Parte de este fallo de implantación se atribuye principalmente a la elevada tasa de anomalías cromosómicas observadas en los embriones humanos (Munné, 2001). Sin embargo, un 15-30% de las mujeres infértiles son diagnosticadas con infertilidad de causa desconocida o idiopática, en el que la incidencia de factores ambientales, tales como el estilo de vida o exposición a químicos ambientales podrían tener un efecto relevante sobre la fertilidad y el estado de salud en general (Sharpe and Franks, 2002).

Diversos estudios han demostrado un impacto de contaminantes ambientales sobre la salud reproductiva humana, sugiriendo que químicos ambientales presentes en comida, agua, aire y productos de consumo pueden contribuir a una deficiente fecundidad (Thomas Zoeller *et al.*, 2012). Particular interés han recibido los llamados 'disruptores endocrinos' (EDCs, del inglés *Endocrine-disrupting chemicals*), que son compuestos exógenos, sintéticos o naturales, que pueden afectar a las rutas hormonales implicadas en el desarrollo y función de ambos sistemas reproductivos, masculino y femenino (Rogers *et al.*, 2013). Los EDCs tienen la capacidad de alterar la función endocrina a través de su interacción con los receptores hormonales, interfiriendo con la acción hormonal o por la alteración de la síntesis, transporte y metabolismo hormonal (Gore *et al.*, 2015). Concretamente, el consumo, inhalación y/o absorción de estos contaminantes ambientales puede afectar directamente al funcionamiento de los ovarios y testículos alterando la ovulación y calidad ovocitaria, así como la

espermatogénesis y calidad espermática. Dicha disrupción endocrina también se puede dar a nivel cerebral, afectando a los distintos ejes hipotalámicos-hipofisario-gonadal, adrenal o tiroideo, resultando en interacciones inmuno-endocrina-metaboloma-epigenoma, etc que pueden afectar no sólo a la función gonadal y de los gametos, sino también a la receptividad endometrial y otros aspectos del envejecimiento biológico, reduciendo la fertilidad (Hipwell *et al.*, 2019). Un grupo particular de EDCs lo conforman los llamados metales pesados, pues a diferencia del resto de EDCs, son los únicos elementos inorgánicos con capacidad disruptora endocrina hasta ahora conocida. También se les conoce con el nombre de ‘metaloestrógenos’ por la capacidad que tienen algunos de ellos de unirse al receptor de estrógeno y desencadenar una reacción estrogénica (Darbre, 2006). Además, estudios experimentales y epidemiológicos evidencian el impacto que tienen los metales pesados sobre la función ovárica, sobre el desarrollo embrionario, así como sobre la fertilidad y resultados reproductivos adversos.

A pesar de los avances en el entendimiento de la fertilidad y la superación de muchas deficiencias de fertilidad en humanos por medio de las técnicas de reproducción asistida (TRA), la tasa de implantación y el número de recién nacidos vivos sigue siendo baja (Andersen *et al.*, 2005). Los factores limitantes de la baja tasa de embarazo conseguida en los programas de fecundación *in vitro* (FIV) incluye: una pobre calidad embrionaria condicionada por una baja tasa de desarrollo embrionario a blastocisto en cultivo y por la alta tasa de aneuploidías, y por otro lado la transferencia de los mismos en un útero con un estado de receptividad desconocido en parte debida a la falta de marcadores fiables de receptividad endometrial para llevar a cabo dicha transferencia embrionaria (Nagaoka *et al.*, 2012).

Diversas mejoras y avances llevados a cabo en el campo de los protocolos de estimulación ovárica controlada, técnicas de fertilización y de cultivo embrionario junto con el estudio cromosómico/genético de los embriones por medio de técnicas como el “cribado genético preimplantacional” (PGS, del inglés *Preimplantational genetic screening*), han llevado a una optimización en el número y calidad de embriones euploides competentes disponibles para la transferencia embrionaria (Fanchin, 2001). Por el contrario, mejoras en la receptividad endometrial no ha llevado una evolución paralela y ha fallado en el beneficio de dichas mejoras, por lo que su alteración o desajuste representa probablemente una importante causa de las tasas subóptimas de implantación embrionaria observadas en los ciclos de FIV (Elnashar and Aboul-Enein, 2004), siendo éstas similares a las encontradas de manera espontánea en ciclos naturales.

Históricamente, tanto la receptividad endometrial como la calidad embrionaria han sido analizadas usando ensayos morfológicos, y la búsqueda de predictores de implantación/receptividad endometrial se ha centrado principalmente en el análisis de marcadores moleculares únicos o individuales. Últimamente ha habido y continúa habiendo un movimiento hacia técnicas más sofisticadas de gran escala y alto rendimiento, tales como ‘arrays’ o ‘chips’ de DNA y proteínas y espectrometría de masas (MS, del inglés *Mass spectrometry*) así como la aplicación de otras técnicas aplicadas a las ciencias –ómicas, desde la transcriptómica hasta la proteómica, pasando por la secretómica y la lipidómica. Dichas técnicas de alto rendimiento son capaces de monitorizar de manera rápida y eficaz pequeños cambios en los niveles de miles de diferentes genes y/o proteínas o metabolitos a la vez. Esto no solo permite el muestreo de muchos más candidatos moleculares potenciales, sino que también permite la identificación de perfiles moleculares característicos de una condición determinada, lo que se conoce como huella genética o proteómica. Esta estrategia puede ser particularmente relevante en el campo de la implantación ya que numerosos factores están implicados, muchos de los cuales tienen múltiples funciones, y dentro de los cuales existe potencialmente una amplia redundancia.

La presente tesis doctoral se engloba dentro de las líneas de investigación que utilizan la proteómica de expresión diferencial cuantitativa en el estudio de la adquisición de la receptividad endometrial durante la ventana de implantación. En esta tesis se abordará un estudio comparativo del perfil proteómico endometrial entre tres grupos: mujeres fértiles, mujeres con fallo de implantación recurrente (RIF, del inglés *Recurrent implantation failure*) y mujeres con un DIU (*Dispositivo intrauterino*) de cobre. Asimismo, también abordaremos el efecto que tienen ciertos disruptores endocrinos como los “metales pesados” en la receptividad endometrial. Concretamente se analizará el efecto del cobre y del plomo sobre la función endometrial, por ser éstos, dos metales con alta incidencia dentro del grupo de mujeres en edad reproductiva. El cobre por estar presente en los DIU de cobre (una de las condiciones endometriales incluidas en la primera parte de la tesis) y el plomo por estar presente entre otras fuentes de exposición en el tabaco, un hábito de consumo habitual. El trabajo realizado no sólo aporta novedades en el área de la proteómica endometrial gracias a la aplicación del marcaje peptídico mediante el uso de isótopos isobáricos estables (los de la tecnología iTRAQ), para comparar cuantitativamente las diferencias que existen a nivel de la expresión de proteínas entre endometrios con distinto estado de receptividad, sino también en el área de la disrupción endocrina de la receptividad endometrial mediada por la exposición a metales pesados.

1. El endometrio y el ciclo menstrual

El útero está compuesto principalmente por dos compartimentos: el endometrio y el miometrio. El endometrio es un tejido multicelular complejo altamente dinámico, con alto potencial regenerador y regulado hormonalmente, que se somete a una serie de cambios durante cada ciclo ovulatorio que lo hacen temporalmente susceptible a la implantación. El endometrio reviste al miometrio y comprende una capa funcional y otra basal. La capa funcional representa los dos tercios superiores del endometrio y es el sitio de proliferación, secreción y degradación, y se desprende cada mes de la capa basal durante la menstruación. La capa basal permanece unida al miometrio y queda intacta durante la menstruación sirviendo de base para la regeneración endometrial. Dentro del endometrio podemos distinguir entre epitelio luminal, epitelio glandular y estroma, este último formado principalmente por células fibroblásticas estromales, además de células inmunocompetentes y vasos sanguíneos (**Figura 1**). El número, actividad, estructura y función de estas células cambia a lo largo del ciclo menstrual y durante el embarazo (Diedrich *et al.*, 2007).

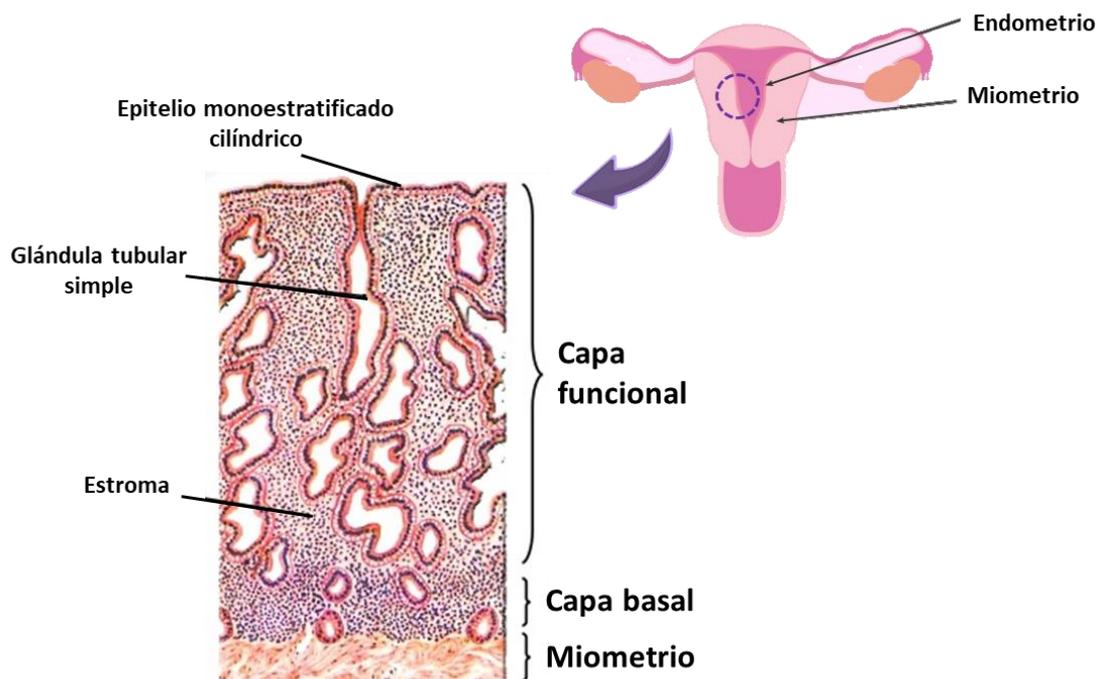


Figura 1. El útero y partes del endometrio. Hay dos capas uterinas principales, el miometrio y el endometrio. El miometrio es la capa muscular del útero y tiene la capacidad de expandirse durante el embarazo y de contraerse durante el parto. El endometrio es la capa mucosa que recubre la parte interna del útero, y su función principal es permitir la implantación del embrión. El endometrio está formado por dos compartimentos, el estromal, formado principalmente por células estromales de tipo fibroblasto que dan sostén al endometrio, y el epitelial formado por células epiteliales. Las células epiteliales pueden formar parte o bien del

epitelio luminal, en contacto con el lumen de la cavidad uterina, o bien formar parte de las glándulas secretoras (epitelio glandular). A nivel funcional el endometrio se encuentra dividido en dos capas, la capa basal y la capa funcional. En la basal se encuentran los vasos sanguíneos y las células madre que regeneran la capa funcional, y la capa funcional que crece durante el ciclo menstrual y se desprende en la menstruación. Imagen adaptada de la página web www.slideshare.net.

Durante el ciclo menstrual, el endometrio experimenta cambios cíclicos bajo la influencia de las hormonas ováricas entre los que destacan la reparación menstrual, proliferación y diferenciación secretora entre otras. Estos cambios son importantes para el desarrollo de la receptividad endometrial y para conseguir la implantación de un embrión competente. Concretamente, se pueden distinguir dos fases endometriales en función de la respuesta a las hormonas ováricas: una 'fase proliferativa o folicular' gobernada por la influencia de estrógenos, como el 17β -estradiol (E2) y otra 'secretora o lútea' dominada por la presencia de progesterona (P4). Los términos proliferativo y secretor vienen determinados por los cambios que experimenta el endometrio, y los términos folicular y lútea a los cambios que ocurren a nivel ovárico durante el ciclo menstrual.

En humanos, el ciclo menstrual comienza con la regla (día 28/día 0) o desprendimiento de la capa funcional. Primero tiene lugar la fase proliferativa (folicular), durante la cual tiene lugar el crecimiento de los folículos ováricos que incrementan los niveles de estrógeno conduciendo a la regeneración de la capa funcional como resultado de un aumento en la proliferación del epitelio, estroma y endotelio vascular. El incremento preovulatorio de 17β -estradiol conduce a una mayor proliferación y diferenciación de las células epiteliales uterinas (Norwitz *et al.*, 2001) haciendo que muchas glándulas asuman una morfología tortuosa durante la fase proliferativa tardía. Durante esta fase también se produce un incremento en los niveles de gonadotropinas pituitarias que a nivel ovárico desencadenan la foliculogénesis y selección del folículo dominante. A mitad de ciclo, se produce un pico de las gonadotropinas 'hormona folículo estimulante (FSH, del inglés *follicle-stimulating hormone*) y 'hormona luteinizante' (LH, del inglés *luteinizing hormone*) que desencadenan la ovulación en el día 14-15 del ciclo. Tras la ovulación, la fase secretora temprana (pre-receptiva) está marcada por el engrosamiento del endometrio, una disminución de los niveles de E2, y por la formación del cuerpo lúteo que secreta progesterona preparando al endometrio para la implantación. Dicha progesterona actúa a nivel endometrial promoviendo por un lado la secreción activa de glicoproteínas y péptidos a la cavidad endometrial por parte de las glándulas y por otro lado promoviendo la diferenciación de las células estromales (predecidualización) junto con un

aumento de la vascularización (edema endometrial) en preparación a la implantación (Hess *et al.*, 2006).

El endometrio durante la mayor parte del ciclo se mantiene en un estado de no receptividad. Sin embargo, éste se vuelve receptivo de manera natural en cada ciclo menstrual, independientemente de que haya o no un embrión presente. Dicha receptividad es alcanzada 5-10 días después de la ovulación, sólo durante un periodo limitado de tiempo, de alrededor de 4 días (días del ciclo 20-24), durante la fase secretora media, alcanzando su máximo aproximadamente siete días después del pico de LH (LH+7) (Fanchin, 2001). Es en esta fase donde el endometrio alcanza su pico de actividad secretora, que junto al incremento de los niveles de E2 y de P4 definen la 'ventana de implantación'. En ausencia de un embrión viable, y por tanto de la producción de hormona gonadotropina coriónica (hCG, del inglés *human chorionic gonadotrophin*) procedente del trofoblasto, la ventana de receptividad transita de manera espontánea a una fase refractaria o post-receptiva (del día 24 al 28), el cuerpo lúteo degenera (luteólisis) resultando en una depleción en los niveles hormonales de estrógeno y progesterona con el subsiguiente desprendimiento de la capa funcional, reseteando de nuevo el ciclo (día 28/día 0) (**Figura 2**). Por el contrario, en presencia de un blastocito implantando, éste secreta hCG para mantener el cuerpo lúteo y la secreción de progesterona por parte de éste y así mantener el embarazo.

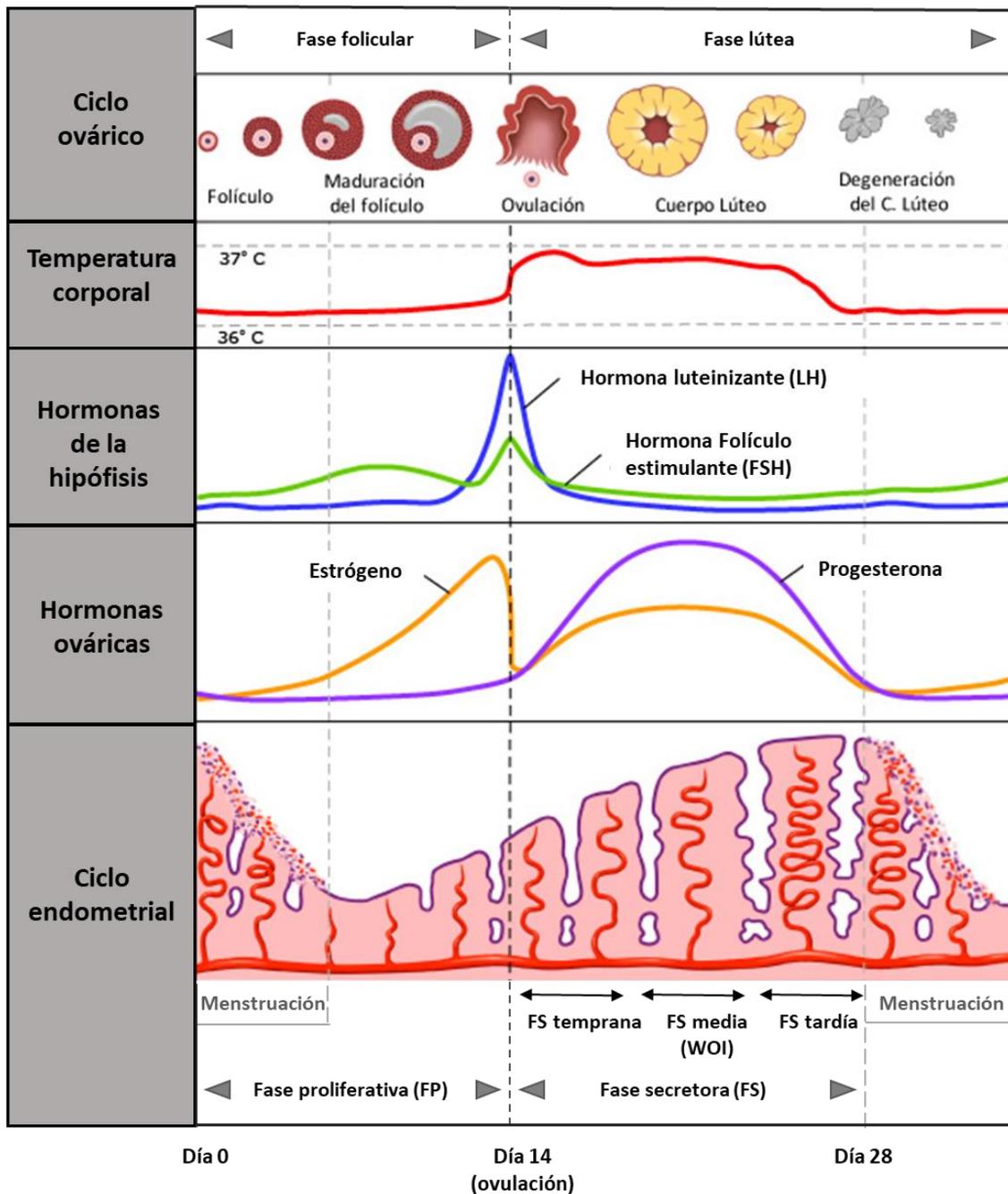


Figura 2. Fases del ciclo endometrial y su regulación hormonal. El ciclo menstrual comienza con la regla y termina el día anterior a la siguiente regla. Tiene una duración normal de 28 días, aunque puede variar entre 25-30 días. Conlleva una serie de cambios estructurales y funcionales, tanto a nivel ovárico como endometrial, los cuales están controlados básicamente por 4 hormonas: la FSH y LH, producidas por la glándula hipofisaria del cerebro, y el estradiol y progesterona, producidas por el ovario. El ciclo se divide en dos fases, la fase proliferativa o folicular y la fase secretora o lútea, separadas por la ovulación. La fase lútea es relativamente constante, con una duración de 14 días. La variabilidad del ciclo, por lo tanto, se debe a la duración de la fase folicular que es de 10-16 días. En la primera de ellas, la hormona principal es la FSH, que estimula el crecimiento y maduración de los folículos ováricos y en consecuencia de ello, el folículo en crecimiento libera estradiol, necesario para el crecimiento de la capa endometrial. La ovulación ocurre tras el pico de LH, aproximadamente el día 14 del ciclo. Tras la ovulación se forma el cuerpo lúteo, que secreta progesterona, hormona predominante en la

segunda fase del ciclo y que es la responsable de preparar al endometrio para la implantación. Si no hay implantación el cuerpo lúteo degenera y con la bajada de los niveles hormonales se desencadena de nuevo la menstruación y comienza el ciclo otra vez. Figura adaptada de la página web www.smaciac.wordpress.com.

2. Receptividad endometrial y decidualización

La 'receptividad endometrial' se define como una secuencia temporal y espacial única de factores que permiten que se dé una implantación embrionaria satisfactoria. Por otro lado, la 'ventana de implantación' es el periodo de tiempo durante el cual el endometrio es óptimamente receptivo a la implantación de un blastocisto (Bergh and Navot, 1992) que como ya se ha comentado en el apartado anterior, dura aproximadamente 4 días, entre los días 20 y 24 del ciclo.

Durante la adquisición de la receptividad endometrial se producen numerosos cambios moleculares, bioquímicos y estructurales a nivel endometrial tanto en el epitelio luminal y glandular como en el compartimento estromal, y también a nivel de la vasculatura y en el fenotipo de la población de leucocitos que migran hacia el endometrio. Uno de los cambios que se dan en el compartimento estromal es el proceso de decidualización, que implica una diferenciación funcional y morfológica de las células endometriales estromales (ESCs, del inglés *endometrial stromal cells*) necesaria para el establecimiento del embarazo. Dicho proceso, ocurre de manera rutinaria en cada ciclo menstrual durante la fase secretora media y tardía, con el incremento de los niveles de progesterona, y es independiente de la presencia o ausencia del embrión. En presencia de un embrión que implante, este proceso continúa a lo largo del embarazo ya que las células ESCs decidualizadas formarán la decidua o parte materna de la placenta. Es un proceso progresivo, que se inicia primero alrededor de las arterias espirales de la capa endometrial superficial y continúa en el embarazo implicando a todo el endometrio (Gellersen *et al.*, 2007).

Durante el proceso de decidualización las ESCs experimentan un gran cambio morfológico caracterizado por la una diferenciación o transformación de tipo mesenquimo-epitelial, en el que las ESCs pasan de tener una morfología alargada tipo fibroblasto, a una morfología más redondeadas tipo epitelial y un fenotipo secretor (Gellersen and Brosens, 2003). Este fenotipo secretor tipo epitelial que adquieren las ESCs decidualizadas se caracteriza por presentar un núcleo más grande y redondeado, un mayor número de nucléolos, un citoplasma más expandido, gránulos de secreción densos, acumulación citoplasmática de gotas lipídicas y de glucógeno y la expansión del retículo endoplasmático rugoso y del aparato de

Golgi (Gellersen and Brosens, 2014). Dentro de los principales productos secretados por las células ESCs decidualizadas se encuentra la prolactina (PRL) y la proteína 1 de unión al factor de crecimiento tipo insulina (IGFBP-1, del inglés '*insuline-like growth factor binding protein 1*'), dos proteínas que se han utilizado ampliamente como marcadores fenotípicos de decidualización (Gellersen and Brosens, 2003) (**Figura 3**). A parte de esto, las células decidualizadas también producen una gran cantidad de citoquinas (p. ej, interleuquina 11, IL-11), factores de crecimiento (p. ej, el factor de crecimiento epidérmico, EGF; el factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, HB-EGF), el factor de determinación izquierda-derecha Lefty-A, neuropéptidos (p. ej, somostatina), entre otros y sirven para ayudar a propagar el proceso decidual de manera autocrina o paracrina. A parte de esto, la decidualización implica una reprogramación completa de muchas funciones celulares incluyendo el remodelado de la matriz extracelular y del citoesqueleto, la respuesta al estrés, la respuesta inflamatoria, la progresión del ciclo celular, el metabolismo y la apoptosis (Okada *et al.*, 2005).

La decidualización ocurre en respuesta a niveles elevados de hormonas esteroideas ováricas, estradiol (E2) y progesterona (P4) (Wetendorf and DeMayo, 2012). El estradiol juega un papel importante en la expresión del receptor de progesterona (PR), que permite al endometrio responder a la progesterona en la fase secretora (Hamilton *et al.*, 2014). La progesterona es un factor clave en el establecimiento y mantenimiento del embarazo, ya que sus niveles circulantes aumentan durante la fase secretora del ciclo menstrual y se mantienen elevados durante el embarazo. Sin embargo, la decidualización es también un proceso dependiente del adenosín monofosfato cíclico (AMPC), un segundo mensajero cuyos niveles intracelulares están incrementados de manera natural en el endometrio durante la fase secretora (Tanaka *et al.*, 1993), y actúa sensibilizando a las ESCs a la progesterona (Brar *et al.*, 1997). Tratamientos con sólo progesterona o en combinación con E2 fueron capaces de inducir la decidualización de las ESCs en cultivo, con el cambio morfológico y secreción de PRL (Brar *et al.*, 1997; Brosens *et al.*, 1999), pero éste requirió de al menos 10-12 días de estimulación. Por otro lado, el AMPC fue capaz de inducir por sí sólo la decidualización de cultivos primarios de ESCs induciendo la expresión de los marcadores PRL e IGFBP-1, incluso en un corto periodo de tiempo inferior a 3 días (Gellersen and Brosens, 2003) pero no fue capaz de mantener el fenotipo decidual más allá de 6 días. Sin embargo, el tratamiento conjunto con progestina (un análogo de la progesterona) no sólo incrementó la expresión de PRL sino que también mantuvo el fenotipo decidual de manera prolongada (Gellersen and Brosens, 2003), indicando

que la señalización del AMPc incrementa la capacidad de las ESCs de responder a la progesterona en cuanto a la expresión de marcadores de decidualización se refiere.

La progesterona y el AMPc actúan por rutas diferentes, la progesterona por medio de la unión a su receptor nuclear (PR) regulando la expresión de genes de respuesta a la progesterona, y el AMPc, un segundo mensajero que mediante la activación de la proteína quinasa A (PKA) es capaz de inducir la expresión de factores de transcripción como FOXO1, C/EPB β , y STAT5, capaces de interactuar con el PR y con el promotor del gen de la PRL. Así, la manera de poder explicar esta sensibilización a la progesterona por medio del AMPc, es a través de la formación de un complejo transcripcional complejo entre el PR y diversos factores de transcripción capaces de modular la función del PR (Gellersen and Brosens, 2003).

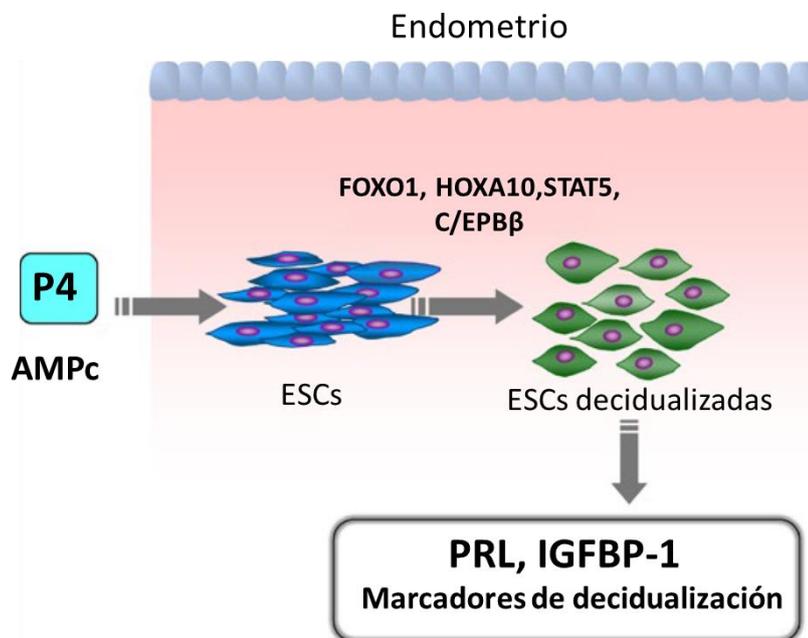


Figura 3. Esquema del proceso de decidualización. La progesterona (P4), junto con proteínas que son reguladas por la progesterona y/o el adenosín monofosfato cíclico (AMPc), incluyendo a forkhead box O1 (FOXO1), homeobox A10 (HOXA10), STAT5 y C/EPB β , forman un complejo transcripcional necesario para la decidualización de las células endometriales estromales (ESCs). La decidualización implica una compleja diferenciación funcional y morfológica y conlleva la expresión de factores específicos de la decidua y marcadores de decidualización, tales como la prolactina (PRL) y la proteína 1 de unión al factor de crecimiento tipo insulina (IGFBP-1). Figura adaptada del artículo (Okada *et al.*, 2018).

En base a esto, los protocolos más comúnmente utilizados para la decidualización *in vitro* implican el tratamiento de células con 1) estradiol y progesterona o un análogo de la progesterona, 2) un factor inductor del AMPc o un análogo, o 3) una combinación de análogo

de AMPc y progesterona. En cuanto a la duración del tratamiento, éste varía mucho entre estudios, desde unas pocas horas a 10 días o más (Gellersen and Brosens, 2014).

A nivel funcional, la decidualización juega un papel esencial en regular la invasión del trofoblasto, así como en la protección del embrión frente al rechazo inmunológico materno además de proporciona un aporte nutricional para el desarrollo del embrión y formación de la placenta (Vinketova *et al.*, 2016). Tanto la PRL como el IGFBP-1, los dos principales proteínas secretadas por las ESCs decidualizadas, se cree que participan en muchas de estas funciones como estimular el crecimiento del trofoblasto y la invasión, evitar el rechazo inmune, modular la supervivencia de las células ‘natural killer uterinas’ además de promover la angiogénesis (Sharma *et al.*, 2016).

La decidualización es uno de los eventos más críticos y remarcables que ocurre en el endometrio humano durante la adquisición de la receptividad endometrial y embarazo, así que un defecto en dicho proceso, conlleva a una receptividad endometrial defectiva y por tanto a un fallo reproductivo y a desórdenes del embarazo (infertilidad, abortos recurrente, desórdenes uteroplacental) (Garrido-Gomez *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017). A pesar de los avances en las TRA, las tasas de implantación siguen estando muy por debajo del 100% de implantación ya que muchas parejas experimentan fallo de implantación incluso con embriones euploides de alta calidad. El fracaso del endometrio para alcanzar la receptividad es una causa de infertilidad, siendo un paso limitante para el éxito de las técnicas de reproducción asistida. Por eso, un medio potencial para mejorar las tasas de implantación tanto en ciclo natural como en ciclos de FIV implica la evaluación de la receptividad endometrial. Es así, que se ha invertido un gran esfuerzo en entender y caracterizar cómo funciona la receptividad endometrial, y en cómo podría ser usada como guía de diagnóstico del factor endometrial.

3. Estudio de la receptividad endometrial

La aparición de las tecnologías -ómicas ha marcado un antes y un después en el estudio de la receptividad endometrial, de tal forma que podemos distinguir dos etapas claves: la era pre-ómicas, basada en el estudio de marcadores morfológicos y/o marcadores moleculares y celulares únicos, y la era de las -ómicas, como la transcriptómica y proteómica, basadas en el estudio a gran escala de perfiles -ómicos endometriales a nivel global.

3.1 Estudio de la receptividad endometrial. Era pre-ómicas

3.1.1 Marcadores morfológicos

A. Dataje histológico de la receptividad endometrial: criterios de Noyes

En 1950 Noyes y colaboradores describieron aspectos morfológicos específicos de los diferentes compartimentos del endometrio a lo largo del ciclo menstrual (Noyes *et al.*, 1950, 1975), estableciendo una correlación aproximada entre la histología del endometrio y la fase del ciclo en la que se encuentra la biopsia endometrial. Concretamente establecieron 8 factores morfológicos para realizar este dataje histológico, aquellos que presentaron un cambio más notorio a lo largo del ciclo menstrual. Entre los factores evaluados se encuentran: la mitosis glandular, la pseudoestratificación de los núcleos, la vacuolización basal, la presencia de secreción, el edema estromal, la reacción pseudodecidual, la mitosis estromal y la infiltración leucocitaria (**Figura 4**). Tradicionalmente y durante más de 60 años, la receptividad endometrial ha sido evaluada histológicamente siguiendo los criterios de Noyes, llegándose a considerar una herramienta de diagnóstico para el dataje endometrial. Sin embargo, su precisión y relevancia funcional como predictor de la receptividad endometrial ha sido cuestionado en diversos estudios (Murray *et al.*, 2004; Myers *et al.*, 2004) por la falta de reproducibilidad y objetividad del mismo (variabilidad inter- e intraobservador). Además, se ha visto que la maduración histológica endometrial no siempre se correlaciona necesariamente con su grado de maduración funcional (Swiersz L and Giudice, 1997), ya que endometrios en fase lútea con una histología normal, acorde al día del ciclo en el que se ha hecho la biopsia, han mostrado tener una alteración en la expresión de ciertos marcadores bioquímicos claves de la receptividad endometrial (Lessey, 1997).

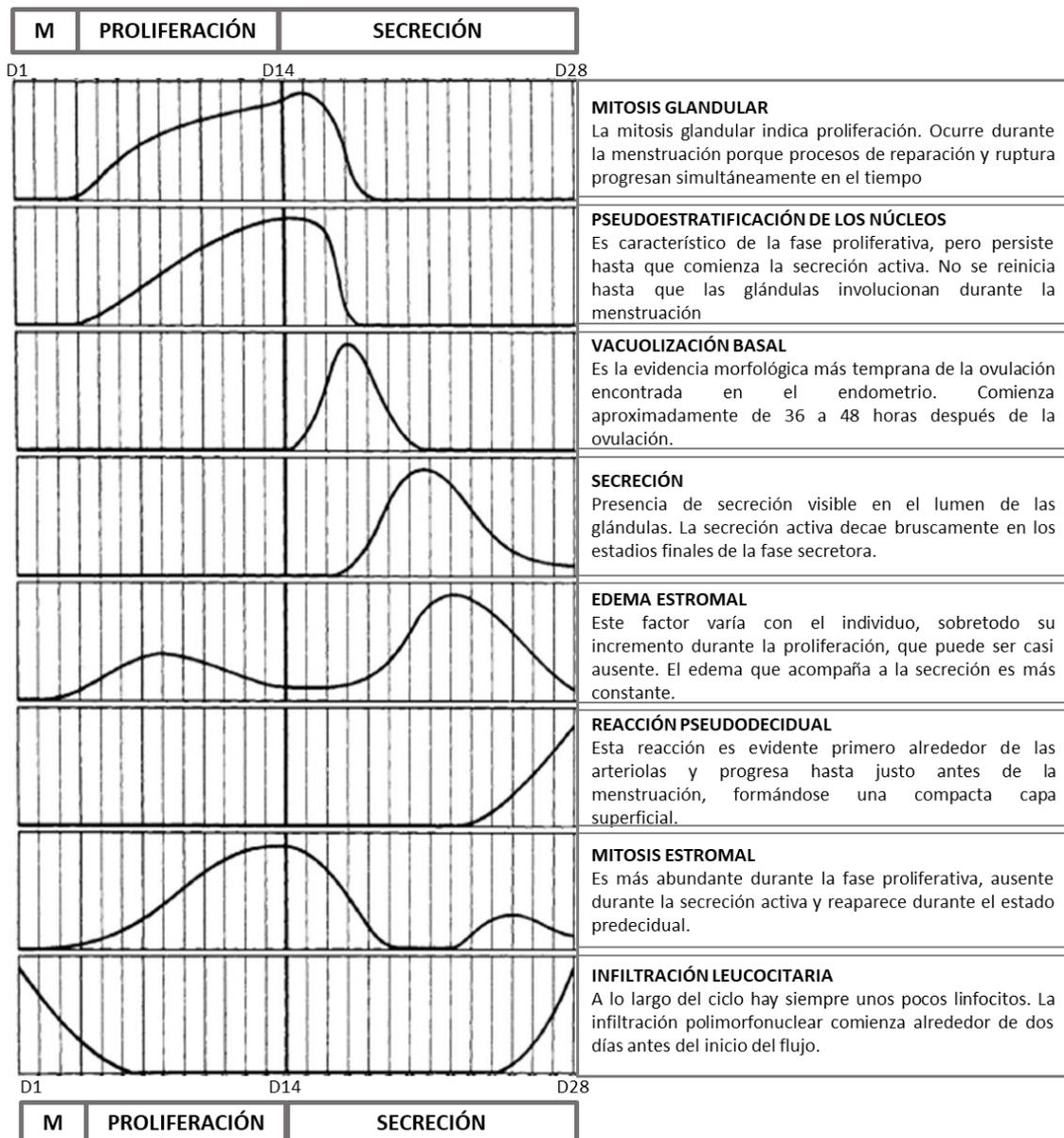


Figura 4. Criterios de Noyes. Este cuadro describe los 8 criterios morfológicos considerados más útiles para el dataje endometrial. Las curvas representan los cambios cuantitativos estimados a lo largo del ciclo menstrual de cada uno de ellos. Cada línea vertical se corresponde con un día del ciclo menstrual. M, menstruación. Figura adaptada del artículo (Noyes *et al.*, 1950).

B. Pinópodos

Los pinópodos son unas estructuras celulares a modo de protusiones globulares que aparecen en la superficie apical del epitelio luminal durante la fase secretora media como resultado de la fusión del microvilli existente en estas células. Se consideran un marcador de la receptividad endometrial ya que su aparición coincide con el incremento de los niveles de progesterona durante la ventana de implantación (días 20-24 del ciclo) (Nikas, 1999) y se ha

visto que su número se correlaciona con la implantación (Nikas and Makrigiannakis, 2003) y que podrían desarrollar un papel importante a la hora de facilitar el contacto entre el embrión y el endometrio (Enders and Nelson, 1973). Además se ha visto que los tratamientos hormonales aplicados durante las TRA pueden producir un desplazamiento del momento de su aparición (Nikas, 1999).

3.1.2 Marcadores moleculares y celulares

Numerosos estudios han investigado marcadores potenciales de receptividad endometrial como posible predictores de una implantación exitosa, ayudando a definir los mecanismos moleculares y celulares implicados en la implantación. Estos marcadores incluyen moléculas de adhesión celular, citoquinas, genes homeobox (HOX), factores de crecimiento, prostaglandinas y metaloproteinasas de la matriz extracelular y sus inhibidores. La mayoría de estos marcadores se expresan mayoritariamente durante la ventana de implantación, regulados o no por las hormonas esteroideas y desarrollan un papel relevante en la receptividad endometrial e implantación embrionaria.

Moléculas de adhesión endometrial

Incluye 4 familias principales: integrinas, cadherinas, selectinas y la superfamilia de las inmunoglobulinas. Las más estudiadas son las integrinas, que son glicoproteínas transmembranas implicadas en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular y contribuyen en la migración celular y transducción de señales (Lessey, 1994). Son proteínas heterodiméricas y están formadas por una subunidad α y otra β . El endometrio expresa tres integrinas con un patrón que coincide muy bien con la ventana de implantación: $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha_v\beta 3$, las cuales se co-expresan en el epitelio glandular sólo durante los días 20 al 24 del ciclo, correspondiéndose con la putativa ventana de implantación. Especial interés se ha mostrado en el estudio de la integrina $\alpha_v\beta 3$, pues su expresión se ha visto disminuida en mujeres con defecto en la fase lútea, con endometriosis y con infertilidad de causa desconocida (Lessey and Castelbaum, 1995; Lessey *et al.*, 1995; Garrido *et al.*, 2002). En general, las integrinas están consideradas entre los mejores marcadores descritos de la receptividad endometrial (Lessey, 1998) (**Figura 5**).

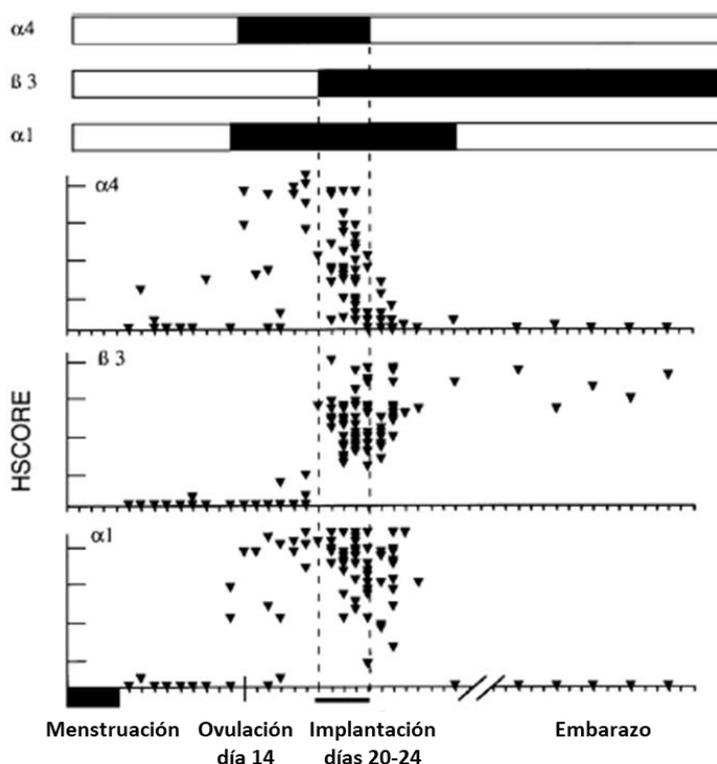


Figura 5. Patrón de expresión de las integrinas $\alpha 1$, $\beta 3$ y $\alpha 4$ durante el ciclo menstrual. Se observa el aumento de la expresión de tres integrinas durante la fase secretora coincidiendo con la ventana de implantación, ya que las tres son coexpresadas sólo durante los días 20-24 de un ciclo idealizado de 28 días. Figura adaptada del artículo (Lessey *et al.*, 1994)

En la siguiente tabla se recogen de manera resumida otros marcadores moleculares importantes en la receptividad endometrial.

Tabla 1. Marcadores moleculares y celulares de la receptividad endometrial

Tipo de marcador	Ejemplos	Funciones	Referencias
<u>Citoquinas y factores de crecimiento</u>	Citoquinas: CSF1, IL-8, MCP-1	Reclutamiento leucocitario, median unión del blastocisto	(Wood <i>et al.</i> , 1997)
	Citoquinas: LIF	Marcador de implantación, baja expresión en mujeres con aborto recurrente e infertilidad de causa desconocida	(Charnock-Jones <i>et al.</i> , 1994; Hambartsoumian, 1998)
	Factores de crecimiento: HB-EGF	Adhesión y desarrollo embrionario	(Tamada <i>et al.</i> , 1999)
<u>Genes Homeobox</u>	Factores de crecimiento: IGFBP-1	Marcador de decidualización	(Han <i>et al.</i> , 1996)
	HOXA10, HOXA11	Receptividad endometrial e implantación embrionaria	(Taylor <i>et al.</i> , 1998, 1999)
<u>Prostaglandinas</u>	COX-2, cPLA _{2α} , PGE ₂	Implantación	(Marions and Gemzell Danielsson, 1999)
<u>Proteasas e inhibidores de proteasas</u>	MMP-2	Invasión trofoblástica	(Turpeenniemi-Hujanen <i>et al.</i> , 1995)

CSF1, factor estimulante de colonia 1; IL-8, interleuquina 8; MCP-1, proteína quimioatrayente de monocitos 1; LIF, factor inhibidor de leucemia; HB-EGF, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina; IGFBP-1, proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina; COX-2, Ciclooxygenasa 2; cPLA_{2α}, fosfolipasa A₂ citosólica; PGE₂, prostaglandina E₂; MMP-2, metaloproteínasa 2.

Aunque muchos de estos marcadores moleculares y celulares han contribuido satisfactoriamente a un mejor entendimiento de la receptividad endometrial, la realidad es que su uso está lejos de tener una aplicabilidad clínica en el diagnóstico de la receptividad endometrial. Resulta poco probable que un único biomarcador sea suficiente para identificar un endometrio receptivo debido a la complejidad tanto de la infertilidad como de la propia individualidad. Todo apunta a la necesidad de un conjunto o cohorte de biomarcadores específicos de la receptividad endometrial, aunque su aplicabilidad clínica y validación suponga una dificultad.

3.2 Estudio de la receptividad endometrial. La era de las -ómicas

3.2.1 Introducción a las -ómicas y su importancia en la búsqueda de nuevos biomarcadores de receptividad endometrial

Dada la dificultad de encontrar marcadores únicos indicadores de la receptividad endometrial y por tanto a la imposibilidad de confeccionar de un test rápido y fiable de aplicación clínica para evaluar la receptividad endometrial, junto con el acuciante esfuerzo por encontrar la causa de la infertilidad idiopática (RIF idiopáticos o de origen desconocido) que tanto limitan el éxito reproductivo en los ciclos de FIV, se ha dirigido el foco de atención hacia una visión más holista, haciendo uso de las tecnologías -ómicas, como herramientas óptimas para identificar múltiples potenciales marcadores de receptividad con posible futura aplicabilidad clínica, a pesar de las dificultades que esto supondría en términos de validación.

El término de '-ómicas' se refiere a técnicas de alto rendimiento y análisis de datos masivos capaces de evaluar el perfil y cambios moleculares entre las condiciones de estudio. Estas tecnologías -ómicas son disciplinas que incluyen el estudio de eventos e interacciones de estructuras y procesos celulares que van desde el ácido desoxirribonucleico (DNA) hasta metabolitos integrados todos ellos de una manera global en los sistemas biológicos. Así, la 'epigenómica' es la ciencia que estudia los cambios heredables en la expresión génica sin que ocurra ningún cambio en la secuencia del gen (Waddington, 2012). La 'transcriptómica' estudia el conjunto completo de ácidos ribonucleicos (RNAs) transcritos o genes expresados por una célula o tejido. La 'proteómica' estudia los cambios en todas las proteínas expresadas y traducidas a partir de un genoma único (Katz-Jaffe and Gardner, 2008), la 'secretómica', una

variante de la proteómica, describe las proteínas producidas por las células y liberadas al medio que las rodea, y la 'metabolómica', estudia simultáneamente la concentración de metabolitos y sus fluctuaciones en un ambiente definido, como resultado del metabolismo celular. Muchas de estas -ómicas han sido o están siendo aplicadas en el campo de la reproducción asistida con el fin de descubrir nuevos biomarcadores que definan los rasgos moleculares óptimos de las células y tejidos implicados en la reproducción principalmente en espermatozoides, ovocitos, células de la granulosa, embriones y endometrio. La finalidad de dicha aproximación de sistemas biológicos es poder encontrar el mejor espermatozoide y ovocito fecundable, el mejor embrión que pueda implantar y dar lugar a un recién nacido vivo, y el mejor estado de receptividad endometrial para la implantación, para mejorar así los resultados reproductivos.

A nivel endometrial, la transcriptómica y la proteómica han sido las dos aproximaciones -ómicas aplicadas más recientemente y con más publicaciones en el estudio de la receptividad endometrial, sin dejar de lado la secretómica, que también ha tenido su papel en el descubrimiento de biomarcadores potenciales para el uso clínico (**Figura 6**). En los apartados siguientes de esta tesis abordaremos principalmente la aproximación transcriptómica y proteómica del estudio de la receptividad endometrial en biopsia endometrial y su repercusión en la diagnosis de la infertilidad.

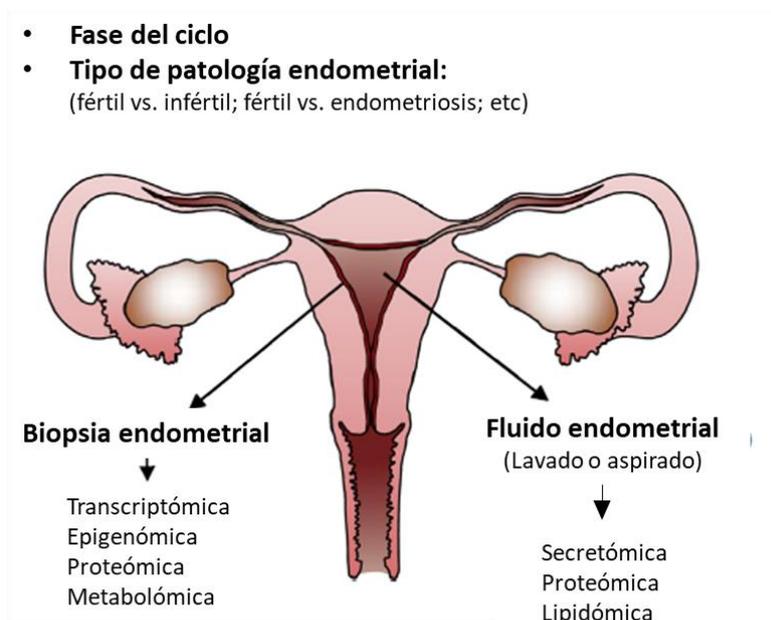


Figura 6. Aproximaciones para el descubrimiento de marcadores para la receptividad endometrial. Para el muestreo, ya sea de biopsia o fluido endometrial, debe de tenerse en cuenta tanto la fase del ciclo como el desorden endometrial. La aplicación de las -ómicas para

la realización de análisis diferenciales tiene el potencial de proporcionar una gran cantidad de marcadores para su posterior validación. Figura adaptada del artículo de (Edgell *et al.*, 2013).

3.2.2 Transcriptómica de la receptividad endometrial

Hasta la entrada de las –ómicas en el campo de la reproducción asistida, la evaluación histológica del endometrio basado en aspectos morfológicos siguiendo los criterios de Noyes había sido considerada la técnica estándar para la diagnosis clínica de la receptividad endometrial en las últimas décadas. Sin embargo, su precisión, reproducibilidad y utilidad clínica fue cuestionado en numerosos estudios (Murray *et al.*, 2004) por la variabilidad entre observador y su falta de objetividad.

Durante el último siglo, la receptividad endometrial ha sido estudiada desde distintos puntos de vistas (morfológicos, bioquímicos, moleculares y celulares), sin embargo, ninguno de los marcadores propuestos ha llegado a ser herramienta diagnóstica debido a su bajo valor predictivo (Lessey, 2011; Haouzi *et al.*, 2012). Además, muchos estudios, en su búsqueda por encontrar marcadores endometriales se han centrado en moléculas únicas o en familias de moléculas específicas (Lessey, 1998; Meseguer *et al.*, 2001), llegando a la conclusión de que una única molécula no es suficiente para describir un fenómeno tan complejo y multifactorial como es la receptividad endometrial.

La principal dificultad del tejido endometrial es que es un tejido altamente dinámico sujeto a numerosos cambios morfológicos y funcionales a lo largo del ciclo menstrual (Ruiz-Alonso *et al.*, 2012), pero poder determinar el perfil molecular de la ventana de implantación desde un punto de vista transcriptómico (huella o firma transcriptómica de la ventana de implantación), proporcionaría una herramienta objetiva y más precisa para diagnosticar la receptividad endometrial. Esto es ya es un hecho real, ya que en 2011 se desarrolló una herramienta transcriptómica clínicamente disponible, basada en microarrays, capaz de diagnosticar el estado de receptividad endometrial humana e incluso predecir patologías endometriales, siendo más robusta y precisa que los criterios de Noyes (Díaz-Gimeno *et al.*, 2011, 2013). Esta herramienta recibió el nombre de ERA, del inglés ‘*endometrial receptivity array*’ o array de receptividad endometrial.

En las últimas décadas se han publicado numerosos estudios transcriptómicos del endometrio humano, proporcionando información considerable de cuál podría ser el patrón de expresión génica de un endometrio receptivo normal (**Tabla 2**).

Los datos transcriptómicos disponibles sugieren que en la fase secretora media se caracteriza por sus altos niveles de actividad metabólica y secretora, su fenotipo no

proliferativo, y una sensibilidad incrementada al sistema inmune, estrés y respuestas a heridas (Giudice, 2006; Simmen and Simmen, 2006; Talbi *et al.*, 2006). La respuesta inmune juega un papel muy importante en la fase secretora media, ya que los genes implicados en la activación de la respuesta inmune innata están sobreexpresados (incluyendo elementos del sistema del complemento, péptidos antimicrobiales y receptores toll-like).

A pesar de la gran cantidad de estudios transcriptómicos, ha existido durante mucho tiempo una falta de consenso a la hora de determinar la firma transcriptómica de la ventana de implantación, ya que se han observado muchas diferencias entre los distintos estudios en cuanto a los posibles genes candidatos de determinar el estado de receptividad. Algunas de las limitaciones asociadas a esta tecnología de los microarrays y que ha llevado a esta diversidad de resultados y a esta falta de consenso son: los diferentes microarrays utilizados para el análisis, las diferencias en el diseño experimental, momento y condiciones de la toma de muestra, las diferencias en los criterios de selección de las muestras, el procesado de los datos, la falta de unos estándares consistentes para la presentación de los datos y al tipo de muestra utilizada para los análisis (biopsias endometriales). El tejido endometrial contiene muchos tipos celulares incluyendo células estromales y epiteliales y leucocitos entre otros y existe una considerable heterogeneidad en la composición celular a lo largo del ciclo, específicamente en lo que se refiere a la ratio de glándulas-estroma y el número de leucocitos. De hecho, también se han llevado a cabo análisis de microarray en compartimentos individuales (fracción estromal y epitelial) obtenidos por microdissección por captura láser (Yanaihara *et al.*, 2005; Evans *et al.*, 2012), demostrando que existe una expresión génica específica del tipo celular, y dependiente del día del ciclo. Sin embargo, la mayoría de los estudios transcriptómicos han utilizado biopsias de tejido endometrial que contiene todos los tipos celulares.

Tabla 2. Lista de trabajos de transcriptómica endometrial en medicina reproductiva

Autores	Tiempo de la biopsia	Comparativa	Array
(Carson, 2002)	LH+(2-4) vs LH+(7-9)	ES vs MS	HG U95A (Affymetrix)
(Kao <i>et al.</i> , 2002)	CD 8-10 vs LH+(8-10)	LP vs MS	HG U95A (Affymetrix)
(Borthwick <i>et al.</i> , 2003)	CD 9-11 vs LH+(6-8)	LP vs MS	HG U95A-E (Affymetrix)
(Riesewijk, 2003)	LH+2 vs LH+7	ES vs MS	HG U95A (Affymetrix)
(Mirkin <i>et al.</i> , 2004)	LH+8 vs hCG+9	Ag vs Atg vs NC	HG U95Av2 (Affymetrix)
(Ponnampalam <i>et al.</i> , 2004)	Ciclo complete, criterios Noyes	EP vs MP vs LP vs ES ES vs MS vs LS	Homemade (Peter MacCallum Cancer Institute)
(Mirkin <i>et al.</i> , 2005)	LH+3 vs LH+8	ES vs MS	HG U95Av2 (Affymetrix)
(Horcajadas <i>et al.</i> , 2005)	LH(+2;+7) vs hCG+7	NC vs COH	HG U133A (Affymetrix)
(Punyadeera <i>et al.</i> , 2005)	CD 9-11 vs CD 11-12	M vs LP	HG U133A (Affymetrix)

Tabla 2. Continuación

(Simon <i>et al.</i> , 2005)	LH (+2;+7) vs hCG (+2;+7)	Ag vs Atg vs NC	HG U133A (Affymetrix)
(Yanaihara <i>et al.</i> , 2005)	CD 9-11	Células epiteliales vs estromales en fase proliferativa	BD Atlas Nylon cDNA Expression Array; BD Biosciences (Clontech)
(Critchley <i>et al.</i> , 2006)	Criterios Noyes	MS vs LS	HG U133A (Affymetrix)
(Talbi <i>et al.</i> , 2006)	Ciclo complete, criterios Noyes	EP vs MP vs LP vs ES	HG U133 Plus 2 (Affymetrix)
(Horcajadas <i>et al.</i> , 2006)	LH+7 vs LH+7	Pre-DIU vs DIU	Agilent 4x44K; HG U133 Plus 2 (Affymetrix)
(Horcajadas <i>et al.</i> , 2008)	LH+(1-9) vs hCG+ (1-9)	NC vs COS	HG U133A (Affymetrix)
(Liu <i>et al.</i> , 2008)	LH+7 vs hCG+7	NC vs COS	HG U133A (Affymetrix)
(Macklon <i>et al.</i> , 2008)	LH+5 vs hCG+2	NC vs COS	HG U133 Plus 2 (Affymetrix)
(Haouzi <i>et al.</i> , 2009a)	LH (+2;+7) vs hCG+(+2;+5)	NC vs COS	HG U133 Plus 2 (Affymetrix)
(Haouzi <i>et al.</i> , 2009b)	LH+2 vs LH+7	ES vs MS	HG U133 Plus 2 (Affymetrix)
(Koler <i>et al.</i> , 2009)	CD 21	Fertilidad vs Infertilidad	Array-Ready Oligo Set for the Human Genome Version 3 (Operon)
(Altmäe <i>et al.</i> , 2010)	LH+7	Fertilidad vs Infertilidad	Whole Human Genome Oligo Microarray (Agilent Technologies),
(Haouzi <i>et al.</i> , 2010)	LH (+2;+7) vs hCG (+2;+5)	Ag vs Atg vs NC	HG U133 Plus 2 (Affymetrix)
(Tseng <i>et al.</i> , 2010)	Criterios Noyes	ES vs MS vs LS	HG U133 Plus 2 (Affymetrix)
(Van Vaerenbergh <i>et al.</i> , 2010)	LH+(5-7)	MS vs embarazo	HG U133 Plus 2 (Affymetrix)
(Blockeel <i>et al.</i> , 2011)	Oocyte retrieval	rFSH vs baja dosis hCG	HG U133 Plus 2 (Affymetrix)
(Díaz-Gimeno <i>et al.</i> , 2011)	(LH+1,+3,+5 vs LH+7) (LH+(1-5) vs LH+7 vs CD 8-12)	LP vs ES vs MS	HG U133A (Affymetrix) and Homemade "ERA"
(Labarta <i>et al.</i> , 2011)	rCG+7	Diferentes niveles de progesterona en suero	Whole Human Genome Oligo Microarray (Agilent Technologies)
(Van Vaerenbergh <i>et al.</i> , 2011)	Punción ovocitaria	Diferentes niveles de progesterona en suero	HG U133 Plus 2 (Affymetrix)
(Evans <i>et al.</i> , 2012)	LH+2 vs LH+7	Células epiteliales vs estromales en fase proliferativa	Agilent 4x44K; HG U133 Plus 2 (Affymetrix)
(Petracco <i>et al.</i> , 2012)	CD 1-3 vs CD 5-8 vs CD 11-13	EP vs MP vs LP	GeneChip Human Gene 1 ST Array (Affymetrix)

Tabla 2. Continuación

(Díaz-Gimeno <i>et al.</i> , 2013)	Criterios Noyes vs Predicción ERA	MP vs ES vs MS vs LS	Homemade ERA
(Ruiz-Alonso <i>et al.</i> , 2013)	P+5/LH+7 RIF vs Controles	pWOL/pWOLdelayed/ pWOLadvanced	Homemade ERA
(Bermejo <i>et al.</i> , 2014)	Punción ovocitaria COS	Comparación de 4 protocolos GnRH-a	Homemade ERA
(Haouzi <i>et al.</i> , 2014)	hCG+2 vs. hCG+7	Diferentes niveles de progesterona en suero	HG U133 Plus 2 (Affymetrix)
(Ruiz-Alonso <i>et al.</i> , 2014)	P+5 vs. P+7	ET vs. pET	Homemade ERA
(Koot <i>et al.</i> , 2016)	LH+7	RIF vs. Fértil	human whole genome microarray V2 (Agilent)
(Huang <i>et al.</i> , 2017)	LH+7	RIF vs. RM	RNA-seq

Abreviaciones: Ag: agonista; Atg: antagonista; CD: día del ciclo o cycle day; COH: hiperestimulación ovárica controlada del inglés ‘controlled ovarian hyperstimulation’; COS: estimulación ovárica controlada del inglés ‘controlled ovarian stimulation’; DIU: dispositivo intrauterino; pre-DIU: antes de la inserción del DIU; EP: proliferativa temprana del inglés ‘early-proliferative’; ERA: array de receptividad endometrial del inglés ‘endometrial receptivity array’; ES: secretora temprana, del inglés ‘early secretory’; ET: transferencia embrionaria, del inglés ‘embryo transfer’; pET: transferencia embrionaria personalizada. GnRH_a: agonista de la hormona liberadora de gonadotropina, del inglés ‘Gonadotropin releasing hormone-agonist’; hCG+: administración de la hormona gonadotropina coriónica humana + nº día; LH+: pico de LH + días; LP: proliferativa tardía, del inglés late-proliferative; LS: secretora tardía, del inglés ‘late-secretory’; M: menstrual; MP: proliferativa media, del inglés mid-proliferative; MS: secretora media, del inglés ‘mid-secretory’; NC: ciclo natural; P+: progesterona + días; pWOL: ventana de implantación personalizada; rCG+: administración de gonadotropina coriónica recombinante + días; RIF: fallo de implantación recurrente; RM: aborto recurrente, del inglés ‘recurrent miscarriage’; RNA-seq: secuenciación del RNA. Tabla actualizada del artículo ‘Transcriptomics of the human endometrium’ (Díaz-Gimeno *et al.*, 2014).

3.2.2.1 El ‘ERA’ o array de la receptividad endometrial

Dada la necesidad de disponer de algún método fiable y objetivo de dataje molecular para el endometrio, en 2011 se desarrolló una herramienta específica capaz de definir la huella transcriptómica de la ventana de implantación de la receptividad endometrial a la que llamó ERA (Díaz-Gimeno *et al.*, 2011, 2013).

El ERA es un array ‘customizado’ o personalizado compuesto por 238 genes diferencialmente expresados entre las fases pre-receptiva (LH+1, LH+3 y LH+5) y receptiva (LH+7) del ciclo endometrial de mujeres fértiles, los cuales se acoplaron a un predictor computacional (basado en un algoritmo de machine learning o support vector machine, SVM) para diagnosticar de manera personalizada la ventana de implantación endometrial de una paciente, independientemente de su histología endometrial (Díaz-Gimeno *et al.*, 2013). Para ello, el predictor fue posteriormente entrenado con los perfiles de expresión génica de un conjunto de muestras obtenidas en diferentes estados del ciclo menstrual (proliferativa,

prereceptiva, receptiva y postreceptiva) con el fin de poder clasificar una muestra problema de acuerdo con los valores de expresión génica obtenidos en el array (**Figura 7**). De los 238 genes, 134 representaron la huella transcriptómica específica de la fase receptiva. Esta fue la primera vez que una herramienta molecular basada en la expresión de un grupo de genes biomarcadores endometriales se utilizó clínicamente para evaluar el factor endometrial con una alta especificidad (0,8857) y sensibilidad (0,99758) (Díaz-Gimeno *et al.*, 2011) siendo más preciso que el dataje histológico (Díaz-Gimeno *et al.*, 2013).

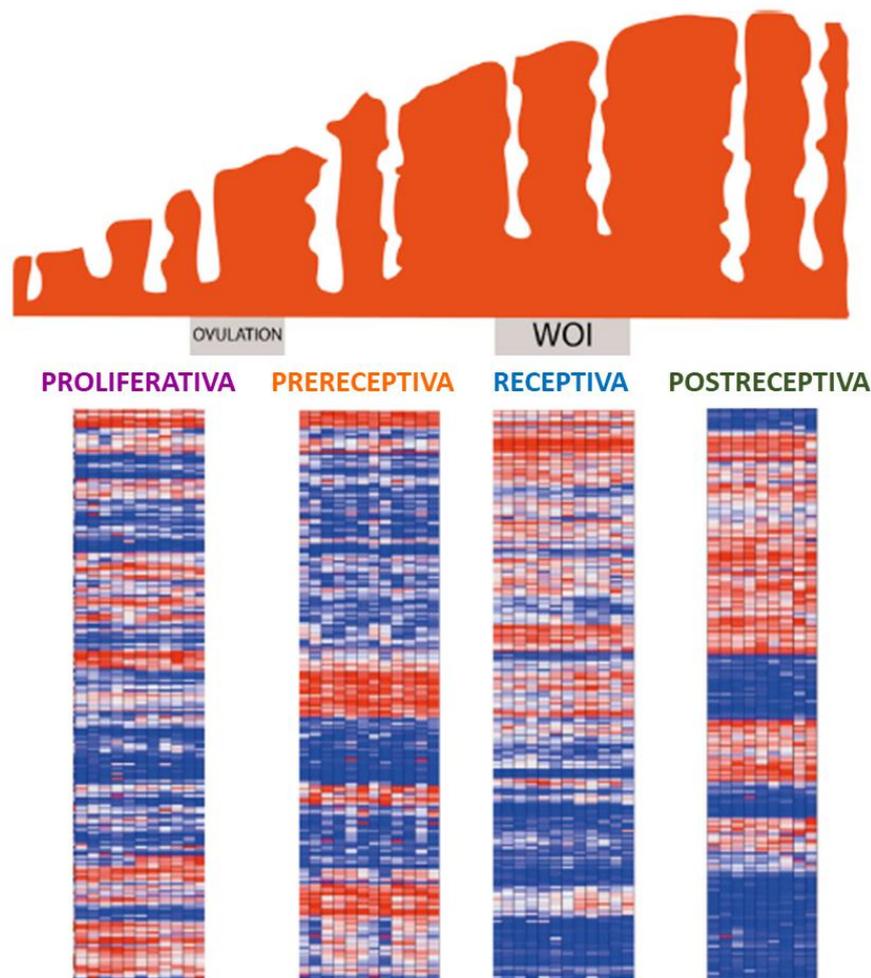


Figura 7. El perfil transcriptómico endometrial a lo largo del ciclo menstrual. Los mapas de calor o 'Heatmaps' muestran los perfiles de expresión génica según el array de receptividad endometrial ERA, en cada fase del ciclo endometrial (proliferativa, prereceptiva, receptiva y postreceptiva). Figura sacada del artículo de (Díaz-Gimeno *et al.*, 2014).

Esta herramienta molecular no sólo permitió definir la huella transcriptómica de la WOI, sino que también caracterizó los perfiles transcriptómicos endometriales de las distintas fases del ciclo endometrial. Por un lado, fue capaz de determinar que sólo un porcentaje de las

pacientes clínicamente diagnosticadas con RIF tienen un desplazamiento de la WOI y, por tanto, su incapacidad para implantar podía ser atribuido al factor endometrial (Ruiz-Alonso et al., 2013). Por otro lado, el ERA permitió definir de manera personalizada la ventana de implantación de cada paciente, ya que un diagnóstico ‘no receptivo’ del test ERA, no solo indica que el endometrio no está preparado para la adhesión embrionaria, sino que también te da información de su perfil pre- o postreceptivo (**Figura 8**). Además, esta capacidad para identificar un desplazamiento de la WOI (adelanto o retraso) le otorga un valor diagnóstico añadido para poder programar el transfer embrionario de manera personalizada en cada paciente, ayudando a mejorar los resultados clínicos de las pacientes RIF con desplazamiento de la WOI (Garrido-Gómez *et al.*, 2013).

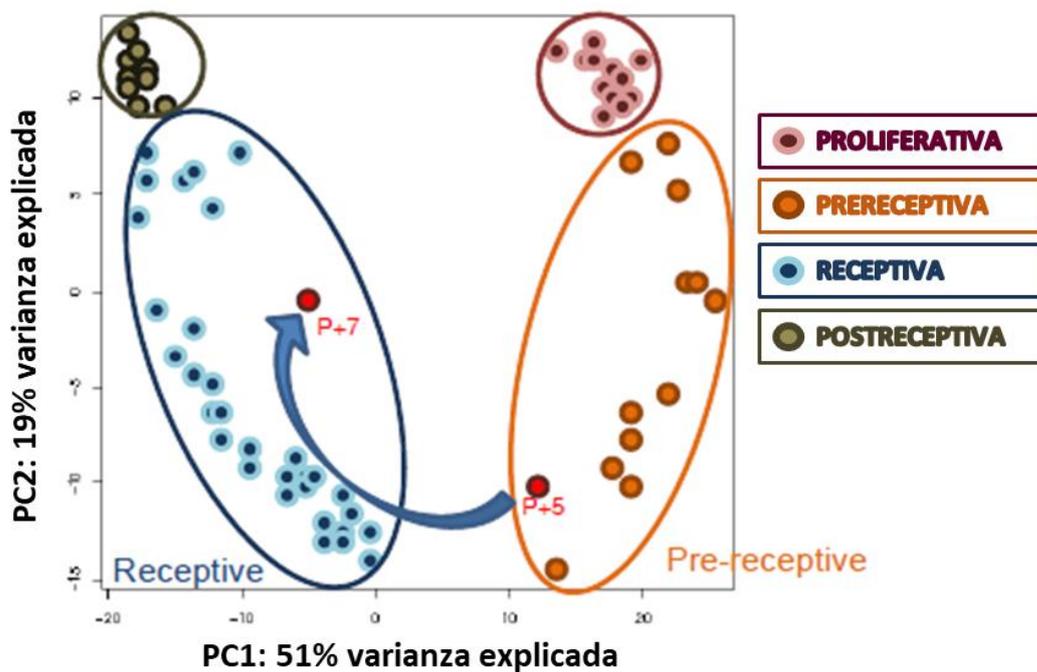


Figura 8. Determinación personalizada de la ventana de implantación con la herramienta ERA. La imagen muestra el análisis de componentes principales (PCA) de dos muestras de la misma paciente cogidas a día P+5 y P+7 de un tratamiento de reemplazo hormonal, formando clusters o agrupaciones con las muestras utilizadas para el entrenamiento del test ERA. Según el test ERA, la primera muestra cogida a los 5 días de administración de progesterona (P+5) muestra un perfil pre-receptivo, mientras que la muestra cogida dos días después, en P+7, muestra tener un perfil endometrial receptivo. Figura sacada del artículo de (Díaz-Gimeno *et al.*, 2014).

3.2.3 Proteómica de la receptividad endometrial

Las “proteínas” son moléculas orgánicas compuestas por aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos (estructura primaria) que adquieren una estructura

tridimensional secundaria, terciaria y/o cuaternaria característica. Estas moléculas tienen un papel crucial en todos los organismos vivos, pudiendo actuar como enzimas catalizadoras de muchas reacciones químicas esenciales del metabolismo celular, o como un componente más estructural o de sostén celular. Destaca el papel que juegan en el mantenimiento de la estructura del DNA y durante la replicación y transcripción de este. Además, las proteínas participan en la motilidad y señalización celular, actúa como hormonas en el sistema endocrino, como anticuerpos en el sistema inmunitario, como transportadoras en la sangre, en la mitosis y meiosis, etcétera. La importancia de las proteínas se ve resaltada por su participación en la mayoría de procesos y funciones celulares.

El término “proteoma” es un concepto con una naturaleza dinámica pues debe entenderse como el conjunto de proteínas expresadas por un genoma dado en un tiempo y espacio determinado (Wasinger *et al.*, 1995), debido a que la composición de este varía de tejido a tejido e incluso de célula a célula. Así, la composición de un proteoma es dependiente de una gran variedad de factores internos y externos tales como el ambiente, edad, sexo, estrés, etcétera. La “proteómica” es por tanto el estudio exhaustivo a gran escala de un proteoma específico, incluyendo no sólo la identificación y cuantificación de proteínas, sino también información sobre sus localizaciones, modificaciones, interacciones y funciones (Fields, 2001). El rápido desarrollo de la proteómica se ha hecho posible gracias al progreso en la instrumentación analítica, especialmente en la espectrometría de masas (MS, mass spectrometry), a los avances tecnológicos y metodológicos en la separación o fraccionamiento de proteínas y péptidos, mayoritariamente por técnicas de cromatografía líquida y electroforesis, y a las herramientas bioinformáticas por su capacidad cada vez mayor de coleccionar, almacenar, procesar y visualizar la gran cantidad de datos que se generan en los estudios proteómicos.

Paralelamente y solapándose a los estudios transcriptómicos comenzaron los estudios proteómicos en el endometrio humano con el mismo fin que la transcriptómica, conocer el perfil proteómico de un endometrio receptivo, y a su vez poder contrastar los resultados con los ya obtenidos por transcriptómica (validar si hay o no correlación entre ambos) y poder descubrir nuevos marcadores para elaborar una prueba o test de receptividad endometrial. Sin embargo, la transcriptómica se adelantó a la proteómica en este propósito con la aparición del ERA, pero a pesar de los avances conseguidos con la transcriptómica en el campo de la receptividad endometrial, la proteómica ha ido ganando terreno en este ámbito y en el área de la investigación biomédica en general. Por un lado, el proteoma de una muestra biológica es mucho más complejo que su genoma correspondiente (**Figura 9**) y es mucho más

informativo sobre el estado fisiológico de un organismo que su genoma, ya que las proteínas son el punto final del proceso transcripción-traducción y las que van a desarrollar una función en la célula.

Se estima que hay más de un millón de proteínas (Walsh *et al.*, 2005), muchas más que genes codificantes (20.000-25.000). Los pasos regulatorios existentes entre el transcriptoma y el proteoma funcional (splicing alternativo y modificaciones postraduccionales) hacen que en la mayoría de los casos cambios a nivel génico no se vean necesariamente reflejados en cambios a nivel proteico. De hecho, la comparación de datos proteómicos en estudios endometriales con los de expresión génica publicados en cohortes similares de mujeres (Burney *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009; Haouzi *et al.*, 2012) han revelado una falta de correlación entre el RNA mensajero (mRNA) y su correspondiente proteína, sugiriendo que la regulación postranscripcional y postraduccionales es un aspecto importante del remodelado endometrial.

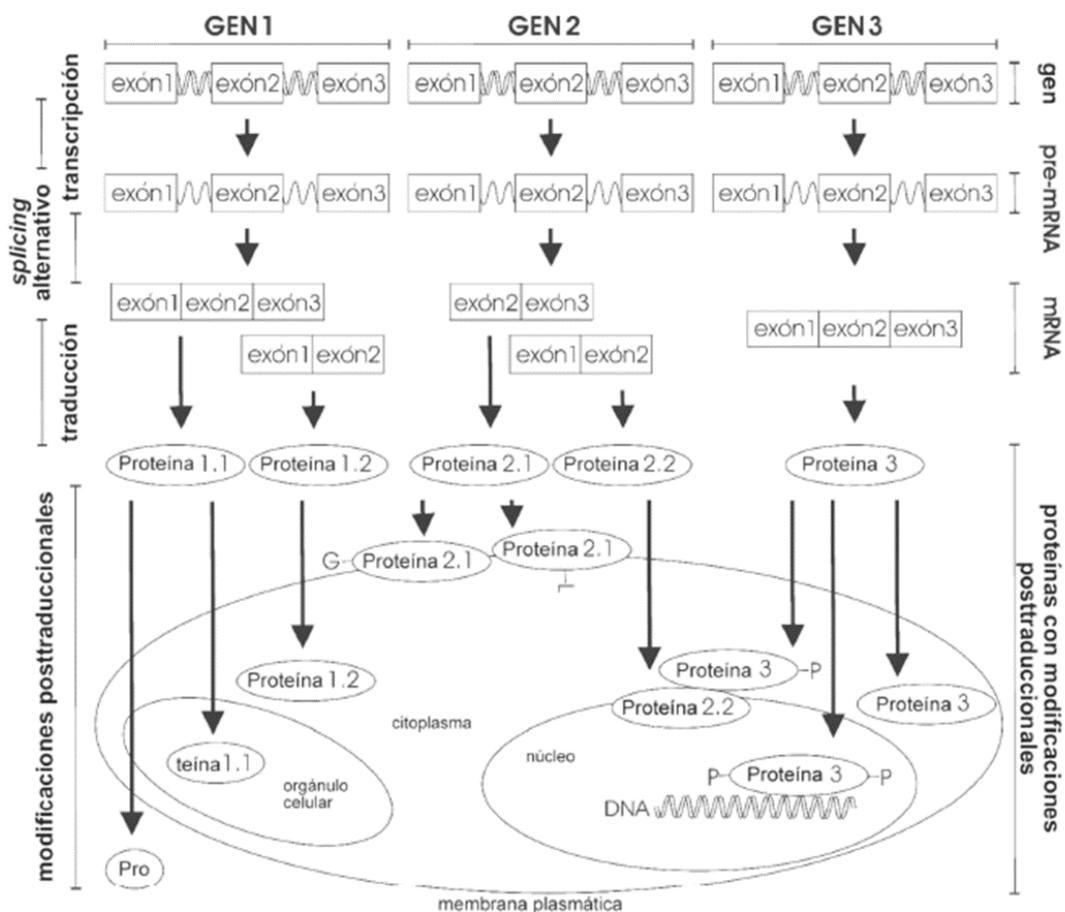


Figura 9. La complejidad del proteoma. Esta figura pretende ilustrar el proteoma creado a partir de tres genes. En primer lugar los genes son transcritos a mRNA, el cual puede experimentar diversos procesos de splicing alternativo, o corte y empalme alternativo de los

intrones. El mRNA resultante es traducido a proteína que también pueden ser cortadas o procesadas según distintos tipos de modificaciones posttraduccionales. La localización de las proteínas y sus interacciones con otras proteínas o moléculas juega un importante papel en su funcionalidad. Las modificaciones posttraduccionales afectan, entre otras características, a la localización e interacción de las proteínas. Adaptado del artículo (Peng and Gygi, 2001).

Considerando que los resultados transcriptómicos no pueden representar completamente los cambios proteicos, se ha utilizado también la aproximación proteómica para estudiar las proteínas diferencialmente expresadas en tejido endometrial bajo diversas situaciones de receptividad endometrial. Numerosos estudios se han centrado en la identificación del proteoma de las diferentes fases del ciclo menstrual, con el fin de conocer la huella proteómica de la receptividad endometrial (**Tabla 3**). Principalmente se han comparado perfiles proteómicos endometriales entre fases no receptivas, ya sea proliferativa (DeSouza *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009; Parmar *et al.*, 2009) o preceptiva (fase secretora temprana) (Domínguez *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011), con otra receptiva (fase secretora media) en mujeres fértiles, identificando diferencias entre ellas.

La proteómica también se ha aplicado para el estudio de la infertilidad de causa desconocida (Manohar *et al.*, 2014) o del RIF (Brosens *et al.*, 2009), bien comparando mujeres fértiles con infértiles (RIF) en la fase secretora media (Brosens *et al.*, 2009) o comparándose distintas fases del ciclo (preceptiva y receptiva) dentro de pacientes infértiles (Manohar *et al.*, 2014) (**Tabla 3**).

Aunque la mayoría de todos estos estudios se han centrado en el análisis del endometrio humano usando biopsias endometriales, también se ha intentado caracterizar la secretómica endometrial analizando y comparando los perfiles de expresión proteico del fluido endometrial cogido en diferentes fases del ciclo menstrual (Casado-vela *et al.*, 2009; Scotchie *et al.*, 2009; Hannan *et al.*, 2010), e incluso de mujeres infértiles (Hannan *et al.*, 2010). Sin embargo, aunque el análisis de biopsias endometriales tiene algunos beneficios como el poder obtener información a nivel local, directamente de las células que forman el tejido, también tiene algunas desventajas, como su heterogeneidad celular y complejidad proteica, así como los cambios en morfología, estructura y composición celular producidos por las distintas fases del ciclo menstrual.

Tabla 3. Análisis proteómicos de tejido endometrial humano en distintas fases del ciclo menstrual

Estudio	Comparativa	Tiempo de la biopsia	Estrategia proteómica	nº de PDEs (en MS o infertilidad)	Algunas PDEs relevantes	Estado de regulación en MS o infértil	Criterio de significatividad	PDEs validadas (IHC/WB)	Localización celular
(DeSouza <i>et al.</i> , 2005)	P (n=3) vs. S (n=3) (histerectomía)	Histología (criterios Noyes)	ICAT + nano-LC-MS/MS	5 (4↑/1↓)	precursor de la subunidad zeta 1 del receptor NMDA glutamato, FRAT1, Quinasa 2 de la cadena ligera de miosina, isopentenil difosfato delta-isomerasa	↑ en S	Fold change > ± 2	ninguna	-
					c-Jun	↓ en S			
(Parmar <i>et al.</i> , 2009)	P (n=5) vs. MS (n=6) (fértil)	DO-3,-2 vs. DO+6 (Ultrasonografía)	2-DE + MALDI-TOF/TOF MS	8 (4 ↑/4 ↓)	calreticulina, fibrinógeno cadena b, adenilato quinasa isoenzima 5, transferrina	↓ en MS	ratio medio > ± 2	calreticulina (IHC)	Epitelio y estroma
					Anexina 5, peroxidoxina 6, α1-antitripsina, creatinina quinasa	↑ en MS		α1-antitripsina (IHC)	Epitelio y estroma
(Chen J. <i>et al.</i> , 2009)	MP (n=3) vs. MS (n=3) (ligadura tubárica, fértil)	DC (8-10) vs. DC (19-23)	2D-DIGE + MALDI-TOF/TOF MS	196 (157↑/39↓)	Proteína 1 del canal intracelular de cloro (CLIC1), Inhibidor 1 disociación-GDP de Rho (GDIR1), Anexina 4 (ANXA4)	↑ en MS	p < 0,05	Proteína 1 del canal intracelular de cloro (CLIC1), Inhibidor 1 disociación-GDP de Rho (GDIR1) (IHC)	Epitelio
					Componente 1 del receptor de progesterona asociado a membrana (PGRMC1)	↓ en MS		Componente 1 del receptor de progesterona asociado a membrana (PGRMC1) (IHC)	Estroma

Tabla 3. Continuación

Estudio	Comparativa	Tiempo de la biopsia	Estrategia proteómica	nº de PDEs (en MS o infertilidad)	Algunas PDEs relevantes	Estado de regulación en MS o infértil	Criterio de significatividad	PDEs validadas (IHC/WB)	Localización celular
					Estatmina 1	↓ en MS		Estatmina 1 (IHC, WB)	Mayoritaria-mente estroma
(Dominguez <i>et al.</i> , 2009)	ES (n=8) vs. MS (n=8) (fértil)	Preceptiva (LH+2) vs. receptiva (LH+7)	2D-DIGE + MALDI-TOF/TOF MS	32 (22↑/10↓)	Anexina A2	↑ en MS	p < 0,05	Anexina A2 (IHC/WB)	Epitelio y estroma
(Brosens <i>et al.</i> , 2009)	S (n=15, fértil) vs. S (n=10, RIF)	(LH+5-LH+10)	ProteinChips array+ SDS-PAGE + SELDI-TOF-MS	4 (2↑/2↓)	Apolipoproteína A1 (apoA-1)	↑ en RIF	p < 0,05	Apolipoproteína A1 (apoA-1) (WB, IHC)	Epitelio y estroma
(Rai <i>et al.</i> , 2010)	MP (n=6) vs. MS (n=6) (fértil)	DC (7-10) vs. DC (20-24)	2DE + MALDI-TOF/TOF MS o MS/MS	49 (16↑/33↓)	Vinculina, HSP27 GRP94, GRP78, ERp57, laminina B1, MVP	↑ en MS ↓ en MS	Fold change ≥ ± 1,2; p < 0,05	Vinculina, HSP27 (WB) GRP94, GRP78, ERp57, laminina B1, MVP (WB)	- -
(Li <i>et al.</i> , 2011)	ES (n=4) vs. MS (n=4) (fértil)	Preceptiva (LH+2) vs. receptiva (LH+7)	2D-DIGE+ MALDI-TOF/TOF MS	31 (17↑/14↓)	Anexina A4, anexina A2, cadena α2 del colágeno 4 Vimentina, precursor de la cadena A del factor XIII de coagulación	↑ en MS ↓ en MS	Ratio medio > ± 1.4; p < 0,05	ninguna	-

Tabla 3. Continuación

Estudio	Comparativa	Tiempo de la biopsia	Estrategia proteómica	nº de PDEs (en MS o infertilidad)	Algunas PDEs relevantes	Estado de regulación en MS o infértil	Criterio de significatividad	PDEs validadas (IHC/WB)	Localización celular
(Manohar M. <i>et al.</i> , 2014)	ES (n=8) vs. MS (n=8) (infertilidad de causa desconocida)	Prereceptiva (LH+2) vs. receptiva (LH+7)	2D-PAGE + LC-MS/MS	9 (5↑/4↓)	Proteínas Rap-1b relacionada con Ras (Ran), Cofilina-1, Proteína disulfuro isomerasa A3, Proteína nuclear Ran de unión a GTP, Apolipoproteína A-1	↑ en MS	Fold Change ≥ 1,5	Cofilina 1, Ran, Apo-A1 (WB, IHC)	Epitelio y estroma
					Miembro 3 de la familia de proteínas promotoras de la polimerización, Superóxido dismutasa, Sorcina, Subunidad α tipo 5 del proteasoma	↓ en MS		Sorcina (WB, IHC)	Epitelio y estroma
(Garrido-Gómez <i>et al.</i> , 2014)	No receptivo (n=6) vs. Receptivo (n=6) (test ERA) (ciclos FIV fallidos)	Prereceptivo (P+5) vs. Receptivo (P+5) (TRH)	2D-DIGE + MALDI-TOF/TOF MS	24 (9↑/15↓) en 'NR'	Anexina A6 (ANXA6)	↑ en NR	p < 0,05	Anexina A6 (ANXA6) (IHC, WB)	Epitelio y estroma
					Componente 1 de membrana del receptor de progesterona (PGRMC1)	↑ en NR		Componente 1 de membrana del receptor de progesterona (PGRMC1) (WB, IHC)	
(Chen <i>et al.</i> , 2015)	MP (n=6) vs. MS (n=6) (factor tubárico o factor masculino)	DC (7-9) vs. DO+7 (Ultrasonografía)	LABEL-FREE + NANO-LC-MS/MS	317 (15↑/9↓)	creatinina quinasa tipo B (CKB)	↑ en MS	Fold Change < 2; p < 0,05	creatinina quinasa tipo B (CKB) (WB, IHC)	Mayoritariamente epitelio
					α-actinina, integrina αV	↓ en MS		α-actinina (ACTN) (WB, IHC)	Mayoritariamente estroma

P: fase proliferativa; S: fase secretora ; MP: fase proliferativa media; ES: fase secretora temprana; MS: fase secretora media; PDEs: proteínas diferencialmente expresadas; DC: día del ciclo; DO: día de la ovulación; LH+n: día 'n' tras el pico de la hormona luteinizantes; ICAT: etiqueta de afinidad codificado por isótopo (en inglés 'Isotope-coded affinity tag'); MALDI-TOF/TOF MS: espectrometría de masa con ionización por desorción laser asistida en matriz y tiempo de vuelo (en inglés 'matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight/time of flight mass spectrometry'); SELDI: ionización/desorción laser potenciado en superficie (en inglés 'Surface-enhanced laser desorption/ionization'); 2D-DIGE: electroforesis en gel diferencial bidimensional; 2DE: electroforesis en gel bidimensional; SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes; TRH: terapia de reemplazo hormonal; LC-MS/MS: cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas en tándem; IHC: inmunohistoquímica; WB: western blot.

4. Receptividad endometrial defectiva

En esta tesis nuestro interés se centra en estudiar dos alteraciones de la receptividad endometrial asociadas a un estado no receptivo; una es una alteración natural o desorden en la implantación producida por una 'patología de base' como es el RIF de causa endometrial, y la otra es una manera artificial e intencionada por medio de un dispositivo intrauterino.

4.1 Fallo de implantación recurrente (RIF). Definición y evolución del RIF de origen endometrial

Comparadas con otras especies de mamíferos, la eficiencia reproductiva de los humanos no es muy alta. La probabilidad de conseguir un embarazo en un ciclo menstrual, definido como la tasa de fecundidad mensual, es del 20-30%. Por el contrario, la tasa de fecundidad mensual puede llegar a ser del 80% en babuinos y del 90% en conejos (Chard, 1991; Stevens, 1997). Análisis del genoma completo han reportado una alta tasa de mosaicismo en embriones humanos, afectando hasta el 70% de embriones de alta calidad, durante los estadios tempranos del desarrollo preimplantacional (Baart *et al.*, 2006; Vanneste *et al.*, 2009; Mertzanidou *et al.*, 2013). Se estima que la tasa de aneuploidías en humanos es 10 veces mayor que la observada en otras especies de mamíferos, pudiendo explicar esta baja eficiencia reproductiva en humanos. A pesar de las mejoras introducidas en los tratamientos de reproducción asistida en los protocolos de estimulación, en el cultivo embrionario y en el cribado genético preimplantacional, el fallo de implantación sigue siendo el factor limitante del éxito de las TRA.

Existen varias definiciones del fallo de implantación recurrente (RIF), pero clínicamente se define como la ausencia de implantación después de 3 o más ciclos de FIV con la transferencia de al menos dos embriones de buena calidad por ciclo o tras la transferencia de un total de 10 o más embriones de buena calidad en múltiples transferencias, ya sean propios o de donantes (Thornhill *et al.*, 2005; Simon and Laufer, 2012).

Existen diversas causas, algunas conocidas y otras no, que pueden llevar a generar un RIF. De esta forma se habla de un 'RIF multifactorial', para designar a aquel RIF originado por una amplia y diversa variedad de razones (anomalías uterinas congénitas, pólipos endometriales, miomas submucosos, endometriosis, trombofilias, síndrome antifosfolípido, desórdenes metabólicos u hormonales), un 'RIF de origen embrionario' cuando la causa del fallo de implantación se debe a un embrión incompetente o cromosómicamente anormal o con un endurecimiento de la zona pelúcida, y de un 'RIF idiopático' o de causa desconocida

cuando embriones de buena calidad e incluso euploides no implantan en mujeres con endometrios aparentemente normales y sin ningún otro factor causal conocido. Un RIF idiopático estaría indicando que o bien el diálogo entre el embrión-endometrio está comprometido o alterado, o que el endometrio falla a la hora de adquirir el estado de receptividad endometrial desde un punto de vista molecular no perceptible en los chequeos rutinarios de las clínicas de reproducción asistida (Timeva *et al.*, 2014). En este último caso estaríamos hablando de un 'RIF puramente endometrial', debida a una alteración constitutiva de la función endometrial.

En la práctica clínica, muchas de las causas mencionadas, si se diagnostican, pueden ser corregidas. Así, por ejemplo, tanto el análisis del contenido cromosómico embrionario por medio del diagnóstico genético preimplantacional como el hatching asistido han conseguido mejorar las tasas de implantación en aquellas pacientes donde el RIF era causado por un factor embrionario (Rubio *et al.*, 2013). Sin embargo, cuando todos los otros factores parecen estar controlados, donde ni el embrión ni otro factor causal descrito parecen estar implicados, todo apunta a una alteración de la receptividad endometrial como la principal causa del RIF idiopático.

El concepto del RIF idiopático, así como el descubrimiento de sus posibles causas ha evolucionado conforme lo han hecho las técnicas de diagnóstico de la función/receptividad endometrial. Inicialmente en la era pre-ómica, el estudio de la receptividad endometrial en pacientes con RIF reveló que tenían alterados muchos de los marcadores moleculares clásicos de receptividad endometrial descritos en apartados anteriores. Así, mujeres con infertilidad de causa desconocida o RIF presentaron un patrón de expresión alterado de la integrina $\alpha\beta3$ (Tei *et al.*, 2003), una disminución de la expresión de la glicoproteína MUC-1 o unas cadenas extracelulares más cortas dificultando la aposición del embrión sobre el epitelio luminal, una disminución de la expresión de las citoquinas LIF e IL-6 (Lim *et al.*, 2000), aumentos de la expresión de IL-15 y IL-18 (Lédée *et al.*, 2011), niveles reducidos de la prostaglandina cPLA2 α y de la cicloxigenasa (COX-2), etc.

Con el desarrollo de las tecnologías -ómicas, en concreto de la transcriptómica empezó una nueva era del diagnóstico molecular de la función endometrial, de una manera más objetiva. No sólo se pudo establecer una clasificación molecular del endometrio usando perfiles transcriptómicos a lo largo del ciclo menstrual (Ponnampalam *et al.*, 2004; Talbi *et al.*, 2006), así como durante la ventana de implantación (Riesewijk, 2003; Díaz-Gimeno *et al.*, 2011), sino que también permitió detectar genes desregulados o diferencialmente expresados

entre pacientes con RIF respecto a mujeres fértiles durante la fase receptiva del endometrio (Tapia *et al.*, 2008; Koler *et al.*, 2009; Koot *et al.*, 2016).

La huella transcriptómica de la herramienta ERA, un predictor transcriptómico endometrial de la WOI, no sólo demostró que uno de cada cuatro pacientes RIF presentaron un desplazamiento de la ventana de implantación, clasificando al endometrio como no receptivo, por estar bien en un estado adelantado (prereceptivo 84%) o retrasado (postreceptivo 16%) respecto a la putativa WOI, sino que una transferencia embrionaria personalizada de acuerdo a la WOI específica del paciente conseguía rescatar un RIF no receptivo en tasas de embarazo (50%) e implantación (38.5%) normalizados (Ruiz-Alonso *et al.*, 2013). De esta demostración surgió la vertiente de que el fallo de implantación de origen endometrial no es una 'enfermedad' o patología molecular, sino una asincronía entre el embrión y el endometrio debido a un desplazamiento de la WOI (Valdes *et al.*, 2017).

Por el contrario, Koot Y. y colaboradores en 2016 (Koot *et al.*, 2016) desarrollaron un predictor transcriptómico endometrial para el RIF, con una huella transcriptómica de 303 genes específica para el RIF, capaz de predecir los RIF con un alto valor predictivo positivo (100%) y alto valor predictivo negativo (81%). A partir de aquí, surgió la otra vertiente del RIF, que opina que el RIF endometrial si es una patología molecular con una huella transcriptómica específica (Macklon, 2017).

A partir de entonces se mantuvo esta visión dual e independiente del RIF endometrial, bien como un desplazamiento de la WOI o como una disrupción molecular de la WOI. Sin embargo, en el 2018 Patricia Sebastián y colaboradores (Sebastian-Leon *et al.*, 2018) demostraron que ambos fenómenos, desplazamiento (asincronía) y disrupción (patología) de la WOI, podían ser la causa del RIF y que podían existir de manera independiente o conjuntamente en la misma paciente RIF.

4.2 Refratariedad endometrial causada por un DIU (DIU de Cobre)

Una de las mejores estrategias para estudiar qué genes son funcionalmente importantes en la ventana de implantación endometrial, es estudiar los patrones de expresión génica entre condiciones en el que las mujeres tienen la receptividad endometrial comprometida, como sería el caso de un endometrio refractario por la presencia de un dispositivo intrauterino (DIU), y compararlo con el de aquellas mujeres fértiles durante el periodo de receptividad endometrial.

Un DIU es un elemento de plástico y/o metal (cobre), con o sin hormonas que actúa como un método anticonceptivo al impedir que el endometrio alcance su estado receptivo. Es un método anticonceptivo de alta eficacia, con un índice de PEARL cercano al 1% (eficacia del 99%) y una duración de 5 años.

Los DIU, independientemente del tipo, provocan cambios histológicos, bioquímicos y moleculares a nivel endometrial cuyo resultado final es un endometrio refractario que no va a permitir la implantación embrionaria. Aunque dicho efecto es reversible, el tiempo medio para conseguir el embarazo tras la retirada del DIU es de 3-4 meses según el tipo de DIU utilizado (Belhadj *et al.*, 1986). Cohen y colaboradores (Cohen, 1981) estimaron que sólo un 30% de las mujeres conseguían embarazarse en el mismo mes de la retirada del DIU.

En 2006 se llevó a cabo el primer estudio transcriptómico basado en microarrays para analizar el perfil de expresión de un endometrio refractario y así estudiar el conjunto de genes que funcionalmente serían relevantes en la WOI (Horcajadas *et al.*, 2006). Para ello, se comparó el perfil génico del endometrio de mujeres fértiles (n=5) en el día LH+7 en cuatro ciclos naturales distintos: antes de la inserción del DIU (biopsia 1), en el momento de la retirada del DIU (biopsia 2), 2 meses después de la retirada (biopsia 3) y 1 año después de su retirada (biopsia 4). En este estudio se utilizó un DIU inerte de plástico (Lippes Loop Intrauterine Double-S) para evitar cualquier factor de confusión, como la presencia de hormonas o cobre asociado, que pudieran modificar el perfil de expresión génica de un endometrio refractario. Al comparar los perfiles génicos de las distintas condiciones, este estudio permitiría conocer no sólo que genes son importantes para la receptividad endometrial, sino cómo cambian en respuesta al DIU y tras su retirada.

El principal mecanismo de acción de los DIU es producir una respuesta inflamatoria local del endometrio ante la presencia de un agente extraño, la cual genera un ambiente hostil para los gametos y embriones (Stanford and Mikolajczyk, 2002). Dicha respuesta inflamatoria no sólo disminuye la viabilidad de los gametos y la movilidad de los espermatozoides (Gemzell-Danielsson *et al.*, 2013a, 2013b), sino que también es capaz de alterar la receptividad endometrial desde un punto de vista transcriptómico (Horcajadas *et al.*, 2006). Los DIU de cobre, a diferencia que los DIU de plástico, llevan un alambre de cobre enrollado al plástico y liberan cobre al medio. El cobre aporta un valor añadido al efecto anticonceptivo de los DIU, ya que no sólo potencia la respuesta inflamatoria local, sino que alcanza niveles tóxicos para los espermatozoides y ovocitos e incrementa la presencia de efectos secundarios no deseados como el dolor y aumento del sangrado menstrual (Ortiz and Croxatto, 2007). Además, el Cu

altera el metabolismo y actividad proliferativa de las células endometriales (Hagenfeldt *et al.*, 1972) y disminuye la expresión génica de HOXA10, un gen esencial en la implantación embrionaria (Tetrault *et al.*, 2009). El papel anticonceptivo del cobre también se vio reflejado a nivel de la receptividad endometrial, ya que fue capaz por sí sólo de alterar la huella transcriptómica de la receptividad endometrial de células endometriales estromales decidualizadas *in vitro* en presencia de cobre (Carrascosa *et al.*, 2018). Concretamente alteró la expresión de 49 genes relacionados con la receptividad endometrial y la respuesta inmune, entre los cuales destacan genes implicados en el proceso de la decidualización (IGFBP-1, FOXO1, IL-8, IL-15, LIF, etc).

5. Proteómica cuantitativa. Aproximaciones

El objetivo de la proteómica cuantitativa no es sólo identificar y caracterizar las proteínas de una muestra con el fin de elucidar su función, interacciones con otras proteínas y modificaciones, sino cuantificarlas y conocer sus cambios o expresión diferencial bajo ciertas condiciones fisiológicas como por ejemplo ‘enfermedad’ frente a ‘control’. Poder caracterizar cambios proteómicos asociados a una enfermedad a menudo desvela mecanismos patológicos relacionados con ella ayudando a identificar potenciales biomarcadores y dianas terapéuticas. Por eso es crucial poder disponer de métodos sensibles y precisos para medir estos cambios.

De manera general, existen dos aproximaciones proteómicas que permiten analizar de manera cuantitativa los cambios en abundancia de proteínas entre muestras, y requieren de la tinción o marcaje de las proteínas/péptidos. Por un lado, está la aproximación que se conoce como proteómica basada en la electroforesis bidimensional (2DE) (o gel-based proteomics) y por otro lado la proteómica libre de gel, basada en espectrometría de masas (gel-free ó MS-based proteomics). Ambas aproximaciones requieren del análisis por MS para la identificación de las proteínas, pero la diferencia está en que en la proteómica basada en gel las proteínas son primero separadas por 2DE y cuantificadas durante su fraccionamiento en el gel, bien comparando puntos diferencialmente teñidos o marcados, mientras que en la proteómica basada en MS la cuantificación de las proteínas se realiza durante el análisis de MS gracias al marcaje isotópico de las mismas.

En la proteómica basada en gel, las proteínas se separan primero por 2DE generando patrones proteómicos únicos para cada muestra. En dicha separación bidimensional, las proteínas se separan primero en función de su punto isoeléctrico (pI) (pH al que un anfótero tiene carga neta cero) en un gel con un gradiente de pH inmovilizado, y a continuación por su peso molecular en un gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) en una segunda

dimensión perpendicular a la anterior. La cuantificación de las proteínas se realiza comparando intensidades de las bandas o 'spots' entre geles (2DE tradicional), o comparando intensidades de fluorescencia de los distintos fluoróforos para un mismo 'spot' en un mismo gel (2D-DIGE). Aquellos 'spots' diferencialmente expresados son escindidos e identificados por MS (**Figura 10A**). Pese a que esta aproximación ofrece alta resolución y es fácilmente accesible en casi cualquier laboratorio, presenta una serie de limitaciones impuesta por el propio gel, entre las que se incluye un rango dinámico limitado en la que proteínas con una alta abundancia tienden a enmascarar la detección de las proteínas de baja abundancia, dificultad en el manejo de proteínas hidrofóbicas (p.ej, las proteínas de membrana), dificultad en la detección de proteínas con valores de peso molecular y punto isoeléctrico (pI) extremos y la posibilidad de encontrar más de una proteína por 'spot' del gel, haciendo que la cuantificación sea un poco ambigua. A esto se añade también la variación dependiente de gel, lo que hace que la cuantificación sea poco reproducible.

El desarrollo de métodos proteómicos no basados en gel, también conocidos como 'shotgun proteomics' o 'bottom-up proteomic', hace referencia a aquellas aproximaciones multidimensionales que usan la combinación de cromatografía líquida en línea con la MS para la identificación y cuantificación de proteínas. Para ello, primero las proteínas son digeridas en sus péptidos por una enzima, los cuales son separados por diversos pasos de cromatografía líquida y analizados e identificados por MS en tándem. En esta aproximación, las proteínas son químicamente marcadas mediante isótopos estables antes de ser analizadas por MS y la detección del marcaje introducido durante la MS permite la cuantificación y comparación de las proteínas detectadas (**Figura 10B**).

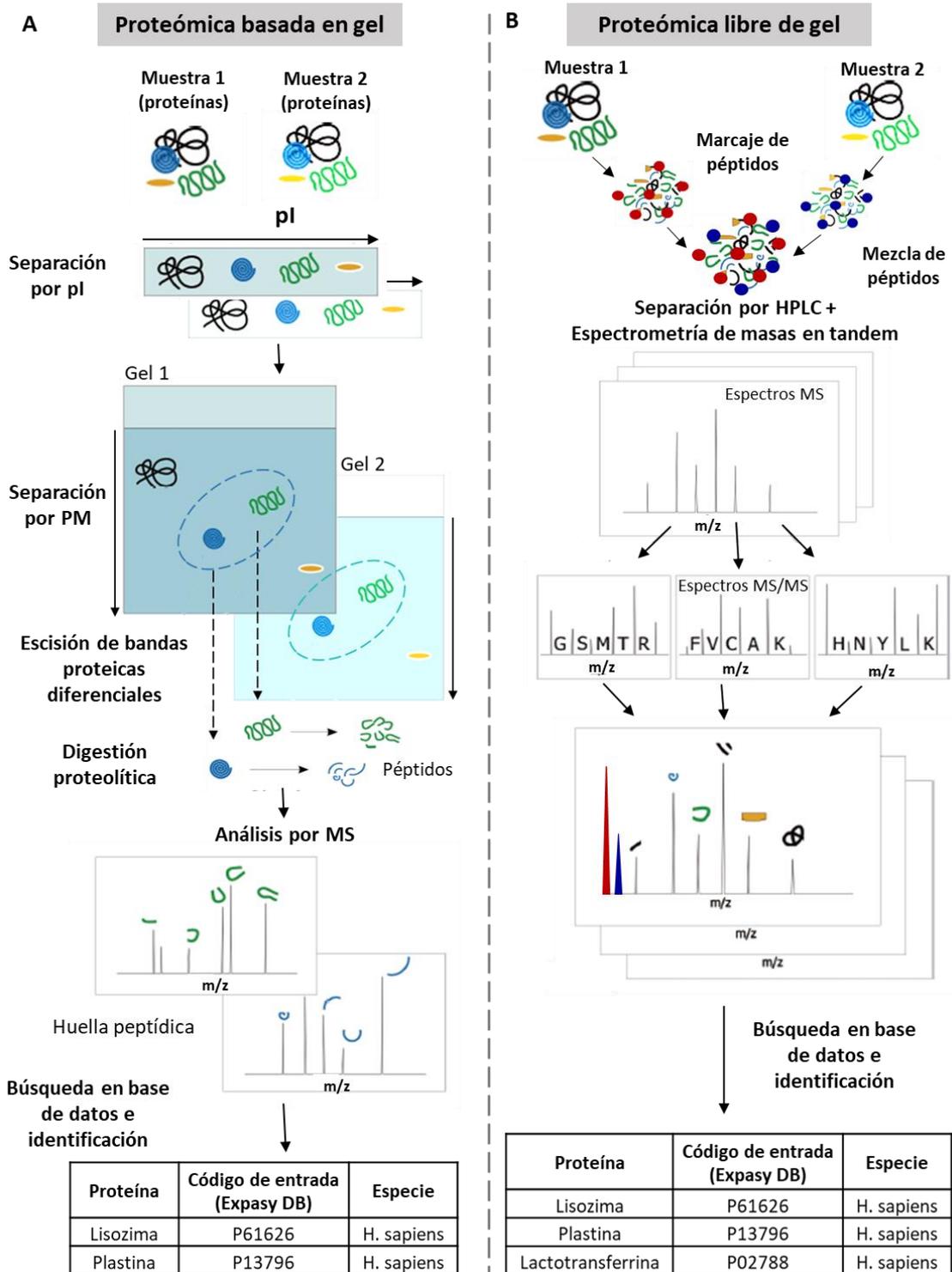


Figura 10. Aproximaciones proteómicas. (A) Pasos de un experimento de proteómica basada en 2DE. Inicialmente una mezcla compleja de proteínas se separa primero en un gel con un gradiente de pH inmovilizado en el que las proteínas se separan de acuerdo con su punto isoelectrico (pI). A continuación, el gel se deposita sobre un gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) en el que las proteínas se separan por su peso molecular (PM) en una segunda dimensión perpendicular al anterior. Tras la tinción o revelado del gel, las bandas proteicas de interés (aquellas diferencialmente cuantificadas) se extraen y se digieren en péptidos, los cuales permiten identificar la proteína correspondiente a partir de su huella peptídica obtenida por MS y subsiguiente búsqueda en bases de datos. (B) Pasos de un

experimento de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Primero, la mezcla compleja de proteínas se digiere enzimáticamente hasta sus péptidos correspondientes, los cuales son luego etiquetados (por ejemplo, marcaje isotópico o isobárico) y mezclados con los de otra muestra. La mezcla de péptidos puede ser fraccionada mediante cromatografía de alta resolución (HPLC) antes de ser analizada por MS/MS. En primer lugar, se adquieren los espectros MS desde los que ciertos péptidos son seleccionados para ser fragmentados. Los espectros de fragmentación resultantes (espectros MS/MS) se usan para llevar a cabo la identificación de la secuencia peptídica. La lista de péptidos secuenciados se utilizan con el fin de identificar, mediante su búsqueda en bases de datos, las proteínas individuales de la muestra original. Figura adaptada de (Tambor *et al.*, 2010).

5.1 Métodos basados en espectrometría de masas o 'shotgun proteomics'

5.1.1 Aspectos instrumentales de la espectrometría de masas

La espectrometría de masas es un método analítico utilizado para medir la relación de la masa frente a la carga de las moléculas (m/z). Para ello, primero las moléculas tienen que ser ionizadas para que adquieran carga y así los iones resultantes podrán ser separados de acuerdo con su relación masa/carga. La MS no sólo permite detectar moléculas en función de su relación m/z sino también detectar la abundancia de estas.

En cuanto a aspectos instrumentales, todos los equipos de MS constan de un ionizador o fuente de iones, un analizador de masas y un detector. El ionizador se encarga de convertir los componentes de una muestra en iones en fase gaseosa. Los más utilizados han sido aquellos basados en técnicas de ionización suave como el electrospray (ESI, del inglés '*Electrospray Ionization*') o la ionización por desorción con láser asistida por matriz (MALDI, del inglés '*Matrix-assisted Laser Desorption Ionization*'). Estas técnicas de ionización suaves permiten la generación de iones a partir de analitos no volátiles, termolábiles y de elevado peso molecular, como son los péptidos y proteínas, sin una fragmentación significativa y son, debido a su eficiencia, las dos técnicas preferidas actualmente para el análisis de estas moléculas. En el analizador de masas, los iones son acelerados y separados según su relación m/z . Los analizadores de masas más comúnmente utilizados son el cuadrupolo (Q, del inglés '*Quadrupole*'), el de tiempo de vuelo (TOF, del inglés '*Time-Of-Flight*'), de trampa iónica (IT, del inglés '*Ion Trap*'), de resonancia ciclotrónica de iones con Transformada de Fourier (FTICR, del inglés '*Fourier transform ion cyclotron resonance*') o de trampa orbital (Orbitrap), y pueden emplearse de manera individual o en tándem (MS/MS). En la modalidad en tándem, primero se adquiere un espectro de masas (espectro MS) peptídico o también conocido como huella peptídica (PMF, del inglés '*Peptide Mass Fingerprinting*'), en la que los péptidos de una mezcla se separan en función de su ratio m/z . De dicho espectro se seleccionan aquellos

péptidos precursores que reúnan ciertos requerimientos de intensidad y carga, los cuales se fragmentarán mediante procesos de colisión conocidos como disociación inducida por colisión (CID, del inglés '*collision-induced dissociation*'). Dichos fragmentos serán luego separados por un segundo analizador de masas en función de su relación m/z obteniéndose un espectro de fragmentación (espectro MS/MS), cuyo patrón de fragmentación será característico de la secuencia aminoacídica específica del péptido, lo que permitirá conocer la secuencia del péptido en cuestión. La información procedente tanto del primer espectro MS como del de fragmentación o MS/MS puede ser usada para identificar a las proteínas presentes en la mezcla (Nesvizhskii, 2007). Desde los analizadores de masas, los iones entran en el detector, encargado de medir la abundancia de cada ión con relación m/z específica.

Para los análisis realizados en esta tesis se ha utilizado una fuente de ionización de nanoelectrospray (nESI) acoplado a dos analizadores de masas en tándem triple cuadrupolo/TOF (QqTOF). El espectrómetro de masas de triple cuadrupolo está formado por tres cuadrupolos colocados consecutivamente: el primero y el tercero (Q1 y Q3 respectivamente) son analizadores de masas, y el segundo (Q2 o q) es una cámara de colisión donde ocurre la fragmentación de la muestra. En dicha tesis se ha utilizado un analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo (QqTOF), en el que el último cuadrupolo (Q3) es sustituido por un analizador tipo TOF.

5.1.2 Marcaje isotópico en espectrometría de masas

Se denominan isótopos a los átomos de un mismo elemento, cuyos núcleos tienen el mismo número de protones (número atómico) pero diferente número de neutrones y por tanto diferente número másico (suma del número de protones y neutrones). Como ejemplo, tendríamos el Hidrógeno y sus tres isótopos, el Protio (1 protón), el Deuterio (1 protón + 1 neutrón) y el Tritio (1 protón + 2 neutrones). Todos ellos tienen el mismo número atómico, 1, al poseer todos ellos un único protón en el núcleo, pero el número másico varía, siendo aproximadamente 1, 2 y 3 respectivamente. Dado que las propiedades físico-químicas de los compuestos marcados con isótopos pesados son idénticos a los de su equivalente ligero, excepto en la masa, el marcaje isotópico se ha ido incorporando en los métodos proteómicos cuantitativos basados en MS como estándares internos y como método para la cuantificación relativa. Así, péptidos idénticos marcados con las dos formas isotópicas (pesada o ligera) de un elemento, producirán picos en el espectro de masas con una diferencia de masa característica a la de los isótopos usados. Dichos isótopos pueden ser incorporados metabólicamente o químicamente a las proteínas o péptidos presentes en la muestra (Goshe and Smith, 2003; Ong

and Mann, 2005). Así en el marcaje metabólico, los isótopos estables se incorporan a las proteínas durante el crecimiento y producción de proteína por parte de las células, usando aminoácidos marcados con distintos isótopos estables en el medio de cultivo celular. Este es el caso de la estrategia SILAC (del inglés *'stable isotope labeling by amino acids in cell culture'*).

Respecto al marcaje químico, las proteínas o péptidos se marcan mediante exposición a los reactivos con los que se produce su marcaje isotópico. Dicho marcaje se lleva a cabo después de la recogida de la muestra, tras la extracción de proteínas. Dichos reactivos reaccionan normalmente con los grupos aminos presentes en los extremos N-terminales de las cadenas polipeptídicas y en los residuos de lisina, o con los grupos sulfhidrilos o tioles presentes en las cisteínas. Los isótopos estables más usados son los de hidrógeno/deuterio ($1\text{H}/2\text{H}$), carbono ($12\text{C}/13\text{C}$) y nitrógeno ($14\text{N}/15\text{N}$). Dentro de las estrategias de MS basadas en marcaje químico con isótopos estables están el ICAT o etiqueta de afinidad codificada por isótopo (del inglés *'Isotope-Coded Affinity Tag'*) y el iTRAQ o cuantificación absoluta y relativa con etiquetas isobáricas (del inglés, *'Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification'*), un tipo de marcaje isotópico, en la que las distintos reactivos presentan la misma masa nominal, de manera que péptidos idénticos marcados con distintos reactivos isobáricos iTRAQ presentarán la misma masa tras su marcaje.

El ICAT es una estrategia de marcaje de proteínas específica de los residuos de cisteína diseñado para comparar dos muestras en dos estados celulares diferentes (p.ej. normal frente a enfermedad), de manera que una de ellas es marcada con la versión ligera y la otra con la versión pesada de los reactivos. La especificidad de los reactivos ICAT por los residuos de cisteína reduce la complejidad de la muestra, ya que sólo los péptidos que contengan cisteínas serán marcados y analizados por MS, sin embargo, su principal desventaja es que algunas proteínas carecen de residuos de cisteína por lo que quedarán excluidas del análisis. Igualmente, no se detectarán aquellas modificaciones posttraduccionales que afecten al estado de las cisteínas, o aquellas que se encuentren en péptidos carentes de cisteínas.

Las estrategias de marcaje isobárico como el iTRAQ, consiguen superar algunas de las principales limitaciones del ICAT. El iTRAQ es el primer set de reactivos basados en isótopos estables, específicos de aminoácidos y multiplexado que puede marcar todos los péptidos de hasta 8 muestras biológicas diferentes permitiendo una identificación y cuantificación simultánea de los mismos. El método iTRAQ fue desarrollado en 2004 por Applied Biosystems (ahora AB Sciex) (Ross *et al.*, 2004), originalmente diseñado para el análisis simultáneo de hasta 4 muestras (iTRAQ 4-plex), pero actualmente existe en el mercado un kit con hasta 8

reactivos diferentes (iTRAQ 8-plex) (Choe *et al.*, 2007). Los reactivos iTRAQ reaccionan con todos los grupos aminos de los péptidos, lo que significa que casi todos los péptidos procedentes de la digestión proteolítica estarán marcados al menos en su grupo N-terminal, permitiendo así obtener información de todos ellos e incluso de sus modificaciones posttraduccionales. Con ello, también se incrementa la confianza de las identificaciones proteicas realizadas al alcanzarse con ellos un mayor porcentaje de cobertura de las secuencias polipeptídicas de las proteínas identificadas. Además la naturaleza isobárica de los reactivos permite que el mismo péptido procedente de las distintas muestras a comparar aparezca como un único pico en el espectro MS, reduciendo la densidad de los datos en los espectros MS sin haber una aumento de la complejidad espectral por el hecho de combinar hasta 8 muestras, en comparación con las estrategias de marcaje isotópico donde las versiones 'pesada' y ligera' de los péptidos aparecen como picos independientes separados por una diferencia de masa determinada.

Tanto el SILAC, como el ICAT y el iTRAQ sirven para el estudio de la 'proteómica de expresión diferencial', que es cuando se quiere comparar los proteomas de dos o más situaciones diferentes. En el caso del SILAC y ICAT pueden sólo comparar la cuantificación relativa de las proteínas entre dos muestras diferentes generalmente, pero el iTRAQ permite la comparación de hasta 8 muestras a la vez en un único análisis de MS, reduciendo el tiempo de análisis y las variaciones técnicas.

5.1.3 Marcaje isobárico: iTRAQ 8-plex

Los reactivos iTRAQ son marcadores isobáricos, es decir motivos químicos que presentan la misma masa. Dichos reactivos se componen de tres regiones bien diferenciadas 1) el grupo reactivo, 2) el grupo balanceador y 3) el grupo reportero (**Figura 11**). El grupo reactivo es un derivado de la N-hidroxisuccimida que reacciona con las aminas primarias de los péptidos incluyendo el extremo N-terminal y el grupo ϵ -amino de la cadena lateral de las lisinas. La región isobárica la componen las otras dos. Por un lado, está el grupo reportero, derivado de la metilpiperacina, que es único para cada reactivo y que para la versión de 8-plex incluyen aquellos con relación m/z de 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 y 121, y por otro lado está el grupo balanceador que lo que hace es compensar la diferencia de masa entre los grupos reporteros, de manera que la masa total de cada reactivo sea la misma. Así, la masa del grupo balanceador varía de 184 Da a 192 Da para mantener una masa total constante de 305 Da. Dicha compensación de la masa se consigue gracias a una distribución complementaria de los isótopos pesados del N, C y O entre los grupos reportero y balanceador. De esta manera,

péptidos idénticos presentes en distintas muestras y marcados con reactivos diferentes, serán también isobáricos, cromatográficamente indistinguibles y mostrando un único pico en el espectro de MS para las 8 muestras analizadas. Sin embargo, tras la fragmentación de los péptidos por MS/MS, el grupo reportero se libera del resto como un ión de bajo peso molecular (relación m/z de 113-121) que será único para cada reactivo. Como cada ión reportero difiere en su peso molecular, estos se podrán detectar como picos distintos en la región de bajo m/z de los espectros MS/MS. Así, la concentración relativa de los péptidos se obtiene por comparación de las intensidades de las señales de los iones reporteros en los espectros MS/MS. Por otro lado, la fragmentación MS/MS de los péptidos también se producen una serie de iones y- y b- que son usados para confirmar la secuencia e identificación del péptido (**Figura 12**). Con el fin de minimizar las posibles interferencias con el ruido de fondo en la región de baja masa, el kit excluye el reportero con m/z de 120, ya que el ión amonio de la fenilalanina aparece a esa relación m/z.

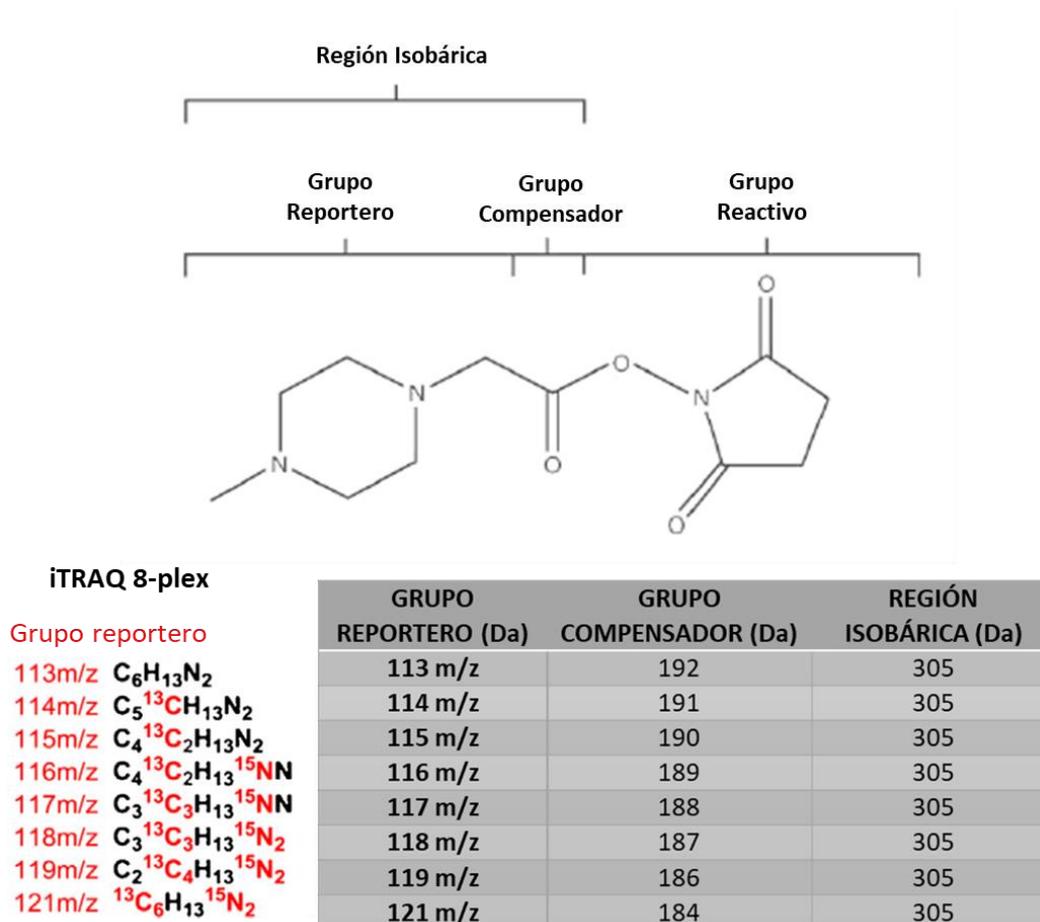


Figura 11. Partes del reactivo iTRAQ. El reactivo iTRAQ es un marcador isobárico que presenta un grupo reportero, un grupo reactivo y una porción compensadora. El grupo reportero presenta una relación m/z que va desde 113,1 a 121,1 en la versión de ocho reactivos y de 114,1 a 117,1 en la de cuatro. El grupo compensador compensa la diferencia que presentan

entre sí los diferentes marcadores, por lo que su masa va de 184 a 192 Da en la versión de ocho reactivos y de 28 a 31 en la de cuatro. De esta manera, la masa de la región isobárica de todos los reactivos se mantiene constante, siendo de 305 Da en la versión de ocho reactivos y de 145 en la de cuatro. En la parte de abajo se muestra la composición isotópica del grupo reportero y las masas correspondiente a las distintas partes de la molécula para cada reactivo de la versión 8plex.

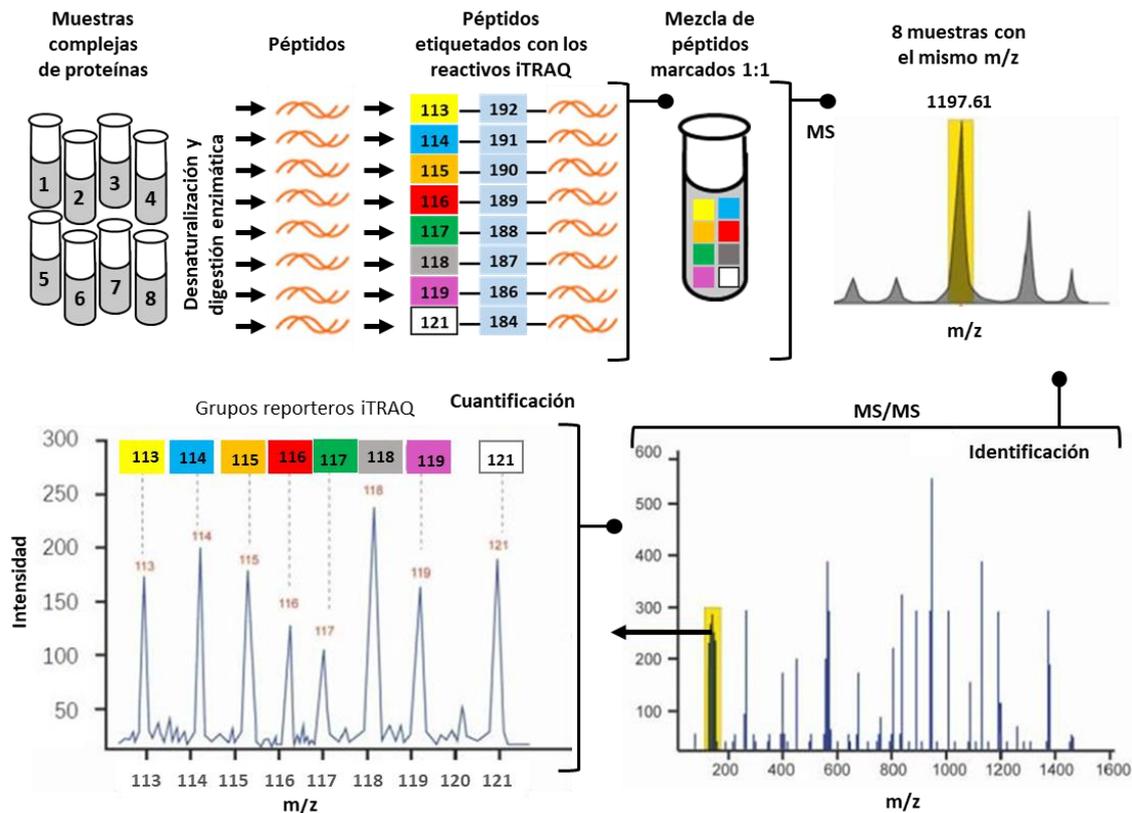


Figura 12. Pasos de un experimento de iTRAQ. Una vez las muestras de péptidos han sido marcadas con los distintos reactivos iTRAQ, estas son combinadas y tratadas como una muestra única en los siguientes procesos y análisis. Durante la obtención de los espectros MS/MS cada marcador isobárico produce un ión reportero único que identifica la muestra del que procede e indica la abundancia relativa del péptido al que se encontraba unido antes de su fragmentación. Figura adaptada de Applied Biosystems iTRAQ Reagents. Foster City, CA Applied Biosystems; 2004.

6. El sistema endocrino y los disruptores endocrinos

El sistema endocrino-hormonal es un sistema complejo de mensajería química finamente regulado por hormonas, que mantiene en comunicación todo el organismo y está involucrado en todas las etapas de la vida, desde la gestación, el nacimiento, la pubertad y la edad adulta hasta la senescencia. Está formado por glándulas que secretan hormonas al torrente sanguíneo las cuales desencadenan una determinada función celular en los órganos

dianas, a través de la unión a receptores hormonales. El número y tipo de receptores hormonales en las células cambian con el tiempo, y cambian en función de la concentración de hormona en la sangre y del estado de desarrollo del organismo. Así, el sistema endocrino es el encargado de la estabilidad del organismo regulando funciones vitales como el metabolismo, la respuesta al estrés, el desarrollo sexual, el desarrollo neuronal, la inteligencia, el comportamiento, los patrones del sueño, la función inmune y la capacidad de reproducirse entre otras (Jameson *et al.*, 2010).

Entre los órganos-glándulas endocrinos se encuentran la hipófisis, el hipotálamo, la tiroides, el páncreas, la glándula adrenal, los ovarios y los testículos, y entre las hormonas que estas secretan se encuentran la GnRH, la LH, la FSH, la hormona tiroidea, la insulina, el glucagón, glucocorticoides, estrógenos y testosterona entre otros. Dentro del sistema endocrino, el eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal, juega un papel fundamental en la regulación del ciclo menstrual y endometrial y por tanto en la función reproductora femenina.

Los EDCs son agentes externos que se encuentran en el medio ambiente principalmente como resultado de la actividad antropogénica. Son compuestos altamente heterogéneos en cuanto a su estructura y pueden ser de diversa naturaleza: compuestos orgánicos sintéticos, muchos de ellos contaminantes industriales, como los pesticidas (organofosforados, carbamatos y organoclorados como el insecticida dicloro-difenil-tricloroetano o DDT, y el metoxicloro o MTX), fungicidas (vinclozolin), agentes antibacterianos (triclosan), compuestos farmacéuticos (dietilestilbestrol, DES), plastificantes (ftalatos como el di(2-etilhexil) ftalato, DEHP), plásticos (Bifesnol A, BPA), dioxinas (tetracloro dibenzodioxina, TCDD), bisfenilos policlorados (PCBs), retardantes de llama (difenil ésteres polibromados; PBDE), desincrustante de pinturas (tributiltin), conservantes antibacterianos de cosméticos (parabenos) así como derivados naturales de plantas como los fitoestrógenos (genisteína y daidzeína). También hay compuestos inorgánicos, como los metales pesados (cadmio, mercurio, plomo, arsénico, etc) que también tienen propiedades o capacidades tipo EDCs (**Figura 13**).

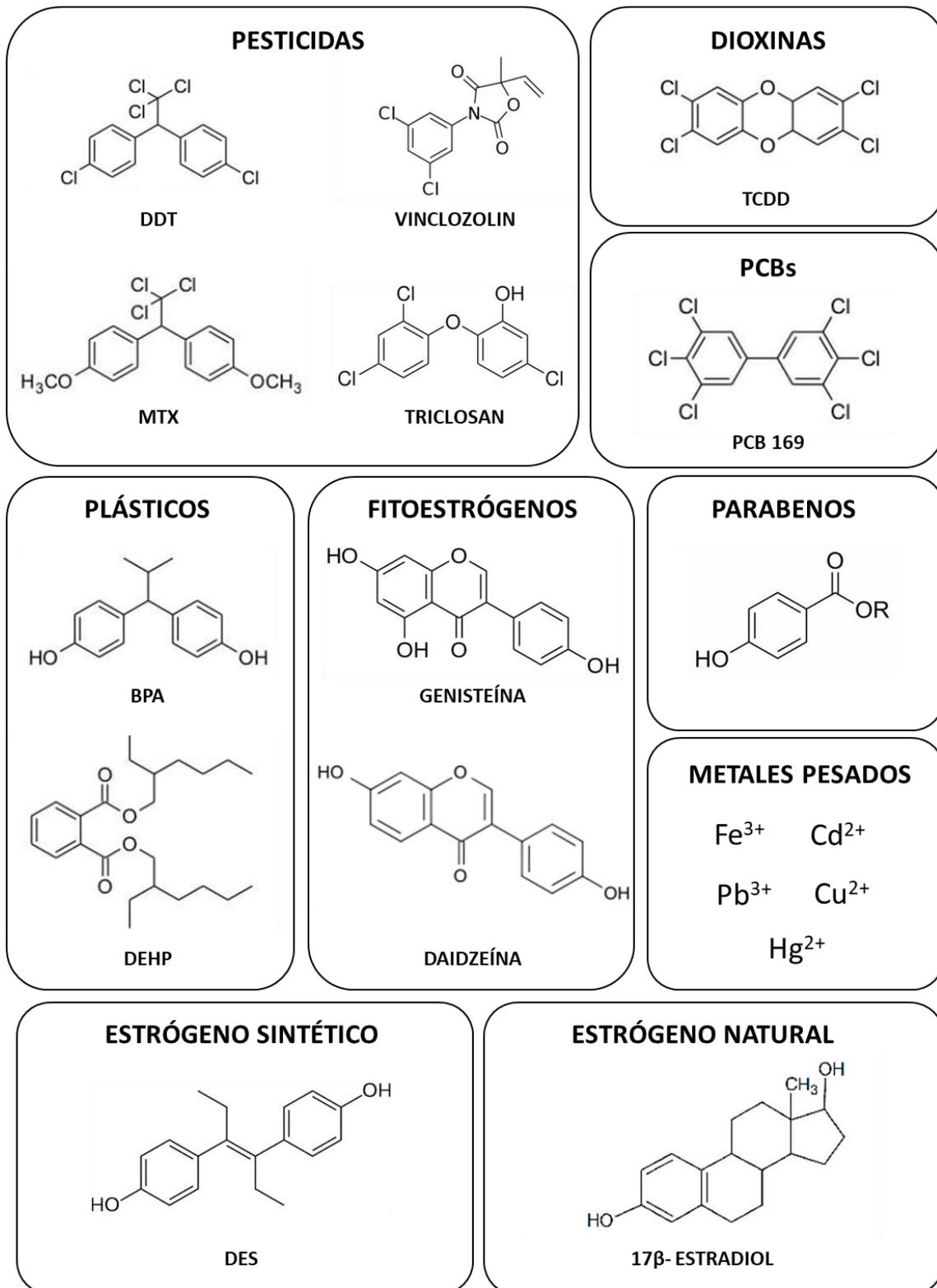


Figura 13. Estructura química de los principales EDCs y del estrógeno natural, 17β-estradiol. DDT, dicloro-difenil-tricloroetano; MTX, metoxicloro; TCDD, tetracloro dibenzodioxina; PCB, bisfenilos policlorados; BPA, bisfenol A; DEHP, dietilhexilftalato; DES, dietilestilbestrol.

Los seres humanos estamos constantemente expuestos a los EDCs. La exposición comienza en el útero y nunca cesa a lo largo de la vida ya que están presentes en una gran variedad de productos y artículos de consumo habitual como botellas de plásticos, plaguicidas, retardadores de llama, fragancias, juguetes, ropa, cosméticos, protectores solares, electrónica, productos de limpieza, automóviles, materiales de construcción, alimentos y envases de alimentos, en los entornos laborales o como contaminantes ambientales (suelo, aire, agua y alimentos contaminados) para los cuales no existe un umbral de exposición seguro (**Tabla 4**). Debido a la amplia variedad de fuentes de exposición a EDCs, son también varias las vías de entrada al organismo. Las principales son:

- La vía digestiva, por la ingestión de agua y alimentos contaminados.
- La vía respiratoria, mediante la inhalación de contaminantes presentes en el ambiente exterior o durante la realización de trabajos que exigen la manipulación de productos con EDCs.
- La vía cutánea, por absorción dérmica durante la utilización de cosméticos, productos de higiene, ropa o sustancias empleadas en el trabajo que contengan disruptores endocrinos.

Tabla 4. Principales usos y fuentes de exposición de los EDCs

USOS	EJEMPLOS DE EDCs
Plásticos	Bisfenol A (BPA), Ftalatos, metales (plomo, cadmio, níquel, mercurio, arsénico)
Envases de alimentos	BPA, Ftalatos, metales (plomo, cadmio, níquel, mercurio, arsénico)
Cosméticos y productos de higiene personal	Ftalatos, parabenos, triclosán, filtros solares
Productos de limpieza	Triclosán, ftalatos
Pinturas, lacas y barnices	BPA, Ftalatos,
Pesticidas	DDT, atrazina, MTX, vinclozólín
Tiques de compra	Papel térmico con BPA
Materiales eléctricos, electrónicos y de construcción	Retardantes de llama (PBDE)
Juguetes	Ftalatos
Vegetales	Pesticidas
Agua de beber	Arsénico, plomo, mercurio
Lubricantes y solventes industriales	Bisfenilos policlorados (PCBs), dioxinas

En 1997, la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (U.S. EPA, Environmental Protection Agency) definió a los disruptores endocrinos como agentes exógenos que interfieren en la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación natural de las hormonas del organismo encargadas del mantenimiento de la homeostasis,

reproducción, desarrollo y/o comportamiento (EPA, 1997). Recientemente, expertos en el sistema endocrino y EDCs han definido, en una declaración consenso de expertos, las diez características claves que definen a los disruptores endocrinos, con el fin de poder utilizarlas en la identificación y evaluación de nuevas sustancias con posible riesgo EDC (La Merrill *et al.*, 2020). Las diez características claves son:

- Actividad como **agonista hormonal**, capaz de interactuar con y activar receptores hormonales produciendo una función biológica similar a la de la hormona endógena (Yang *et al.*, 2015). Por ejemplo, una sustancia estrogénica sería aquella que actúa como un estrógeno, uniéndose a los receptores de estrógeno celulares y desencadenando una respuesta biológica cualitativamente similar a la que desencadenaría dicha hormona endógenamente.
- Actividad como **antagonista hormonal**, interactuando con el receptor pero sin producir una respuesta biológica en sí tras su unión, además de bloquear la unión de la hormona propiamente dicha (Kelce and Wilson, 1997). Así, un anti-andrógeno es una sustancia que puede bloquear la acción de un andrógeno por unión a su receptor, evitando que las células respondan a andrógenos.
- Alteración de la **expresión de receptores hormonales**.
- Alteración de la **transducción de señales** en células sensibles a hormonas.
- Inducción de **modificaciones epigenéticas** en células sensibles o productoras de hormonas.
- Alteración de la **síntesis de hormonas** (Crellin *et al.*, 2001).
- Alteración del **transporte hormonal** a través de las membranas celulares.
- Alteración de la **distribución hormonal o los niveles circulantes de hormonas**.
- Alteración del **metabolismo hormonal** o la **depuración** (Ye *et al.*, 2011)
- Alteración del **destino de las células productoras de hormonas** o sensibles a las hormonas.

Otras características relevantes de los disruptores endocrinos en cuanto a su modo de actuación (Gore *et al.*, 2006) son las siguientes:

- Los efectos de los EDCs pueden variar dependiendo del momento o de la etapa de la vida en la que se produce exposición. Existen diferentes **ventanas de exposición** a lo largo de la vida con diferente **grado de susceptibilidad**. La exposición a EDCs es principalmente dañina en los momentos en los que el cuerpo experimenta grandes cambios hormonales incluyendo el desarrollo prenatal y postnatal temprano, la

pubertad, el embarazo y la menopausia/andropausia, siendo especialmente importante durante el desarrollo del feto y en la infancia, ya que las hormonas juegan un papel crítico en controlar el desarrollo del cuerpo.

- Los efectos generados por la exposición a EDCs pueden ser transmitidos a las siguientes generaciones, aún incluso sin haber estado expuestas al estímulo inicial, probablemente implicando mecanismos epigenéticos. Es lo que se conoce como **herencia multi y transgeneracional** (Xin *et al.*, 2015).
- Muchos EDCs no siempre presentan curvas respuestas dosis dependientes, ya que un incremento de la dosis no siempre va asociado a un mayor efecto. Muchos de ellos presentan **efectos a bajas dosis**, no observables a altas dosis, y por tanto **curvas dosis-respuestas no monotónicas** (Vandenberg *et al.*, 2012) (**Figura 14**).

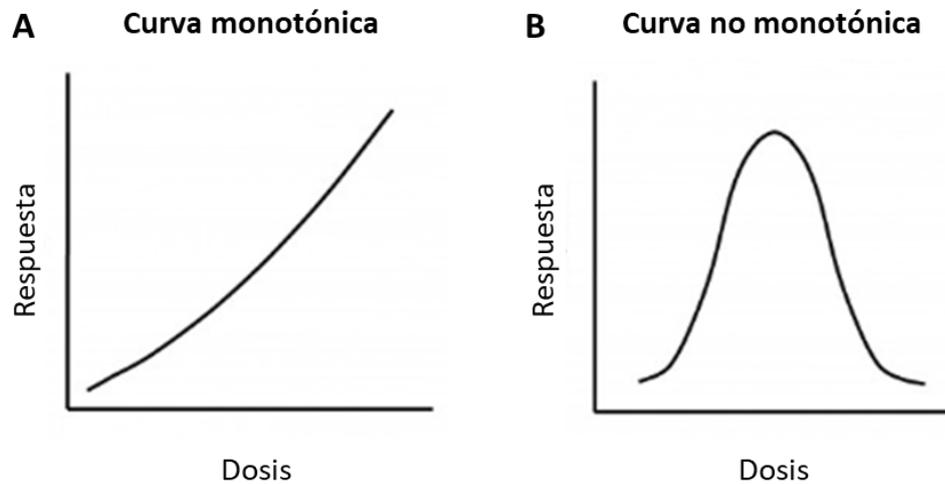


Figura 14. Ejemplos de curvas dosis-respuesta. **A.** Curva monotónica, donde hay una asociación lineal positiva entre dosis y efecto, de manera que efectos a altas dosis permiten predecir de manera precisa efectos a bajas dosis. **B.** Curva no monotónica en forma de U invertida, donde la pendiente de la curva cambia una o más veces y donde los efectos a bajas dosis no se pueden predecir a partir de los observados a altas dosis.

- Algunos EDCs presentan **estructuras similares a las de las hormonas endógenas** con cuya acción interfieren, explicando así la capacidad que tienen los EDCs de actuar como agonistas o antagonistas hormonales. Ejemplo de ello serían los EDCs estrogénicos como el DES (estrógeno sintético), el DDT, los PCBs, y fitoestrógenos como la genisteína y daidzeína (Bern *et al.*, 1992; Sumpter and Jobling, 1993; Newbold, 1995; Cederroth *et al.*, 2012).

7. Consecuencias en la fertilidad femenina por la exposición a EDCs

Según la organización mundial de la salud (OMS), una cuarta parte de la carga mundial de morbilidad se debe a factores ambientales modificables (Nelson *et al.*, 2005). Aproximadamente el 15%-30% de parejas de todo el mundo son diagnosticadas de 'infertilidad de causa desconocida' (Quaas and Dokras, 2008). El aumento en la prevalencia de la infertilidad, asociada a una mayor exposición a contaminantes ambientales, evidenciado por estudios experimentales y epidemiológicos, ha llevado a centrar la atención en investigar la etiología de la infertilidad. Entre los factores que se piensan que pueden estar afectando a la fertilidad humana están, el ambiente físico (salud y estilo de vida), factores psicosociales y socioeconómicos y los contaminantes ambientales (Younglai *et al.*, 2005).

Los EDCs son sustancias químicas ubicuas que exhiben propiedades endocrinas disruptoras tanto en humanos como en animales. La reproducción femenina es un proceso importante, el cual está regulado por hormonas, y es susceptible de los efectos de exposición a los EDCs. La disrupción de las funciones reproductivas femeninas por exposición a EDCs puede resultar en subfertilidad, infertilidad, una producción hormonal inadecuada, anormalidades en el ciclo menstrual y estral, anovulación, y senescencia reproductiva temprana (Patel *et al.*, 2015; Rattan *et al.*, 2017).

Se han estudiado los efectos que tiene la exposición a diversos EDCs sobre el hipotálamo, la pituitaria, los ovarios y el útero, de mujeres y hembras adultas de roedores, por ser estos los órganos responsables de conseguir una adecuada fertilidad (Rattan *et al.*, 2017). En el modelo animal murino y de rata hay numerosos estudios que evidencian que EDCs son capaces de interferir en la funcionalidad de estos cuatro órganos/glándulas en hembras adultas. En el caso del hipotálamo y pituitaria, la mayoría de los EDCs estudiados afectaron a los niveles y liberación de la hormona GnRH y de las gonadotropinas (LH y FSH) respectivamente. A nivel ovárico, la mayoría de los EDCs afectaron principalmente al peso ovárico, al crecimiento y producción folicular y a la viabilidad oocitaria, disminuyéndolos o incrementando la atresia folicular. También afectaron a la esteroidogénesis. En cuanto al útero, la mayoría de los EDCs afectaron al peso y tamaño uterino, bien aumentándolo o disminuyéndolo, a la estructura de las glándulas y grosor endometrial, algunos indujeron procesos inflamatorios y otros afectaron negativamente a la implantación. En el caso de humanos, la mayoría de los datos de asociación entre exposición a EDCs y efectos en la función reproductiva provienen de estudios epidemiológicos o de estudios de mujeres sometidas a técnicas de reproducción asistida. La mayoría de estos estudios en mujeres adultas evidencian

un efecto a nivel ovárico, observando efectos como una reducción en la producción de hormonas esteroideas sexuales, disminución en el número y desarrollo ovocitario, alteraciones en el ciclo menstrual y un reducido desarrollo embrionario. En las siguientes tablas se muestra una descripción de los efectos generados por la exposición a EDCs en los órganos reproductivos en hembras de roedores adultas (**Tabla 5**) y en mujeres adultas (**Tabla 6**).

Tabla 5. Efectos de los EDCs en el sistema reproductivo femenino (modelo animal)

Órgano	EDCs	Efecto	Referencias
Hipotálamo	Pesticidas	↑ niveles de GnRH	(Gore, 2001)
	PCBs	↓ los niveles de GnRH y ↑ la apoptosis de células GnRH	(Bell, 2014)
Pituitaria	Pesticidas	↓ la liberación de LH, suprime la frecuencia de LH y ↑ la liberación de FSH	(Stoker <i>et al.</i> , 2005; Fraites <i>et al.</i> , 2009; Goldman <i>et al.</i> , 2013)
	DES	Supresión de los niveles de LH y FSH, ↓ cavidad de la glándula pituitaria	(Jaroenporn <i>et al.</i> , 2007; Zhao <i>et al.</i> , 2010)
	Metales pesados	↓ niveles de LH, FSH y la fluidez de la membrana pituitaria	(Chatterjee and Chatterji, 2010; Chattopadhyay and Ghosh, 2010)
	Dioxina	↓ niveles de LH, FSH y prolactina	(Petroff <i>et al.</i> , 2001)
Ovario	Pesticidas	↓ peso ovárico, ↓ crecimiento folicular, ↓ viabilidad oocitaria, y ↓ hormonas esteroideas sexuales	(Borgeest <i>et al.</i> , 2002; Tiemann, 2008; Basavarajappa <i>et al.</i> , 2011; Aoyama <i>et al.</i> , 2012; Sangha <i>et al.</i> , 2013)
	DES	↓ el número de folículos; atrofia ovárica y cicatrices en el tejido conectivo ovárico	(Jaroenporn <i>et al.</i> , 2007; Hong <i>et al.</i> , 2010)
	Plastificantes	↑ atresia folicular; ↓ el número de folículos	(Wato <i>et al.</i> , 2009; Rasmussen <i>et al.</i> , 2017)
	Metales pesados	↓ peso ovárico, ↓ el número de folículos, ↑ atresia folicular	(Chattopadhyay and Ghosh, 2010)
	Dioxina	↓ la ovulación, ↓ peso ovárico y la esteroidogénesis.	(Petroff <i>et al.</i> , 2001; Bhattacharya and Keating, 2012)
	PCBs	↓ la esteroidogénesis e ↑ la apoptosis de las células del cúmulus	(Liu <i>et al.</i> , 2014)
	Triclosan	↓ peso ovárico, ↓ hormonas sexuales esteroideas	(Fang <i>et al.</i> , 2015; Feng <i>et al.</i> , 2016)
Útero	Pesticidas	↑ y ↓ el peso uterino	(Aoyama <i>et al.</i> , 2012; Rana, 2014)
	DES	Engrosamiento del endometrio, dilatación de las glándulas, ↑ de proteínas secretoras, distensión de los cuernos uterinos	(Jaroenporn <i>et al.</i> , 2007; Zhao <i>et al.</i> , 2014)
	Plastificantes	↑ crecimiento uterino, endometriosis	(Signorile <i>et al.</i> , 2010; Rochester and Bolden, 2015)
	Metales pesados	↓ tamaño uterino y del número de glándulas endometriales, ↓ grosor del miometrio	(Chatterjee and Chatterji, 2010; Chattopadhyay and Ghosh, 2010)

Tabla 5. Continuación

Órgano	EDCs	Efecto	Referencias
Útero	Dioxina	Induce inflamación y lesiones y ↓ la implantación	(Kitajima <i>et al.</i> , 2004; Yoshizawa <i>et al.</i> , 2009)
	PCBs	Induce inflamación crónica y carcinoma uterino	(Yoshizawa <i>et al.</i> , 2009)
	Triclosan	↓ peso uterino, ↓ sitios de implantación	(Crawford and deCatanzaro, 2012)
	Parabenos	↑ peso uterino	(Lemini <i>et al.</i> , 2003; Kawaguchi <i>et al.</i> , 2009)

DES (dietilestilbestrol); PCBs (Bisfenilos policlorados)

Tabla 6. Efectos de los EDCs en el sistema reproductivo femenino (modelo humano)

Órgano	EDCs	Efecto	Referencias
Pituitaria	Metales pesados	Asociación inversa con la [LH] en sangre	(Laks, 2009)
Ovario	Pesticidas	↓ producción de hormonas esteroideas sexuales	(Windham <i>et al.</i> , 2005; Luderer <i>et al.</i> , 2013)
	Metales pesados	↓ producción de oocitos y ↓ el número de oocitos maduros	(Wright <i>et al.</i> , 2015; Cavallini <i>et al.</i> , 2016)
	Plastificantes	Síndrome de ovario poliquístico	(Tarantino <i>et al.</i> , 2013)
Útero	Dioxina	Inhibe enzimas y receptores de hormonas dentro de la vía de la esteroidogénesis	(Patel <i>et al.</i> , 2015)
	PCBs	↓ desarrollo embrionario (FIV)	(Petro <i>et al.</i> , 2012)
	Parabenos	↓ número de folículos antrales y acortamiento de los ciclos menstruales	(Smith <i>et al.</i> , 2013; Nishihama <i>et al.</i> , 2016)
	Metales pesados	Asociación con fibroides uterinos	(Johnstone <i>et al.</i> , 2014)

PCBs (Bisfenilos policlorados)

8. Metales pesados. Definición, fuentes de contaminación ambiental y exposición humana

El término de 'metales pesados' (MP, *Heavy metals*) hace referencia a aquellos metales que poseen una densidad específica superior a 5 veces la densidad del agua (5 g/cm³) y un peso atómico superior a 40.04 y que resultan perjudiciales para el medio ambiente y para los seres vivos (Duffus, 2002; Järup, 2003). Aunque inicialmente no existió una definición clara de los MP, el término se utilizó para referirse al alto grado de toxicidad y contaminación ambiental de ciertos metales. Sin embargo, parece ser que es la densidad, la principal característica que los define. A bajas dosis, algunos MP son considerados nutrientes esenciales para la vida como el hierro (Fe), el cobalto (Co), el cobre (Cu), el níquel (Ni), el magnesio (Mg),

el molibdeno (Mo), el manganeso (Mn), el selenio (Se) y el Zinc (Zn). Estos elementos están presentes de manera natural en ciertos alimentos (marisco, frutas y vegetales) y desempeñan funciones importantes en el metabolismo celular y en el mantenimiento de las funciones bioquímicas y fisiológicas de los seres vivos (Caserta *et al.*, 2011). Sin embargo, cuando exceden un umbral de concentración pueden llegar a resultar nocivos para la salud. Hay otros que no desarrollan ninguna función biológica y son considerados como metales no esenciales. Es el caso del cadmio (Cd), el mercurio (Hg), el plomo (Pb) la plata (Ag), el cromo (Cr) y el arsénico (As), que incluso en muy pequeñas cantidades resultan tóxicos para los humanos. Muchos de estos metales no esenciales han sido considerados por la EPA como potenciales carcinógenos.

En el contexto de la disrupción endocrina, la actividad estrogénica de ciertos xenobióticos es considerado un mecanismo establecido de toxicidad que puede alterar la función reproductiva e incluso causar algún tipo de cáncer (Daston *et al.*, 1997). Los MP son un grupo peculiar de EDCs, pues pese a ser compuestos inorgánicos, carentes de una estructura similar a la del 17 β -estradiol, muchos de ellos han mostrado tener un efecto estrogénico (Choe *et al.*, 2003). De hecho, también se le conoce con el término de metaloestrógenos (Darbre, 2006) por la capacidad que tienen de unirse a los receptores de estrógeno (ER), actuando como agonistas estrogénicos tanto *in vitro* (Choe *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2003) como *in vivo* (Johnson *et al.*, 2003; Vetillard and Bailhache, 2005). Esta respuesta estrogénica está caracterizada por una disminución de los niveles de ER, un incremento de la expresión de genes regulados por estrógenos y por un incremento en la proliferación de células dependientes de estrógeno para crecer (Martin *et al.*, 2003).

Los metales pesados se encuentran de manera natural en el medio ambiente o entran en el a través de actividades humanas. Debido a la era de la industrialización y con ello al incremento de la contaminación ambiental por parte las actividades del hombre, se ha visto un incremento de la presencia de MP en los ecosistemas. Entre las principales fuentes se incluyen la erosión natural de la corteza terrestre, erupciones volcánicas, la minería, vertidos industriales, la combustión de combustibles fósiles, las esorrentías urbanas, aguas residuales, actividad agrícola (insecticidas, herbicidas, etc) y muchas otras (Morais *et al.*, 2012). En el caso de las industrias, cuando los metales pesados se utilizan para distintos fines industriales, muchos de ellos son liberados al aire por medio de la combustión o al suelo y aguas en forma de vertidos. Además, los productos industriales tales como las pinturas, cosméticos, pesticidas y herbicidas, son también fuentes de metales pesados. Las vías de entrada al organismo son diversas y derivan de las anteriores. De esta forma, los metales pesados pueden entrar al

organismo por vía oral, a través del consumo de alimentos (pescado, plantas, etc) y aguas contaminadas, por la inhalación de aire contaminado, por contacto directo (vía dérmica) con productos industriales o a través de exposición ocupacional en el lugar de trabajo (Yu *et al.*, 2012b) (Figura 15).

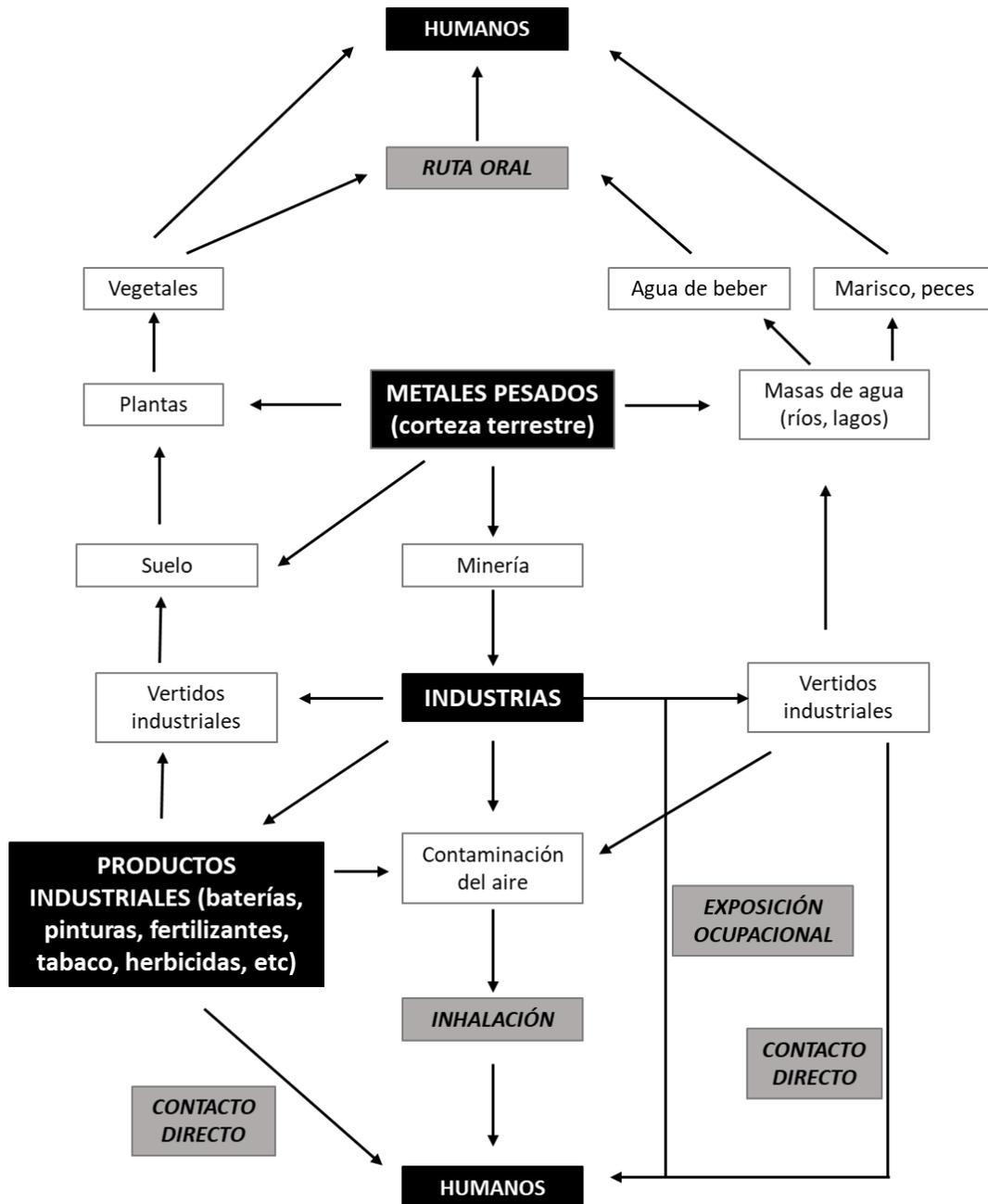


Figura 15. Esquema de las fuentes de exposición y vías de entrada en los seres humanos. Adaptada de (Azeh Engwa *et al.*, 2019).

Los metales pesados son compuestos inorgánicos que el cuerpo no es capaz de metabolizar y que, por tanto, se acumulan en los órganos y los tejidos. La mayoría de los metales pesados se

distribuyen en el cuerpo a través de la sangre (Florea and Büsselberg, 2006), y dependiendo de la forma química en la que se presenten, podrán ser mejor o peor depurados.

8.1 Mecanismos de acción de los metales pesados sobre la salud humana

Los metales pesados son perjudiciales para la salud humana, presentan numerosos mecanismos de acción y múltiples dianas biológicas. Entre los principales mecanismos por los que los MP generan toxicidad son:

- Estrés oxidativo y oxidación de moléculas biológicas

Se sabe que ciertos metales generan especies reactivas del oxígeno (ROS) o radicales libres tales como superóxido (O_2^{\bullet}), óxido nítrico (NO^{\bullet}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^{\bullet}) entre otros, que pueden conducir a un estrés oxidativo y causar otros daños celulares (Cd, Cr, Pb, As) (Jomova and Valko, 2011; Reyes *et al.*, 2013). El estrés oxidativo a nivel celular está causado por un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la generación de antioxidantes celulares (glutatión, glutatión transferasa, superóxido dismutasa, catalasa, etc) necesarios para la detoxificación y reparación de daños causados. La mayoría de los metales afectan al balance entre ROS y antioxidantes, incrementando los niveles de ROS y disminuyendo los niveles de antioxidantes (**Figura 16**). A altas concentraciones, ROS puede causar daños estructurales en las células, proteínas, ácidos nucleicos (roturas en la cadena del DNA), membranas y lípidos (peroxidación lipídica), generando una situación de estrés a nivel celular (Mathew, 2011). Estudios experimentales han confirmado que el Cu es capaz de inducir roturas en la cadena del DNA y la oxidación de las bases nitrogenadas a través de la generación de ROS (Brezova *et al.*, 2003).

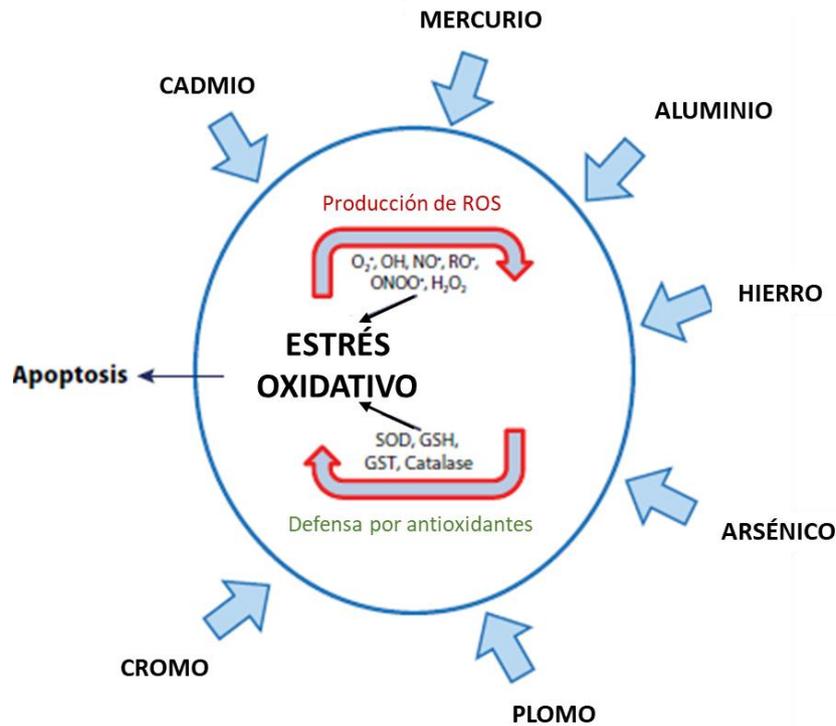


Figura 16. Esquema de la inducción de estrés oxidativo por parte de los metales pesados, al alterar el equilibrio celular entre la producción de ROS y la de antioxidantes. Adaptada de (Jaishankar *et al.*, 2014).

- Inducción de carcinogénesis

Los metales pesados pueden inducir efectos carcinogénicos induciendo daño a nivel del DNA, o actuando sobre proteínas y factores de transcripción implicados en la apoptosis, la regulación del ciclo celular, la reparación del DNA y la metilación del DNA y modificaciones de histonas (Kim *et al.*, 2015). Los metales pesados en su forma iónica, tiene la capacidad de unirse a componentes celulares como el DNA generando daños estructurales (As, Cr, Co) (Jomova and Valko, 2011) y a proteínas nucleares, desplazando a los metales originales de sus respectivos sitios de unión, induciendo en ellas cambios conformacionales y funcionales que pueden desencadenar en carcinogénesis o apoptosis (Wang and Shi, 2001).

Numerosos estudios han demostrado que la producción de ROS y el estrés oxidativo juegan un papel clave en la toxicidad y carcinogenicidad de metales tales como As (Yedjou and Tchounwou, 2007), Cd (Tchounwou *et al.*, 2001), Cr (Patlolla *et al.*, 2009), Pb (Tchounwou *et al.*, 2004) y Hg (Sutton and Tchounwou, 2007). Todos ellos son tóxicos sistémicos que producen daño multiorgánico, incluso a niveles muy bajos de exposición (Tchounwou *et al.*, 2012). Debido a su alto grado de toxicidad, estos cinco elementos han sido clasificados por la EPA y la Agencia internacional para investigación del cáncer (IARC, *International Agency for*

Research on Cancer) de Estados Unidos, como ‘carcinógenos humanos’ conocidos o probables, basados en estudios experimentales y epidemiológicos que muestran una asociación entre la exposición y la incidencia de cánceres en humanos y animales.

- Inducción de neurotoxicidad

Algunos metales pesados como el plomo y el manganeso y el mercurio pueden atravesar la barrera hematoencefálica y afectar al cerebro y causar toxicidad neurológica afectando a los procesos de aprendizaje y memoria (Farina *et al.*, 2011; Neal *et al.*, 2012). Los mecanismos de neurotoxicidad inducidos por plomo incluyen:

- La inhibición del receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR), implicado en potenciar la memoria y el aprendizaje mediada por el hipocampo. El Pb es un antagonista no competitivo del NMDAR (Neal *et al.*, 2011)
- El bloqueo de la neurotransmisión, inhibiendo la liberación de neurotransmisores (Xiao C, Gu Y 2006) y bloqueando los canales de calcio neuronales dependientes de voltaje (Peng *et al.*, 2002).

8.2 Metales pesados con capacidad EDCs sobre el sistema reproductor femenino

Los efectos de los metales pesados en la reproducción femenina pueden surgir, al igual que el resto de EDCs, cuando la exposición ocurre durante periodos críticos del desarrollo. Ya sea prenatal o neonatal, puede inducir cambios funcionales incluso años después de la exposición. Entre los efectos observados tras la exposición a metales pesados se encuentran: la subfertilidad, infertilidad, menopausia prematura, restricción del crecimiento intrauterino, abortos espontáneos, malformaciones congénitas, muerte postnatal, déficits de comportamiento y aprendizaje y envejecimiento prematuro (Sengupta *et al.*, 2015).

Numerosos estudios evidencian que los metales pesados actúan como disruptores endocrinos (Choe *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2003), afectando a la fertilidad (Rzymiski *et al.*, 2015). Entre todos los metales pesados, el Cd, el Pb, el Hg y el As son los más ubicuos debido al incremento global de las actividades industriales y de los que más estudios hay acerca de su repercusión en la fertilidad, especialmente del Cd. Además se han relacionado con la infertilidad de causa desconocida al detectarse de manera significativa dos de ellos, el Cd y el Pb, en muestras endometriales de mujeres con infertilidad de causa desconocida, sugiriendo un posible papel causal de dichos metales en la etiología de dicha patología (Tanrikut *et al.*, 2014). La mayoría de las mujeres con infertilidad de causa desconocida presentan una receptividad endometrial reducida (Lessey *et al.*, 1995), en el que un endometrio defectivo a la

hora de adquirir la receptividad endometrial es el principal factor limitante. Por lo tanto, no resultaría extraño pensar que un tejido hormonalmente dependiente como es el endometrio, que experimenta cambios a lo largo del ciclo menstrual bajo la regulación del estradiol y la progesterona, pueda verse alterado o dañado por la presencia de metales pesados.

Respecto al efecto tóxico de los metales pesados sobre el sistema reproductivo femenino, en la mayoría de los estudios experimentales llevados a cabo en animales se describe un efecto de toxicidad ovárica incluyendo estrés oxidativo, deterioro de la estructura ovárica y desarrollo folicular, apoptosis y fallo ovárico (S.V.S Rana 2014). Así, el Hg alteró la ciclicidad estral e indujo aberraciones cromosomales en la línea celular de ovario de hámster chino (Ehrenstein *et al.*, 2002) y se acumuló en los ovarios de ratonas produciendo infertilidad y/o fallo ovárico (Al-Saleh *et al.*, 2009). En otro estudio llevado a cabo en ratas, la exposición oral a As disminuyó el peso ovárico y el número de folículos sanos y aumentó la atresia (Chattopadhyay and Ghosh, 2010). El Cd afectó al crecimiento folicular, a la maduración oocitaria y a la esteroidogénesis en los ovarios de ratas (Massányi *et al.*, 2007; Xuying Wan *et al.*, 2010). Además, estudios clínicos llevados a cabo en humanos también han reflejado un impacto de los metales pesados a nivel ovárico, produciendo una disminución del número de folículos ováricos en mujeres expuestas a Pb o Hg que estaban siguiendo un tratamiento de FIV (Perkins *et al.*, 2014; Cavallini *et al.*, 2016). Sin embargo, no hay muchos estudios que muestren un impacto de los metales pesados a nivel endometrial/uterino. Entre los llevados a cabo en animales, se ha visto que ratas expuestas a As presentaron una disminución del tamaño uterino, acompañado de una reducción en el número de glándulas endometriales y un adelgazamiento del miometrio (Chattopadhyay and Ghosh, 2010), además de mostrar un efecto disruptor disminuyendo la expresión de dos genes de respuesta a estrógenos, el ER α y el factor de crecimiento endotelial-vascular (VEGF), en el endometrio de rata (Chatterjee and Chatterji, 2010). Por otro lado, el Cd inhibió la implantación en ratas (Zipper *et al.*, 1968) y alteró aspectos morfológicos y moleculares del endometrio de ratonas, disminuyendo el grosor endometrial y la expresión del ER α , e incrementó la apoptosis en las células endometriales epiteliales (Sapmaz-Metin *et al.*, 2017). Además, en estudios *in vitro*, el Cd también alteró la migración de las células trofoblásticas e indujo una decidualización temprana en células endometriales estromales humanas (Tsumumi *et al.*, 2009). En humanos, la exposición a Pb y Hg se correlacionó con la presencia de fibroides uterinos (Johnstone *et al.*, 2014).

Por otra parte los estudios epidemiológicos en humanos muestran una asociación entre exposición a metales pesados y resultados reproductivos adversos como infertilidad de causa

desconocida por la exposición al Pb (Rahman *et al.*, 2013) y al Hg (Cole *et al.*, 2006), preeclampsia en mujeres con elevados niveles de Pb en sangre (Jameil, 2014), abortos espontáneos por la exposición a As y Pb (Quansah *et al.*, 2015) y bajo peso al nacer tras la exposición materna a As, Hg y Pb (Ferguson *et al.*, 2013). De hecho, los MP pueden atravesar la placenta y acumularse en ella, también en el líquido amniótico, en el cordón umbilical, e incluso en tejido fetal (Caserta *et al.*, 2013). Concretamente, se sabe que el Pb, el mercurio Hg y el cadmio Cd alteran el balance materno-fetal de la placenta, llegando a causar daño a largo plazo en los recién nacidos (Gundacker *et al.*, 2010). En particular, la exposición a metales pesados no solo tiene efectos directamente sobre la fertilidad femenina (cambios hormonales, irregularidades en el ciclo menstrual, etc) sino que una exposición intrauterina temprana puede tener efectos sobre el desarrollo del feto y resultados reproductivos (restricción del crecimiento intrauterino, bajo peso al nacer, parto prematuro, abortos o mortinatos, etc) así como efectos postnatales afectando a la salud de los recién nacidos y niños tales como desórdenes neurológicos (Grandjean and Landrigan, 2006), del desarrollo (Gundacker *et al.*, 2010) y endocrinos (Gollenberg *et al.*, 2010).

8.3 El cobre y el plomo, potenciales disruptores endocrinos

La segunda parte de la presente tesis se ha centrado en estudiar el efecto, en particular, de dos metales pesados, el Cu y el Pb, sobre la función endometrial, por estar estos presentes en los DIU de cobre y en el tabaco respectivamente, dos fuentes de exposición controlables, con un impacto negativo sobre la consecución del embarazo y con una alta incidencia en mujeres en edad reproductiva. Los DIU de cobre son usados como método anticonceptivo y el tabaco es un hábito de consumo ampliamente generalizado. Sin embargo, no hay que descartar otras posibles fuentes de exposición a estos y otros contaminantes ambientales, por vías menos controlables como la exposición ambiental, ocupacional y alimentaria, que podrían darse de manera simultánea generando efectos sinérgicos negativos sobre la fertilidad.

Ambos metales han mostrado tener capacidad disruptiva endocrina, actuando como agonistas estrogénicos en la línea celular MCF7 de cáncer de mama humano (Choe *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2003). También hay evidencias de que ambos metales se pueden acumular en el endometrio a partir de dichas fuentes de exposición. Por un lado, los DIU de cobre liberan iones de cobre al líquido endometrial, los cuales pueden depositarse y acumularse en el endometrio y persistir incluso una vez es retirado (Arancibia *et al.*, 2003; Horcajadas *et al.*, 2006). Por otro lado, se han detectado niveles de Pb más elevados en el endometrio de mujeres fumadoras (Rzymiski *et al.*, 2015) respecto al de no fumadoras. Además, los primeros

estudios experimentales acerca del mecanismo de acción de los DIU basados en metales mostraron que el Cu y el Pb además de otros metales, disminuyeron la implantación embrionaria en ratas (Chang C et al., 1970), y que la administración intravenosa de Pb inhibió también la implantación en ratones (Wide M. et al., 1977) y alteró la ultraestructura superficial del endometrio (Wide M. et al., 1979). Por lo tanto, una exposición a estos metales por parte de un DIU de cobre y del tabaco, al ser dos fuentes de exposición conocidas y controlables, permitiría establecer una correlación directa entre llevar o haber llevado recientemente un DIU de cobre y/o fumar y los posibles resultados reproductivos negativos obtenidos.

Respecto al papel del Cu como posible disruptor endocrino, se ha visto que juega un papel muy importante en el efecto contraceptivo de los DIU de cobre, potenciando la respuesta inflamatoria endometrial, alterando el metabolismo de las células endometriales y alcanzando concentraciones en el fluido endometrial tóxicas para los espermatozoides y ovocitos, lo que evitaría así el encuentro de gametos sanos que puedan dar lugar a un embrión viable (Arancibia *et al.*, 2003; Ortiz and Croxatto, 2007). De hecho, se han llegado a detectar niveles de Cu de 92,84-300 μM en el líquido endometrial de mujeres portadoras de un DIU de cobre (Arancibia *et al.*, 2003). Se ha postulado incluso, que el Cu liberado por el DIU puede depositarse en el endometrio y acabar generando un fallo de implantación (Matsubayashi *et al.*, 2017). Además, el cobre por sí solo, es capaz de afectar a la receptividad endometrial alterando el transcriptoma de la ventana de implantación, evidenciando el efecto anti-implantación del Cu, independientemente de la actuación conjunta que pueda tener dentro de un DIU (Carrascosa *et al.*, 2018). También un estudio *in vitro*, ha demostrado que el Cu afecta a la decidualización, reduciendo la expresión de dos marcadores de decidualización (IGFBP-1 y PRL) de las células endometriales estromales humanas HESC (Li *et al.*, 2017a), proceso necesario para adquirir una receptividad endometrial adecuada.

En lo referente al Pb, este metal está presente en el tabaco y se ha detectado en el endometrio de mujeres fumadoras (Rzymiski *et al.*, 2014). También se ha asociado con infertilidad de causa desconocida (Tanrikut *et al.*, 2014), bajo peso al nacer, bajo número de ovocitos (Rattan *et al.*, 2017) y con una mayor tasa de abortos espontáneos (Hertz-Picciotto, 2000). Desde hace décadas se conocen los efectos adversos del Pb en la reproducción femenina. De hecho, se han reportado casos de infertilidad, aborto espontáneo y muerte neonatal después de la exposición ocupacional al Pb en mujeres. Estudios epidemiológicos han mostrado una clara y directa asociación entre niveles elevados de Pb en sangre y/o en placenta de mujeres embarazadas viviendo cerca de fundidores de plomo. Además se observó una relación dosis-respuesta dependiente entre los niveles de Pb detectados en sangre y placenta,

y las tasas de parto prematuro y aborto espontáneo (McMichael *et al.*, 1986; Falcón *et al.*, 2003). Debido a la capacidad que tiene el Pb de almacenarse en los huesos durante décadas, mujeres que sufrieron envenenamiento por Pb durante su infancia, presentaron resultados reproductivos negativos. Concretamente, la tasa de abortos espontáneos o mortinatos fue del 30% entre las mujeres expuestas y del 15% en los controles (Hu *et al.*, 1991). Se piensa que, durante el embarazo, la desmineralización ósea que experimentan las mujeres podría favorecer la liberación del Pb acumulado en los huesos durante la infancia y afectar al embarazo.

Estudios experimentales con animales han mostrado que el Pb reduce el tamaño de las camadas, el peso de la descendencia, la tasa de supervivencia y altera la maduración del sistema reproductor femenino (*WHO, Environmental health criteria 165: inorganic lead*, 1995). La implantación de blastocistos expuestos a Pb se vio reducida en ratones, aunque la coadministración de estrógenos y progesterona junto con el tratamiento del Pb evitó el fallo de implantación, sugiriendo que el Pb podría interferir en la estimulación esteroidea ovárica del endometrio (Wide, 1980, 1983). Ratas expuestas a Pb desde el destete mostraron un inicio de la pubertad retrasado y además su descendencia femenina, expuesta también intraútero a Pb, mostró también un retraso en la apertura vaginal (Kimmel *et al.*, 1980), irregularidades en el ciclo estral, y un patrón irregular de liberación de gonadotropinas (FSH y LH) (McGivern *et al.*, 1991). Todos estos resultados muestran que la exposición al Pb puede afectar a diferentes niveles del eje hipotalámico-pituitario-gonadal, principalmente durante el periodo prenatal y postnatal, que es cuando estas estructuras están experimentando una rápida proliferación.

La mayoría de los estudios experimentales y epidemiológicos hablan del impacto que tienen los metales pesados en la toxicidad ovárica, en la implantación embrionaria y su asociación con resultados reproductivos adversos, y aunque evidencian una potencial implicación de los mimos en la función endometrial, poco se sabe acerca de cómo afectan los metales pesados al endometrio a nivel molecular.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS

Esta tesis recoge dos hipótesis:

Hipótesis 1. Un endometrio con fallo de implantación recurrente (RIF) se comporta funcionalmente como un endometrio refractario, ajeno a la implantación. La comparación de los perfiles de expresión proteica de un endometrio fértil, un endometrio con RIF y un endometrio refractario (generado por la presencia de un dispositivo intrauterino de cobre, DIU-Cu) ayudará a comprender mejor el proceso de la receptividad endometrial a nivel molecular revelando proteínas claves implicadas en el proceso de adquisición de la receptividad endometrial.

Hipótesis 2. El Cu y el Pb son dos metales pesados con papel disruptor a nivel endocrino conocido. Cu y Pb podrían alterar la función reproductiva afectando principalmente a la receptividad endometrial e implantación embrionaria interfiriendo negativamente en la decidualización, en la capacidad regenerativa y en la adhesividad endometrial.

III. OBJETIVOS

Este proyecto tiene dos objetivos principales y dentro de cada uno tenemos objetivos específicos o secundarios:

1. Identificar los perfiles de proteínas implicados en la adquisición de la receptividad endometrial.

- 1.1 Realizar un análisis comparativo de los perfiles proteicos de tres tipos de condiciones endometriales (endometrio receptivo, endometrio refractario (DIU-Cu) y endometrio no receptivo procedente de pacientes diagnosticadas con fallo de implantación recurrente) por medio de la metodología iTRAQ 8-plex.
- 1.2 Validar las proteínas diferencialmente expresadas entre los grupos de estudio, por medio de Western Blot, así como localizar su expresión en cortes de tejido humano endometrial por medio de inmunohistoquímica.
- 1.3 Caracterización de las funciones moleculares así como los 'pathways' o rutas bioquímicas en las que están implicadas las proteínas diferencialmente expresadas en las tres condiciones endometriales (fértil, RIF y DIU) mediante la elaboración de redes de correlación/coexpresión.

2. Estudiar *in vitro* el efecto disruptor o alterador de dos metales pesados (Cu y Pb) sobre la función endometrial.

- 2.1 Establecer la viabilidad *in vitro* de células endometriales estromales (ESCs) y epiteliales (EECs) procedentes de biopsias humanas (cultivo primario) en presencia de Cu y plomo Pb.
- 2.2 Evaluar la capacidad de decidualización de las ESCs en presencia de Cu y Pb, así como evaluar la expresión de genes implicados en dicho proceso: ER α (receptor de estrógeno alfa), PR (receptor de progesterona) y HOXA10.
- 2.3 Analizar el grado de muerte celular (apoptosis) y proliferación de las ESCs tras exposición a Cu y Pb tanto en condición decidual como no decidual.
- 2.4 Determinar el estado oxidativo de las células ESCs en presencia de ambos metales pesados.
- 2.5 Determinar el efecto del Cu y Pb en la adhesión embrionaria y regeneración de las células endometriales epiteliales (EEC).

MATERIALES Y MÉTODOS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales y métodos parte I: estudio proteómico de la receptividad endometrial

1.1 Tamaño muestral y criterios de inclusión/exclusión

Para la elaboración de la primera parte de la tesis se han empleado muestras biológicas humanas, en concreto biopsias de endometrio de mujeres con distinto estado de receptividad endometrial. Dicho estudio fue previamente aprobado por el Comité ético de investigación del Instituto valenciano de infertilidad IVI Valencia (#1203-C-101-FD) siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki. Además, todas las pacientes incluidas en dicho estudio firmaron el consentimiento informado, en el que expresan o reflejan su conformidad a participar en el estudio.

El tamaño muestral se estableció conforme a la cantidad de pacientes con RIF que acuden a la clínica IVI Valencia para tratamientos de reproducción asistida intentando obtener el mismo número de biopsias dentro de cada grupo sin llegar a perder poder estadístico. Para dicho estudio se reclutaron un total de 43 mujeres de la clínica IVI Valencia, 28 de las cuales fueron destinadas para el estudio proteómico y las 15 restantes para la validación externa por inmunohistoquímica. Las muestras endometriales destinadas para el estudio proteómico (n=28) provinieron de tres grupos de mujeres: 10 mujeres fértiles (donantes de ovocitos con fertilidad probada), 8 pacientes con fallo de implantación recurrente (RIF, del inglés 'Recurrent Implantation Failure') y 10 mujeres (donantes de ovocitos) con un dispositivo intrauterino basado en cobre (DIU-Cu) como medida anticonceptiva. Las otras 15 muestras destinadas para la validación externa, fueron muestras recogidas en distintas fases del ciclo y procedieron de donantes fértiles.

El rango de edad de las pacientes del estudio fue de 18 a 34 años para los grupos de mujeres fértiles y aquellas portadoras de un DIU de cobre y de 18 a 41 años para el grupo de pacientes con RIF. Respecto al índice de masa corporal (BMI, del inglés 'Body Mass Index) este estudio incluyó a mujeres con un BMI entre 18 a 30 Kg/m² y normo-ovuladoras, con ciclos menstruales normales (21-35 días). La **tabla 7** recoge las características de las pacientes entre ellas la edad (media \pm desviación estándar) y el índice de masa corporal (IMC) (media \pm desviación estándar). Como era de esperar, las pacientes con RIF presentaron una media de edad significativamente más alta que los otros dos grupos (**, p-valor < 0.01). Los otros dos grupos (fértil y DIU), al tratarse de donantes de ovocitos, suelen ser mujeres más jóvenes que

acuden a la clínica para una ovodonación. Sin embargo, las pacientes con RIF, son mujeres que ya han tenido varios intentos de ciclos previos fallidos, ya sea en casa de manera natural como por medio de TRAs, por lo que es de esperar que tengan más edad, o simplemente han buscado ser madres a edades más tardías, donde el factor edad también entraría en juego como factor negativo a la hora de conseguir un embarazo.

Las mujeres fértiles de este estudio fueron donantes de ovocitos con fertilidad probada, con al menos un recién nacido vivo, dado a luz de dos años a 9 meses antes de la recogida de la biopsia endometrial y sin consumo de anticonceptivos, para evitar la posible influencia que puedan tener las hormonas en el perfil de expresión proteica. Las pacientes con RIF se definieron como mujeres que tuvieron al menos tres ciclos consecutivos fallidos de fecundación *in vitro* (FIV) con transfer de al menos de dos a tres embriones de buena calidad, frescos o congelados, en cada ciclo, sin presentar una etiología conocida (RIF idiopático). Se descartaron aquellas pacientes que presentaron fallo de implantación por alguna de las siguientes causas: anormalidades cromosómicas en el cariotipo de alguno de los dos parentales, trombofilias, patologías endocrinas, endometriosis o síndrome de ovario poliquístico. Las pacientes con DIU también fueron donantes de ovocitos pero que llevaron un DIU no hormonal basado en cobre (Effi-t 380®), con el fin de evitar la presencia de cualquier factor hormonal extra que pudiera interferir o modificar el perfil de expresión proteica endometrial. Ninguna de las mujeres tuvo una historia médica con endometritis, enfermedad pélvica inflamatoria, patologías anatómicas uterinas, o sangrado irregular en el ciclo en el que se realizó la toma de la biopsia endometrial.

Todas las mujeres incluidas en el estudio siguieron el mismo tratamiento de preparación endometrial, basado en la terapia de reemplazo hormonal (TRH) con el fin de homogeneizar el posible efecto hormonal sobre el perfil de expresión proteica en los tres grupos y así detectar diferencias debidas al estado de receptividad endometrial (entre grupos) y no al hecho de llevar distintos tratamientos hormonales. La TRH también permite regular los ciclos endometriales de todas las pacientes y así asegurarse de que la muestra endometrial sea recogida en la misma fase del ciclo en todas ellas y poder medir el perfil de expresión en muestras en la misma fase del ciclo. En cuanto al grosor endometrial (**Tabla 7**), pese a que los tres grupos siguieron el mismo tratamiento hormonal, las mujeres con DIU alcanzaron un grosor endometrial menor que el de una mujer fértil o con RIF ($p < 0,05$), lo que cabría esperar, ya que uno de los modos de actuación de un DIU como medida anticonceptiva es evitar que el endometrio proliferase y adquiriera el grosor adecuado para la implantación embrionaria.

Siguiendo con la TRH, inicialmente las pacientes son tratadas con un agonista de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH, del inglés *gonadotropin-releasing hormone*), Ganirelix 0,25 mg (ORGALUTRAN, MSD, Madrid) durante 5 días tras el primer o segundo día de menstruación con el fin de anular el eje hipófisis-hipotalámico y con ello la propia regulación hormonal endógena del ciclo menstrual y así poder regularlo con el aporte exógeno de hormonas. Simultáneamente con el agonista de la GnRH se suministran dos parches de estradiol (E2) (75 µg EVOPAD por parche, Janssen Pharmaceutica N.V, Belgium) los cuales son cambiados cada 48 horas tras comprobar la quiescencia o reposo ovárico por ultrasonografía. Los parches de E2 son mantenidos hasta que el endometrio adquiere un aspecto trilaminar y al menos un grosor de 7 mm (de 8 a 10 días tras el inicio de la administración de E2), que es cuando se administraron 400 mg de progesterona (P4) micronizada por vía vaginal cada 12 horas (en total 800 mg por día) durante 5 días.

Las biopsias endometriales de todas las pacientes (n=28) se recogieron del fundus uterino usando un catéter Pipelle (Cornier Devices, CCD Laboratories) bajo condiciones estériles 5 días después de la administración de la progesterona (P+5), coincidiendo con “la ventana de implantación” o fase secretora media, que en ciclos naturales vendría a ser aproximadamente el séptimo día después del pico de la LH (LH+7, día 21 del ciclo). Las muestras fueron congeladas y almacenadas a -80°C para la posterior extracción de proteínas.

Tabla 7. Características clínicas de las pacientes del estudio

Grupos	Edad (años)	IMC (kg/m ²)	Grosor endometrial (mm)	Apariencia endometrial	P4 (ng/mL)	E2 (pcg/mL)
Fértil 1	26	22,04	7,7	trilaminar	n/a	n/a
Fértil 2	23	21,97	n/a	n/a	n/a	n/a
Fértil 3	26	26,11	6,8	trilaminar	n/a	n/a
Fértil 4	33	19,13	7,6	trilaminar	n/a	n/a
Fértil 5	23	19,29	6	trilaminar	n/a	n/a
Fértil 6	34	18,82	10	trilaminar	n/a	n/a
Fértil 7	34	26,9	9,4	trilaminar	n/a	n/a
Fértil 8	28	28,91	8,7	trilaminar	n/a	n/a
Fértil 9	34	21,91	10	trilaminar	n/a	n/a
Fértil 10	26	20,55	8	trilaminar	n/a	n/a
MEDIA ± SD (n =10)	28,7 ± 4,59	22,56 ± 3,55	8,24 ± 1,40			

Tabla 7. Continuación

Grupos	Edad (años)	IMC (kg/m ²)	Grosor endometrial (mm)	Apariencia endometrial	P4 (ng/mL)	E2 (pcg/mL)
DIU 1	26	26,17	7,5	trilaminar	n/a	n/a
DIU 2	25	18,03	8	trilaminar	n/a	n/a
DIU 3	32	23,73	6	trilaminar	n/a	n/a
DIU 4	31	24,98	7,4	trilaminar	n/a	n/a
DIU 5	31	18,75	5	trilaminar	n/a	n/a
DIU 6	28	16,85	6,3	trilaminar	n/a	n/a
DIU 7	30	22,94	7,5	trilaminar	n/a	n/a
DIU 8	24	29,17	8,6	trilaminar	n/a	n/a
DIU 9	26	27,48	9	trilaminar	n/a	n/a
DIU 10	26	19,49	7	trilaminar	n/a	n/a
MEDIA ± SD (n=10)	27,9 ± 2,88	22,76 ± 4,28	7,23 ± 1,21 (#)			
RIF 1	38	18,59	7,7	trilaminar	0,2	96
RIF 2	29	24,14	10	trilaminar	0,2	381
RIF 3	38	21,87	11	trilaminar	1,1	444
RIF 4	34	n/a	9,1	trilaminar	<0,05	88,88
RIF 5	39	27,82	9,2	trilaminar	0,1	116
RIF 6	35	21,63	8,5	trilaminar	0,4	129
RIF 7	40	22,03	7,1	trilaminar	0,18	55,1
RIF 8	41	25,73	8,4	trilaminar	0,29	68
MEDIA ± SD (n=8)	36,75 ± 3,92(**)	23,12 ± 3,04	8,88 ± 1,24		0,33 ± 0,33	172,25 ± 151,10

Tabla 7. Muestra las características clínicas de las mujeres incluidas en dicho estudio, entre las cuales se encuentran la edad, el índice de masa corporal (IMC), el grosor endometrial, el estadio o apariencia endometrial y niveles hormonales (E2 y P4) tomados el día de la ecografía (8 días después de la última menstruación u 8 días después de iniciar la terapia de reemplazo hormonal). Los niveles hormonales sólo estuvieron disponibles para las pacientes con RIF. (**) Diferencia significativa ($p < 0,01$) cuando se compara el grupo RIF frente a las otras dos condiciones (Fértil y DIU), (#) diferencia significativa ($p < 0,05$) cuando se compara el grupo DIU con el RIF, (n/a) dato no disponible (del inglés 'not available'). Tabla adaptada del artículo Pérez-Deben S., et al 2019.

1.2 Diseño experimental

Para la identificación y cuantificación de las proteínas extraídas a partir de las biopsias endometriales de las distintas pacientes se utilizó la técnica multiplex (8-plex) de etiquetado isobárico para la cuantificación absoluta y relativa, también conocida como iTRAQ 8-plex (del inglés '*isobaric tag for relative and absolute quantification*'), capaz de analizar hasta 8 muestras a la vez en un único experimento de espectrometría de masas.

Como ya se comentó anteriormente, para el estudio proteómico se analizaron un total de 28 muestras endometriales, de las cuales 10 procedieron de mujeres fértiles, otras 10 procedieron de mujeres portadoras de un DIU de cobre y las 8 restantes de pacientes con RIF. Las muestras fueron distribuidas en 4 experimentos iTRAQ independientes, considerados como réplicas técnicas del experimento, ya que las muestras de los tres grupos se repartieron de manera equitativa entre los 4 análisis iTRAQ, de manera que en cada iTRAQ se incluyeron de 2 a 3 muestras procedentes cada grupo. En cada iTRAQ se incluyó un estándar interno, siendo éste la mezcla equitativa de todas las muestras biológicas del experimento, y cada ratio que da el iTRAQ de cada proteína está referenciado frente a dicho estándar interno (**Figura 17**).

Las proteínas que resultaron estar diferencialmente expresadas entre los grupos tras aplicar los análisis estadísticos correspondientes (ANOVA para una primera comparación de los tres grupos y T-test o comparaciones diferenciales ‘por pares’ para las posteriores comparaciones dos a dos) son las que se utilizaron para el siguiente análisis funcional. Adicionalmente se hizo una validación interna de la técnica del iTRAQ por medio de la técnica del western blot. Para ello se seleccionaron tres proteínas diferencialmente expresadas entre los tres grupos con una posible implicación potencial en la receptividad endometrial: la plastina 2 (PLSL), la lisozima (LYSC) y la lactotransferrina (TRFL). Para la validación interna se emplearon los extractos proteicos de las mismas muestras analizadas por el iTRAQ. También se hizo una validación externa de las mismas proteínas, pero por inmunohistoquímica, utilizando otras veinte biopsias endometriales de donantes en distintas fases del ciclo, y no incluidas en el experimento iTRAQ. La finalidad de esta última validación fue comprobar que dichas proteínas se expresasen en el tejido endometrial humano, así como analizar el patrón de expresión y localización de estas tres proteínas a lo largo del ciclo endometrial.

Para el análisis funcional de las proteínas diferenciales encontradas entre los grupos se utilizó la herramienta KEGG (del inglés ‘*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome*’) para estudiar las rutas más representativas y las redes de co-expresión/correlación para las proteínas significativa dentro de cada comparativa para dar sentido biológico tanto a la receptividad como a la refractariedad endometrial.

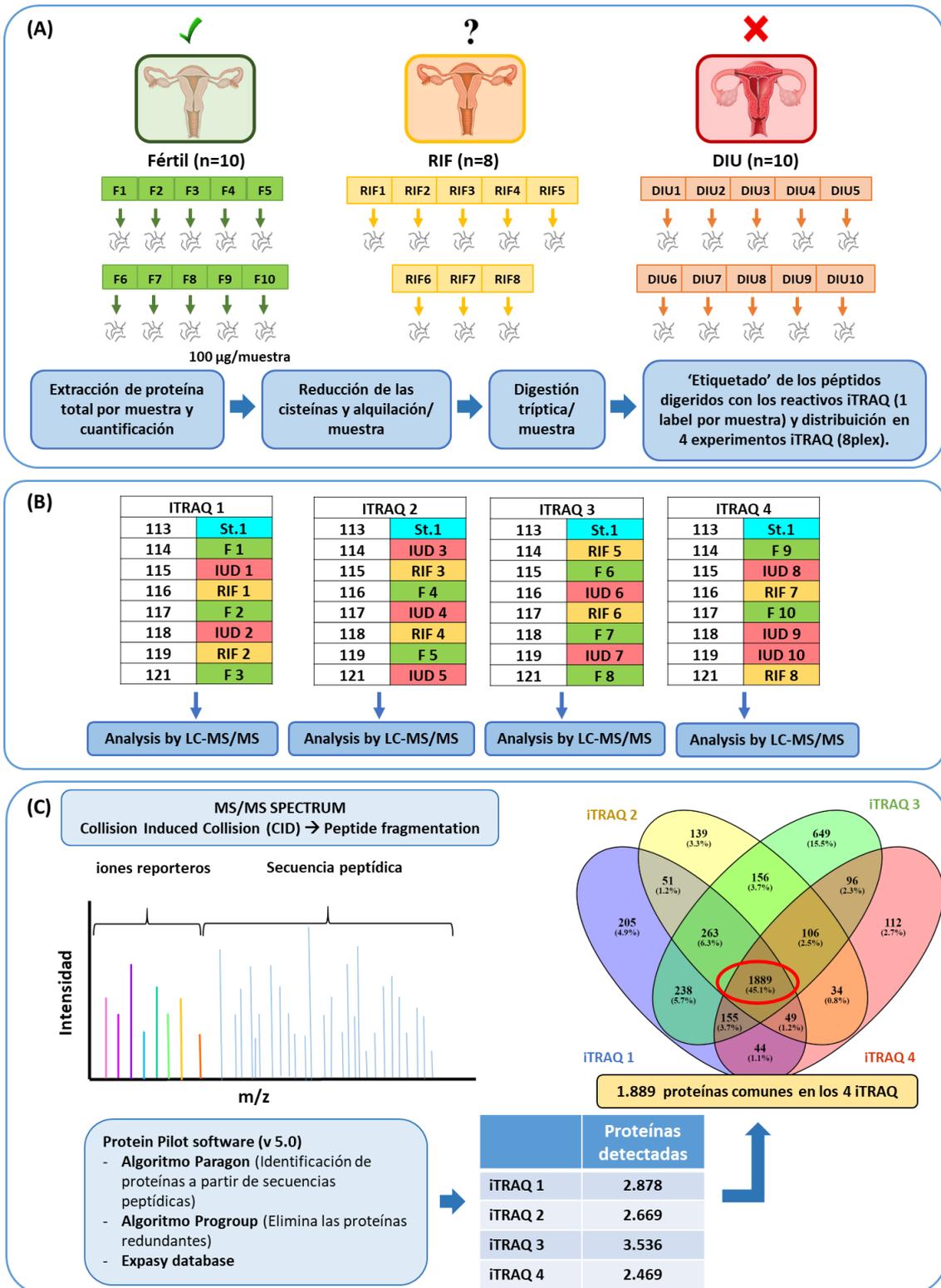


Figura 17. Esquema gráfico del diseño experimental de la preparación de muestras, análisis e interpretación de los datos proteómicos para la cuantificación iTRAQ. (A) Primero se extraen las proteínas totales a partir de las biopsias endometriales de las donantes fértiles (Fértil, n=10), de las pacientes con RIF (n=8), y de las mujeres con DIU (n=10) y se tripsinizan en péptidos. Los péptidos son luego marcados o ‘etiquetados’ con 8 diferentes reactivos o etiquetas iTRAQ (1 reactivo por muestra). **(B)** Debido al alto número de muestras, se llevaron a cabo 4 experimentos iTRAQ 8plex con un estándar interno común (etiquetado con el reactivo

113 m/z) incluido en cada uno de los experimentos. **(C)** La identificación y cuantificación de proteínas se llevó a cabo tras el análisis LC-MS/MS, usando los algoritmos del programa Protein Pilot y la base de datos Expasy. El diagrama de Venn muestra las 1.889 proteínas comunes detectadas en los cuatro experimentos iTRAQ. Esquema adaptado del artículo *Pérez-Deben S., et al 2019*.

1.3 Metodología del iTRAQ

1.3.1 Extracción y cuantificación de proteínas

La extracción de proteínas a partir de las biopsias endometriales se realizó en un tampón de lisis (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 4% y 30 mM de Tris pH 8,5) usando el Kit 2D Grinding (GE Healthcare). Tras ello, las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) (5 µL; concentración final al 10%) a partir de una alícuota de cada muestra incubándola toda la noche con TCA a 5°C. Tras la centrifugación, los sedimentos de proteínas o pellets fueron lavados con acetona fría (-18°C), centrifugados de nuevo y secados al aire. A continuación, se disolvieron los pellets de proteínas en 40 µL de urea 8 M en tampón bicarbonato de trietilamonio (TEAB) 0,5 M y finalmente cuantificadas en el Qubit (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

1.3.2 Digestión triptica, marcaje peptídico con los reactivos iTRAQ y prefractionamiento peptídico por isoelectroenfoque

Para el análisis proteómico del iTRAQ, se usaron 100 µg de proteína total por cada muestra. Para dicho análisis primero los residuos de cisteína de las proteínas fueron reducidos en presencia de 4 µL de (tris-2-carboxietil-fosfina) (TCEP) (AB SCIEX) a 37°C durante 180 minutos (min), y los grupos sulfidrilos fueron alquilados usando 2 µL de metil metanotiosulfonato (MMTS) a temperatura ambiente durante 10 min. Seguidamente, las proteínas fueron digeridas en péptidos usando 10 µg de tripsina (Promega, Madison, WI) a una ratio 1:10 con incubación nocturna a 37°C. Tras la digestión enzimática de las proteínas, los péptidos fueron secados por centrifugación al vacío y reconstituidos en tampón bicarbonato de trietilamonio (TEAB) 0,5 M. A continuación, los péptidos de cada muestra fueron marcados químicamente con los reactivos iTRAQ correspondientes (113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, y 121 m/z) del Kit 8-plex (AB SCIEX 2010) de acuerdo con el protocolo del fabricante, de tal manera que todos los péptidos de una misma muestra estarán marcados con el mismo reactivo iTRAQ. Debido al número de muestras incluidas en este estudio (n=28), y teniendo en cuenta de que en cada análisis iTRAQ se pueden analizar hasta 8 muestras, se llevaron a cabo

un total de 4 experimentos iTRAQ 8-plex independientes incluyendo en todos ellos un estándar interno común, marcado con el reactivo 113 m/z (**Figura 17**).

A continuación, las 8 muestras incluidas en cada análisis iTRAQ fueron mezcladas en proporciones iguales (1:1:1:1:1:1:1:1), secadas por centrifugación al vacío y preparadas para el fraccionamiento o separación por isoelectroenfoque (IEF). El IEF permite separar péptidos de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI) a lo largo de tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG), siendo éste un paso pre-analítico fundamental para llevar a cabo análisis de muestras peptídicas complejas con marcaje isobárico tipo iTRAQ (Chenau *et al.*, 2008). El IEF no es sólo un método de fraccionamiento de alta resolución y capacidad para péptidos, sino que también ofrece la oportunidad de validar péptidos de manera indirecta y así incrementar la confianza con la que un péptido es identificada tras análisis MS/MS, gracias a la determinación del pI de los mismos (Hörth *et al.*, 2006; Ernoult *et al.*, 2008)

Para la separación por IEF, 250 µg del pool de péptidos de cada experimento iTRAQ se disolvió en tampón de muestra (urea 7 M, tiourea 2 M, tampón IPG al 1,6% de anfolitos v/v pH 3-11) para incorporar agentes reductores y anfolitos. Para cada experimento iTRAQ se usó una tira de 13 cm con gradiente de pH inmovilizado (IPG pH 3-11 NL, GE), la cual fue hidratada con la solución de péptidos a temperatura ambiente durante toda la noche y fraccionado a un voltaje de 5000-250000 Vh. Para incrementar la reproducibilidad, los cuatro iTRAQ fueron fraccionados por IEF al mismo tiempo. Posteriormente, se lavaron las tiras con agua miliQ y se cortaron 11 fracciones iguales de 1,2 cm aproximadamente. Se extrajeron los péptidos de cada fracción con 120 µL de soluciones crecientes de acetonitrilo (ACN) (solución A: ACN al 5%, ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%; solución B: ACN al 50%, TFA al 0,1%; solución C: ACN al 70%, TFA al 0,1%; solución D: ACN al 80-90%, TFA al 0,1%). Todas las fracciones de péptidos fueron combinadas, secadas por centrifugación al vacío y disueltas de nuevo con 40 µL de ACN al 2% y TFA al 0,1%. Las 11 fracciones de péptidos fueron lavadas y concentradas en columnas de fase reversa (POROS R2, Milipore). Finalmente, la mezcla de péptidos fue secada al vacío y resuspendida a una concentración de 0,30 µg/µL en ACN al 2% y TFA al 0,1%.

1.3.3 Fraccionamiento y análisis peptídico por cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

Para la separación peptídica por sistema de cromatografía líquida se usaron 5 µL de cada una de las fracciones individuales obtenidas tras el IEF, los cuales fueron inyectados y capturados en una columna trap cromatográfica (NanoLC Column, 3 µm C18-CL, 75 µm x 15 cm; Eksigen) y desalado con TFA al 0,1% a un flujo de 3 µL/min durante 5 min. A continuación,

se cargaron los péptidos en una columna analítica (LC Column, 3 μm C18-CL, 75 μm x 15 cm; Eksigen) equilibrada con acetronitrilo al 5% y ácido fórmico (FA) al 0,1%. La elución de los péptidos se llevó a cabo con un gradiente lineal del 5% al 35% (v/v) del tampón B en A durante 90 min (A: FA al 0,1%; B: ACN, FA al 0,1%) a un flujo de 300 nL/min. Los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas basado en el método de ionización por electrospray nanoESE qTOF (5600 TripleTOF, AB SCIEX). El tripleTOF fue operado en un modo de adquisición dependiente de información, en la que se llevó a cabo un escaneo del espectro de masas (MS) a 0,25 s entre un rango masa/carga de 350-1250 m/z, seguido por escaneos del producto iónico a 0,075 s en el rango masa/carga de 100-1500 m/z en los 25 iones con carga 2-5 más intensos.

1.3.4 Análisis e interpretación de los datos proteómicos

Para la identificación de las proteínas y péptidos se usó el motor de búsqueda del programa Protein Pilot (versión 5.0, AB SCIEX). Se usaron los parámetros de defecto del Protein Pilot para generar el listado de picos directamente a partir de los archivos wiff del TripleTOF 5600. El algoritmo Paragon del Protein Pilot (Shilov *et al.*, 2007) permitió realizar la búsqueda de proteínas sobre la base de datos de proteínas Expasy (SwissProt_150202). Para dicha búsqueda se usaron los siguientes parámetros: cuantificación por iTRAQ 8-plex, digestión por tripsina, alquilación de cisteínas por metil metanetiosulfonato (MMTS), restricción taxonómica a Homo sapiens, esfuerzo de búsqueda en modo exhaustivo y corrección de sesgos. Adicionalmente, este programa también realizó un análisis de la tasa de error tipo I (falsos positivos), también conocido como análisis del 'false Discovery rate' (FDR), y para ello utilizó una base de datos de identificación de secuencia reversa (inversa) para determinar el FDR.

Para evitar el uso de la misma evidencia espectral en más de una proteína, las proteínas identificadas fueron agrupadas en base al espectro MS/MS por medio del algoritmo Progroup del Protein Pilot. Con el fin de reducir la probabilidad de identificación de péptidos falsos, sólo los péptidos con al menos un 95% de confianza fueron considerados como péptidos identificados, y cada identificación de una proteína con cierto grado de confianza implicó al menos un único péptido exclusivo de esa proteína, no compartido entre otras proteínas. Sólo proteínas con un 'unused score' > 1,3 (identificada con una confianza \geq 95%) y un p-valor menor de 0,05 (establecido por un análisis diferencial 'por pares' o t-test entre condiciones) fueron consideradas para posteriores análisis.

Los datos proteómicos de espectrometría de masas se han depositado en el consorcio ProteomeXchange a través del repositorio asociado PRIDE (Vizca *et al.*, 2016) con el identificador de datos PXD011094 y 10.6019 / PXD011094.

1.3.5 Procesamiento de los datos

Todos los análisis bioinformáticos se llevaron a cabo usando el lenguaje estadístico R (Development Core Team, 2008) en el entorno R estudio (“RStudio: Integrated Development for R. RStudio,” 2015). Inicialmente los datos crudos de fold change se normalizaron entre muestras usando el método de normalización por cuantiles (Bolstad *et al.*, 2003), incluido en el paquete *preprocess de R* (Bolstad, 2016). Seguidamente, el efecto tando o ‘batch effect’ asociado a los 4 experimentos iTRAQ independientes se corrigió usando la metodología comBat, incluida en el paquete *sva* de R (Leek *et al.*, 2012). También se realizó un análisis exploratorio previo para ver cómo agrupan las muestras. Concretamente, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA, del inglés ‘Principal Component Assay’) (“A User’s Guide to Principal Components . by J . Edward Jackson Review by : Brian D,” 2014) teniendo en cuenta todas las proteínas y muestras del estudio. Sobre dicho PCA se representaron las elipses de confianza al 95%, que vienen a representar el 95% de la distribución de cada grupo experimental de muestras. Estas elipses se añadieron a las anotaciones del PCA usando el paquete *factoextra* de R (Kassambara and Mundt, 2017).

1.4 Enriquecimiento funcional de las proteínas diferencialmente expresadas y redes de correlación

El análisis de enriquecimiento funcional se llevó a cabo sobre los genes de las proteínas significantes obtenidas en los análisis diferenciales pairwise o “por pares” llevados a cabo entre los 3 grupos experimentales usando el paquete de R *clusterProfiler* (Yu *et al.*, 2012a). Para este análisis se consideraron dos bases de datos de anotación funcional: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Ogata *et al.*, 1999) y Gene Ontology (GO) (Uhlén *et al.*, 2005). En dicho análisis, las funciones o rutas KEGG que salieron significativas se representaron a modo de red usando el software Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003), en la que las funciones se representaron como núcleos o ‘cores’ de la red y las uniones entre ellas se establecieron de acuerdo con el número de genes compartidos. En el caso del análisis funcional del GO, las funciones significativas se agruparon manualmente conforme a su función general en la célula de acuerdo con la terminología ‘procesos biológicos’ del GO.

Adicionalmente, se llevaron a cabo redes de correlación o de co-expresión génica entre las proteínas diferencialmente expresadas (PDEs) obtenidas en cada comparativa pairwise, con el fin de analizar qué genes/proteínas presentaron un patrón de expresión similar entre las muestras de los grupos comparados. Estas redes son redes ‘no dirigidas’, donde las proteínas se correlacionan en función de su patrón de expresión, pero sin indicar que haya una relación causal, interacción física o proceso bioquímico común entre ellas. Sin embargo, son de gran interés biológico ya que muchos genes co-expresados están regulados por el mismo programa de regulación transcripcional o por miembros de la misma ruta o complejos de proteínas, pudiendo incluso llegar a existir una funcionalidad relacionada entre ellas (Stuart, Joshua M. et al., 2003; Weirauch et al., 2011). Además, permiten analizar de manera simultánea la gran cantidad de datos obtenidos a partir de las tecnologías -ómicas, muchas veces difícil de abordar, dando una visión más integrada dentro de una red con posible significado biológico.

En dichas redes de correlación, dos proteínas están correlacionadas positivamente, si el nivel de ambas aumenta o disminuye de manera conjunta entre las muestras a comparar, y presentan una correlación negativa cuando al aumentar la expresión de una de ellas, la otra disminuye. Dicha correlación viene determinada por el coeficiente de correlación de Pearson, que no es más que un índice que mide el grado de relación entre dos variables cuantitativas y continuas. Para ello, primero se estimaron las correlaciones de Pearson entre las parejas de proteínas seleccionadas como significativamente diferentes en cada comparación pairwise usando el paquete *RcmdrMisc* de R (Su et al., 2005). Luego se estimó el umbral al cual una determinada correlación se considera significativa aplicando un análisis de densidad de redes (Feng et al., 2012), para el cual se estableció un coeficiente de correlación de Pearson $\geq \pm 0,9$ para las correlaciones significativas. En base a esto, se representaron las redes de correlación significativas usando el programa Cytoscape (Shannon et al., 2003). Además, las correlaciones incluidas en cada red se contrastaron o buscaron en dos bases de datos de interacción proteína-proteína con el fin de evaluar su novedad u originalidad: STRING (von Mering et al., 2003) y GeneMANIA (Warde-Farley et al., 2010). Es decir, ver si dichas interacciones ya están descritas en la bibliografía, lo que daría peso a nuestro estudio, o bien ver el aporte nuevo de correlaciones entre proteínas cuya interacción física quedaría por demostrar.

1.5 Validación de tres proteínas diferencialmente expresadas del iTRAQ (PLSL, TRFL y LYSC) por western blot

Para el western blot partimos de proteína total extraída de cada una de las muestras endometriales tal y cómo se describe en el punto 3.1 de materiales y métodos parte I. A modo

de validación interna de la técnica utilizada, se validaron tres proteínas que salieron diferencialmente expresadas en el iTRAQ (plastina 2 (PLSL), lactoferrina (TRFL) y lisozima (LYSC)) y se incluyeron a todas las muestras de cada grupo (n=10 fértiles, n=10 DIU, n=8 RIF).

Para el western blot se usaron 30 µg de proteína total de cada muestra. Las proteínas se desnaturalizaron por calor 5 min a 95°C, y se separaron verticalmente por electroforesis discontinua durante 1 h a 190 V. Para la electroforesis en gel discontinua se precisó de 2 geles, un gel de apilamiento o 'stacking' al 4% de poliacrilamida, que se coloca en la parte alta y sirve para apilar las bandas de proteínas antes de que sean separadas, y un gel de separación o 'resolving', en la parte baja, cuyo porcentaje es mayor que el del 'stacking' pero variable en función del tamaño de la proteína a detectar. Concretamente usamos el gel 'resolving' del 12% para resolver la proteína de menor tamaño o peso molecular, la LYSC de 17 KDa, y el del 10% para las proteínas PLSL y TRFL de 70 y 79 KDa respectivamente. Tras la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) por electrotransferencia (horizontal) húmeda usando un tampón de transferencia Tris/Glicina (Biorad). Las condiciones de transferencia fueron 160 V durante 2 h a 4°C. El bloqueo de las membranas se realizó incubándolas con leche desnatada en polvo al 5% disuelta en PBS 1X-Tween 0.5% (PBS-T) durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, cada membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente a cada una de las tres proteínas humanas seleccionadas, a 4°C durante la noche. Concretamente se utilizaron: el anticuerpo monoclonal de ratón anti-plastina 2 (1,5 µg/µL; ab80726 Abcam, Reino Unido), el anticuerpo monoclonal de conejo anti-lisozima (dilución 1:20000; ab 108508 Abcam, Reino Unido) y el anticuerpo policlonal de conejo anti-lactotransferrina (dilución 1:500; ab15811 Abcam, Reino Unido). Después de esto, las membranas se lavaron con PBS-T (3 lavados de 5 min en agitación) y se incubaron con el anticuerpo secundario policlonal IgG de cabra correspondiente, anti-ratón o anti-conejo, conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) (dilución 1:2000, Santa Cruz, USA) durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas de PVDF fueron reveladas con el kit basado en quimioluminiscencia (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, ThermoFisher Scientific) y analizadas en un sistema de imagen para western blot ECL (enhanced chemiluminescence) usando el instrumento Fujifilm LAS-3000 Imager. Una vez obtenidas las imágenes, se analizaron las bandas por densitometría usando el software Image J. A continuación, se llevó a cabo el 'stripping' o desnudado de la membrana, incubando las membranas con un tampón de stripping (Restore Western Blot Stripping Buffer, Thermo Scientific) durante 15 min a temperatura ambiente. Con este proceso lo que se consigue es

eliminar la señal del primer anticuerpo utilizado y permite usar la misma membrana para múltiples anticuerpos. De esta manera, las membranas fueron incubadas por segunda vez con un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti- β -actina humana (dilución 1:2000; Santa Cruz Biotechnology), seguido de su correspondiente anticuerpo secundario de cabra anti-ratón y analizada como se describe anteriormente. La β -actina se usó como control positivo de la técnica y como proteína 'housekeeping' o control interno sobre la que relativizar la expresión del resto de proteínas.

1.6 Caracterización de la expresión de PLSL, TRFL y LYSC en tejido endometrial por inmunohistoquímica

Para la validación externa, se emplearon 15 muestras endometriales de otra cohorte de mujeres donantes fértiles diferentes a las usadas en el iTRAQ y cogidas en diferentes fases del ciclo endometrial (n=3, fase proliferativa media temprana; n=3, fase proliferativa tardía; n=3, fase secretora temprana; n=3, fase secretora media; n=3, fase secretora tardía). Dichas muestras fueron primero fijadas en paraformaldehído al 4%, deshidratadas en baños de alcoholes de gradación creciente (del 70-100% de etanol) y luego embebidas en parafina. De los bloques de parafina se realizaron cortes de 5 μ m que fueron colocados en portaobjetos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) para la posterior inmunohistoquímica. A continuación, las secciones se desparafinaron en la estufa a 60 °C durante 1 h seguido de dos baños en histoclear o xilol de 5 min c/u, y se deshidrataron en series de alcoholes de gradación decreciente (del 100-70% de etanol). Tras ello, las secciones o cortes se enjuagaron primero con agua del grifo y luego con agua destilada.

Para la inmunohistoquímica se utilizó el Kit de Peroxidasa LSAB (DAKO, USA). Brevemente, el primer paso del protocolo consiste en el desenmascaramiento del antígeno inducido por calor, para el cual las secciones o cortes se incubaron con una solución de tampón de citrato de sodio a pH 6.0 a 95°C durante 20 min, en un baño de agua. Luego, se hicieron dos lavados de 5 min c/u. con PBS seguidos del bloqueo con una solución de BSA al 5% (en PBS) (Sigma) durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se incubaron los cortes toda la noche a 4°C con los correspondientes anticuerpos primarios monoclonales de ratón frente a la plastina 2 humana (10 μ g/mL; Abcam, Reino Unido), o de conejo anti-lisozima humana (1:2500; Abcam, Reino Unido), ambos diluidos en PBS con 3% de BSA. En el caso de las secciones de tejido destinadas a la detección de la TRFL, el desenmascaramiento del antígeno se llevó a cabo con proteinasa K (20 μ g/uL diluida en tampón Tris/EDTA) durante 5 min a 37°C antes de ser incubadas con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-latotransferrina

humana (1:500; Abcam, Reino Unido) a 4°C durante toda noche. Como control negativo se utilizaron cortes de tejido endometrial siguiendo el mismo protocolo de tinción, pero incubando con BSA al 3% en PBS en lugar del anticuerpo primario correspondiente, y como control positivo se usaron tejidos en los que se conoce que esa proteína se expresa. De tal forma se usaron amígdala humana como control positivo para la PLSL y la TRFL y pulmón humano como control positivo para la LYSC. Los anticuerpos secundarios vinieron incluidos en el Kit Peroxidasa LSAB, siendo válidos para anticuerpos primarios de conejo, ratón o cabra. Para el revelado o detección de la inmunoreactividad se utilizó el sustrato diaminobencidina (DAB) del kit, el cual es metabolizado por la enzima HRP en presencia de peróxido de hidrógeno, dando un precipitado de color marrón, allí donde se expresa la proteína de interés. Finalmente, los cortes fueron contrateñidos con hematoxilina durante 10 segundos para visualizar los núcleos, lavados con agua destilada y montados con el medio de montaje Eukitt para su posterior visualización al microscopio óptico. La cuantificación de la tinción o señal se llevó a cabo por medio del método H-Scores, en el que tres observadores independientes y de manera ciega categorizaron la intensidad de señal en ausencia completa de tinción (0) a una señal muy fuerte (3). Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm desviación estándar (SD).

1.7 Estadística

Los datos proteómicos se analizaron utilizando el programa R (R Core Team, Austria) primero por medio de un análisis de la Varianza (ANOVA) (Cox, 2007) para evaluar qué proteínas salieron diferencialmente expresadas entre los tres grupos analizados. A los resultados obtenidos del ANOVA se les aplicó la corrección del método FDR (Tasa de falsos rechazos o de descubrimientos falsos; 'False Discovery Rate') para controlar la probabilidad global de error tipo I, o de falsos positivos, mediante un test de hipótesis o comparaciones múltiples (Benjamini and Hochberg, 1995). Así, aquellas proteínas que mostraron un FDR menor que el 0,05 se consideraron significativamente diferentes. Pero para saber entre qué dos grupos están diferencialmente expresadas esas proteínas resultantes del ANOVA, se llevaron a cabo los análisis diferenciales 'por pares' o 'pairwise', en los cuales se compararon los tres grupos experimentales dos a dos. Dichos análisis diferenciales 'por pares' se llevaron a cabo usando el paquete *limma* de R. También se llevaron a cabo representaciones gráficas, a modo de diagramas de Venn, del número de proteínas diferencialmente expresadas resultantes de los análisis diferenciales por medio de paquete *VennDiagram* de R (Chen and Boutros, 2011).

Para los resultados del western blot, la densitometría de banda de cada proteína se normalizó frente a la de su correspondiente banda de β -actina para determinar la concentración de proteína. Para la PLSL, se compararon los valores medios de densitometría normalizada o concentración de proteína entre los grupos endometriales primero haciendo un ANOVA seguido de un análisis post-hoc de Bonferroni y segundo haciendo un T-test de Student. Respecto a la TRFL y LYSC, se aplicó una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunn's usando el programa SPSS (IBM SPSS). Un *p*-valor < 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

2. Materiales y métodos parte II: El Cu y el Pb y su papel disruptor en la función endometrial

2.1 Reclutamiento de pacientes y recogida de muestras endometriales

Para la realización de la segunda parte de la tesis se reclutaron 32 mujeres. Todas ellas eran mujeres fértiles con edad comprendida entre los 18-33 años y con un IMC dentro de la normalidad, de 20-25 Kg/m², que acudieron a la clínica IVI Valencia para la donación de ovocitos. Todas ellas presentaron ciclos menstruales regulares (21-32 días) y se sometieron a un control ecográfico y ginecológico para descartar otras condiciones limitantes de la fertilidad, tales como adenomiosis, endometriosis, endometritis, enfermedad pélvica inflamatoria o sangrado irregular, patologías anatómicas uterinas o embarazo dentro de los 3 meses anteriores a la recogida de la muestra endometrial.

Este estudio fue aprobado por el comité ético institucional del Instituto Universitario (IU)-IVI Valencia (#1606-FIVI-050-FD, Valencia, España), y todas las participantes firmaron el consentimiento informado antes del procedimiento quirúrgico. Tras ello, las biopsias endometriales (n=32) fueron recogidas con un catéter Pipelle (CCD Laboratoire, France) del útero de las donantes fértiles de ovocitos en el día de la punción ovocitaria, las cuales estaban siguiendo un ciclo de estimulación ovárica controlada.

2.2 Aislamiento y cultivo primario de células estromales y epiteliales endometriales humanas

Las biopsias endometriales fueron procesadas por sedimentación gravitacional para la separación de células endometriales primarias, estromales (ESCs, del inglés '*Endometrial Stromal Cells*') y epiteliales (EECs, del inglés '*Endometrial Epithelial Cells*'), de acuerdo a lo previamente descrito por Domínguez et al., 2010 (Dominguez *et al.*, 2010) (**Figura 18**). Brevemente, el tejido endometrial es primero triturado mecánicamente con ayuda de unos bisturíes en pequeñas porciones de $\leq 1 \text{ mm}^3$. Posteriormente, los fragmentos de la biopsia son digeridos enzimáticamente con colagenasa (colagenasa tipo IA al 0,1%; Sigma-Aldrich, España) en medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM; Sigma-Aldrich, España) sin rojo fenol a 4°C durante la noche. A continuación, colocando el tubo en posición vertical durante 10 minutos, las EECs (de la porción luminal y glandular) y las ESCs se separan en función del tamaño por sedimentación gravitacional, de manera que las EECs de mayor tamaño y densidad tienden a precipitar antes y sedimentar en el fondo del tubo, mientras que las ESC quedan suspendidas en el sobrenadante. El sobrenadante con las ESC se recoge y filtra mediante unos filtros de

membrana con tamaño de poro de 50 μm (cell filters, Celltrics, GmbH; Alemania), mientras que el sedimento (con las células epiteliales glandulares y luminales) se lava y agita tres veces con medio fresco DMEM. A cada lavado le siguen unos 10 minutos de sedimentación gravitacional y filtración de las ESC del sobrenadante. Una vez aisladas y filtradas, las ESC se centrifugan a 2.500 rpm durante 5 minutos. Por otro lado, las células epiteliales finalmente también se filtran en filtros de membrana de tamaño de poro de 100 μm (Celltrics, GmbH; Alemania), para eliminar el exceso de glándulas. Para eliminar los eritrocitos presentes en las muestras, cada fracción celular es tratada con 3 mL de tampón de lisis de eritrocitos 1X (Cloruro de amonio $[\text{NH}_4\text{Cl}]$ 1,5M, Hidrocarbonato de sodio $[\text{NaHCO}_3]$ 100 mM y ácido etilendiaminotetraacético [EDTA] 1 mM, pH 7,4) y centrifugada a 2.500 rpm durante 5 minutos. Tras la lisis de los eritrocitos, las ESC se resuspenden y cultivan en su medio de cultivo DMEM/F12 libre de rojo fenol al 10% de suero bovino fetal (SBF) y conteniendo 0,2% de antibióticos (0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fungizona and 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina) (medio de cultivo de ESCs al 10% de SBF) y las EECs en su medio de cultivo compuesto de 75% DMEM/25% MCDB-105 suplementado con 10% de SBF, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de insulina (Sigma-Aldrich; Spain) y 0,2% de antibióticos (medio de cultivo de EEC al 10% de SBF).

Una vez aisladas las dos poblaciones celulares, el primer paso fue comprobar la pureza de ambas por medio de inmunocitoquímica de fluorescencia con marcadores específicos para ESCs y EECs, y el segundo paso fue evaluar el efecto de la exposición *in vitro* al Cu y Pb sobre el cultivo primario de ESCs y EECs por medio de diversos ensayos funcionales *in vitro*. Para la fracción estromal se llevaron a cabo ensayos de viabilidad (MTS) con curvas de exposición tiempo-dosis, ensayos de decidualización con análisis de la expresión de receptores esteroideos y análisis del estrés oxidativo (ensayo ROS). En la fracción epitelial se llevaron a cabo también ensayos de viabilidad (MTS) además de ensayos de adhesión trofoblástica y de migración (**Figura 18**).

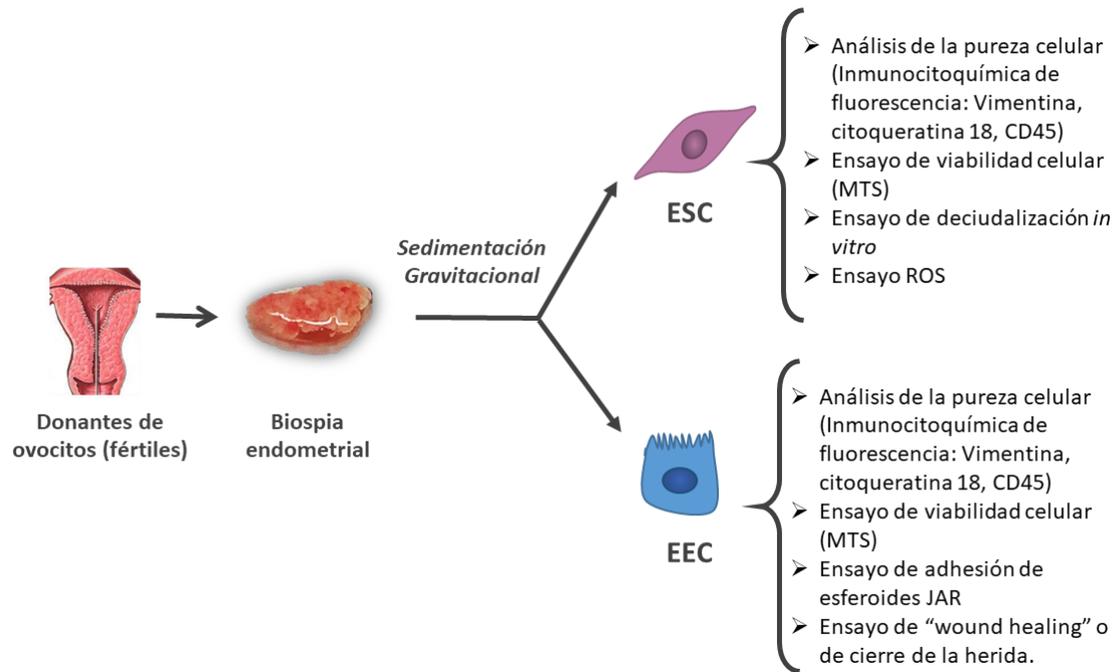


Figura 18. Esquema de la obtención y separación de las ESCs y EECs a partir de biopsias endometriales por sedimentación gravitacional y ensayos funcionales llevados a cabo con cada fracción celular.

2.3 Caracterización de la pureza/homogeneidad de las poblaciones celulares ESCs y EECs por medio de inmunofluorescencia de Vimentina, Citoqueratina 18 y CD45

La homogeneidad de los cultivos celulares se determinó de acuerdo a las características morfológicas bajo el microscopio óptico de campo claro y verificado por localización por inmunofluorescencia de los siguientes marcadores: citoqueratina (marcador epitelial) y vimentina (marcador de epitelio y estroma) y CD45 (marcador de células inmune, macrófagos) (Simón *et al.*, 1999; Domínguez *et al.*, 2003; Braza-Boils *et al.*, 2013).

Para ello se cultivaron ESCs y EECs en placas de 24 pocillos (6 pocillos por tipo celular, 3 para cada anticuerpo por separado y otros tres para sus correspondientes controles negativos) en sus respectivos medios al 10 % de SBF hasta alcanzar el 90-100% de confluencia. Tras ello, primero se fijaron las células con paraformaldehído al 4% (PFA) durante 20 minutos y luego se permeabilizaron con Triton-X 100 al 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Antes y después de cada paso, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con tampón fosfato salino 1X (PBS, del inglés Phosphate Buffer Saline). Una vez las células fueron fijadas y permeabilizadas, se procedió a realizar el bloqueo con albumina de suero bovino (BSA, del inglés Bovine Serum Albumin) al 5%/suero normal de cabra al 5% (NGS, del inglés Normal Goat

Serum) durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de dos lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X. Ambos tipos celulares, ESCs and EECs, fueron incubados con los tres anticuerpos primarios por separado (en pocillos separados): anticuerpo anti-vimentina (dilución 1:100 en BSA al 1%, anticuerpo hecho en ratón frente a humano; Abcam, Reino Unido), anticuerpo anti-citoqueratina 18 (dilución 1:300 en BSA 1%, hecho en conejo frente a humano; Abcam, Reino Unido) y anticuerpo anti-CD45 (dilución 1:200 en BSA 1%, hecho en conejo frente a humano; Santa Cruz, Alemania) a 4° C durante la noche. Tras la incubación con el anticuerpo primario, las células se lavaron con PBS (3 lavados de 5 min) e incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente AlexaFluor 488 de cabra frente a ratón (1:500 en BSA 1%) o el AlexaFluor 488 de cabra frente a conejo (1:1000 en BSA 1%) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave. Los controles negativos fueron células de ambos tipos celulares que siguieron el mismo procedimiento de tinción, pero en ausencia de cada uno de los anticuerpos primarios. Tras la incubación con el anticuerpo secundario y respectivos lavados con PBS, se contratiñeron los núcleos celulares con un medio de montaje que contiene el agente intercalante, 6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Molecular probes, Lifes Technologies, España). La tinción se comprobó en un microscopio invertido de fluoerescencia (ZEISS AXIO) equipado con una cámara AXIoCam ICc5 camera. Se tomaron fotos de las células para su posterior análisis a un aumento de 40X.

2.4 Preparación de las soluciones de las sales metálicas de Cobre y Plomo

Para cada metal, se preparó una solución stock (solución de trabajo) de 2000 μM , disolviendo la cantidad adecuada de cada sal metálica ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y PbCl_2 ; con grado de pureza analítico $\geq 98\%$; Sigma-AldrichTM, España) en agua MilliQ (Millepore, Francia) y filtrado con esterilidad (filtros con doble membrana de 0,2/0,8 μm) antes del tratamiento celular. Las soluciones de trabajo de menor concentración de dichos metales (50-200 μM para el cobre y 30-500 μM para el plomo) se prepararon por dilución de las soluciones stocks con sus respectivos medios de cultivo para ESC/EEC suplementado con 2% de SBF.

Las dosis de ambos metales pesados se seleccionaron de acuerdo con la bibliografía previa publicada. En el caso del cobre (Cu), se seleccionaron dosis más bajas y similares a aquellas encontradas en el líquido endometrial de pacientes portadoras de un DIU de cobre (Arancibia *et al.*, 2003; Carrascosa *et al.*, 2018) y también dosis usadas en cultivo *in vitro* con la línea celular de células humanas estromales endometriales (HESC) (Li *et al.*, 2017b) (50, 100 y 200 μM). Para el plomo (Pb), se seleccionaron dosis similares a aquellas usadas en trabajos

previos para el cultivo in vitro de células Ishikawa y células neuronales PC12 (Guyot *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2015) (30, 100 y 500 μM).

2.5 Ensayo de viabilidad celular en ESCs y EECs expuestas al Cu y Pb

La viabilidad celular de ESCs y EECs expuestas a Cu y Pb se evaluó midiendo la competencia metabólica por medio del ensayo colorimétrico MTS (CellTiter 96Aqueous cell proliferation assay kit; Promega, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este ensayo mide la reducción de la sal tetrazolio (MTS) a formazán (producto coloreado) catalizado por las enzimas deshidrogenasas de las mitocondrias intactas de células vivas. De esta manera, el cambio de absorbancia es directamente proporcional al número de células vivas. Brevemente, se sembraron $2,0 \times 10^4$ células ESC (n=4) y EEC (n=4) por pocillo en placas de 96 pocillos y se dejaron crecer hasta una confluencia del 40-50% en sus respectivos medios de cultivo suplementados al 10% de SBF a 37°C en 5% CO₂ en atmósfera húmeda antes de la exposición al metal pesado. A continuación, las células ESCs y EECs fueron expuestas durante 72 y 48 horas respectivamente con diferentes dosis de Cu (50, 100, 200 μM) y Pb (30, 100, 500 μM) añadiendo 100 μL de la solución de trabajo correspondiente preparada en medio ESC/EEC al 2% de SBF. Las condiciones control para ambos metales pesados fueron células cultivadas en el mismo medio al 2% de SBF pero sin tratar con metales pesados (0 μM). Tras la incubación con las soluciones de Cu y Pb, se midió la densidad óptica (OD, del inglés optical density) o absorbancia a 490nm a las 2h (t_0) postratamiento y cada 24 horas tras añadir 20 μL /pocillo del reactivo MTS (**Figura 19; A,B**). Para que se dé la reacción, se requirió una incubación de 2 horas con el reactivo MTS a 37°C y tras ello se midió la absorbancia en un lector de microplacas (SpectraMAX 190, Molecular Devices; USA).

Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad celular. Los valores de OD en cada punto de tiempo-dosis fueron normalizados al valor de OD de las células controles no expuestas (0 μM) a las 72h para las ESCs y a las 48h para las EECs (100% de viabilidad) \pm desviación estándar ($\pm\text{SD}$) (n=4). Se realizaron dos réplicas por condición en cada experimento.

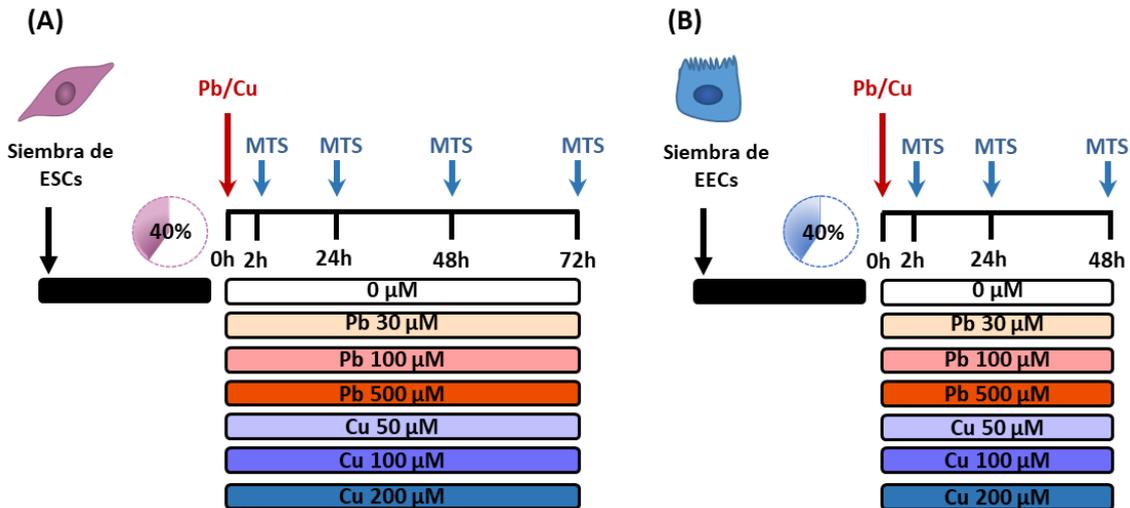


Figura 19. Diagrama para el ensayo MTS para las ESCs y para las EECs expuestas a Cu y Pb. (A) Esquema gráfico del experimento MTS para las ESCs. Dichas células fueron tratadas con Cu (0, 50, 100, 200 µM) y Pb (0, 30, 100, 500 µM) durante 72 h. La viabilidad se midió a las 2, 24, 48 y 72 h post-exposición al Cu o Pb. **(B)** Esquema gráfico del experimento MTS para las EECs. Las EECs fueron tratadas con Cu (0, 50, 100, 200 µM) y Pb (0, 30, 100, 500 µM) durante 48 h. La viabilidad se midió a las 2, 24 y 48 h post-exposición al Cu y Pb.

2.6 Decidualización *in vitro* de ESCs primarias expuestas a cobre y plomo

Para el ensayo de decidualización, primero se sembraron ESCs primarias ($n=4$) en placas de 12 pocillos con medio ESC suplementado al 10% SBF. Una vez alcanzado el 60-70% de confluencia, se trataron con las soluciones de Cu (50 y 100 µM) y plomo (30 y 100 µM) durante 24 h en medio ESC al 2% de SBF. Veinticuatro horas después de la exposición al metal pesado, se indujo la decidualización *in vitro* de las células ESC durante 7-8 días añadiendo medio fresco al 2% de SBF conteniendo 1 µM de progesterona (P4; 4-pregнено-3,20-diona; Sigma-Aldrich), 30 nM de estrógeno (E2; 17β-estradiol-acetato; Sigma-Aldrich) en presencia de las anteriormente mencionadas concentraciones de Cu y Pb. Se cambió el medio después de 3-4 días de cultivo y se dejó otros 4 días con el correspondiente medio nuevo con la mezcla de hormonas y metales pesados. En paralelo, se mantuvieron ESCs tratadas con las dosis de Cu y Pb correspondientes, siguiendo las mismas pautas de cultivo, pero sin decidualizar, a modo de controles no deciduales de cada dosis. También se incluyeron los controles no expuestos (0 µM) para las condiciones decidual y no decidual (**Figura 20**). Aunque el SBF podría contener trazas de hormonas esteroideas (Milo *et al.*, 1976; Sedelaar and Isaacs, 2009), la misma concentración de SBF (2%) en el medio se usó también en los controles no expuestos al metal pesado, excluyendo su posible interferencia estrogénica en nuestros resultados.

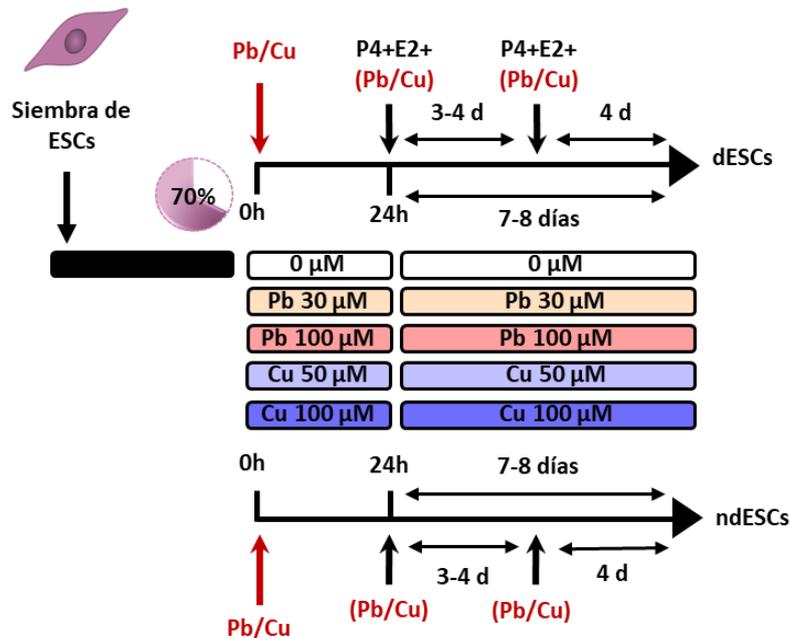


Figura 20. Diagrama para el ensayo de decidualización in vitro de las ESCs en presencia de Cu y Pb. Tras alcanzar una confluencia del 70%, las ESCs fueron incubadas durante 24 h con Cu (0, 50, 100 µM) o Pb (0, 30, 100 µM) y luego se les indujo la decidualización con las hormonas P4+E2 en presencia de las respectivas dosis de Cu o Pb (parte de arriba del esquema). El medio se cambió a los 3-4 días, y se dejó a las células incubando con medio fresco conteniendo hormonas y el metal pesado correspondiente durante otros 4 días. Las ESCs expuestas o no a los metales pesados, pero sin tratamiento hormonal (parte de abajo del esquema) fueron los controles no deciduales (ndESCs).

2.7 Chequeo o comprobación del proceso de decidualización

Para comprobar el grado de decidualización de las células ESCs expuestas a Cu y Pb, se midieron los siguientes parámetros:

- Los niveles de prolactina (PRL), marcador de decidualización, secretados al medio de cultivo por parte de las ESCs decidualizadas in vitro y expuestas a Cu y Pb.

Después de los 7 u 8 días de decidualización, los medios de cultivos condicionados de las ESCs decidualizadas (dESCs) y no decidualizadas (ndESCs) expuestas a Cu y Pb (n=4) fueron recogidos y evaluados por duplicado para determinar la concentración del marcador de decidualización PRL usando una técnica de inmunoensayo conocida como ELISA (acrónimo del inglés, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: 'ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas'). Concretamente se utilizó un Kit de ELISA comercial específico para detectar la PRL humana (Abnova, Dinamarca). La técnica ELISA es una técnica de inmunoensayo en al

cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color o algún otro tipo; en ocasiones, con el fin de reducir los costos del ensayo, nos encontramos con que existe un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado la enzima anteriormente mencionada. La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra. El límite de detección del Kit de ELISA de PRL fue 2 ng/mL. Para reducir la variabilidad inter-biopsia en cuanto a los niveles de PRL, cada condición de tratamiento fue normalizada con su respectiva condición decidual no expuesta a metales pesados (0 μ M), considerando esta como el 100% de decidualización en cada biopsia. Los valores de PRL se expresaron como porcentaje medio de decidualización \pm desviación estándar (\pm SD) (n=4).

- Los niveles de expresión del gen de PRL a nivel celular

Por otro lado, se recogieron las células dESCs y ndESCs expuestas a Cu y Pb, después de los 7-8 días de cultivo para analizar los niveles de mRNA (del inglés, messenger RiboNucleic Acid: 'RNA mensajero') de PRL a nivel celular por medio de la técnica de 'reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real' (RT-qPCR, del inglés Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction). Para ello, primero las células fueron 'tripsinizadas' añadiendo la enzima tripsina (Tryple Select Enzyme 1X, ThermoFisher) e incubando las células durante 5 minutos a 37°C en el incubador. Tras ello, se inactivó la tripsina añadiendo medio al 10% de SBF y se centrifugaron las células a 2,500 rpm durante 5 minutos. Se quitó el sobrenadante, se lavaron las células con PBS 1X y se volvieron a centrifugar. El pellet de células se utilizó para la extracción de RNA y para la detección del nivel de expresión de ciertos genes entre ellos PRL y otros genes implicados en el proceso de decidualización y receptividad endometrial tales como el receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$), el receptor de progesterona (PR) y el gen *HOXA10* (ver apartado 8 de materiales y métodos parte II).

- Reorganización del citoesqueleto

Una característica de las células decidualizadas es que se diferencian a un fenotipo tipo secretor y experimentan una reorganización a nivel del citoesqueleto de actina pasando de una morfología fibroblástica alargada a una más redondeada o

poligonal. Para ello, se analizó el citoesqueleto en ESCs primarias adicionales (n=3), sometidas al mismo protocolo de decidualización en placas de 24 pocillos por medio de la tinción de los filamentos de actina (F-actin) con el colorante fluorescente rodamina-faloidina (Abcam). Para ello, las células fueron primero fijadas con 4% de paraformaldehído durante 20 minutos y permeabilizadas con 0,1% Tritón-X 100 durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de cada paso, las células fueron lavadas con PBS 1X (3 lavados de 5 minutos c/u). Finalmente, las células se incubaron con el reactivo rodamina-faloidina 1X (Abcam, Reino Unido) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La estructura del citoesqueleto se visualizó y fotografió usando un microscopio invertido ZEISS AXIO (n=3).

2.8 Aislamiento celular del RNA y RT-qPCR de PRL, ER α , PR y HOXA10

Para el aislamiento del RNA total tanto de las células dESCs como de las ndESCs expuestas y no expuestas a metales pesados, se usó el Kit 'RNeasy mini Kit' (Qiagen; Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este Kit se basa en la lisis celular y consiguiente obtención del RNA total por medio del uso de una serie de tampones de lisis y de lavado, haciendo pasar las muestras por un sistema de columnas con filtros donde el RNA queda inicialmente retenido en la columna y finalmente es eluido en agua libre de nucleasas (nuclease free H₂O). Tras cuantificar en el espectrofotómetro Nanodrop, la cantidad total de RNA extraído por muestra, se usaron 500 ng de RNA para su retrotranscripción en su DNA complementario (cDNA). Para la transcripción reversa se usó un cebador ('primer' en inglés) oligomérico de timinas (dT), otros cebadores de secuencias aleatorias (random mers) y la transcriptasa reversa incluidos en el kit (PrimeScriptTM RT reagent kit, Takara; Japón) de acuerdo con los protocolos normalizados. La RT-qPCR se llevó a cabo usando el agente intercalante fluorescente SYBR Green (PowerUpTM SYBRTM Green Master Mix, Applied Biosystems; USA) en un termociclador para PCR a tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems; USA). Para la amplificación se usó la 'Master Mix' comercial PowerUp SYBR Green Master Mix (ThermoFisher Scientific), la cual contiene:

- La Dual-LockTM Taq DNA polimerasa con doble mecanismo 'hot start' (inicio en caliente) de control de actividad. Por un lado, proporciona un fino control sobre la activación de la enzima previniendo una activación temprana no deseable de la misma a temperaturas más bajas que puedan conducir a una amplificación inespecífica. Por otro lado, permite la reactivación de la polimerasa después de sólo 2 minutos a 95°C.

- La enzima termolábil Uracil-D-glicosilasa (UDG), que actúa como control de contaminación, degradando cualquier producto remanente de PCR previamente amplificado que puedan contaminar reacciones de PCR subsecuentes. Concretamente, actúa sobre DNA de simple o doble cadena que contenga uracilos (dU), hidrolizando los puentes glicosídicos del DNA en los sitios que contengan dU. No tiene actividad sobre el RNA ni sobre DNA que contiene timinas (dT) y se inactiva durante la desnaturalización por calor de las hebras de DNA.
- Desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) de adenina, guanina, citosina y timina. Son los sustratos que utiliza la polimerasa para la replicación del DNA.
- Desoxirribonucleótidos de uracilo (dUTP), que permiten la actividad de la UDG y mantiene los resultados de la PCR óptimos.
- SYBR Green, que permite la detección de los productos de PCR por fluorescencia tras unirse al DNA de doble cadena formado durante la PCR.
- ROX, que es otro fluoróforo que se usa como referencia pasiva o control interno de la Master Mix sobre el cual la señal del reportero SYBR Green es normalizada durante el análisis de los datos. Dicha normalización es necesaria para corregir las fluctuaciones de fluorescencia debidas a cambios en concentración o volumen.

El protocolo comprendió dos primeros pasos de mantenimiento, el primero de 2 minutos a 50°C para la activación de la Uracil-D-glicosilasa y 2 minutos a 95°C para la activación de la *Taq* DNA polimerasa, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 3 segundos para la desnaturalización del DNA de doble cadena y 60°C durante 30 segundos para el anillado de los cebadores y la extensión de la hebra de DNA (en modo rápido). Cada reacción contuvo 5 µL de la Master Mix, 10 µM de los primers forward y reverse, 10 ng del molde cDNA, y agua libre de nucleasa en un volumen total de 10 µL.

La **tabla 8** recoge la secuencia de los primers utilizados en la RT-qPCR para la amplificación de los genes *ERα*, *PR*, *HOXA10* y *gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)*. La especificidad de los primers se evaluó por medio del análisis de las curvas de 'melting' o desnaturalización de los amplicones (fragmento de DNA amplificado) y por la incorporación de controles negativos (agua libre de nucleasas en vez de cDNA) para cada pareja de primers. Se llevaron a cabo 3 réplicas de amplificación por cada muestra. Los niveles de expresión de cada gen se normalizaron respecto el nivel del gen 'housekeeping' o control interno (*GAPDH*), expresándose los datos a modo de cuantificación relativa usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y usando la condición ndESC sin tratar (0 µM) como muestra de referencia. Los resultados se expresaron como la tasa de cambio o fold-change medio \pm desviación estándar (SD) (n=4).

Tabla 8. Primers usados para la RT-qPCR

Gen	Primer forward (5'–3')	Primer reverse (5'–3')
PR	GTGGGAGCTGTAAGGTCTTCTTTAA	AACGATGCAGTCATTTCTTCCA
ERα	GCTTCGATGATGGGCTTAC	CTGATCATGGAGGGTCAAATC
HOXA10	GATGAGCGAGTCGACCAAA	TGCTCCCTTCGCCAAATTA
GAPDH	AGATCAAGAAGGTGGTGAAG	TTGTCATACCAGGAAATGAGC

2.9 Ensayos Ki67 y TUNEL de las ESCs tras el proceso de decidualización en presencia de Cu y Pb

Para evaluar si el estado de proliferación y el grado de muerte celular de las ESC expuestas a Cu y Pb se veía alterado tras el proceso de decidualización, se analizó la cantidad de señal del marcador nuclear de proliferación Ki67 por inmunofluorescencia y la apoptosis mediante el ensayo TUNEL (del inglés 'deoxynucleotide Transferase dUTP Nick End Labelling', o etiquetado de los extremos de las mellas o incisiones en la cadena de DNA por medio de la deoxiribonucleótido transferasa (dUTP)) respectivamente por separado, tanto de las dESC como sus controles ndESC expuestas y no expuestas a las distintas dosis de Cu y Pb. Para ello, las ESCs fueron cultivadas en placas de 24 pocillos bajo el mismo proceso de decidualización descrito en el apartado 6, en presencia o ausencia de metales pesados durante 7-8 días. En resumen, las ESCs fueron primero expuestas a Cu (0, 50, 100 μ M) o a Pb (0, 30, 100 μ M) y, tras las 24 h de exposición se indujo la decidualización in vitro usando principalmente P4 + E2 como estímulo de decidualización. Los controles no deciduales de cada dosis se llevaron a cabo en paralelo. Para ambos métodos, después de 7-8 días de decidualización, las células fueron lavadas con PBS 1X, fijadas con PFA al 4% (20 minutos), permeabilizadas con 0,1% de Tritón X-100 en 0,1% de citrato sódico (5 minutos), y lavadas tres veces con PBS 1X.

Para la inmunofluorescencia de Ki67, tras la fijación y permeabilización de las células, el bloqueo se realizó con BSA al 3% (Sigma-Aldrich, España)/NGS al 5% (Fischer Scientific, USA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células fueron lavadas con PBS 1X (2 lavados de 5 minutos c/u) e incubadas con el anticuerpo primario de conejo anti-Ki67 (dilución 1:100 en BSA 1%; Sigma-Aldrich, España) a 4°C durante toda la noche. Tras ello, se lavaron las células para la eliminación del exceso del anticuerpo primario con PBS-T 1X (Tween-20 al 0,05% en PBS) y se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra frente a

conejo AlexaFluor 488 (dilución 1:1000 en BSA al 1%) (Santa Cruz; Alemania) en agitación a temperatura ambiente durante 1h. El control negativo se preparó siguiendo el mismo proceso de tinción, pero en ausencia del anticuerpo primario.

La reacción TUNEL se basa en etiquetar o marcar las roturas de simple o doble cadena de DNA producidas durante el proceso de apoptosis, por medio de una enzima, la dUTP-transferasa terminal, que lo que hace es añadir nucleótidos de uracilos marcados con un fluoróforo rojo (dUTPs*) a los extremos de las roturas de la cadena de DNA, permitiendo así cuantificar la muerte celular por apoptosis a nivel de célula única. Este ensayo se llevó a cabo usando el kit de detección *in situ* de muerte celular, TMR rojo (Roche, Sigma-Aldrich, España), siguiendo el protocolo para células adherentes. De manera breve, las células una vez fijadas y permeabilizadas, se incubaron con 150 µL de la mezcla de reacción TUNEL (solución enzima + solución de etiquetado (dUTPs); 1:10) durante 60 min a 37°C en oscuridad y en atmósfera húmeda. El control positivo fueron células fijadas y permeabilizadas incubadas con 2000 U/mL de DNasa I en 50 mM de tampón Tris-HCl pH 7,5 con 1 mg/mL de BSA durante 10 min a 25°C para inducir roturas en las cadenas de DNA antes de añadir la mezcla de reacción TUNEL. El control negativo fueron células fijadas y permeabilizadas incubadas sólo con la solución de etiquetado (sin la transferasa terminal) en lugar de la mezcla de reacción TUNEL.

Después de la inmunotinción con Ki67 y/o de la reacción TUNEL, las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X y se contratiñeron los núcleos con DAPI (Molecular Probes, Life Technologies, España). Finalmente se analizaron las células bajo el microscopio de fluorescencia Zeiss AXIO equipado con la cámara AXioCam ICc5.

Se replicaron los experimentos en 3 muestras endometriales diferentes (n=3). Los resultados se expresaron para Ki67 como el *porcentaje de células Ki67 positivas* cuantificado como el número de células positivas para Ki67 (fluorescencia verde) sobre el número total de células (células positivas para DAPI; fluorescencia azul) por campo observado. La misma representación se utilizó para los resultados del ensayo TUNEL, siguiendo la fórmula de la tasa o ratio de apoptosis: porcentaje de células positivas para TUNEL (%) = (número de células TUNEL positivas (fluorescencia roja)/número de células positivas para DAPI) x 100. Se contaron un total de 3-4 campos por condición en tres muestras diferentes.

2.10 Medición de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en ESCs expuestas a Cu y Pb (ensayo ROS)

La generación de ROS (del inglés 'Reactive Oxygen Species') inducida por la exposición a Cu y Pb in ESCs se midió por medio de un kit de detección de ROS celular basado en el uso del colorante permeable DCFDA (2',7'-diclorofluoresceína diacetato) (DCFDA Cellular ROS Detection Assay Kit; Abcam, Reino Unido). A modo de resumen, inicialmente se sembraron 4×10^4 células por pocillo en placas de 96 pocillos (de fondo claro y bordes oscuros) y cuando alcanzaron el 80 % de confluencia se trataron con 100 μL de Pb (30 y 100 μM) o Cu (50 y 100 μM) en medio ESC al 2% de SBF durante 24 h. Se llevaron a cabo 2 réplicas técnicas por condición para un total de 4 experimentos independientes ($n=4$). Tras l 24 h de exposición, se lavaron las células con PBS (2 lavados) y se tiñeron con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del colorante fluorescente nuclear Hoeschst 33258 durante 30 minutos en oscuridad (37°C y 5% de CO_2). A continuación, las células se lavaron (dos lavados) con PBS y se incubaron durante 45 minutos en oscuridad (37°C y 5% de CO_2) con el DCFDA (25 μM) en medio incompleto (medio ESC al 2% de SBF) conteniendo también las respectivas dosis de Cu o Pb (**Figura 21**). Como control positivo se usaron ESCs expuestas a peróxido de tertbutilo (TBHP) (100 μM) durante 3 horas en idénticas condiciones, pero sin exponer a metales pesados. Finalmente, las células se lavaron 2 veces con PBS y se analizaron bajo el microscopio de fluorescencia. La fluorescencia intracelular se midió utilizando el microscopio de fluorescencia invertido Zeiss AXIO equipado con la cámara AXioCam ICc5 y se cuantificó utilizando el programa de análisis Image J. Los datos de células positivas para ROS (fluorescencia verde) se normalizaron primero frente número total de células por campo (células positivas para el Hoechst; fluorescencia azul) y luego expresadas como fold-change respecto a las células control no expuestas (0 μM) a metales pesados. Los valores mostrados representan el fold change medio \pm sd ($n=4$).

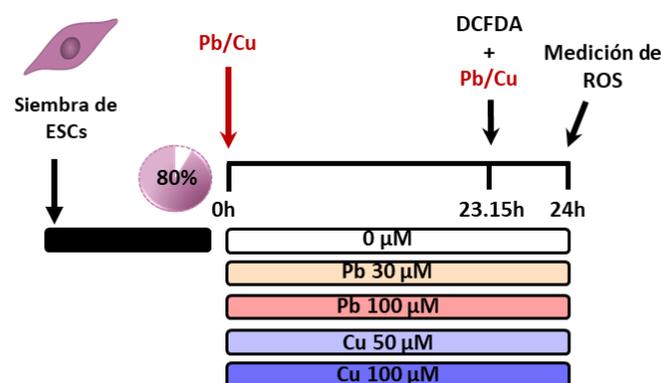


Figura 21. Diagrama para el ensayo ROS en ESCs expuestas a Cu y Pb. El estrés oxidativo generado por la exposición a Cu y Pb se analizó utilizando el DCFDA. Para este ensayo las ESCs fueron expuestas a Cu (0, 50, 100 μM) o Pb (0, 30, 100 μM) durante 24 h. Antes de completar las 24 h de exposición a Cu o Pb, las ESCs fueron incubadas durante 45 min con el DCFDA y finalmente se midió la producción de ROS midiendo la cantidad de fluorescencia generada.

2.11 Cultivo celular de los esferoides JAR y ensayo de adhesión

Debido a la dificultad de utilizar embriones humanos para los ensayos *in vitro* en lo que respecta principalmente a los aspectos éticos y al número de ellos que se necesitarían para llevar a cabo los ensayos de adhesión, hemos usado al uso de una línea celular trofoblástica para dicha aproximación *in vitro*. Concretamente se utilizó la línea celular de coriocarcinoma humano JAR (ATCC HTB-144™). Dichas células cultivadas en condiciones de baja adhesión se agrupan formando lo que aquí llamamos esferoides, adoptando una morfología y comportamiento similar al de un trofoblasto de un embrión humano. Particularmente, las células JAR se cultivaron en 2 mL de medio JAR (medio RPMI 1460 suplementado con 10 mM de medio HEPES, 1 mM de piruvato sódico, 10 % de SBF y 0,2% de antibióticos) en placas de 6 pocillos de baja adhesión a una concentración de $3,0 \times 10^4$ células por pocillo. Tras 48 h de cultivo, se recolectaron los esferoides seleccionando aquellos más redondeados y similar tamaño, los cuales fueron teñidos con 10 μ M de un colorante vital fluorescente naranja (CellTracker™ Orange CMTMR Dye, Invitrogen, Estados Unidos) en medio JAR sin suero durante 30 minutos en oscuridad (37°C, 5% CO₂). Para eliminar el exceso de colorante, los esferoides fueron lavados con PBS o en medio fresco JAR.

La adhesión de los esferoides JAR a la monocapa de células epiteliales se midió con un ensayo mecánico previamente descrito (John *et al.*, 1993). Para este ensayo, primero se sembraron monocapas confluentes de EECs primarias en placas de 24 pocillos, las cuales fueron pre-expuestas a Cu (0, 50, 100 μ M) o Pb (0, 30, 100 μ M) durante 24 h en medio EEC suplementado con SBF al 2%. A continuación, se añadieron los esferoides JAR teñidos y se cocultivaron junto con las monocapas de EECs durante 24h en presencia de las dosis previamente descritas de Cu y Pb (**Figura 22**). En cada experimento de adhesión se usaron de 5-7 esferoides por condición (dosis de metal pesado), en 7 tandas de EECs procedentes de 7 biopsias endometriales diferentes, lo que hizo un total de 49-77 esferoides por condición. La adhesión de los esferoides se midió a las 24 h poscucultivo haciendo ligeros movimientos circulares con la placa bajo un microscopio invertido (Zeiss AXIO) en campo claro y fluorescencia. La tasa de adhesión se calculó como la proporción de esferoides adheridos con respecto al número total de esferoides evaluados por condición.

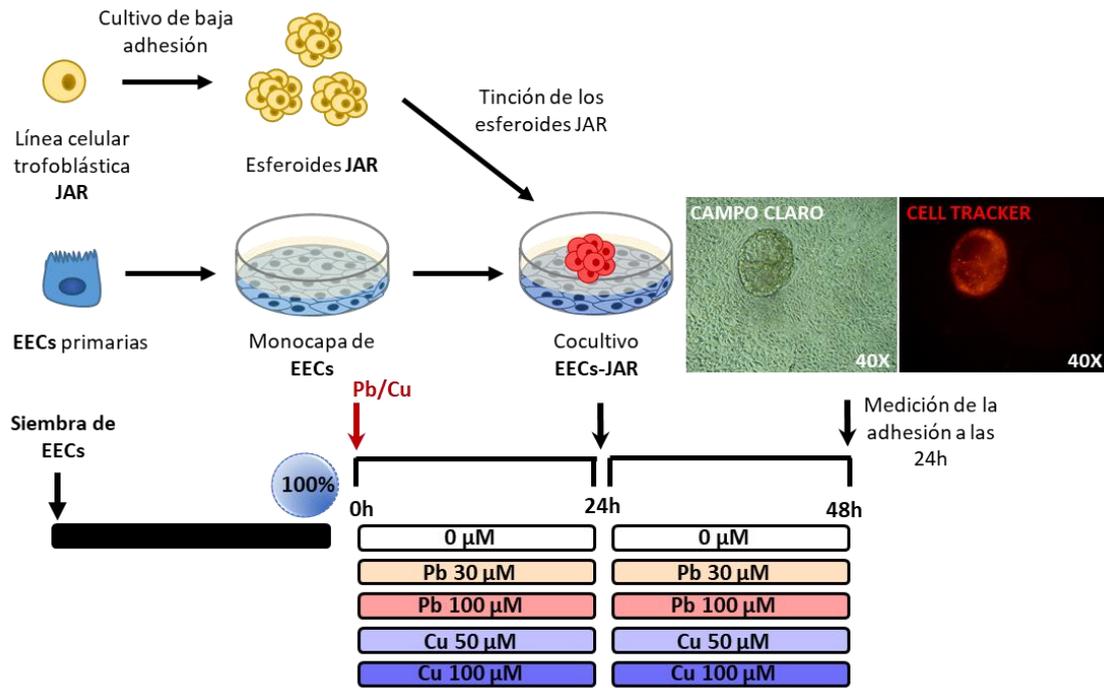


Figura 22. Diagrama para el ensayo de adhesión trofoblástica sobre monocapa de EECs expuestas a Cu y Pb. Las EECs primero fueron tratadas durante 24 h con Cu (0, 50, 100 μM) o Pb (0, 30, 100 μM) y luego se añadieron los esferoides JAR teñidos con el cell tracker y se cocultivaron ambos en presencia de Cu o Pb. Al cabo de las 24h se chequeó la adhesión de los esferoides. Se incluyen micrografías en campo claro y de fluorescencia del cocultivo de los esferoides JAR sobre la monocapa de EEC.

2.12 Ensayo de migración de las EECs (ensayo ‘wound healing’ o cicatrización de la herida)

Con el fin de evaluar la capacidad de migración de las células EECs en presencia del Cu y Pb, se llevó a cabo el ensayo ‘wound healing’ o de ‘cicatrización o cierre de la herida’. Para ello, se sembraron EECs en placas de 24 pocillos en medio EEC al 10% de SBF y se dejaron crecer hasta confluencia. Tras alcanzarla, se trataron las células con las soluciones de los metales pesados (0 μM ; 30, 100 μM Pb; 50, 100 μM Cu) en medio EEC suplementado con 2% de SBF durante 24 h. A continuación, a cada monocapa se le hizo una herida o ‘scratch’ con una punta de pipeta estéril de 1000 μL en la mitad del pocillo, se lavaron con PBS 1X para eliminar los restos de células levantadas por la herida y se añadió medio fresco al 2% de SBF y la dosis correspondiente de Cu o Pb. Se midió la anchura de la herida, en tres puntos equidistantes de la misma, en un microscopio de contraste de fase inmediatamente después de hacer la herida (t_0) y después de 24, 48 y 72h (t_{24} , t_{48} , t_{72}) (**Figura 23**). El cierre de la herida se calculó y expresó como porcentaje de cierre EECs respecto a la anchura inicial (t_0) de la herida. Los datos mostrados

representan la media \pm sd de dos medidas por condición y por biopsia ($n=4$). (Dos réplicas técnicas por condición para un total de 4 experimentos independientes $n=4$).

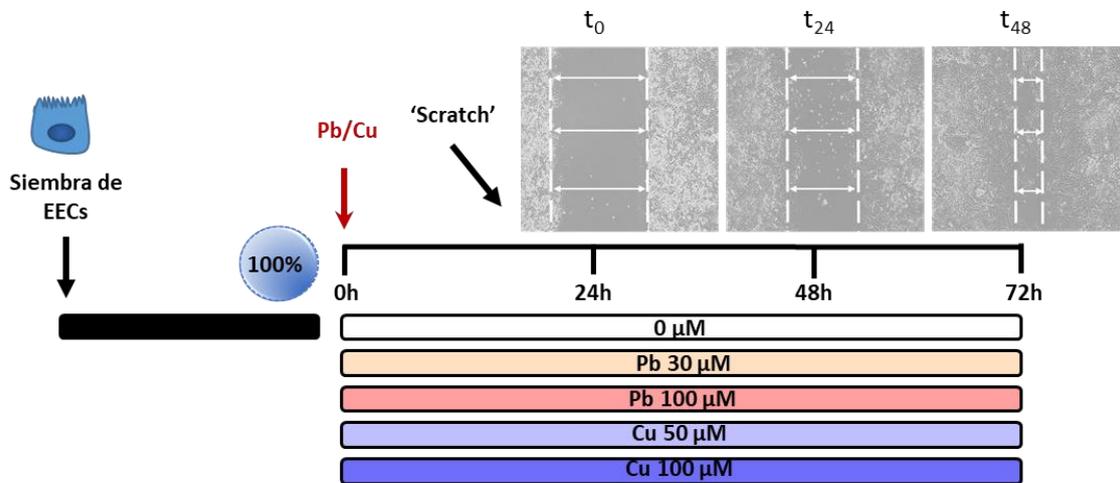


Figura 23. Diagrama para el ensayo de 'Wound Healing' con EECs expuestas a Cu y Pb. Monocapas de EECs fueron primero tratadas con Cu (0, 50, 100 μM) o Pb (0, 30, 100 μM) durante 24h, luego se le hizo la herida o 'scratch' y se les volvió a añadir medio fresco con Cu o Pb. Se midió la anchura de la herida por análisis de imagen a las 0, 24 y 48 h tras hacer la herida.

2.13 Análisis estadístico

Para cada experimento, se presentan los resultados como la media \pm la desviación estándar (SD), indicando ' n ' el número de experimentos. Para el ensayo MTS, el efecto de las dosis de Cu y Pb fue analizado dentro de cada tiempo, comparando cada dosis con la condición 0 μM . Por lo tanto, el porcentaje de viabilidad celular se analizó primero por medio de una prueba de análisis de la varianza (ANOVA) seguido por una prueba post-hoc con corrección de Games-Howell o HSD Tukey para determinar qué grupos/dosis presentaron diferencias significativas. Los niveles de PRL secretados y los fold changes de los genes *ER α* , *PR* y *HOXA10* se compararon por medio de pruebas de la T, comparando cada dosis de exposición frente a los controles no expuestos tanto en ndESCs y en dESCs.

Para los análisis TUNEL y Ki67, la estimación de los porcentajes de células positivas para TUNEL y células positivas para Ki67 se compararon entre condiciones por medio de un modelo de regresión mixta de Poisson para comparar el efecto de las dosis del metal pesado (Cu o Pb) frente a las células no expuestas (0 μM), dentro de las condiciones no decidual y decidual respectivamente. Este modelo calcula las Odds Ratios (OR) de cada dosis frente a la condición 0 μM en ndESCs y dESCs para determinar la significatividad estadística.

Para los ensayos de 'wound healing' y de adhesión, se usaron pruebas de la T para comparar el porcentaje de cierre de la herida y el porcentaje de esferoides adheridos para cada dosis de Cu y Pb con respecto a la condición 0 μ M.

Para todos los análisis, un p-valor $< 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

V. RESULTADOS

1. Resultados parte I: Estudio proteómico de la receptividad endometrial

1.1 El análisis iTRAQ desvela cambios en el número y la abundancia de las proteínas detectadas en las diferentes condiciones endometriales (mujeres fértiles, pacientes con RIF y mujeres portadoras de un DIU-Cu)

Con el fin de obtener una visión global de la posible alteración del proteoma en tres situaciones endometriales clínicas diferentes (fértil, RIF y endometrio refractario), se llevó a cabo una aproximación proteómica cuantitativa basada en el iTRAQ. En la **Figura 17** se describe el diseño experimental del iTRAQ y el flujo de trabajo. Para la identificación de las proteínas obtenidas tras el iTRAQ se utilizó la base de datos de proteínas humanas ExPASy (SwissProt database), detectando un total de 2.878, 2.669, 3.536 y 2.469 proteínas con un FDR global por debajo del 5% en cada uno de los 4 experimentos iTRAQ realizados. De todas esas proteínas, se detectaron 1.889 proteínas comunes, compartidas entre los 4 experimentos iTRAQ. Se utilizaron estas 1.889 proteínas para caracterizar los tres grupos endometriales y realizar las diferentes comparaciones estadísticas (ANOVA y comparaciones diferenciales 'pairwise' o por pares).

Inicialmente, se llevó a cabo un proceso de normalización por cuantiles de los valores del iTRAQ para la abundancia de las 1.889 proteínas comunes (**Figura 24; A,B**). Tras la normalización, las distribuciones de los datos mostraron la eliminación de los cambios o desplazamientos globales en abundancia y redujeron la variabilidad de los datos (**Figura 24B**).

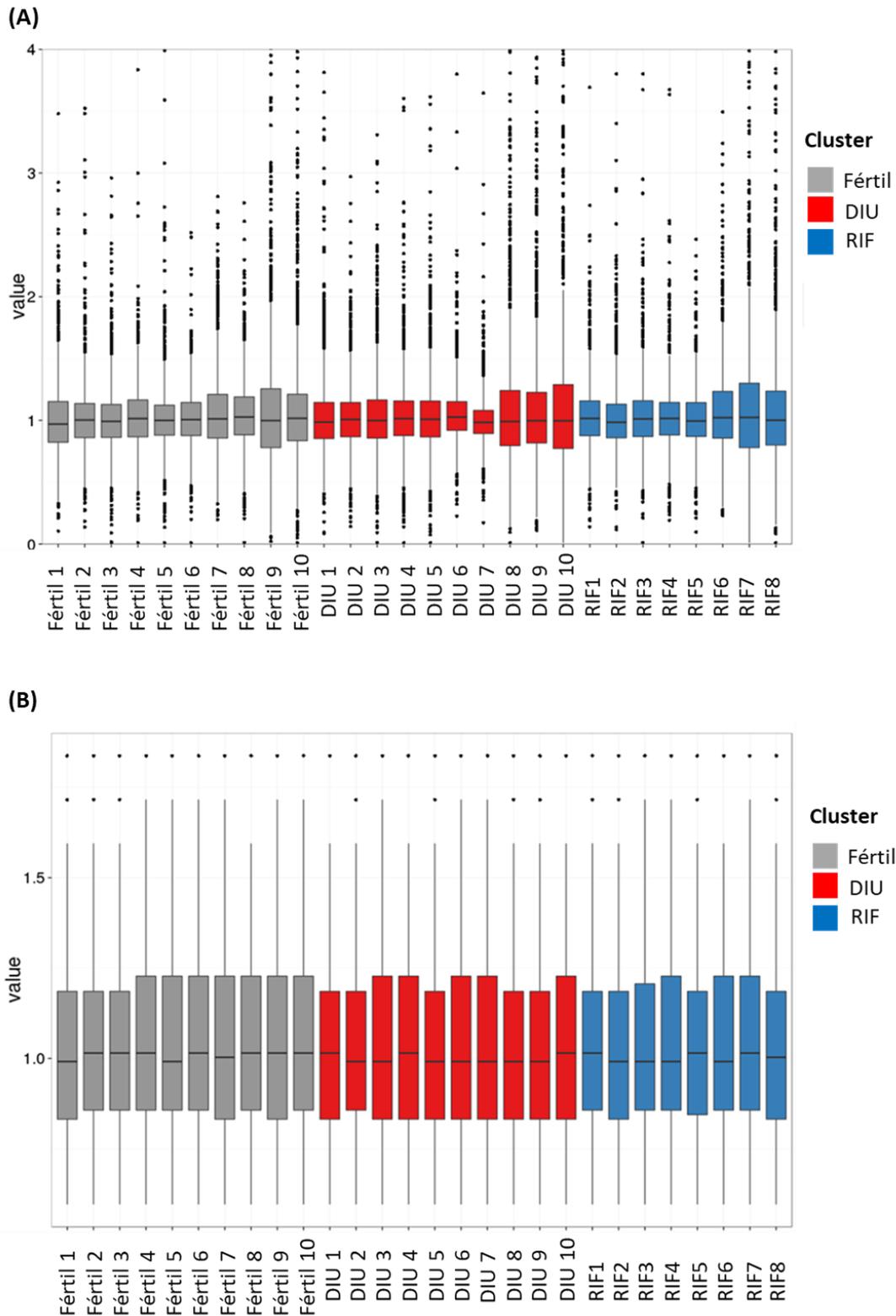


Figura 24. Normalización por el método de los cuantiles para los valores de abundancia de las 1.889 proteínas. (A) Diagrama de cajas para la abundancia de proteínas de las muestras del iTRAQ antes de la normalización por el método de los cuantiles. El eje Y representa los valores para la abundancia de proteínas calculada como la intensidad de cada ión reportero respecto a su valor en el estándar interno. **(B)** Diagrama de cajas para la abundancia de proteínas de las

muestras del iTRAQ después de la normalización por cuantiles. Gráficas sacadas del artículo (Pérez-Debén *et al.*, 2019).

Tras la normalización, se corrigió el efecto tanda o 'batch effect' por el hecho de haber hecho 4 experimentos iTRAQs independientes. Con el fin de disminuir el efecto tanda, muestras de los tres grupos de estudio estuvieron igualmente representadas en cada análisis iTRAQ. Como método exploratorio y forma de visualizar la corrección del efecto tanda, se llevaron a cabo distintas representaciones gráficas mediante PCA para ver cómo agrupan las muestras en función del perfil de expresión de las 1.889 proteínas comunes, antes y después de dicha corrección (**Figura 25; A,B**). Antes de la corrección del 'batch effect', podemos ver que muestras incluidas en el mismo iTRAQ tienden a agrupar conjuntamente, lo que indica la existencia de un efecto tanda, como es el caso de las muestras del iTRAQ 4 (en verde) (**Figura 25 A**). Después de la corrección, muestras de la misma condición endometrial incluidas en diferentes iTRAQs agruparon conjuntamente (**Figura 25 B**).

La **figura 26** muestra otra forma de representar el PCA de las muestras para las 1889 proteínas comunes tras la corrección del batch effect, pero resaltando la agrupación por condición endometrial en vez de por el número del análisis iTRAQ. Según el PCA, las condiciones DIU y RIF definieron dos grupos o 'clusters' separados de acuerdo a sus perfiles proteómicos, pero la condición fértil resultó ser muy heterogénea y solapó con una gran proporción del grupo RIF y con parte del grupo DIU. Esta representación muestra que las condiciones DIU y RIF son dos grupos claramente separados, sugiriendo que un endometrio refractario tiene un perfil proteómico completamente diferente al de una paciente con RIF.

De estas 1.889 proteínas, el análisis ANOVA mostró 188 PDEs significantes entre los tres grupos (p -valor < 0,05), sugiriendo que estas 188 proteínas podrían ser cruciales en la adquisición de la receptividad endometrial (**Tabla suplementaria 1. Anexo I**).

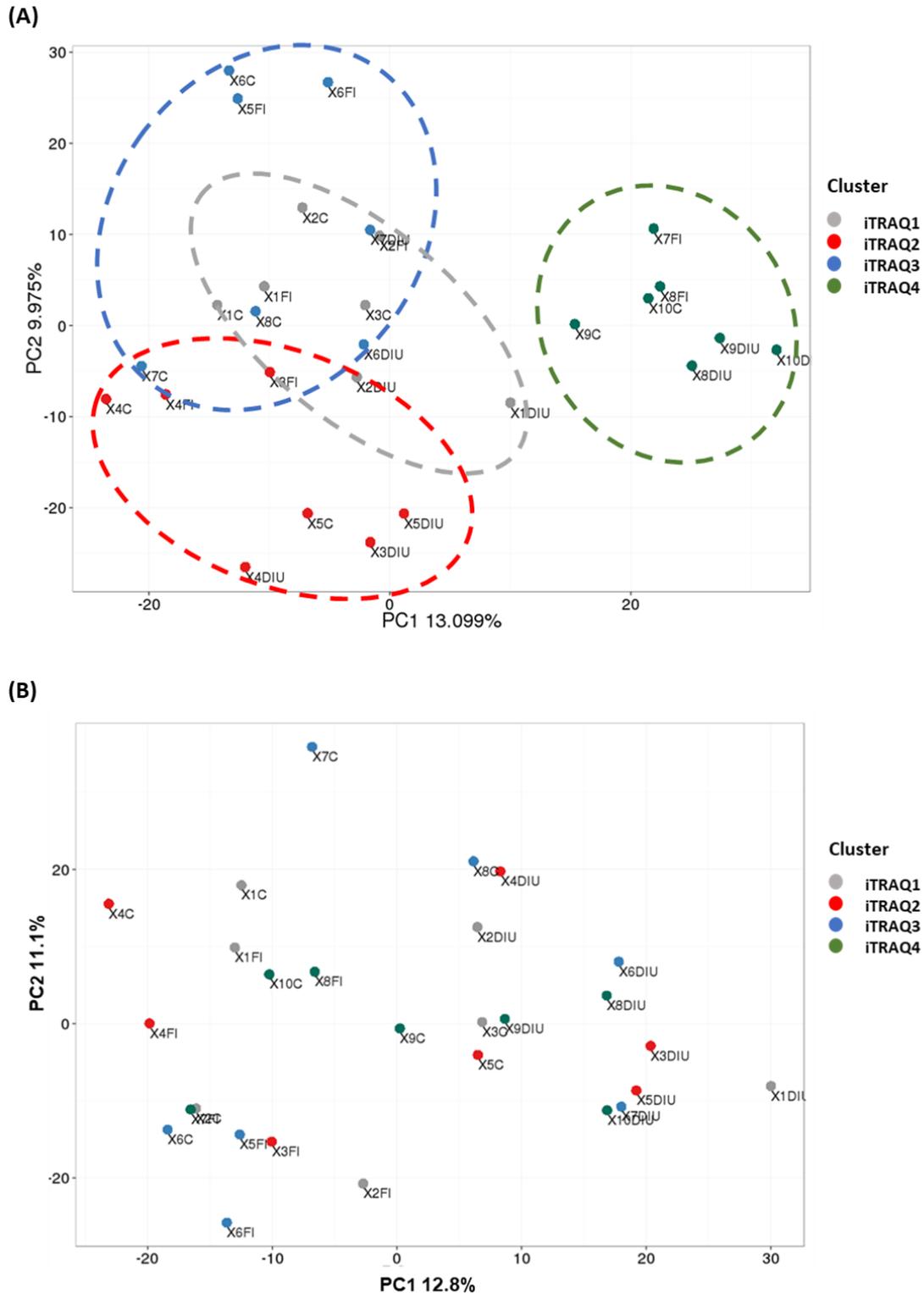


Figura 25. Corrección del 'batch effect'. (A) PCA para las muestras del iTRAQ antes de la corrección del efecto tanda o 'batch effect'. Las elipses de cada color delimitan las muestras incluidas en cada iTRAQ. (B) PCA para las muestras iTRAQ después de la corrección del 'batch effect'. (C = Fértil o control; FI=RIF; DIU). Gráficas sacadas del artículo Pérez-Debén S. *et al.*, 2019.

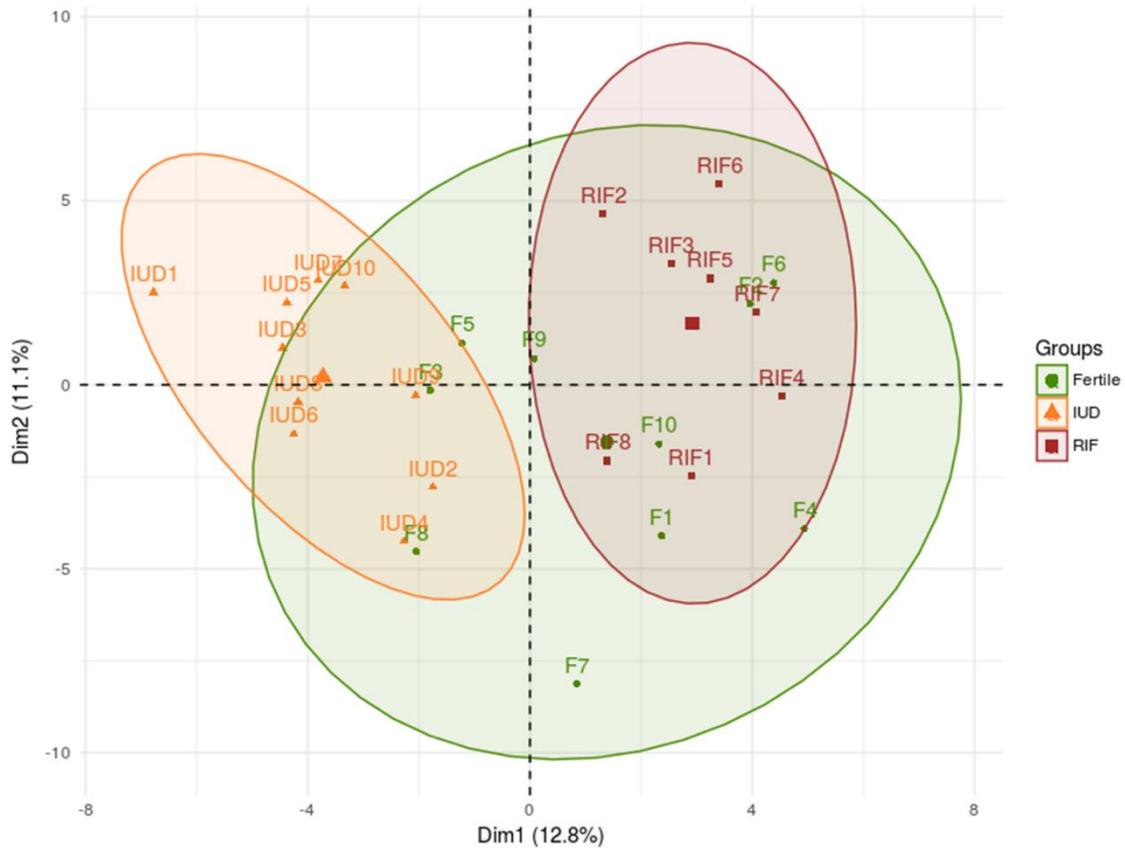
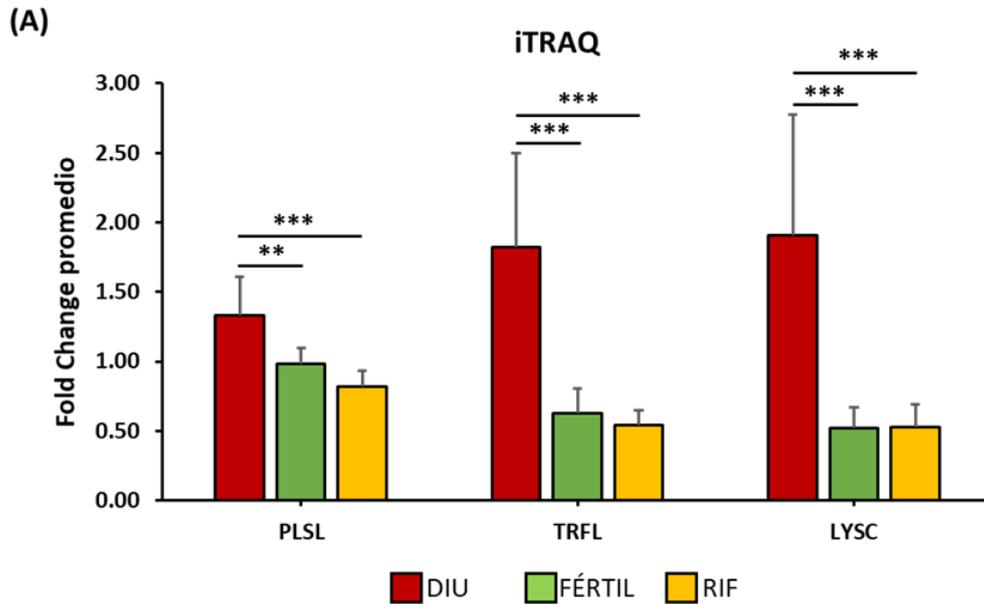


Figura 26. Análisis PCA de los perfiles endometriales de expresión proteica para las condiciones Fértil, DIU y RIF. La muestras endometriales (F = Fértil en círculos verde; IUD = DIU en triángulos amarillos y RIF en cuadrados rojos) agruparon en función del perfil de abundancia proteómica de las 1.889 proteínas comunes detectadas entre los 4 experimentos iTRAQ.). Figura sacada del artículo Pérez-Debén S. *et al.*, 2019.

1.2 Validación por western blot de la plastina 2, lisozima y lactotransferrina:

De las 188 PDEs, se eligieron tres para la validación de los resultados del iTRAQ por medio de la metodología western blot. Las proteínas seleccionadas fueron: plastina 2 (n=10 fértil, n=8 RIF, n=9 DIU), lisozima (n=10 fértil, n=8 RIF, n=9 DIU), y lactotransferrina (n=10 fértil, n=8 RIF, n=9 DIU), debido a su posible implicación en el proceso de receptividad endometrial. Pese a que todas las muestras del iTRAQ se incluyeron en la validación del western blot, sólo una de las muestras del grupo DIU se excluyó del análisis por no presentar banda para la proteína housekeeping β -actina.

De acuerdo con los resultados del iTRAQ, estas tres proteínas estuvieron 'upreguladas' o sobreexpresadas en la condición DIU con respecto a los otros dos grupos y presentaron una expresión diferencial significativa (DIU frente a RIF y DIU frente a Fértil) (p -valor < 0,05) (**Figura 27; A,B**).



(B)

PROTEÍNA	FC DIU	FC FÉRTIL	FC RIF	ANOVA (p-valor)	Fértil vs, IUD (p-valor)	RIF vs, IUD (p-valor)
PLSL	1,328	0,983	0,819	0,0122	0,010	< 0,001
TRFL	1,825	0,627	0,542	0,0008	< 0,001	< 0,001
LYSC	1,910	0,518	0,527	0,0007	< 0,001	< 0,001

Figura 27. Resultados de los Fold changes del iTRAQ para la PLSL, TRFL y LYSC. (A) Fold change promedio del iTRAQ para las proteínas validadas por western blot. Los ratios de los fold changes medios para la plastina 2 (PLSL), la lactotransferrina (TRFL) y la lisozima (LYSC) se representaron para cada condición endometrial (DIU n=10, Fértil n=10 y RIF n=8). Estas tres proteínas mostraron diferencias significativas al comparar los grupos Fértil frente a DIU y RIF frente a DIU. ** p-valor < 0,01; ***p-valor < 0,001. **(B)** En la tabla se recogen los valores de los fold changes calculados como la media en cada grupo endometrial respecto a su estándar interno y los p-valores asociados tanto al ANOVA como para las comparaciones por pares Fértil frente a DIU y RIF frente a DIU. Figura sacada del artículo Pérez-Deben S, *et al.*, 2019.

La plastina 2 es una proteína relacionada con el citoesqueleto, y previamente se ha descrito que algunas proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina están implicadas en el proceso de implantación (Venuto *et al.*, 2008; Montazeri *et al.*, 2015). Por otro lado, la lisozima y la lactotransferrina están implicadas en procesos de respuesta inmune y de defensa, funciones también importantes en el proceso de implantación embrionaria.

Los análisis densitométricos del western blot para PLSL, TRFL, y LYSC mostraron la misma tendencia observada en el análisis iTRAQ, con una mayor abundancia en las muestras IUD comparada con las otras dos condiciones (**Figuras 28, 29 y 30**), pero sólo la LYSC mostró diferencias significativas en las comparaciones DIU frente a Fértil y DIU frente a RIF (*p-valor* <

0,01). Aunque todas las muestras de cada grupo fueron utilizadas para el análisis de validación por western blot, no se alcanzaron diferencias significativas para las proteínas PLSL y TRFL. El bajo poder estadístico asociado con el análisis western blot para la PLSL y para la TRFL (0,028 y 0,22 respectivamente) y la baja sensibilidad y especificidad de la técnica del western blot en comparación con el iTRAQ podría explicar esta discrepancia en los resultados.

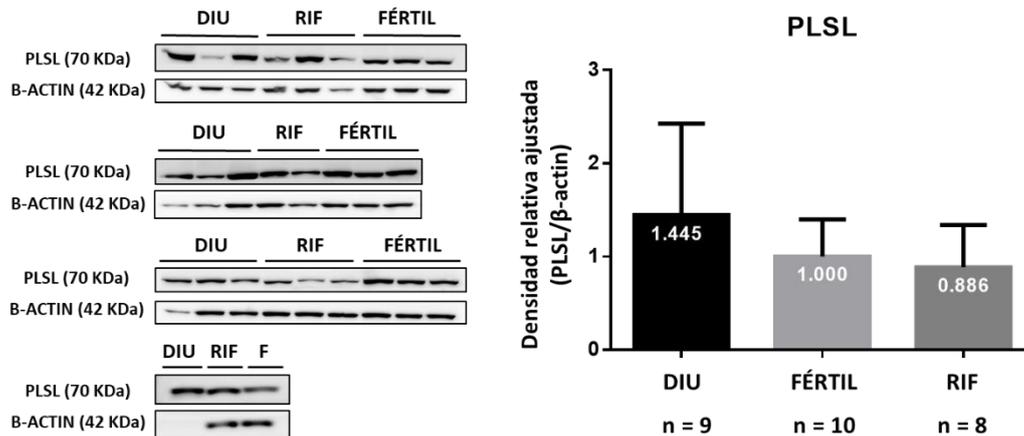


Figura 28. Validación de la Plastina 2 (PLSL) por western blot. PLSL (70 KDa) fue analizada por western blot en los tres grupos endometriales (n=9 DIU, n=10 Fértil, n=8 RIF). Al lado de cada imagen del western blot se muestra el análisis densitométrico en el que la intensidad de cada banda de la proteína PLSL se compara o normaliza con la de su β-actina (42 KDa). El número en cada barra indica el valor medio del análisis densitométrico para cada grupo. Figura sacada del artículo Pérez-Debén S. et al., 2019.

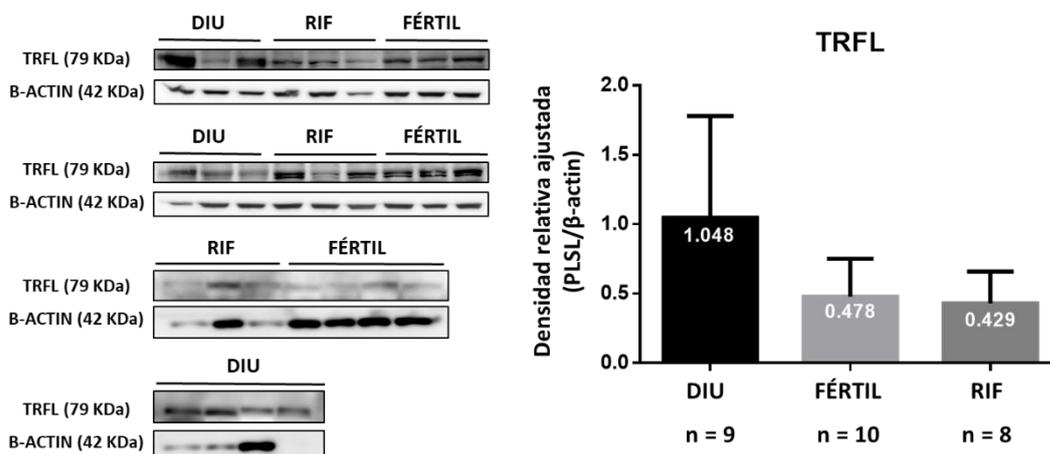


Figura 29. Validación de la Lactotransferrina (TRFL) por western blot. TRFL (79 KDa) fue analizada por western blot en los tres grupos endometriales (n=9 DIU, n=10 Fértil, n=8 RIF). Al lado de cada imagen del western blot se muestra el análisis densitométrico en el que la intensidad de cada banda de la proteína TRFL se compara o normaliza con la de su β-actina (42 KDa). El número en cada barra indica el valor medio del análisis densitométrico para cada grupo. Figura sacada del artículo Pérez-Debén S. et al., 2019.

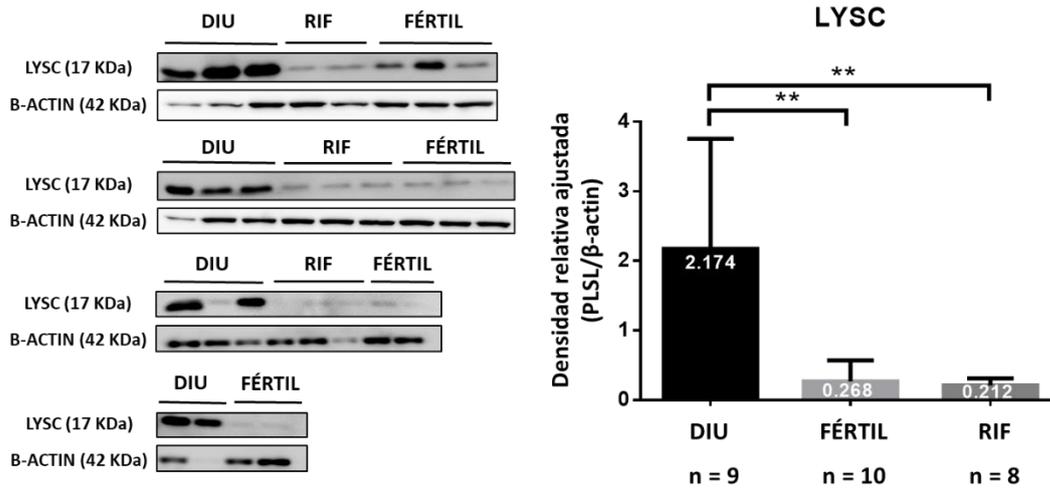


Figura 30. Validación de la Lisozima (LYSC) por western blot. LYSC (17 KDa) fue analizada por western blot en los tres grupos endometriales (n=9 DIU, n=10 Fértil, n=8 RIF). Al lado de cada imagen del western blot se muestra el análisis densitométrico en el que la intensidad de cada banda de la proteína LYSC se compara o normaliza con la de su β-actina (42 KDa). El número en cada barra indica el valor medio del análisis densitométrico para cada grupo. ** *p*-valor < 0,01. Figura sacada del artículo Pérez-Debén S. et al., 2019.

1.3 El análisis proteómico cuantitativo del iTRAQ muestra perfiles proteómicos diferenciales en RIF frente a DIU, y en Fértil frente a DIU, pero no en RIF frente a donantes fértiles

Para entender mejor el proceso de adquisición de receptividad endometrial, se llevaron a cabo también comparaciones por pares de los tres grupos endometriales. De esta forma, la comparación Fértil frente a DIU mostró 133 PDEs, estando 59 de ellas sobreexpresadas y las 74 restantes 'downreguladas' o disminuidas en las donantes fértiles en comparación con las mujeres portadoras de un DIU-Cu (**Tabla 9**). Sorprendentemente, al comparar los grupos RIF frente a Fértil, no se detectó ningún cambio significativo en ninguna de las proteínas comparadas. Por otro lado, como era de esperar, se observaron diferencias significativas al comparar los grupos RIF frente a DIU, mostrando 158 PDEs significativas, con 73 de ellas sobreexpresadas y 85 disminuidas en el grupo RIF comparado con las mujeres portadoras de un DIU-Cu (**Tabla 10**).

Tabla 9. 133 proteínas diferencialmente expresadas para la comparación Fértil frente a DIU

Accesion code ^a	Protein name	Gene symbol	Protein description	FC (Fértil/DIU) ^b	adj.P.Val ^c
P62841	RS15	<i>RPS15</i>	ribosomal protein S15	1,2	0,05
Q14789	GGOB1	<i>GOLGB1</i>	golgin B1	1,2	0,05
Q16836	HCDH	<i>HADH</i>	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	1,2	0,05
P14927	QCR7	<i>UQCRB</i>	ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	1,21	0,05
P55809	SCOT1	<i>OXCT1</i>	3-oxoacid CoA transferase 1	1,21	0,04
P80365	DH12	<i>HSD11B2</i>	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2	1,21	0,04
Q99733	NP1L4	<i>NAP1L4</i>	nucleosome assembly protein 1-like 4	1,21	0,04
P00167	CYB5	<i>CYB5A</i>	cytochrome b5 type A (microsomal)	1,22	0,04
P07954	FUMH	<i>FH</i>	fumarate hydratase	1,22	0,04
P30084	ECHM	<i>ECHS1</i>	enoyl CoA hydratase, short chain, 1, mitochondrial	1,22	0,04
P37108	SRP14	<i>SRP14</i>	signal recognition particle 14kDa (homologous Alu RNA binding protein)	1,22	0,04
P39687	AN32A	<i>ANP32A</i>	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A	1,22	0,04
P54819	KAD2	<i>AK2</i>	adenylate kinase 2	1,22	0,04
Q02252	MMSA	<i>ALDH6A1</i>	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	1,22	0,04
Q9BXP5	SRRT	<i>SRRT</i>	serrate RNA effector molecule homolog (Arabidopsis)	1,22	0,04
Q9ULR3	PPM1H	<i>PPM1H</i>	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1H	1,22	0,04
Q9Y2W1	TR150	<i>THRAP3</i>	thyroid hormone receptor associated protein 3	1,22	0,04
P05186	PPBT	<i>ALPL</i>	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	1,23	0,04
P08123	CO1A2	<i>COL1A2</i>	collagen, type I, alpha 2	1,23	0,03
P08621	RU17	<i>SNRNP70</i>	small nuclear ribonucleoprotein 70kDa (U1)	1,23	0,04
P23246	SFPQ	<i>SFPQ</i>	splicing factor proline/glutamine-rich	1,23	0,04
P26599	PTBP1	<i>PTBP1</i>	polypyrimidine tract binding protein 1	1,23	0,04
P40939	ECHA	<i>HADHA</i>	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein), alpha subunit	1,23	0,04
P49790	NU153	<i>NUP153</i>	nucleoporin 153kDa	1,23	0,05
P52272	HNRPM	<i>HNRNPM</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	1,23	0,05
Q13573	SNW1	<i>SNW1</i>	SNW domain containing 1	1,23	0,04
Q14011	CIRBP	<i>CIRBP</i>	cold inducible RNA binding protein	1,23	0,04
Q15293	RCN1	<i>RCN1</i>	reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain	1,23	0,03
Q6NVY1	HIBCH	<i>HIBCH</i>	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase	1,23	0,04
Q99584	S10AD	<i>S100A13</i>	S100 calcium binding protein A13	1,23	0,04
Q9UJZ1	STML2	<i>STOML2</i>	stomatin (EPB72)-like 2	1,23	0,04
P10809	CH60	<i>HSPD1</i>	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	1,24	0,02
Q15424	SAFB1	<i>SAFB</i>	scaffold attachment factor B	1,24	0,03
Q96DB5	RMD1	<i>RMDN1</i>	regulator of microtubule dynamics 1	1,24	0,04
O15231	ZN185	<i>ZNF185</i>	zinc finger protein 185 (LIM domain)	1,25	0,02
P12277	KCRB	<i>CKB</i>	creatine kinase, brain	1,25	0,03
P67809	YBOX1	<i>YBX1</i>	Y box binding protein 1	1,25	0,02
Q92945	FUBP2	<i>KHSRP</i>	KH-type splicing regulatory protein	1,25	0,02

Tabla 9. Continuación

Accesion code ^a	Protein name	Gene symbol	Protein description	FC (Fértil/DIU) ^b	adj.P.Val ^c
Q96KP4	CNDP2	<i>CNDP2</i>	CNDP dipeptidase 2 (metallopeptidase M20 family)	1,25	0,02
Q99959	PKP2	<i>PKP2</i>	plakophilin 2	1,25	0,02
Q9Y2W2	WBP11	<i>WBP11</i>	WW domain binding protein 11	1,25	0,02
O00584	RNT2	<i>RNASET2</i>	ribonuclease T2	1,26	0,02
O75874	IDHC	<i>IDH1</i>	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	1,26	0,02
P07910	HNRPC	<i>HNRNPC</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)	1,26	0,02
P62316	SMD2	<i>SNRPD2</i>	small nuclear ribonucleoprotein D2 polypeptide 16.5kDa	1,26	0,02
Q14980	NUMA1	<i>NUMA1</i>	nuclear mitotic apparatus protein 1	1,26	0,02
P05783	K1C18	<i>KRT18</i>	keratin 18	1,27	0,01
P05787	K2C8	<i>KRT8</i>	keratin 8	1,27	0,01
P06748	NPM	<i>NPM1</i>	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	1,27	0,01
P51991	ROA3	<i>HNRNPA3</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	1,27	0,02
P55084	ECHB	<i>HADHB</i>	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein), beta subunit	1,27	0,01
Q15181	IPYR	<i>PPA1</i>	pyrophosphatase (inorganic) 1	1,27	0,01
Q9NSC7	SIA7A	<i>ST6GALNAC1</i>	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminy-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 1	1,27	0,01
Q9UIJ7	KAD3	<i>AK3</i>	adenylate kinase 3	1,27	0,01
P30040	ERP29	<i>ERP29</i>	endoplasmic reticulum protein 29	1,28	0,01
P61604	CH10	<i>HSPE1</i>	heat shock 10kDa protein 1	1,28	0,01
Q15056	IF4H	<i>EIF4H</i>	eukaryotic translation initiation factor 4H	1,28	0,01
P26885	FKBP2	<i>FKBP2</i>	FK506 binding protein 2, 13kDa	1,32	0,01
Q16890	TPD53	<i>TPD52L1</i>	tumor protein D52-like 1	1,32	<0,001
O14558	HSPB6	<i>HSPB6</i>	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6	-1,19	0,05
P12814	ACTN1	<i>ACTN1</i>	actinin, alpha 1	-1,2	0,04
P00736	C1R	<i>C1R</i>	complement component 1, r subcomponent	-1,21	0,04
P01857	IGHG1	<i>IGHG1</i>	immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)	-1,21	0,05
P26641	EF1G	<i>EEF1G</i>	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	-1,21	0,04
P42345	MTOR	<i>MTOR</i>	mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)	-1,21	0,05
P60842	IF4A1	<i>EIF4A1</i>	eukaryotic translation initiation factor 4A1	-1,21	0,04
Q07020	RL18	<i>RPL18</i>	ribosomal protein L18	-1,21	0,04
Q8IX12	CCAR1	<i>CCAR1</i>	cell division cycle and apoptosis regulator 1	-1,21	0,05
Q96RQ9	OXLA	<i>IL4I1</i>	interleukin 4 induced 1	-1,21	0,05
O00151	PDLI1	<i>PDLIM1</i>	PDZ and LIM domain 1	-1,22	0,04
O15427	MOT4	<i>SLC16A3</i>	solute carrier family 16 (monocarboxylate transporter), member 3	-1,22	0,04
O43294	TGFI1	<i>TGFB1I1</i>	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1	-1,22	0,03
O75083	WDR1	<i>WDR1</i>	WD repeat domain 1	-1,22	0,04

Tabla 9. Continuación

Accesion code ^a	Protein name	Gene symbol	Protein description	FC (Fértil/DIU) ^b	adj.P.Val ^c
P00450	CERU	<i>CP</i>	ceruloplasmin (ferroxidase)	-1,22	0,04
P05155	IC1	<i>SERPING1</i>	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	-1,22	0,04
P07737	PROF1	<i>PFN1</i>	profilin 1	-1,22	0,04
P26038	MOES	<i>MSN</i>	moesin	-1,22	0,04
P61247	RS3A	<i>RPS3A</i>	ribosomal protein S3A	-1,22	0,03
Q7L2H7	EIF3M	<i>EIF3M</i>	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit M	-1,22	0,04
P05090	APOD	<i>APOD</i>	apolipoprotein D	-1,23	0,04
P40261	NNMT	<i>NNMT</i>	nicotinamide N-methyltransferase	-1,23	0,03
P40763	STAT3	<i>STAT3</i>	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	-1,23	0,03
P54577	SYYC	<i>YARS</i>	tyrosyl-tRNA synthetase	-1,23	0,03
P62906	RL10A	<i>RPL10A</i>	ribosomal protein L10a	-1,23	0,04
Q14764	MVP	<i>MVP</i>	major vault protein	-1,23	0,04
Q93062	RBPMS	<i>RBPMS</i>	RNA binding protein with multiple splicing	-1,23	0,03
O43707	ACTN4	<i>ACTN4</i>	actinin, alpha 4	-1,24	0,04
O94788	AL1A2	<i>ALDH1A2</i>	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2	-1,24	0,02
P18124	RL7	<i>RPL7</i>	ribosomal protein L7	-1,24	0,03
P27105	STOM	<i>STOM</i>	stomatin	-1,24	0,02
Q9NVP1	DDX18	<i>DDX18</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 18	-1,24	0,03
P00966	ASSY	<i>ASS1</i>	argininosuccinate synthase 1	-1,25	0,02
P09960	LKHA4	<i>LTA4H</i>	leukotriene A4 hydrolase	-1,25	0,02
P13796	PLSL	<i>LCP1</i>	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)	-1,25	0,01
P15880	RS2	<i>RPS2</i>	ribosomal protein S2	-1,25	0,02
P30740	ILEU	<i>SERPINB1</i>	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1	-1,25	0,01
Q8WX93	PALLD	<i>PALLD</i>	palladin, cytoskeletal associated protein	-1,25	0,02
Q9Y490	TLN1	<i>TLN1</i>	talin 1	-1,25	0,01
O75367	H2AY	<i>H2AFY</i>	H2A histone family, member Y	-1,26	0,02
P07686	HEXB	<i>HEXB</i>	hexosaminidase B (beta polypeptide)	-1,26	0,02
P11216	PYGB	<i>PYGB</i>	phosphorylase, glycogen; brain	-1,26	0,01
P27635	RL10	<i>RPL10</i>	ribosomal protein L10	-1,26	0,02
O00299	CLIC1	<i>CLIC1</i>	chloride intracellular channel 1	-1,27	0,01
P16401	H15	<i>HIST1H1B</i>	histone cluster 1, H1b	-1,27	0,01
P19971	TYPH	<i>TYMP</i>	thymidine phosphorylase	-1,27	0,01
P21333	FLNA	<i>FLNA</i>	filamin A, alpha	-1,27	0,01
Q9NZU5	LMCD1	<i>LMCD1</i>	LIM and cysteine-rich domains 1	-1,27	0,01
P04179	SODM	<i>SOD2</i>	superoxide dismutase 2, mitochondrial	-1,28	0,01
P24158	PRTN3	<i>PRTN3</i>	proteinase 3	-1,28	0,01
P27338	AOFB	<i>MAOB</i>	monoamine oxidase B	-1,28	0,01
P43490	NAMPT	<i>NAMPT</i>	nicotinamide phosphoribosyltransferase	-1,28	0,01
P46781	RS9	<i>RPS9</i>	ribosomal protein S9	-1,28	0,01
P83731	RL24	<i>RPL24</i>	ribosomal protein L24	-1,28	0,01

Tabla 9. Continuación

Accesion code ^a	Protein name	Gene symbol	Protein description	FC (Fértil/DIU) ^b	adj.P.Val ^c
O15143	ARC1B	<i>ARPC1B</i>	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa	-1,29	0,01
P10412	H14	<i>HIST1H1E</i>	histone cluster 1, H1e	-1,29	0,01
P39023	RL3	<i>RPL3</i>	ribosomal protein L3	-1,29	0,01
P62277	RS13	<i>RPS13</i>	ribosomal protein S13	-1,29	0,01
P35573	GDE	<i>AGL</i>	amylo-alpha-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase	-1,3	<0,001
P62753	RS6	<i>RPS6</i>	ribosomal protein S6	-1,3	0,01
P05164	PERM	<i>MPO</i>	myeloperoxidase	-1,31	0,01
P26447	S10A4	<i>S100A4</i>	S100 calcium binding protein A4	-1,32	<0,001
P49913	CAMP	<i>CAMP</i>	cathelicidin antimicrobial peptide	-1,32	<0,001
P80188	NGAL	<i>LCN2</i>	lipocalin 2	-1,33	<0,001
P62280	RS11	<i>RPS11</i>	ribosomal protein S11	-1,34	<0,001
Q9Y696	CLIC4	<i>CLIC4</i>	chloride intracellular channel 4	-1,34	<0,001
P02788	TRFL	<i>LTF</i>	lactotransferrin	-1,35	<0,001
P06702	S10A9	<i>S100A9</i>	S100 calcium binding protein A9	-1,35	<0,001
P61626	LYSC	<i>LYZ</i>	lysozyme	-1,35	<0,001
Q5SSJ5	HP1B3	<i>HP1BP3</i>	heterochromatin protein 1, binding protein 3	-1,35	<0,001
P62249	RS16	<i>RPS16</i>	ribosomal protein S16	-1,36	<0,001
Q01995	TAGL	<i>TAGLN</i>	transgelin	-1,37	<0,001
P05109	S10A8	<i>S100A8</i>	S100 calcium binding protein A8	-1,38	<0,001
P62701	RS4X	<i>RPS4X</i>	ribosomal protein S4, X-linked	-1,41	<0,001

^aAccession code, o código de entrada de la proteína en la base de datos Expasy (SwissProt)

^bFold change promedio, expresado como la media del ratio de expresión de cada proteína en las muestras del grupo Fértil respecto a las muestras DIU. FC (Fértil/DIU).

^cp-valor ajustado de la comparación diferencial 'por pares'.

Tabla 10. 158 proteínas diferencialmente expresadas para la comparativa RIF frente a DIU

Accesion code ^a	Protein name	Gene symbol	Protein description	FC (RIF/DIU) ^b	adj.P.Val ^c
O00264	PGRC1	<i>PGRMC1</i>	Membrane-associated progesterone receptor component 1	1,21	0,05
P63162	RSMN	<i>SNRPN</i>	Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N	1,21	0,05
P30825	CTR1	<i>SLC7A1</i>	High affinity cationic amino acid transporter 1	1,22	0,04
Q96A33	CCD47	<i>CCDC47</i>	Coiled-coil domain-containing protein 47	1,22	0,03
Q9BV20	MTNA	<i>MRI1</i>	Methylthioribose-1-phosphate isomerase	1,22	0,03
O43447	PPIH	<i>PPIH</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H	1,23	0,03
O60437	PEPL	<i>PPL</i>	Periplakin	1,23	0,05
O60487	MPZL2	<i>MPZL2</i>	Myelin protein zero-like protein 2	1,23	0,03
P05787	K2C8	<i>KRT8</i>	Keratin, type II cytoskeletal 8	1,23	0,03
P08123	CO1A2	<i>COL1A2</i>	Collagen alpha-2(I) chain	1,23	0,03
P09543	CN37	<i>CNP</i>	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	1,23	0,03

Tabla 10. Continuación

Accesion code ^a	Protein name	Gene symbol	Protein description	FC (RIF/DIU) ^b	adj.P.Val ^c
P55809	SCOT1	<i>OXCT1</i>	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial	1,23	0,03
Q10713	MPPA	<i>PMPCA</i>	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha	1,23	0,04
Q9BTT6	LRRC1	<i>LRRC1</i>	Leucine-rich repeat-containing protein 1	1,23	0,04
O43491	E41L2	<i>EPB41L2</i>	Band 4.1-like protein 2	1,24	0,03
O75390	CISY	<i>CS</i>	Citrate synthase, mitochondrial	1,24	0,03
P02751	FINC	<i>FN1</i>	Fibronectin	1,24	0,04
P10515	ODP2	<i>DLAT</i>	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	1,24	0,03
Q8IVD9	NUDC3	<i>NUDCD3</i>	NudC domain-containing protein 3	1,24	0,04
O60488	ACSL4	<i>ACSL4</i>	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4	1,25	0,03
O94874	UFL1	<i>UFL1</i>	E3 UFM1-protein ligase 1	1,25	0,03
P09012	SNRPA	<i>SNRPA</i>	U1 small nuclear ribonucleoprotein A	1,25	0,02
P45880	VDAC2	<i>VDAC2</i>	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	1,25	0,02
P47813	IF1AX	<i>EIF1AX</i>	Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal	1,25	0,03
P49821	NDUV1	<i>NDUFV1</i>	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	1,25	0,03
P51659	DHB4	<i>HSD17B4</i>	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	1,25	0,03
P68371	TBB4B	<i>TUBB4B</i>	Tubulin beta-4B chain	1,25	0,02
Q13247	SRSF6	<i>SRSF6</i>	Serine/arginine-rich splicing factor 6	1,25	0,02
O00217	NDUS8	<i>NDUFS8</i>	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial	1,26	0,02
O60701	UGDH	<i>UGDH</i>	UDP-glucose 6-dehydrogenase	1,26	0,02
O60716	CTND1	<i>CTNND1</i>	Catenin delta-1	1,26	0,01
O75874	IDHC	<i>IDH1</i>	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	1,26	0,02
P12277	KCRB	<i>CKB</i>	Creatine kinase B-type	1,26	0,02
P14923	PLAK	<i>JUP</i>	Junction plakoglobin	1,26	0,02
P21796	VDAC1	<i>VDAC1</i>	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	1,26	0,02
P37108	SRP14	<i>SRP14</i>	Signal recognition particle 14 kDa protein	1,26	0,02
P40926	MDHM	<i>MDH2</i>	Malate dehydrogenase, mitochondrial	1,26	0,03
Q9BQE3	TBA1C	<i>TUBA1C</i>	Tubulin alpha-1C chain	1,26	0,02
Q9H0U4	RAB1B	<i>RAB1B</i>	Ras-related protein Rab-1B	1,26	0,02
Q9Y6M7	S4A7	<i>SLC4A7</i>	Sodium bicarbonate cotransporter 3	1,26	0,01
O00584	RNT2	<i>RNASET2</i>	Ribonuclease T2	1,27	0,02
P27144	KAD4	<i>AK4</i>	Adenylate kinase 4, mitochondrial	1,27	0,01
O75521	ECI2	<i>ECI2</i>	Enoyl-CoA delta isomerase 2, mitochondrial	1,28	0,01
P06576	ATPB	<i>ATP5B</i>	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	1,28	0,02
P40939	ECHA	<i>HADHA</i>	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	1,28	0,01
P48047	ATPO	<i>ATP5O</i>	ATP synthase subunit O, mitochondrial	1,28	0,01
Q56VL3	OCAD2	<i>OCIAD2</i>	OCIA domain-containing protein 2	1,28	0,01
Q9Y3Z3	SAMH1	<i>SAMHD1</i>	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	1,28	0,01
P55084	ECHB	<i>HADHB</i>	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	1,29	0,01
P62899	RL31	<i>RPL31</i>	60S ribosomal protein L31	1,29	0,01

Tabla 10. Continuación

Accesion code ^a	Protein name	Gene symbol	Protein description	FC (RIF/DIU) ^b	adj.P.Val ^c
Q9BSD7	NTPCR	<i>NTPCR</i>	Cancer-related nucleoside-triphosphatase	1,29	0,01
Q9Y394	DHRS7	<i>DHRS7</i>	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7	1,29	0,01
O14638	ENPP3	<i>ENPP3</i>	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3	1,3	0,01
P09622	DLDH	<i>DLD</i>	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	1,3	0,01
P35232	PHB	<i>PHB</i>	Prohibitin	1,3	0,00
O15231	ZN185	<i>ZNF185</i>	Zinc finger protein 185	1,31	0,01
O95831	AIFM1	<i>AIFM1</i>	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	1,31	<0,001
P00167	CYB5	<i>CYB5A</i>	Cytochrome b5	1,31	<0,001
Q6NVY1	HIBCH	<i>HIBCH</i>	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial	1,31	0,01
Q93099	HGD	<i>HGD</i>	Homogentisate 1,2-dioxygenase	1,31	0,01
O75915	PRAF3	<i>ARL6IP5</i>	PRA1 family protein 3	1,32	<0,001
Q15043	S39AE	<i>SLC39A14</i>	Zinc transporter ZIP14	1,32	<0,001
Q02252	MMSA	<i>ALDH6A1</i>	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	1,33	<0,001
Q13011	ECH1	<i>ECH1</i>	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	1,33	<0,001
Q9ULC5	ACSL5	<i>ACSL5</i>	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 5	1,33	<0,001
P25705	ATPA	<i>ATP5A1</i>	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	1,34	<0,001
P53007	TXTP	<i>SLC25A1</i>	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	1,34	<0,001
P80365	DHI2	<i>HSD11B2</i>	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 2	1,35	<0,001
Q99623	PHB2	<i>PHB2</i>	Prohibitin-2	1,35	<0,001
Q9NRD9	DUOX1	<i>DUOX1</i>	Dual oxidase 1	1,35	<0,001
Q9Y2Q3	GSTK1	<i>GSTK1</i>	Glutathione S-transferase kappa 1	1,35	<0,001
P30084	ECHM	<i>ECHS1</i>	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	1,36	<0,001
Q16836	HCDH	<i>HADH</i>	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	1,38	<0,001
P60842	IF4A1	<i>EIF4A1</i>	Eukaryotic initiation factor 4A-I	-1,21	0,04
P29401	TKT	<i>TKT</i>	Transketolase	-1,22	0,05
O00170	AIP	<i>AIP</i>	AH receptor-interacting protein	-1,23	0,03
P00734	THRB	<i>F2</i>	Prothrombin	-1,23	0,03
P07737	PROF1	<i>PFN1</i>	Profilin-1	-1,23	0,04
P16401	H15	<i>HIST1H1B</i>	Histone H1.5	-1,23	0,03
P40306	PSB10	<i>PSMB10</i>	Proteasome subunit beta type-10	-1,23	0,02
P62249	RS16	<i>RPS16</i>	40S ribosomal protein S16	-1,23	0,04
Q14624	ITIH4	<i>ITIH4</i>	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	-1,23	0,05
Q96D15	RCN3	<i>RCN3</i>	Reticulocalbin-3	-1,23	0,03
P01008	ANT3	<i>SERPINC1</i>	Antithrombin-III	-1,24	0,03
P01042	KNG1	<i>KNG1</i>	Kininogen-1	-1,24	0,03
P14618	KPYM	<i>PKM</i>	Pyruvate kinase PKM	-1,24	0,02
P21397	AOFA	<i>MAOA</i>	Amine oxidase [flavin-containing] A	-1,24	0,03
P62701	RS4X	<i>RPS4X</i>	40S ribosomal protein S4, X isoform	-1,24	0,03
P80748	LV302	<i>IGLV3-21</i>	Ig lambda chain V-III region LOI	-1,24	0,03
Q96CN7	ISOC1	<i>ISOC1</i>	Isochorismatase domain-containing protein 1	-1,24	0,03
O94788	AL1A2	<i>ALDH1A2</i>	Retinal dehydrogenase 2	-1,25	0,02

Tabla 10. Continuación

Accesion code ^a	Protein name	Gene symbol	Protein description	FC (RIF/DIU) ^b	adj.P.Val ^c
P01859	IGHG2	<i>IGHG2</i>	Ig gamma-2 chain C region	-1,25	0,03
P02765	FETUA	<i>AHSG</i>	Alpha-2-HS-glycoprotein	-1,25	0,03
P08185	CBG	<i>SERPINA6</i>	Corticosteroid-binding globulin	-1,25	0,03
P10412	H14	<i>HIST1H1E</i>	Histone H1.4	-1,25	0,02
P19652	A1AG2	<i>ORM2</i>	Alpha-1-acid glycoprotein 2	-1,25	0,03
P19827	ITIH1	<i>ITIH1</i>	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	-1,25	0,03
P37802	TAGL2	<i>TAGLN2</i>	Transgelin-2	-1,25	0,03
P52566	GDIR2	<i>ARHGDI2</i>	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	-1,25	0,03
Q14515	SPRL1	<i>SPARCL1</i>	SPARC-like protein 1	-1,25	0,02
Q96AC1	FERM2	<i>FERMT2</i>	Fermitin family homolog 2	-1,25	0,02
Q9NZU5	LMCD1	<i>LMCD1</i>	LIM and cysteine-rich domains protein 1	-1,25	0,02
P01031	CO5	<i>C5</i>	Complement C5	-1,26	0,02
P02768	ALBU	<i>ALB</i>	Serum albumin	-1,26	0,02
P02787	TRFE	<i>TF</i>	Serotransferrin	-1,26	0,02
P07858	CATB	<i>CTSB</i>	Cathepsin B	-1,26	0,03
P08603	CFAH	<i>CFH</i>	Complement factor H	-1,26	0,02
P08697	A2AP	<i>SERPINF2</i>	Alpha-2-antiplasmin	-1,26	0,01
Q8WX93	PALLD	<i>PALLD</i>	Palladin	-1,26	0,02
Q93062	RBPMS	<i>RBPMS</i>	RNA-binding protein with multiple splicing	-1,26	0,01
P01871	IGHM	<i>IGHM</i>	Ig mu chain C region	-1,27	0,02
P36955	PEDF	<i>SERPINF1</i>	Pigment epithelium-derived factor	-1,27	0,02
P55196	AFAD	<i>AFDN</i>	Afadin	-1,27	0,01
Q01995	TAGL	<i>TAGLN</i>	Transgelin	-1,27	0,01
Q13418	ILK	<i>ILK</i>	Integrin-linked protein kinase	-1,27	0,01
O00299	CLIC1	<i>CLIC1</i>	Chloride intracellular channel protein 1	-1,28	0,01
P00736	C1R	<i>C1R</i>	Complement C1r subcomponent	-1,28	0,01
P02790	HEMO	<i>HPX</i>	Hemopexin	-1,28	0,02
P35579	MYH9	<i>MYH9</i>	Myosin-9	-1,28	0,01
O00151	PDLI1	<i>PDLIM1</i>	PDZ and LIM domain protein 1	-1,29	0,01
P00568	KAD1	<i>AK1</i>	Adenylate kinase isoenzyme 1	-1,29	0,01
P02760	AMBP	<i>AMBP</i>	Protein AMBP	-1,29	0,01
P02774	VTDB	<i>GC</i>	Vitamin D-binding protein	-1,29	0,01
P0CG05	LAC2	<i>IGLC3/IGLC2</i>	Ig lambda-2 chain C regions	-1,29	0,01
P00966	ASSY	<i>ASS1</i>	Argininosuccinate synthase	-1,3	0,01
P01009	A1AT	<i>SERPINA1</i>	Alpha-1-antitrypsin	-1,3	0,01
P01834	IGKC	<i>IGKC</i>	Ig kappa chain C region	-1,3	0,01
P01023	A2MG	<i>A2M</i>	Alpha-2-macroglobulin	-1,31	0,01
P01857	IGHG1	<i>IGHG1</i>	Ig gamma-1 chain C region	-1,31	0,01
P08729	K2C7	<i>KRT7</i>	Keratin, type II cytoskeletal 7	-1,31	0,01
P21333	FLNA	<i>FLNA</i>	Filamin-A	-1,31	0,00
P24158	PRTN3	<i>PRTN3</i>	Myeloblastin	-1,31	0,00
O15143	ARC1B	<i>ARPC1B</i>	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	-1,32	0,01
P01024	CO3	<i>C3</i>	Complement C3	-1,32	0,01

Tabla 10. Continuación

Accesion code ^a	Protein name	Gene symbol	Protein description	FC (RIF/DIU) ^b	adj.P.Val ^c
P05164	PERM	<i>MPO</i>	Myeloperoxidase	-1,32	<0,001
P19971	TYPH	<i>TYMP</i>	Thymidine phosphorylase	-1,32	<0,001
P26038	MOES	<i>MSN</i>	Moesin	-1,32	<0,001
P26447	S10A4	<i>S100A4</i>	Protein S100-A4	-1,32	<0,001
Q9Y696	CLIC4	<i>CLIC4</i>	Chloride intracellular channel protein 4	-1,32	<0,001
P00751	CFAB	<i>CFB</i>	Complement factor B	-1,33	<0,001
P09466	PAEP	<i>PAEP</i>	Glycodelin	-1,33	<0,001
P30740	ILEU	<i>SERPINB1</i>	Leukocyte elastase inhibitor	-1,33	<0,001
P61626	LYSC	<i>LYZ</i>	Lysozyme C	-1,33	<0,001
O95479	G6PE	<i>H6PD</i>	GDH/6PGL endoplasmic bifunctional protein	-1,34	<0,001
Q15942	ZYX	<i>ZYX</i>	Zyxin	-1,34	<0,001
P05155	IC1	<i>SERPING1</i>	Plasma protease C1 inhibitor	-1,36	<0,001
P00450	CERU	<i>CP</i>	Ceruloplasmin	-1,37	<0,001
P04179	SODM	<i>SOD2</i>	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	-1,37	<0,001
P40261	NNMT	<i>NNMT</i>	Nicotinamide N-methyltransferase	-1,37	<0,001
P43490	NAMPT	<i>NAMPT</i>	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	-1,37	<0,001
Q9Y490	TLN1	<i>TLN1</i>	Talin-1	-1,37	<0,001
P01876	IGHA1	<i>IGHA1</i>	Ig alpha-1 chain C region	-1,38	<0,001
P02788	TRFL	<i>LTF</i>	Lactotransferrin	-1,39	<0,001
P05109	S10A8	<i>S100A8</i>	Protein S100-A8	-1,39	<0,001
P49913	CAMP	<i>CAMP</i>	Cathelicidin antimicrobial peptide	-1,41	<0,001
P80188	NGAL	<i>LCN2</i>	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	-1,41	<0,001
P13796	PLSL	<i>LCP1</i>	Plastin-2	-1,42	<0,001
P06702	S10A9	<i>S100A9</i>	Protein S100-A9	-1,43	<0,001

^aAccession code, o código de entrada de la proteína en la base de datos ExPASy (SwissProt)

^bFold change promedio, expresado como la media del ratio de expresión de cada proteína en las muestras del grupo RIF respecto a las muestras DIU. FC (RIF/DIU).

^cp-valor ajustado de la comparación diferencial 'por pares'.

Dado que no se encontraron diferencias significativas entre las donantes fértiles y las pacientes con RIF, se centró la atención en comparar el perfil proteómico de un endometrio receptivo (fértil) con uno completamente refractario (DIU) y el de un hipotético RIF con uno refractario (DIU). Para ello, se analizaron las proteínas alteradas o con una expresión diferencial significativa obtenidas de estas dos comparaciones frente al grupo DIU (fértil frente a DIU y RIF frente a DIU) (**Tablas 9 y 10**). Sólo 54 PDEs fueron compartidas entre las dos comparativas, siguiendo todas ellas el mismo patrón de expresión (16 proteínas con expresión disminuida y 38 sobreexpresadas en el grupo DIU en comparación con los otros dos grupos) (**Tabla 11**). Estas 54 proteínas representaron el 40,6% y el 34,2% del total de proteínas

significantes detectadas en las respectivas comparaciones Fértil frente a DIU y RIF frente a DIU (Figura 31).

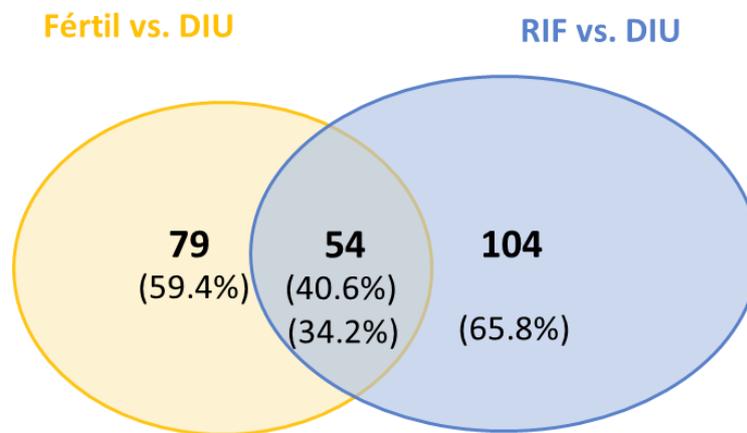


Figura 31. Diagrama de Venn para la comparación de las proteínas diferencialmente expresadas identificadas en ambas comparaciones Fértil frente a DIU y RIF frente a DIU. Para la comparación Fértil frente a DIU se identificaron 133 proteínas diferencialmente significativas, 79 de las cuales fueron exclusivas para dicha comparación. La comparación RIF frente a DIU mostró 158 proteínas diferencialmente expresadas, 104 de las cuales fueron propias de esta comparación. Hubo 54 proteínas significativas compartidas entre ambas comparaciones. Figura sacada del artículo Pérez-Deben S. *et al.*, 2019.

Tabla 11. 54 proteínas diferencialmente expresadas comunes a DIU frente a Fértil y DIU frente a RIF

Accesion code ^a	Protein name	Protein description	Gene symbol	Fold Change (DIU/Fértil) ^b	adj.P.Val ^c	Fold Change (DIU/RIF) ^d	adj.P.Val ^e
P08123	CO1A2	Collagen alpha-2(I) chain	COL1A2	-1,23	0,0309	-1,23	0,03
P00167	CYB5	Cytochrome b5	CYB5A	-1,22	0,0408	-1,31	<0,001
P80365	DHI2	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 2	HSD11B2	-1,21	0,0413	-1,35	<0,001
P40939	ECHA	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	HADHA	-1,23	0,0396	-1,28	0,01
P55084	ECHB	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	HADHB	-1,27	0,0145	-1,29	0,01
P30084	ECHM	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHS1	-1,22	0,0396	-1,36	<0,001
Q16836	HCDH	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	HADH	-1,2	0,0492	-1,38	<0,001
Q6NVY1	HIBCH	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial	HIBCH	-1,23	0,0395	-1,31	0,01
O75874	IDHC	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDH1	-1,26	0,0169	-1,26	0,02
P05787	K2C8	Keratin, type II cytoskeletal 8	KRT8	-1,27	0,0125	-1,23	0,03
P12277	KCRB	Creatine kinase B-type	CKB	-1,25	0,0291	-1,26	0,02
Q02252	MMSA	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	ALDH6A1	-1,22	0,0445	-1,33	<0,001
O00584	RNT2	Ribonuclease T2	RNASET2	-1,26	0,0169	-1,27	0,02
P55809	SCOT1	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial	OXCT1	-1,21	0,0412	-1,23	0,03

Tabla 11. Continuación

Accession code ^a	Protein name	Protein description	Gene symbol	Fold Change (DIU/Fértil) ^b	adj.P.Val ^c	Fold Change (DIU/RIF) ^d	adj.P.Val ^e
P37108	SRP14	Signal recognition particle 14 kDa protein	<i>SRP14</i>	-1,22	0,0419	-1,26	0,02
O15231	ZN185	Zinc finger protein 185	<i>ZNF185</i>	-1,25	0,0229	-1,31	0,01
O94788	AL1A2	Retinal dehydrogenase 2	<i>ALDH1A2</i>	1,24	0,0229	1,25	0,02
O15143	ARC1B	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	<i>ARPC1B</i>	1,29	0,0113	1,32	0,01
P00966	ASSY	Argininosuccinate synthase	<i>ASS1</i>	1,25	0,0229	1,3	0,01
P00736	C1R	Complement C1r subcomponent	<i>C1R</i>	1,21	0,0412	1,28	0,01
P49913	CAMP	Cathelicidin antimicrobial peptide	<i>CAMP</i>	1,32	0,0014	1,41	<0,001
P00450	CERU	Ceruloplasmin	<i>CP</i>	1,22	0,0388	1,37	<0,001
O00299	CLIC1	Chloride intracellular channel protein 1	<i>CLIC1</i>	1,27	0,011	1,28	0,01
Q9Y696	CLIC4	Chloride intracellular channel protein 4	<i>CLIC4</i>	1,34	0,0009	1,32	<0,001
P21333	FLNA	Filamin-A	<i>FLNA</i>	1,27	0,013	1,31	<0,001
P10412	H14	Histone H1,4	<i>HIST1H1E</i>	1,29	0,0113	1,25	0,02
P16401	H15	Histone H1,5	<i>HIST1H1B</i>	1,27	0,0113	1,23	0,03
P05155	IC1	Plasma protease C1 inhibitor	<i>SERPING1</i>	1,22	0,0371	1,36	<0,001
P60842	IF4A1	Eukaryotic initiation factor 4A-I	<i>EIF4A1</i>	1,21	0,0396	1,21	0,04
P01857	IGHG1	Ig gamma-1 chain C region	<i>IGHG1</i>	1,21	0,0492	1,31	0,01
P30740	ILEU	Leukocyte elastase inhibitor	<i>SERPINB1</i>	1,25	0,0145	1,33	<0,001
Q9NZU5	LMCD1	LIM and cysteine-rich domains protein 1	<i>LMCD1</i>	1,27	0,0122	1,25	0,02
P61626	LYSC	Lysozyme C	LYZ	1,35	0,0007	1,33	<0,001
P26038	MOES	Moesin	<i>MSN</i>	1,22	0,0431	1,32	<0,001
P43490	NAMPT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	<i>NAMPT</i>	1,28	0,0097	1,37	<0,001
P80188	NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	<i>LCN2</i>	1,33	0,0013	1,41	<0,001
P40261	NNMT	Nicotinamide N-methyltransferase	<i>NNMT</i>	1,23	0,0324	1,37	<0,001
Q8WX93	PALLD	Palladin	<i>PALLD</i>	1,25	0,0195	1,26	0,02
O00151	PDL1	PDZ and LIM domain protein 1	<i>PDLIM1</i>	1,22	0,0431	1,29	0,01
P05164	PERM	Myeloperoxidase	<i>MPO</i>	1,31	0,0056	1,32	<0,001
P13796	PLSL	Plastin-2	LCP1	1,25	0,0122	1,42	<0,001
P07737	PROF1	Profilin-1	<i>PFN1</i>	1,22	0,0429	1,23	0,04
P24158	PRTN3	Myeloblastin	<i>PRTN3</i>	1,28	0,0097	1,31	<0,001
Q93062	RBPM5	RNA-binding protein with multiple splicing	<i>RBPM5</i>	1,23	0,0266	1,26	0,01
P62249	RS16	40S ribosomal protein S16	<i>RPS16</i>	1,36	0,0009	1,23	0,04
P62701	RS4X	40S ribosomal protein S4, X isoform	<i>RPS4X</i>	1,41	0,0006	1,24	0,03
P26447	S10A4	Protein S100-A4	<i>S100A4</i>	1,32	0,0041	1,32	<0,001
P05109	S10A8	Protein S100-A8	<i>S100A8</i>	1,38	0,0006	1,39	<0,001
P06702	S10A9	Protein S100-A9	<i>S100A9</i>	1,35	0,0008	1,43	<0,001
P04179	SODM	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	<i>SOD2</i>	1,28	0,0113	1,37	<0,001
Q01995	TAGL	Transgelin	<i>TAGLN</i>	1,37	0,0007	1,27	0,01
Q9Y490	TLN1	Talin-1	<i>TLN1</i>	1,25	0,015	1,37	<0,001
P02788	TRFL	Lactotransferrin	LTF	1,35	0,0008	1,39	<0,001

Tabla 11. Continuación

Accession code ^a	Protein name	Protein description	Gene symbol	Fold Change (DIU/Fértil) ^b	adj.P.Val ^c	Fold Change (DIU/RIF) ^d	adj.P.Val ^e
P19971	TYPH	Thymidine phosphorylase	TYMP	1,27	0,0138	1,32	<0,001

^aAccession code, o código de entrada de la proteína en la base de datos Expasy (SwissProt)

^{b,d}Fold change promedio, expresado como la media del ratio de expresión de cada proteína en las muestras del grupo DIU respecto a las muestras Fértil^b y RIF^d respectivamente. FC (DIU/Fértil) y FC (DIU/RIF).

^{c,e}p-valor ajustado de la comparación diferencial 'por pares' para DIU frente a Fértil^c y para DIU frente a RIF^d.

En amarillo se indican las tres proteínas elegidas para la validación del iTRAQ.

Teniendo en cuenta que las proteínas son el producto final que determina el fenotipo, estos porcentajes, aunque no elevados, resultan ser más que suficiente para apoyar nuestros resultados de no detectar diferencias significativas entre las condiciones Fértil y RIF. Sin embargo, por otro lado, el hecho de no detectar diferencias significativas entre dichos grupos (fértil y RIF), no significa que sean completamente iguales a nivel proteómico, pues en ese caso hubiésemos esperado un mayor solapamiento o número de PDEs comunes entre ambas comparaciones (DIU frente a Fértil y DIU frente a RIF). Lo que está ocurriendo es que, para esas 54 proteínas compartidas en ambas comparativas, sus niveles de expresión en los grupos RIF y fértil sí son muy parecidos o iguales entre sí y lo suficientemente diferentes del grupo DIU como para detectar diferencias significativas con respecto a él ($DIU < F \sim RIF$; $DIU > F \sim RIF$). Sin embargo, en las 79 proteínas significativas restantes exclusivas de la comparación Fértil frente a DIU, los niveles de expresión de esas proteínas en el grupo RIF se encuentran en el medio de la de los grupos DIU y Fértil ($DIU \geq RIF \geq F$; $DIU \leq RIF \leq F$), siendo diferente a ambos grupos pero no lo suficiente como para detectar diferencias significativas, sólo entre los grupos extremos DIU y Fértil. En el caso de las 104 PDEs restantes exclusivas de la comparativa RIF frente a DIU, ocurre lo contrario, en este caso dichas proteínas para el grupo fértil tienen un nivel de expresión medio entre los otros dos grupos ($DIU \geq F \geq RIF$; $DIU \leq F \leq RIF$), sin llegar tampoco a detectarse diferencias significativas, solamente entre DIU y RIF. En definitiva, esto confirma que el grupo DIU, con un endometrio completamente refractario, es el más diferente a nivel proteómico, permaneciendo siempre en un extremo, mientras que entre un endometrio fértil y otro con RIF idiopático sólo hay diferencias sutiles en la expresión de ciertas proteínas. Esto evidencia que un RIF idiopático y un endometrio fértil son muy parecidos entre sí en cuanto al perfil de expresión proteica, y que sólo con pequeños cambios en el nivel de expresión de ciertas proteínas es suficiente para generar un RIF.

Adicionalmente se llevó a cabo un análisis del poder estadístico de la prueba diferencial multivariante aplicada a los resultados obtenidos del iTRAQ (**Figura suplementaria 1. Anexo I**), con el fin de determinar la fiabilidad o sensibilidad del estudio a la hora de detectar proteínas diferencialmente expresadas. Según el gráfico ‘power plot’, sólo el 26% de las proteínas (500 proteínas) consiguieron un poder estadístico del 50% y aproximadamente el 6% (114 proteínas) consiguieron un poder estadístico del 90%, siendo esto una limitación importante a la hora de poder detectar todas las diferencias en verdad existentes.

1.4 El análisis funcional in silico muestra rutas KEGG específicas para las comparaciones Fértil frente a DIU y RIF frente a DIU

En consonancia con lo comentado en el apartado anterior, el hecho de no haber detectado diferencias significativas entre los grupos fértil y RIF, significaría obtener un mayor número de proteínas compartidas entre las comparaciones Fértil frente a DIU y RIF frente a DIU. Por lo tanto, se llevó a cabo un análisis funcional usando la base de datos KEGG y las PDEs de cada comparativa para, primero entender mejor el contexto biológico de las rutas en las que ellas participan, y segundo para comprobar si proteínas no compartidas entre ambas comparaciones están implicadas en rutas relacionadas. Este análisis funcional también permite determinar qué rutas KEGG podrían estar más afectadas cuando un endometrio fértil o con RIF se compara con otro que es completamente refractario. Finalmente, también se muestra un análisis funcional KEGG integrado, mostrando todas las rutas de cada una de las comparaciones arriba mencionadas conectadas entre sí en caso de compartir alguna proteína.

El análisis funcional KEGG mostró 12 rutas significativas ($p\text{-valor} < 0,05$) cuando se compararon las proteínas significativas de la comparativa Fértil frente a DIU, siendo el ‘Ribosoma’, y la ‘Degradación de valina, leucina e isoleucina’, las dos rutas más representadas (**Figura 32A y Tabla suplementaria 2. Anexo I**). El análisis funcional KEGG para las PDEs de la comparativa RIF frente a DIU reveló 17 rutas significativas ($p\text{-valor} < 0,05$), donde la ‘degradación de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina’ y ‘la degradación de los ácidos grasos’ fueron las dos rutas más significativas (**Figura 32B y Tabla suplementaria 3. Anexo I**). Con el objetivo de determinar cuántas rutas KEGG son compartidas entre ambas comparaciones, se llevó a cabo un diagrama de Venn, el cual mostró 10 rutas compartidas, relacionadas con el metabolismo de aminoácidos (‘degradación de valina, leucina e isoleucina’, ‘metabolismo del triptófano’ y ‘metabolismo de la alanina’), el metabolismo de los ácidos grasos (‘elongación de los ácidos grasos’, ‘degradación de los ácidos grasos’ y ‘metabolismo de los ácidos grasos’), el metabolismo de los ácidos carboxílicos (‘metabolismo del butanoato’ y

'metabolismo del propanoato') y el metabolismo del carbón (Figura 33 y Tabla suplementaria 4. Anexo I).

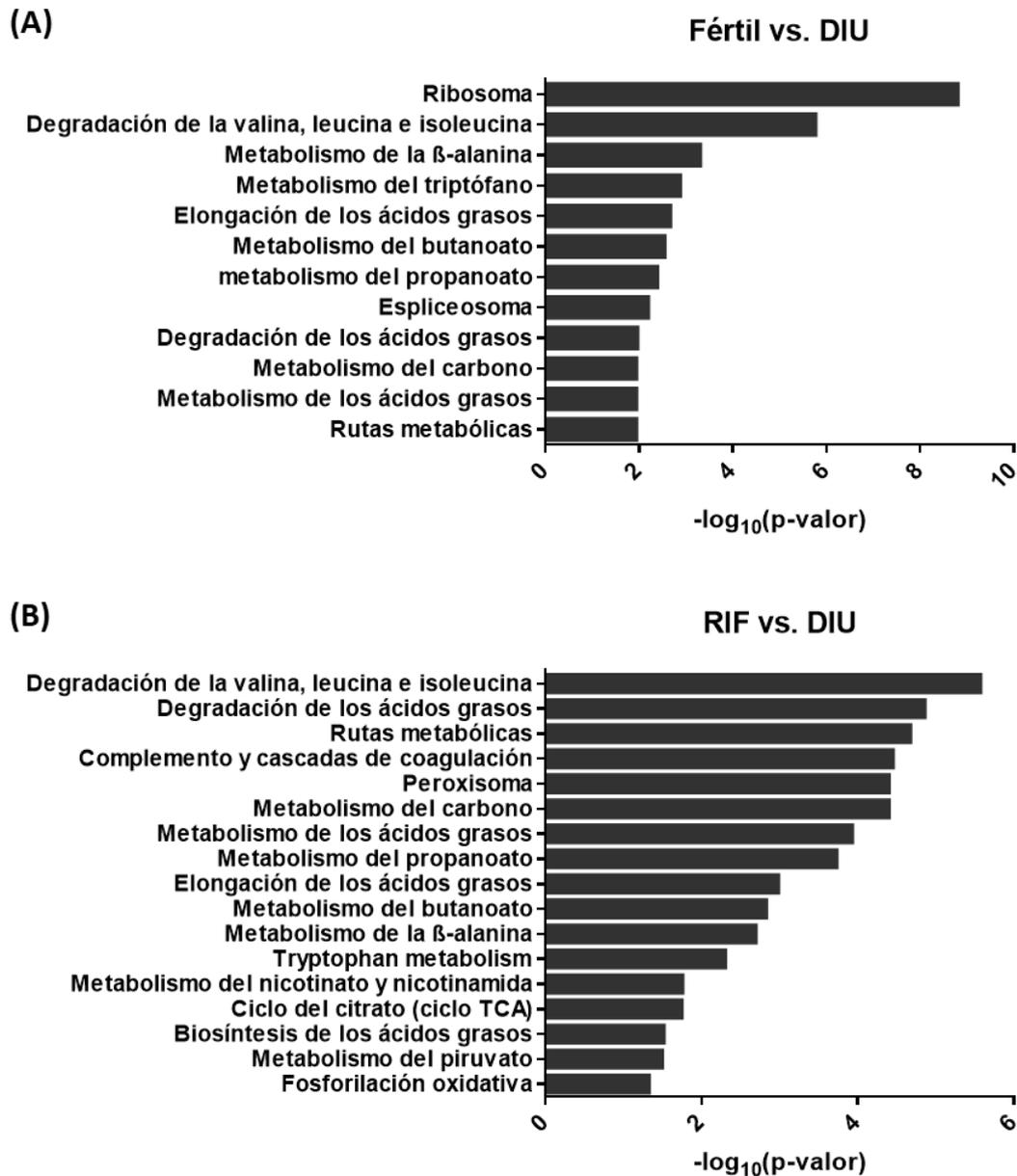


Figura 32. Análisis funcional KEGG de las comparaciones de los grupos Fértil y RIF frente al de mujeres con DIU. (A) El análisis in silico de las 133 PDEs obtenidas de la comparativa Fértil frente a DIU usando la base de datos KEGG reveló 12 rutas significativas ($p\text{-valor} < 0,05$). **(B)** El análisis in silico de las 158 PDEs obtenidas de la comparativa RIF frente a DIU usando la base de datos KEGG reveló 17 rutas significativas ($p\text{-valor} < 0,05$). Figura sacada del artículo *Pérez-Debén S. et al., 2019*.

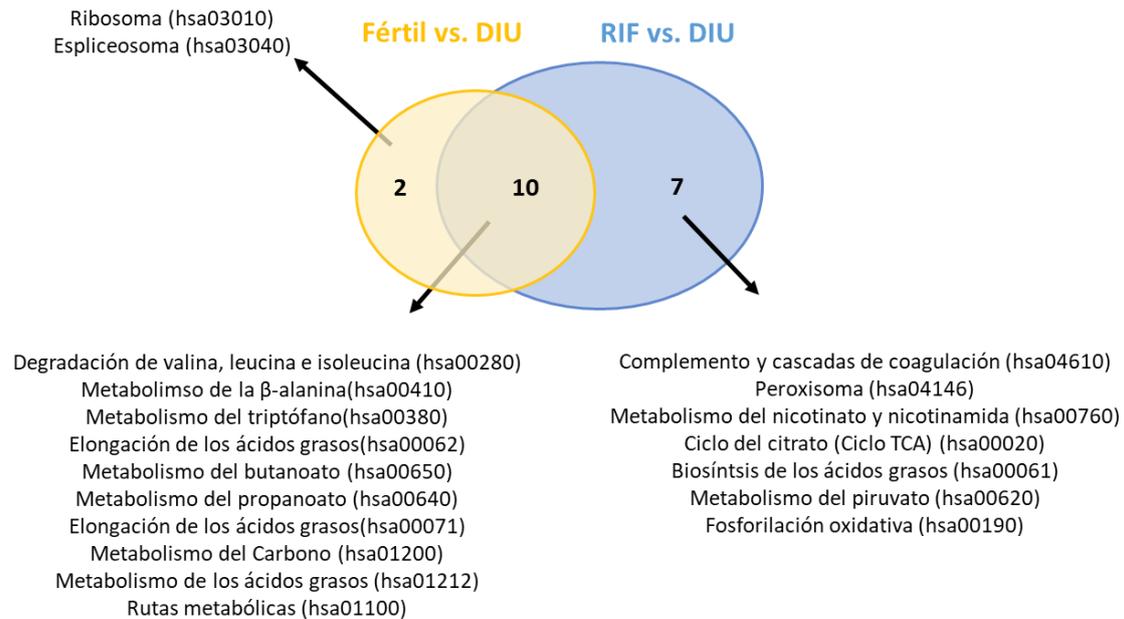


Figura 33. Diagrama de Venn para el análisis funcional KEGG. Dicho diagrama muestra 10 rutas KEGG significativas compartidas entre ambas comparaciones (Fértil frente a DIU y RIF frente a DIU). Figura sacada del artículo Pérez-Debén S. et al., 2019.

En consecuencia, la comparación RIF frente a DIU mostró 7 rutas KEGG significantes específicas relacionadas con la *'cascadas de coagulación y el sistema de complemento'*, el *'peroxisoma'*, el *'metabolismo del nicotinato y nicotinamida'*, el *'ciclo de los ácidos tricarboxílicos'*, la *'biosíntesis de ácidos grasos'*, el *'metabolismo del piruvato'* y la *'fosforilación oxidativa'* (**Tabla suplementaria 5. Anexo I**). Por otro lado, la comparativa Fértil frente a DIU mostró sólo 2 rutas KEGG específicas relacionadas con el *'ribosoma'* y *'el espliceosoma'* (**Tabla suplementaria 5. Anexo I**).

En la **figura 34** se muestra una representación gráfica en red para las rutas KEGG específicas y compartidas por ambas comparaciones (RIF frente a DIU y Fértil frente a DIU). Las rutas KEGG que compartieron proteínas aparecen conectadas. Para la comparación RIF frente a DIU, 6 de las 7 rutas específicas (excepto para la *cascada de coagulación y sistema de complemento*) enlazaron con alguna de las 10 rutas compartidas. Esto corrobora que estas dos comparaciones (Fértil frente a DIU y RIF frente a DIU) compartieron más funciones (proteínas implicadas en rutas comunes) que proteínas individuales, ayudando así a entender mejor la falta de diferencias significativas entre los grupos fértil y RIF. Sin embargo, aunque dichas comparaciones comparten algunas similitudes, los grupos RIF y fértil podrían no considerarse la misma entidad desde el punto de vista del perfil proteómico. De hecho, cuando se compararon los grupos RIF y fértil frente a un endometrio completamente refractario, se

obtuvieron tanto PDEs y rutas específicas y diferentes para cada comparación (RIF frente a DIU y DIU frente a Fértil).

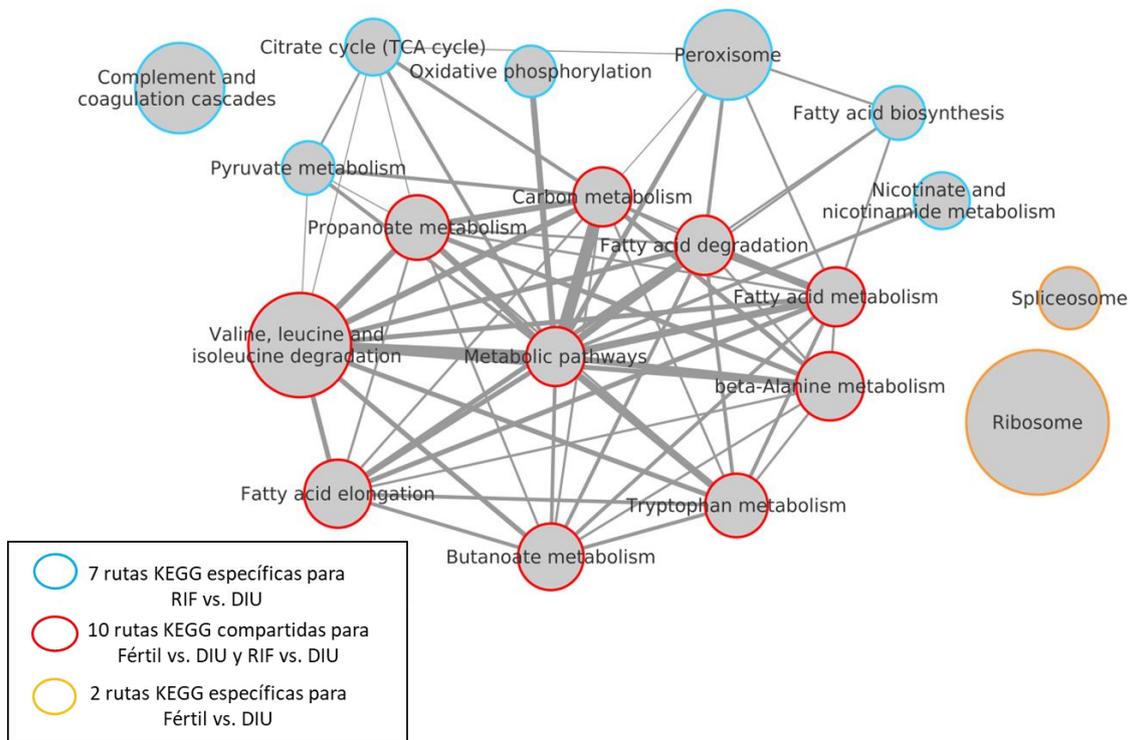


Figura 34. Red funcional integrada para las rutas KEGG significativas obtenidas en las comparaciones Fértil frente a DIU y RIF frente a DIU. El tamaño de los círculos o nodos representa la significancia de la ruta. En rojo aparecen las rutas comunes, en azul los nodos de las rutas relacionadas con el grupo RIF y en naranja las rutas relacionadas con el grupo Fértil. El grosor de las uniones representa el número de genes compartidos entre las rutas. Figura sacada del artículo *Pérez-Debén S. et al., 2019*.

1.5 Las redes de correlación de la PDEs para las comparaciones Fértil frente a DIU y RIF frente a DIU muestran nuevas asociaciones de proteínas

Después de que el análisis de expresión diferencial no revelase diferencias significativas a nivel de proteínas individuales entre las muestras del grupo fértil y RIF, centramos nuestra atención en estudiar las redes de correlación para las 133 y 158 proteínas significativas obtenidas de las comparativas fértil frente a DIU y RIF vs DIU, respectivamente. La idea de hacer estas redes de correlación fue comprobar si alguna nueva relación de co-expresión (positiva o negativa) podría existir entre las PDEs, lo que ayudaría a entender mejor el comportamiento de un endometrio fértil o con RIF en comparación a uno que es refractario. 80 de las 133 PDEs y 78 de las 158 PDEs fueron anotadas en la base de datos KEGG, las cuales fueron utilizadas primero para crear las redes de correlación de cada grupo (fértil, RIF y DIU)

por separado. Estas redes se confeccionan analizando cada proteína con todas las demás (en parejas) para ver si correlacionan positivamente (cuando el nivel de expresión de ambas sube o baja) o negativamente (cuando la expresión de una sube, baja el de la otra), pero sin saber si interaccionan o no físicamente.

Primero, para la comparación Fértil frente a DIU, la red de correlación para el grupo 'fértil' se compuso de 20 nodos (proteínas individuales) y 14 correlaciones (**Figura 35A y Tabla suplementaria 6. Anexo I**), de las cuáles sólo dos correlaciones fueron significativas, una de ellas entre la proteína de choque térmico mitocondrial de 60 KDa (CH60/*HSPD1*) y la proteína de choque térmico mitocondrial de 10 KDa (CH10/*HSPE1*) (*p*-valor 0,0013) y la otra entre la moesina (MOES/*MSN*) y la plastina 2 (PLSL/*LCD1*) (*p*-valor 0,0252). De hecho, la interacción física entre CH60-CH10 ya ha sido previamente descrita (Hansen *et al.*, 2003). La red de correlación para el grupo DIU se compuso de 31 nodos y 24 correlaciones (**Figura 35B y Tabla suplementaria 6. Anexo I**), con sólo una correlación significativa, entre la proteína ribosomal 40S (RS13/*RPS13*) y la proteína S100-A9 (S10A9/*S100A9*) (*p*-valor 0,0036).

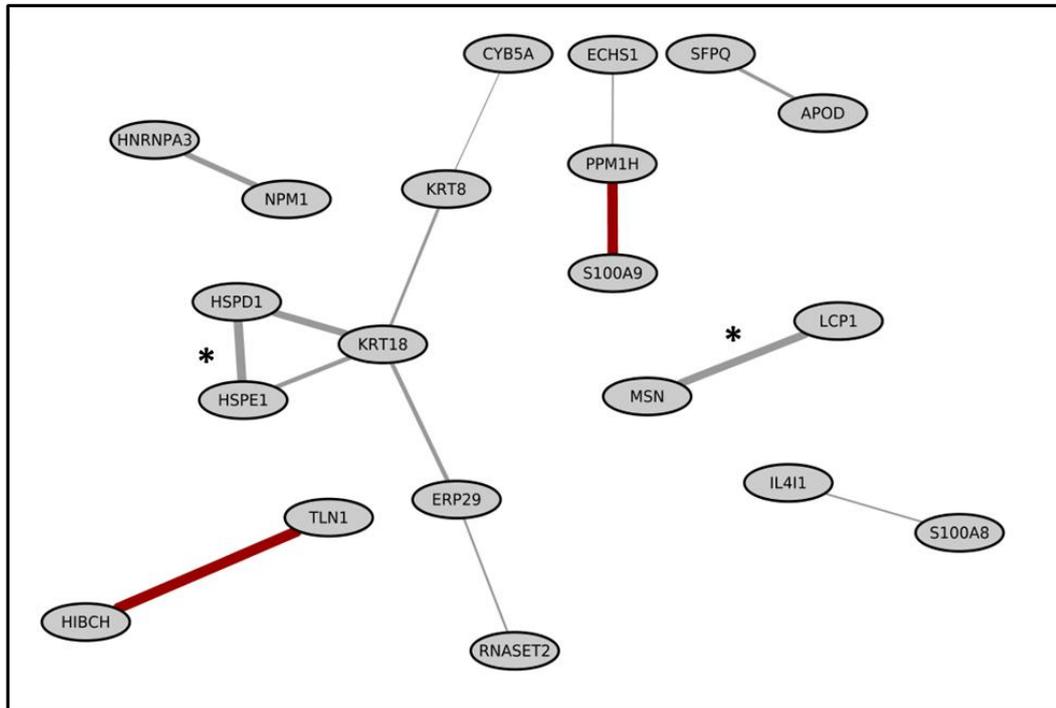
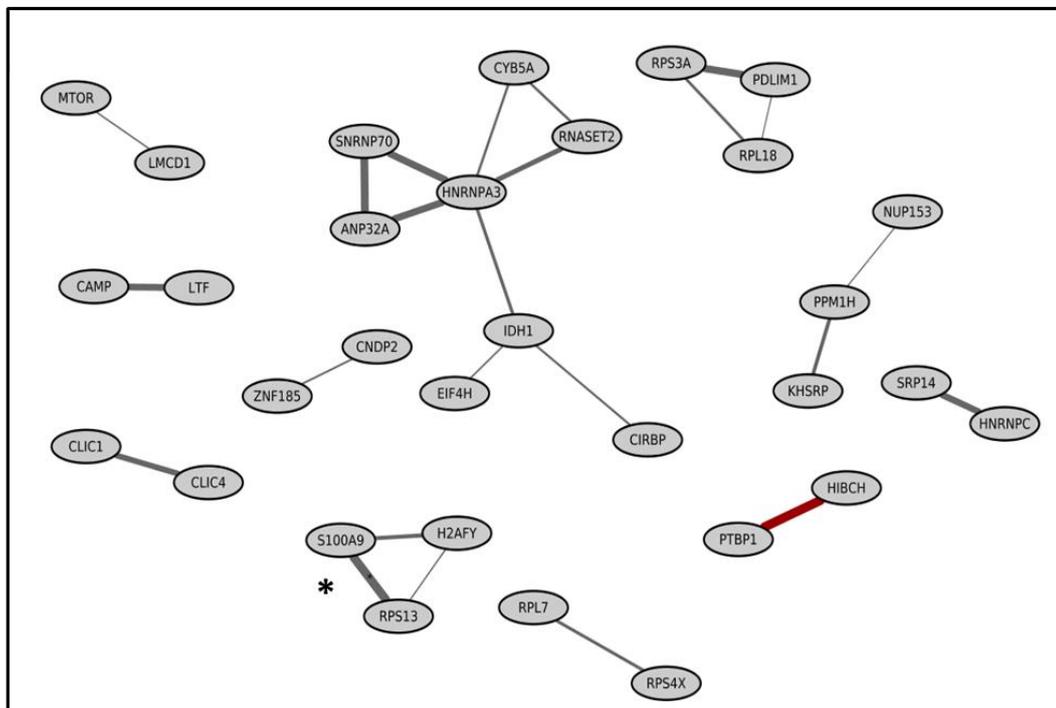
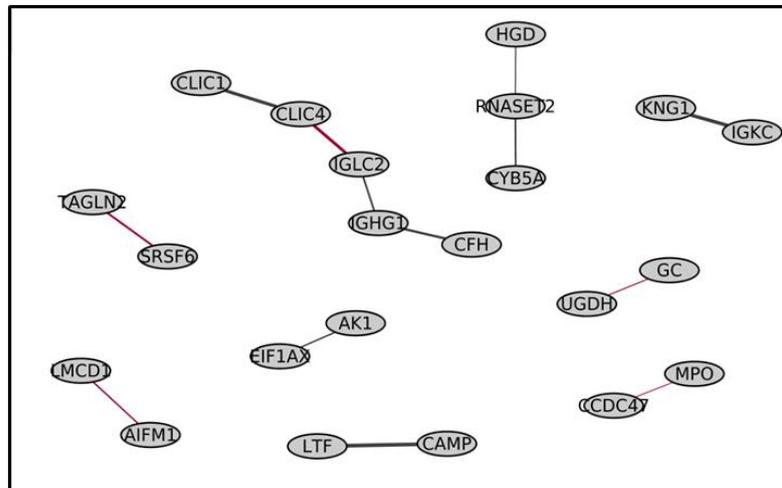
(A) Red de correlación para el grupo Fértil (20 Proteínas)**(B) Red de correlación para el grupo DIU (31 Proteínas)**

Figura 35. Redes de correlación para las condiciones Fértil y DIU generadas a partir de las 133 PDEs de la comparación Fértil frente a DIU. (A) La red de correlación para un endometrio de pacientes fértiles muestra 20 proteínas correlacionadas (coeficiente de Pearson $\geq \pm 0,9$) y 14 conexiones. (B) La red de correlación para un endometrio portador de un DIU muestra 31 proteínas correlacionadas (coeficiente de Pearson $\geq \pm 0,9$) y 24 conexiones. El color de la

conexión indica si la correlación es positiva (negro) o negativa (rojo). La anchura de la unión es proporcional al grado de correlación. * *p*-valor < 0,05 (correlación significativa). Figura sacada del artículo Pérez-Deben S. et al., 2019.

Segundo, para la comparación RIF frente a DIU, la red de correlación DIU mostró 22 proteínas con 13 correlaciones entre ellas (Figura 36A) y la red de correlación RIF mostró 72 proteínas con 78 conexiones (Figura 36B), pero sin ninguna correlación significativa en ambas redes.

(A) Red de correlación para el grupo DIU (22 proteínas)



(B) Red de correlación para el grupo RIF (72 proteínas)

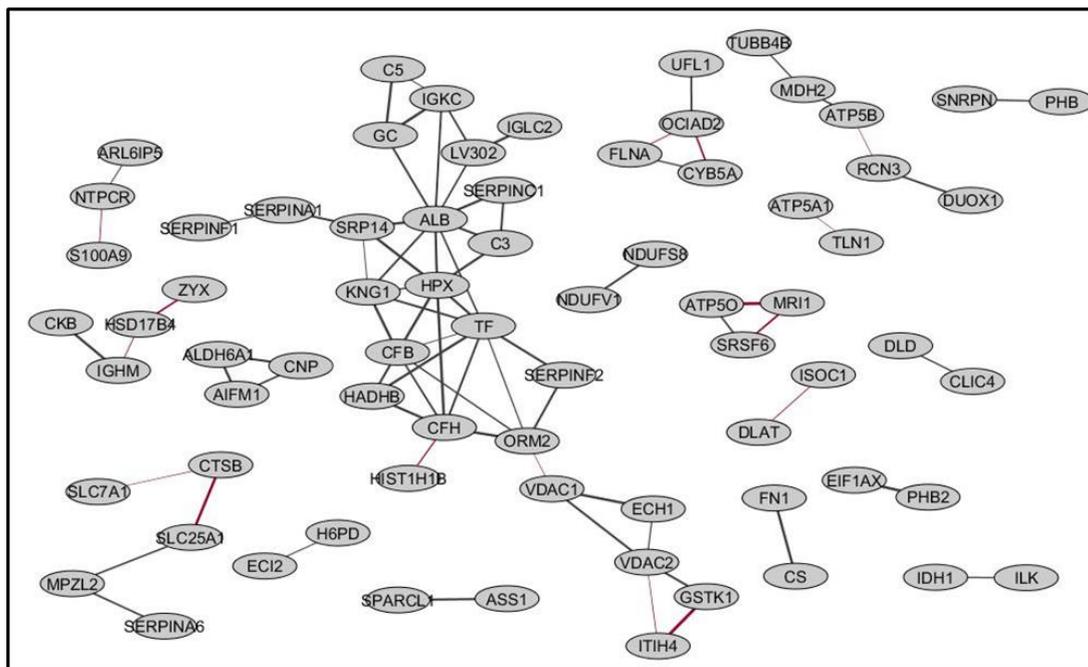


Figura 36. Redes de correlación para las condiciones endometriales DIU y RIF generadas a partir de las 158 PDEs de la comparativa RIF frente a DIU. (A) La red de correlación para un endometrio portador de un DIU muestra 22 proteínas con una tasa de correlación mayor a $\pm 0,9$ y sólo 13 conexiones entre ellas. **(B)** La red de correlación para un endometrio de las pacientes con RIF muestra 72 proteínas correlacionadas con una tasa de correlación superior a $\pm 0,9$ y 78 conexiones entre ellas. El color de la conexión indica si la correlación es positiva (negro) o negativa (rojo). La anchura de la unión es proporcional al grado de correlación. * p -valor $< 0,05$ (correlación significativa). Figura sacada del artículo *Pérez-Debén S. et al., 2019*.

Finalmente, para cada comparación se generó una red de correlación para el grupo DIU (grupo común en ambas comparativas) de acuerdo con los procesos biológicos del GO para ver si algunas de las proteínas correlacionadas en cada una de las redes DIU de cada comparativa, compartieron o participaron en procesos biológicos relacionados. Así pues, la red de correlación DIU para la comparación Fértil frente a DIU mostró tres procesos biológicos principales relacionados con '*los procesos de transporte de iones*', '*el sistema inmune*' y '*los procesos de transcripción y traducción*' (**Figura 37 y Tabla suplementaria 7 Anexo I**). En el caso de la red de correlación DIU de la comparativa RIF frente a DIU, '*el sistema inmune*' y '*los procesos de transporte iónico*' fueron las funciones biológicas GO principales que incluyeron un mayor número de proteínas correlacionadas (**Figura 38 y Tabla suplementaria 7. Anexo I**). Algunas de estas correlaciones detectadas ya fueron previamente reportadas en diferentes bases de datos (STRING, GeneMania) (**Tabla suplementaria 8. Anexo I**).

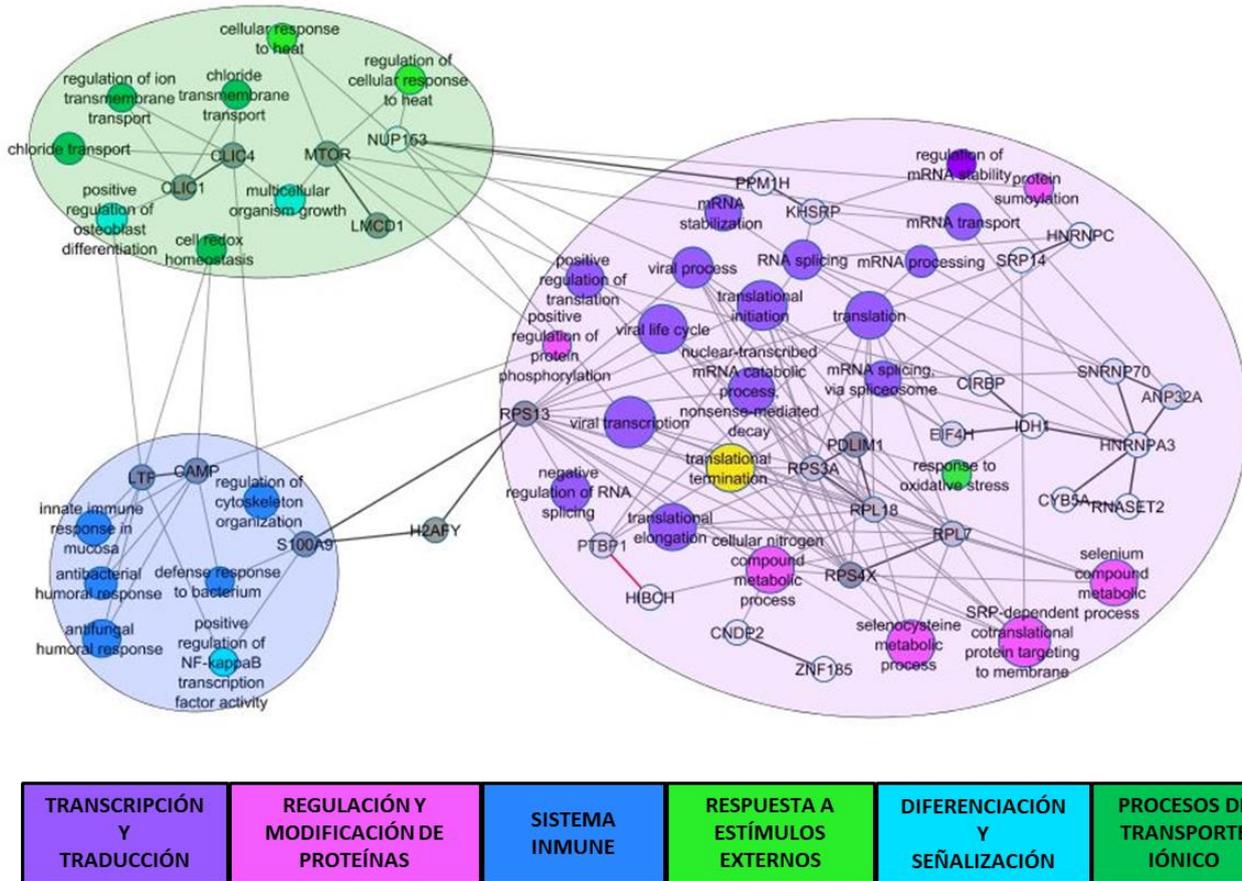


Figura 37. Red de correlación para la condición DIU en base a la categoría ‘procesos biológicos’ del Gene Ontology (GO) para la comparativa Fértil frente a DIU. Las 31 proteínas correlacionadas de la red DIU se organizaron de acuerdo a los procesos biológicos del GO en los que ellas participan. Se describen tres procesos biológicos principales: el sistema inmune en azul oscuro, el transporte iónico en verde fuerte, y procesos relacionados con la transcripción y traducción en morado. Las esferas pequeñas en tonos grises y claros representan a las 31 proteínas implicadas en la red de correlación DIU. El color de las conexiones indica si la correlación es positiva (negro) o negativa (rojo). La anchura de la conexión es proporcional al score de correlación. Figura sacada del artículo Pérez-Deben S. et al., 2019.

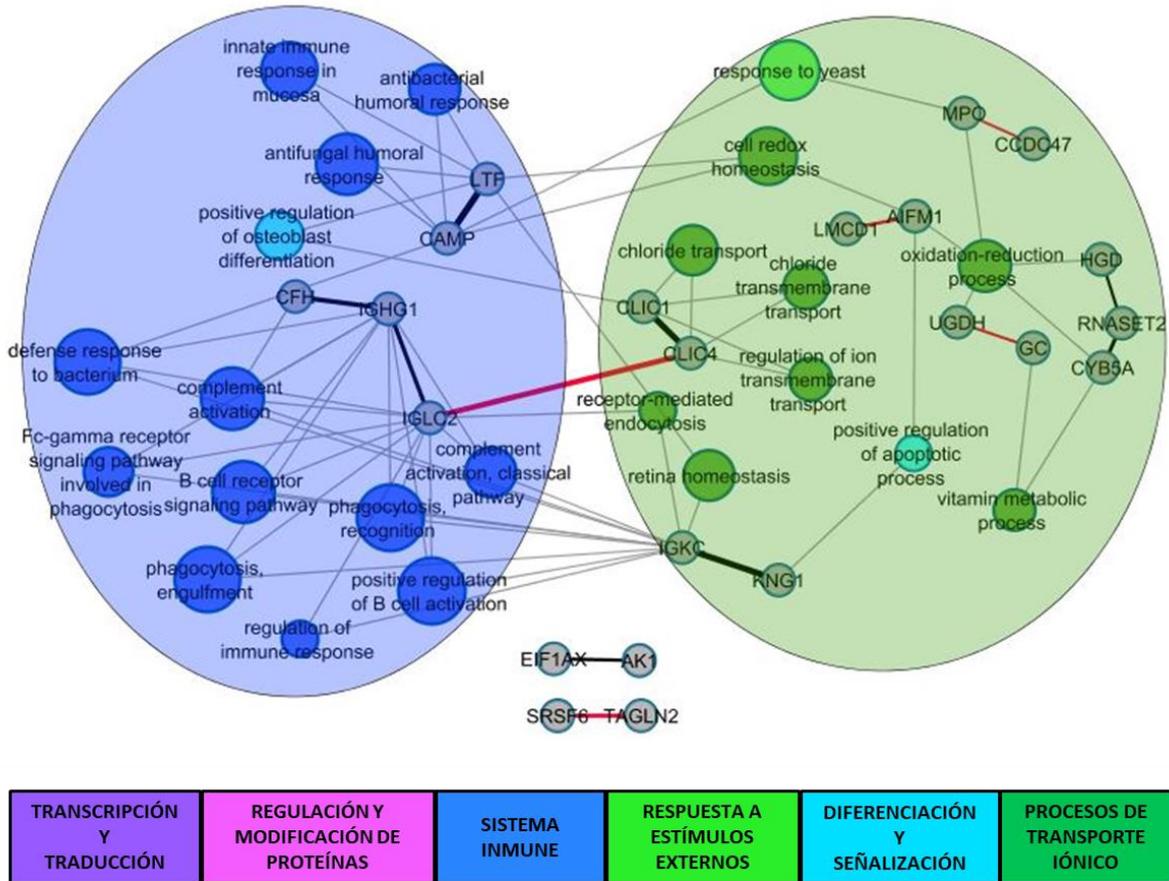


Figura 38. Red de correlación para la condición DIU en base a la categoría ‘procesos biológicos’ del Gene Ontology (GO) para la comparativa RIF frente a DIU. Las 22 proteínas correlacionadas de la red DIU se organizaron de acuerdo a los procesos biológicos del GO en los que ellas participan. Se describen dos procesos biológicos principales: el sistema inmune en azul y el transporte iónico en verde. Las esferas pequeñas en tonos oscuros y claros representan a las 22 proteínas implicadas en la red de correlación DIU. El color de las conexiones indica si la correlación es positiva (negro) o negativa (rojo). La anchura de la conexión es proporcional al score de correlación. Hubo 4 proteínas para las cuales no hubo un proceso biológico asociado en la bases de datos GO. Figura sacada del artículo Pérez-Debén S. *et al.*, 2019.

1.6 Inmunolocalización y caracterización de PLSL, LYSC y TRFL a través del ciclo endometrial

Para la validación externa por inmunohistoquímica, se seleccionaron tres proteínas endometriales no caracterizadas previamente en endometrio humano (PLSL, LYSC y TRFL) y que resultaron estar diferencialmente expresadas entre los grupos de estudio del análisis iTRAQ. Concretamente se caracterizó su abundancia y localización a lo largo del ciclo endometrial.

En cada una de las fases del ciclo endometrial, la PLSL mostró una abundancia similar en los tres compartimentos analizados (epitelio luminal, epitelio glandular y estroma) a lo largo del ciclo endometrial. Sólo se observó un ligero incremento en la expresión de la proteína en el epitelio luminal en la fase secretora media (**Figura 39; A,B**). Para la LYSC, apenas se detectó su expresión en los tres compartimentos endometriales. Sólo se detectó un ligero pico de expresión en la fase proliferativa tardía, seguido de un considerable descenso durante la fase secretora media. El pico de expresión fue menor para el estroma que para los otros dos compartimentos epiteliales (**Figura 40; A,B**). En el caso de la TRFL, ésta mostró también una abundancia similar en los tres compartimentos endometriales, con una baja señal en general a lo largo del ciclo endometrial, y sólo se observó un pico de expresión en la fase secretora temprana. Después de esta fase, la abundancia de la TRFL pareció volver a los niveles basales, pero a nivel estromal mantuvo una señal de dicha proteína por encima de los otros dos

compartimentos

(Figura

41;

A,B).

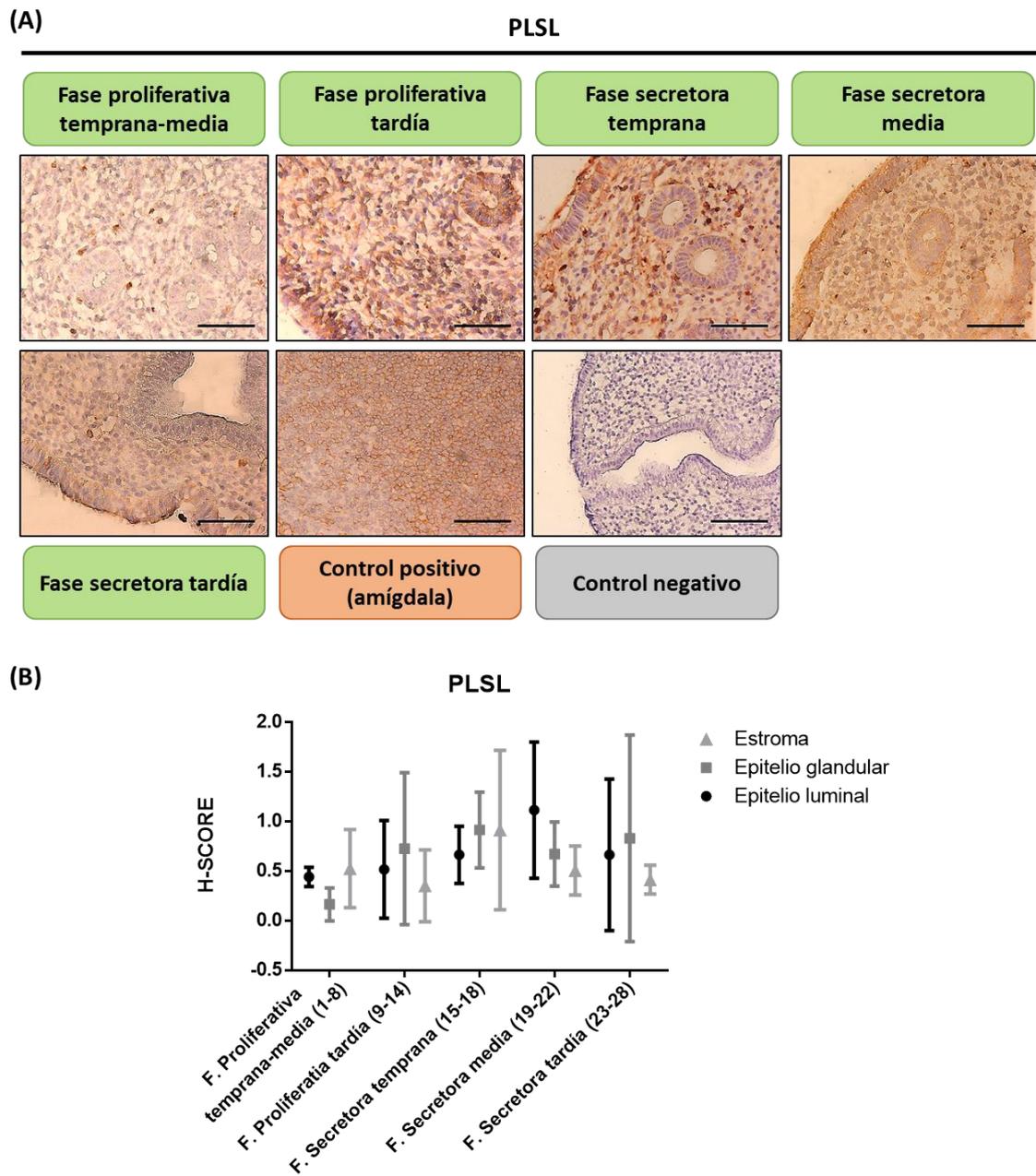
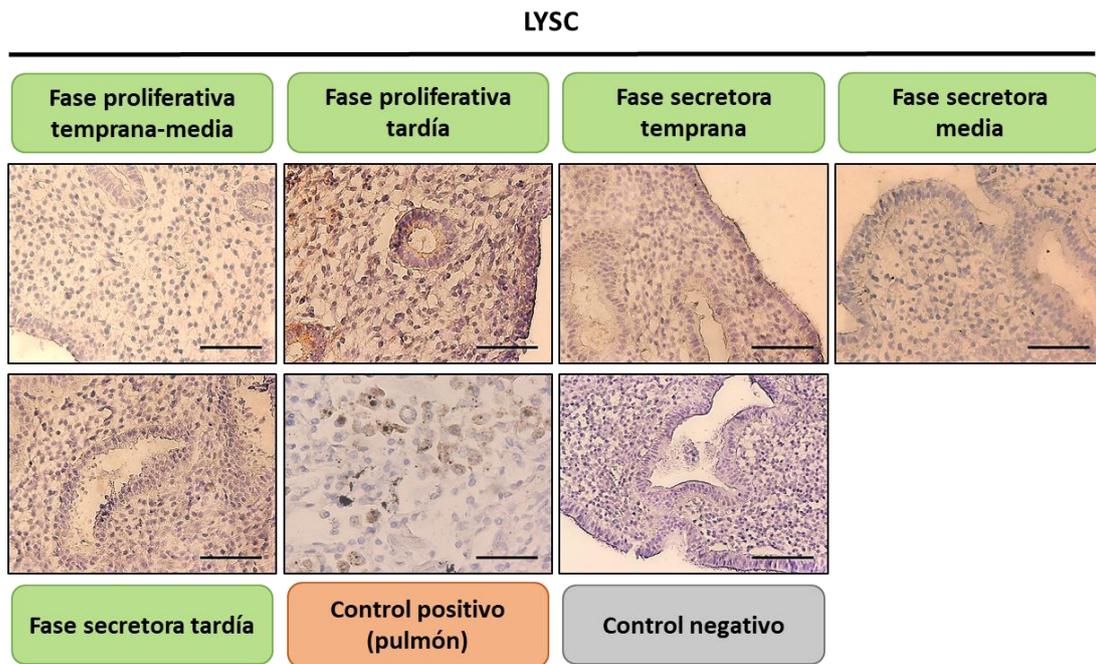


Figura 39. Inmunolocalización de la plastina 2 a través del ciclo endometrial. (A) Se analizó la expresión y localización de la plastina 2 (PLSL) por inmunohistoquímica en tejido endometrial humano a lo largo del ciclo endometrial. (B) La abundancia de la proteína se representó gráficamente como el H-Score en los tres compartimentos endometriales (estroma, epitelio glandular y luminal). El control positivo fue amígdala humana y el control negativo fueron cortes endometriales sin anticuerpo primario. La barra de cada imagen representa una escala de 500 μm . Figura sacada del artículo Pérez-Deben S. *et al.*, 2019.

(A)



(B)

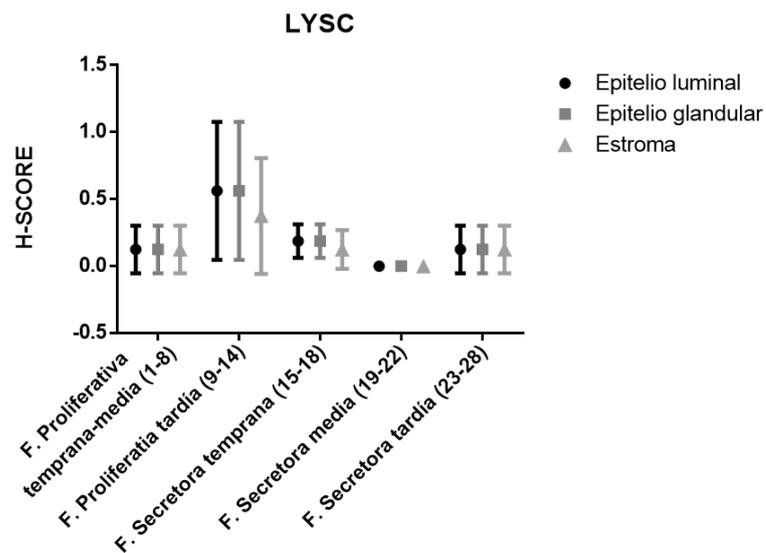


Figura 40. Inmunolocalización de la lisozima a través del ciclo endometrial. (A) Se analizó la expresión y localización de la lisozima (LYSC) por inmunohistoquímica en tejido endometrial humano a lo largo del ciclo endometrial. **(B)** La abundancia de la proteína se representó gráficamente como el H-Score en los tres compartimentos endometriales (estroma, epitelio glandular y luminal). El control positivo fue pulmón humano y el control negativo fueron cortes endometriales sin anticuerpo primario. La barra de cada imagen representa una escala de 500 μm . Figura sacada del artículo Pérez-Debén S. *et al.*, 2019.

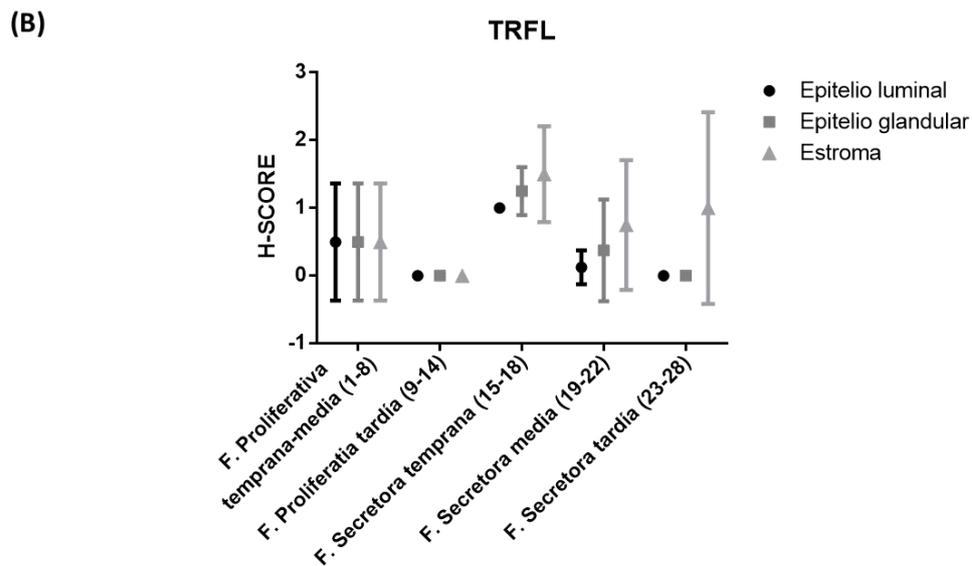
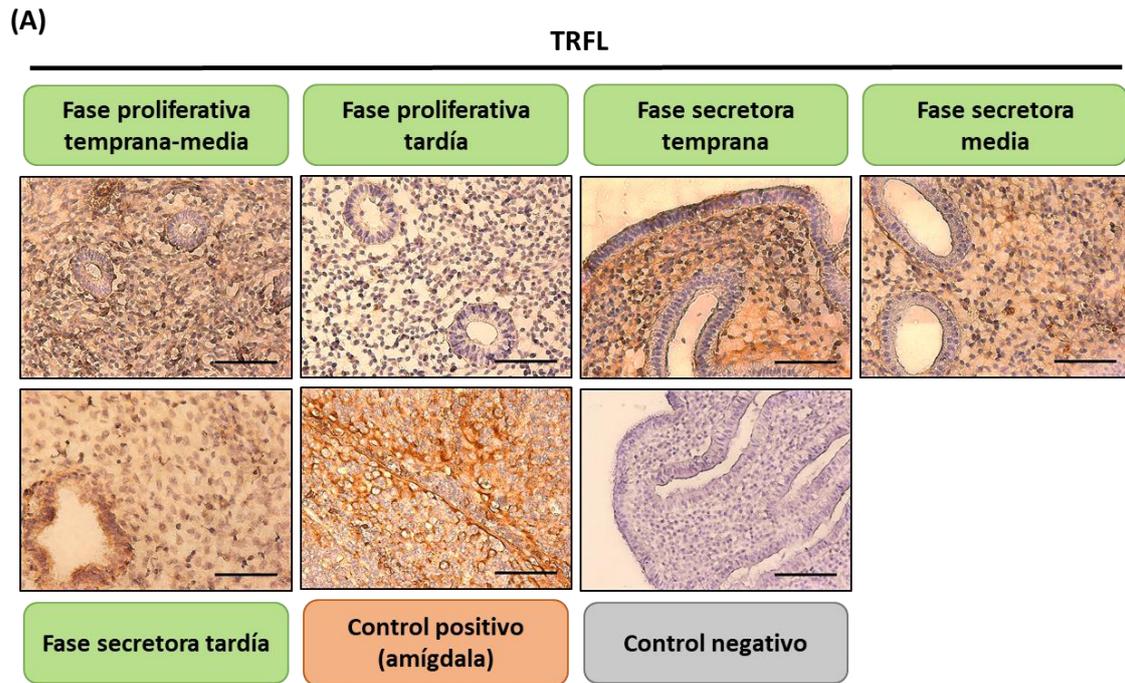


Figura 41. Inmunolocalización de la lactotransferrina a través del ciclo endometrial. (A) Se analizó la expresión y localización de la lactotransferrina (TRFL) por inmunohistoquímica en tejido endometrial humano a lo largo del ciclo endometrial. **(B)** La abundancia de la proteína se representó gráficamente como el H-Score en los tres compartimentos endometriales (estroma, epitelio glandular y luminal). El control positivo fue amígdala humana y el control negativo fueron cortes endometriales sin anticuerpo primario. La barra de cada imagen representa una escala de 500 μ m. Figura sacada del artículo Pérez-Debén S, et al., 2019.

2. Resultados parte II: El Cu y el Pb y su papel disruptor en la función endometrial

2.1 Análisis de la pureza de los cultivos primarios de ESCs y EECs procedentes de biopsias endometriales humanas

La caracterización de los cultivos celulares primarios de células endometriales (ESCs y EECs) se llevó a cabo mediante la identificación de características morfológicas propias de cada fracción celular al microscopio de campo claro y por el uso de marcadores celulares estromales y epiteliales. Las ESCs aisladas por digestión mecánica y enzimática seguida de sedimentación gravitacional y cultivadas en medio químicamente definido presentaron una morfología alargada fibroblástica y su pureza se evaluó por mostrar una tinción positiva para la vimentina (células estromales y epiteliales) y negativa para la citoqueratina 18 (células epiteliales) y para CD45 (macrófagos y células inmunes). Las EECs en cultivo presentaron una morfología más poliédrica y un crecimiento en islas con un patrón circular, lo que resultó consistente con los resultados previamente publicados (Bongso *et al.*, 1988; Cork *et al.*, 2002). Además, las EECs fueron positivas para la tinción con citoqueratina 18, indicando la presencia de células epiteliales luminales. También dieron positivo para la vimentina y negativo para la tinción con CD45 (**Figura 42; A,B**). Ya que las ESCs expresaron también vimentina, ésta no se usó como marcador para la contaminación celular estromal en los cultivos aislados de EECs. Por lo tanto, se consideró únicamente el marcaje con citoqueratina 18 para la evaluación de la pureza del cultivo (marcaje positivo en EECs y negativo en ESCs). Las observaciones al microscopio mostraron la mínima presencia de sangre o células inmunes ($n < 1.2\%$), y una pequeña cantidad de contaminación epitelial ($n < 3.4\%$) en los cultivos de células estromales (**Figura 42; B,D**). En definitiva, se consiguió aislar de manera exitosa las ESCs y EECs a partir de tejido fresco endometrial humano, obteniendo una pureza mayor del 95% para ambas poblaciones (**Figura 42; A-D**).

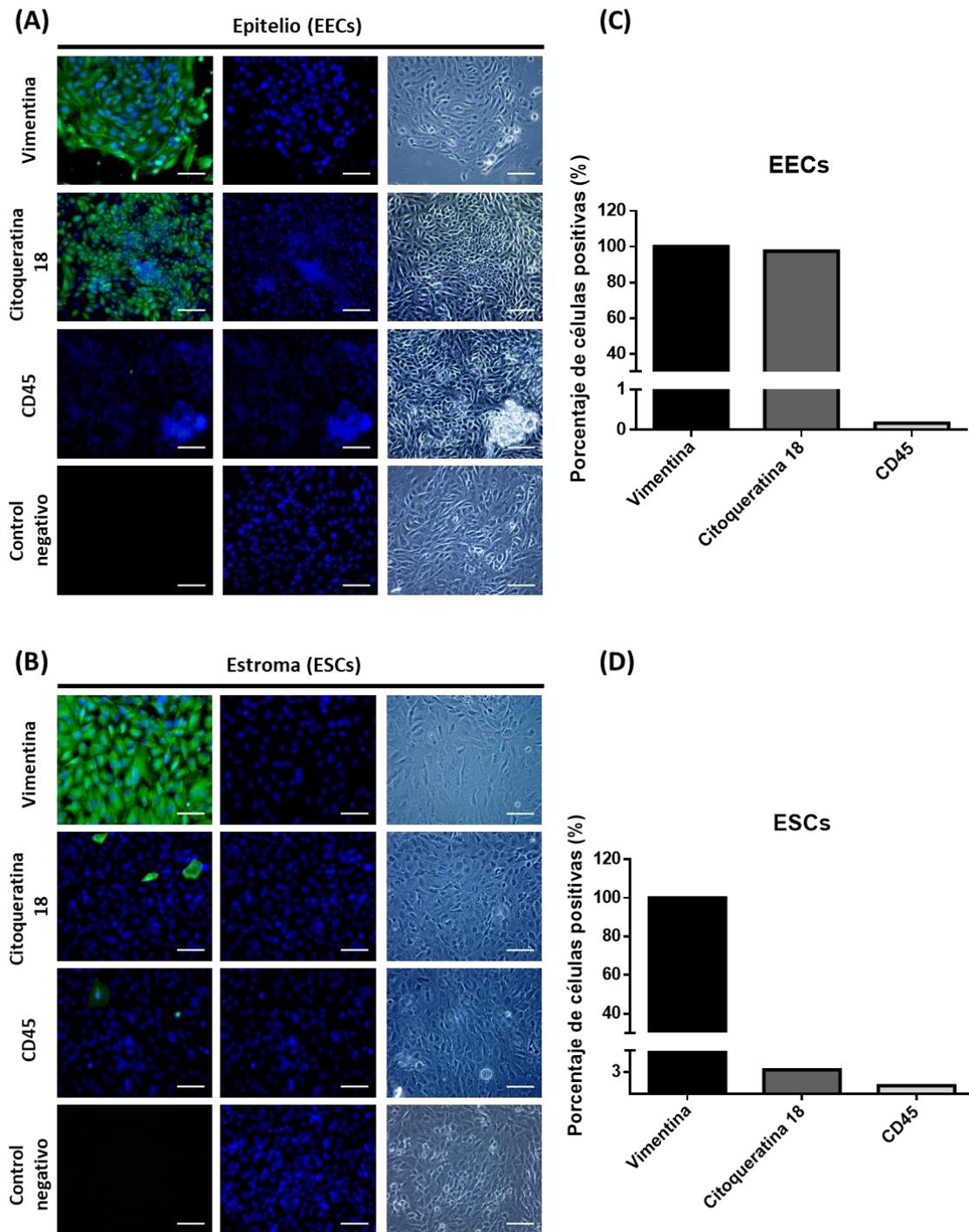


Figura 42. Análisis por inmunofluorescencia de la pureza de los cultivos primarios de EECs y ESCs. (A,B) Los cultivos celulares primarios de EECs (A) y ESCs (B) fueron teñidos para vimentina, citoqueratina 18 y CD45. En verde (primera columna) aparece la señal positiva para cada uno de los marcadores testados, en azul se muestra la tinción nuclear con DAPI (primera y segunda columna) y en campo claro (tercera columna) la apariencia morfológica de cada tipo celular. Los controles negativos son células (EECs o ESCs) siguiendo el mismo protocolo de inmunofluorescencia pero sin los respectivos anticuerpos primarios. Las imágenes incluyen una barra de escala de 300 μ m. (C,D) Gráficas con el porcentaje de células positivas para cada marcador normalizado por el número total de células (células positivas para DAPI) para la población epitelial (C) y estromal (D).

2.2 La exposición a Cu y Pb altera la viabilidad de las ESCs y EECs

Se evaluó el efecto tiempo-dosis de exposición *in vitro* del Cu (0, 50, 100 y 200 μM) y del Pb (0, 30, 100 y 500 μM) sobre la viabilidad celular de ESCs y EECs durante 72 y 48 horas de exposición respectivamente usando el método colorimétrico MTS. Se midió la viabilidad celular para determinar por un lado el rango de concentraciones de Cu y Pb no tóxicas para el cultivo *in vitro* y por otro, el tiempo durante el cual las células se mantienen viables, con idea de fijar la duración de los ensayos funcionales a posteriori.

En lo que respecta al Cu, las ESCs y EECs expuestas a Cu (50-200 μM) presentaron una disminución dosis dependiente de la viabilidad celular en comparación a las células no expuestas (0 μM) para cada uno de los tiempos analizados (**Figura 43; A,B**). Concretamente, se observó una disminución significativa de la viabilidad celular a las dosis más altas de Cu (100 y 200 μM) a las 48 h ($p < 0,05$ para 100 μM ; $p < 0,0001$ para 200 μM) y a las 72 h ($p < 0,001$ para 100 μM ; $p < 0,0001$ para 200 μM) para las ESCs (**Figura 43A**) ya las 24 h ($p < 0,05$; $p < 0,0001$) y 48 h ($p < 0,01$; $p < 0,0001$) para las EECs (**Figura 43B**). En los puntos de tiempo más cortos, solamente la dosis más alta de Cu (200 μM) mostró una viabilidad celular significativamente reducida ($p < 0,05$) a las 2 y 24 h para las ESCs y a las 2h para las EECs ($p < 0,01$).

Por el contrario, en el caso del Pb, las ESCs y EECs tratadas *in vitro* con diferentes dosis de Pb (0, 30, 100, 500 μM) mostraron un incremento en la viabilidad celular de manera dosis dependiente, con la excepción de la dosis 500 μM para las ESCs, que aunque el porcentaje de viabilidad celular fue superior a la de la dosis 0 μM , éste fue menor que el de 100 μM (**Figura 43; C,D**). Dicho incremento fue sólo significativo para la dosis 100 μM de Pb después de las 72 h en las ESCs (**Figura 43C**) y para todas las dosis de Pb (30, 100 y 500 μM) a las 48h en las EECs en comparación con los controles no expuestos (**Figura 43D**).

Tras el cribado inicial de las concentraciones de Cu y Pb, las dos dosis más bajas de cada metal (50 y 100 μM para el Cu, y 30 y 100 μM para el Pb) se seleccionaron para los subsiguientes experimentos. Para el Cu, las dosis de 50 y 100 μM son dosis compatibles con aquellas encontradas en el líquido endometrial de mujeres portadoras de un DIU de Cu (Arancibia *et al.*, 2003). Aunque la dosis de Cu 100 μM disminuyó significativamente la viabilidad celular respecto a las células control no expuestas, el número de células viables todavía se incrementó con el tiempo en nuestros experimentos. Sin embargo, este ensayo no discrimina entre efectos antiproliferativos y/o muerte celular. Además, la dosis más alta de Cu (200 μM) no mostró ningún incremento en el número de células viable con el tiempo, indicando que esta dosis sí está comprometiendo la viabilidad celular. Para el Pb, la dosis más

alta (500 μM) no afectó negativamente a la viabilidad celular, pero no se observó un efecto concordante de dicha dosis en las ESCs y EECs. Así pues, las dos dosis más bajas (30 y 100 μM), que sí presentaron el mismo efecto y la misma tendencia en ambos tipos celulares, fueron elegidas para los siguientes experimentos.

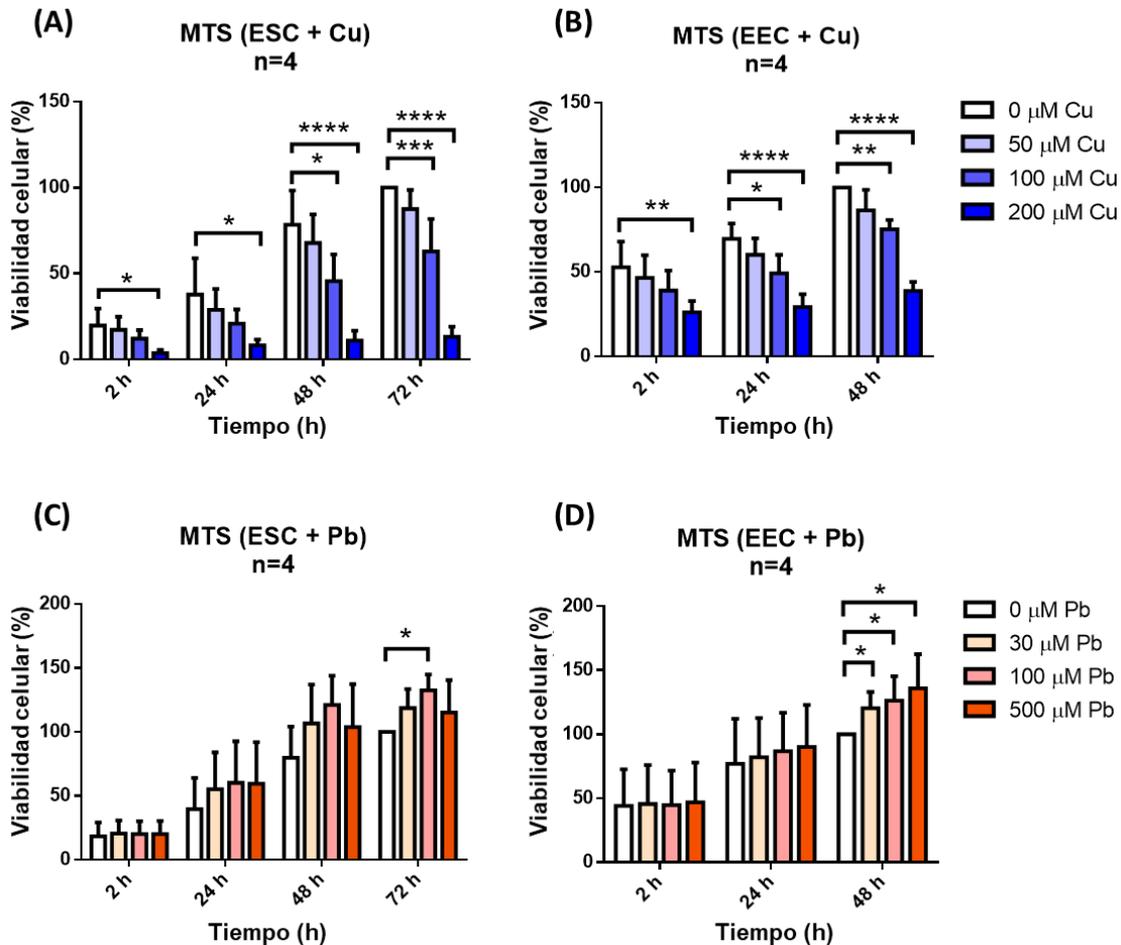


Figura 43. Efecto del Cu y Pb sobre la viabilidad de las ESCs y EECs. (A,B) Cuantificación de los resultados del ensayo MTS para las ESCs (A) y las EECs (B), tratadas con Cu (0, 50, 100 y 200 μM) durante 72 h y 48 h, respectivamente. (C,D) Cuantificación de los resultados del ensayo MTS para las ESCs (C) y para las EECs (D) tratadas con Pb (0, 30, 100, 500 μM) durante 72 h y 48 h, respectivamente. La viabilidad se midió cada 24 h. Los datos se expresaron como el porcentaje de viabilidad celular relativa a los controles no expuestos a tiempo final, 72 h para ESCs (A,C), y 48 h para EECs (B,D) (100% viabilidad) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Figura sacada del artículo (Pérez-Deben *et al.*, 2020).

2.3 La exposición a Cu y Pb inhibe la decidualización in vitro de las ESCs

Para determinar si la exposición a Cu o Pb afecta a la capacidad de *decidualización in vitro* de las ESCs, dichas células tratadas con Cu o Pb se decidualizaron con P4 + E2 durante 7-8 días en presencia de estos metales pesados. La decidualización se evaluó entonces midiendo

los niveles de la proteína PRL secretada al medio por medio de un kit de ELISA y a nivel celular midiendo la expresión génica (mRNA) de dicho marcador de decidualización por medio de RT-qPCR. También se analizó la morfología del citoesqueleto de actina por medio de una tinción específica para los filamentos de actina.

Después de 7-8 días de decidualización, los niveles de PRL secretada disminuyeron significativamente en células expuestas a 30 μM de Pb (~60%; $p < 0,01$) y a 100 μM de Pb (30%; $p < 0,0001$) en comparación a los niveles detectados en dESCs no expuestas a metales pesados (100% de decidualización) (**Figura 44A**). Las concentraciones de Cu de 50 y 100 μM tuvieron un efecto similar en los niveles de PRL secretada, disminuyendo ambas dosis los niveles medios de PRL por debajo del 10 % de las dESCs no expuestas ($8,39 \pm 8,97$ para Cu 50 μM y $7,01 \pm 5,90$ para Cu 100 μM ; media \pm SD, $p < 0.0001$) (**Figura 44B**). La expresión a nivel de mRNA del gen de PRL, también mostró una disminución dosis dependiente en dESCs expuestas a Pb y Cu, pero sin observar diferencias significativas debido a la alta variabilidad entre muestras encontrada principalmente en las dESCs no expuestas a metales pesados (**Figura 44; C,D**).

La disposición u organización del citoesqueleto se analizó usando una tinción específica para los filamentos de actina (faloidina-rodamina) para confirmar que la exposición a Cu y/o Pb bloquea la decidualización. No se observaron considerables cambios en la morfología o disposición del citoesqueleto en las dESCs comparado con las ndESCs, ni siquiera en las dESCs a la dosis 0 μM (**Figure 45; A-J**). Las ndESCs y dESCs no expuestas y expuestas a 30 o 100 μM de Pb, mostraron una morfología tipo fibroblasto alargada (**Figura 45; A-F**), mientras que sólo unas pocas dESCs mostraron la típica morfología poligonal-redondeada de las células decidualizadas (**Figura 45; B,D,F**). Sin embargo, células expuestas a Cu difirieron de las células no expuestas y de aquellas expuestas a Pb, exhibiendo una morfología poligonal a 50 y 100 μM de Cu tanto en ndESCs como en dESCs (**Figura 45; G-J**).

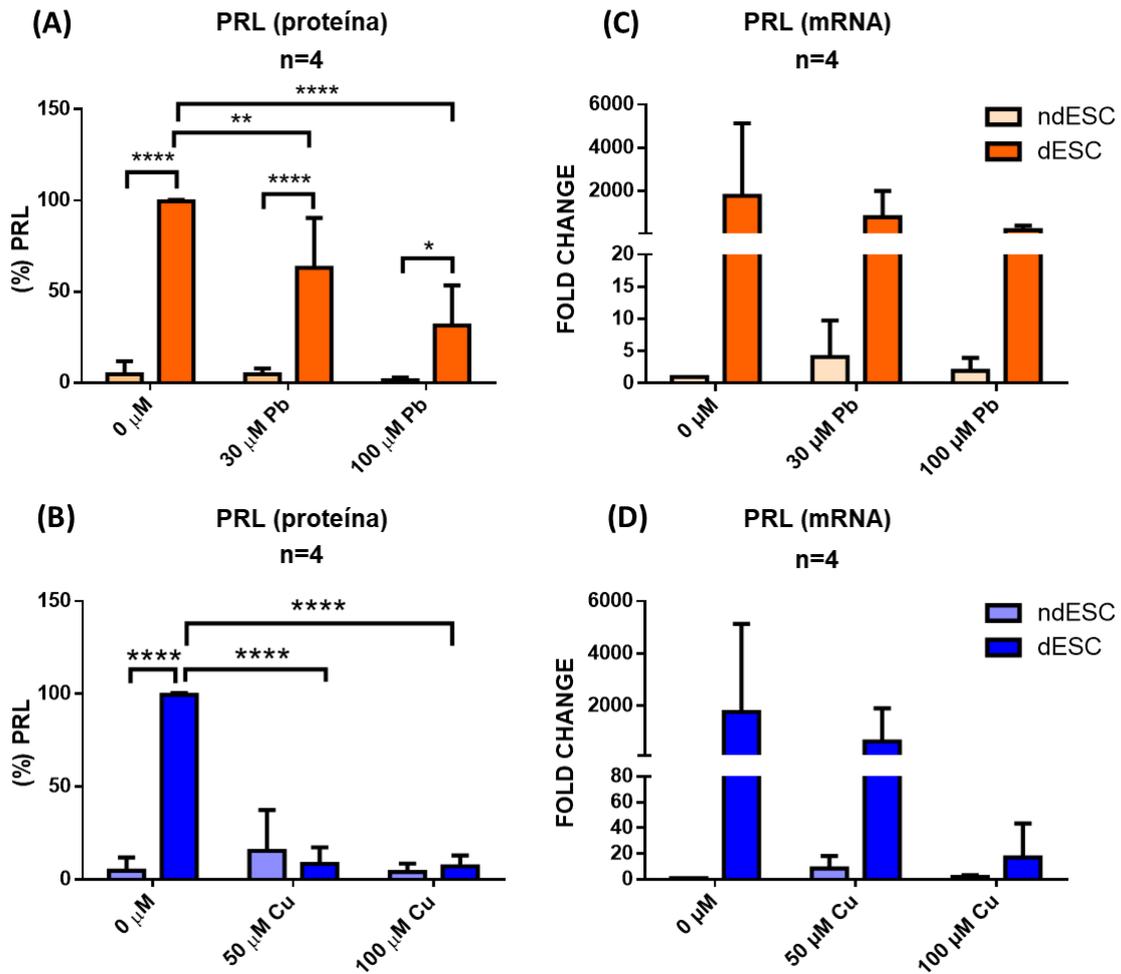


Figura 44. La decidualización *in vitro* de las ESCs se ve inhibida en presencia de Cu y Pb. (A,B) Cuantificación por ELISA de los niveles de PRL secretada al medio por parte de las ndESCs y dESCs expuestas a Pb (A) o Cu (B). Los niveles de PRL secretados se referenciaron a la condición decidual no expuesta (100%) y se representaron como el porcentaje medio de decidualización \pm SD ($n = 4$). **(C,D)** Cuantificación por RT-qPCR de los niveles de expresión del gen PRL (mRNA) en ndESCs y dESCs expuestas a Pb (C) o Cu (D). Los datos de mRNA de PRL se expresaron como el fold change medio \pm SD ($n=4$) ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; $****p < 0,0001$). Figura sacada del artículo Pérez-Deben et al., 2020.

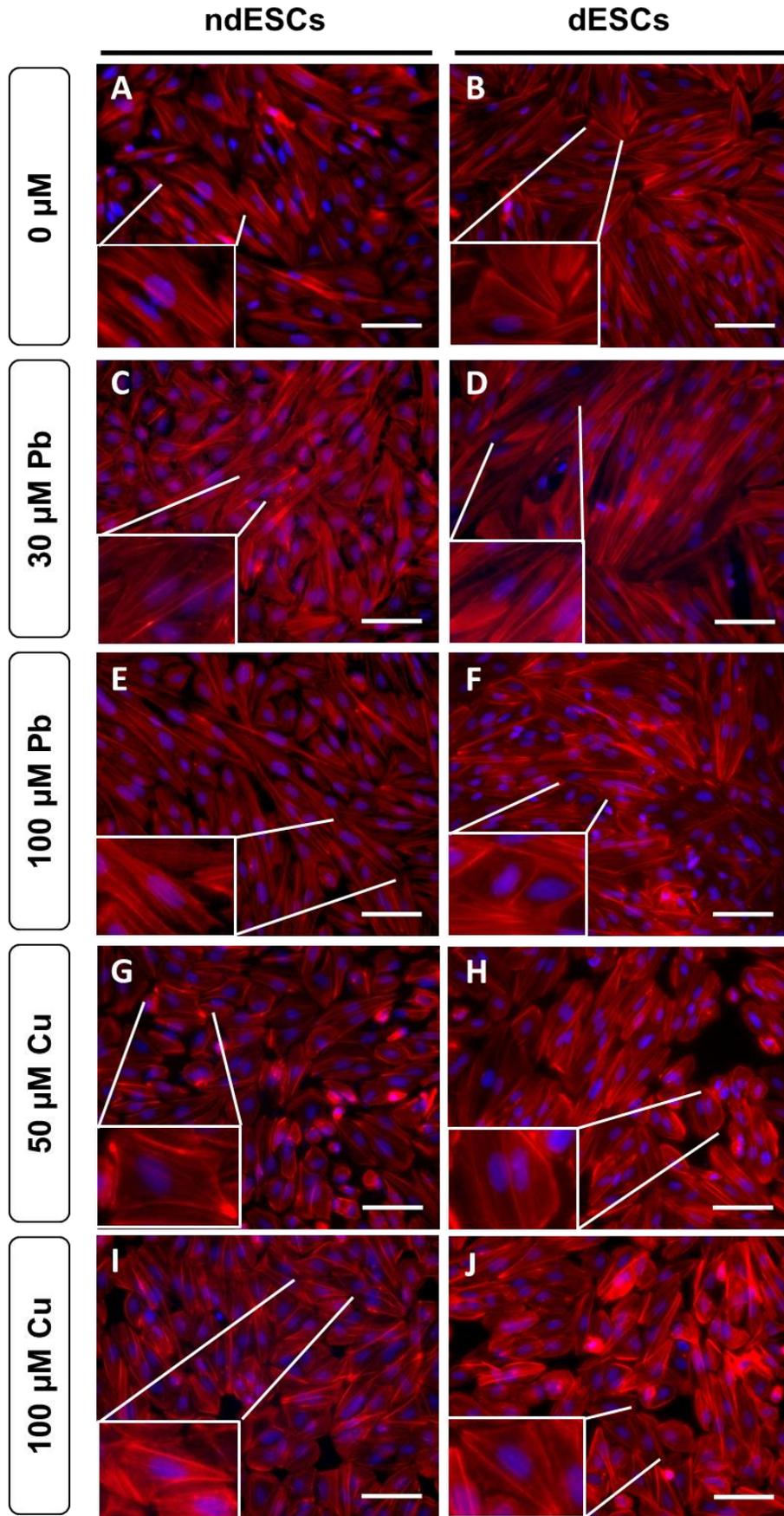


Figura 45. Disposición de los filamentos de actina del citoesqueleto de las ndESCs y dESCs en presencia de Cu y Pb. Micrografías fluorescentes representativas de la morfología del citoesqueleto por medio de la tinción de los filamentos de actina en ndESCs y en dESCs expuestas a Pb (A-F) o Cu (G-J). En rojo se tiñen los filamentos de actina, y en azul los núcleos. Se incluye una barra de escala de 300 μm . Figura sacada del artículo Pérez-Debén et al., 2020.

2.4 El Cu y Pb alteran la expresión de los genes $ER\alpha$, PR y HOXA10 durante el proceso de decidualización

Se analizó la expresión de los receptores esteroideos (PR y $ER\alpha$) en ndESCs y dESCs tratadas con Cu o Pb. El estímulo de decidualización (P4+E2) aumentó por sí solo la expresión del mRNA de PR y $ER\alpha$ en las dESCs no expuestas (**Figura 46; A-D**). Sin embargo, la expresión de PR y $ER\alpha$ fue considerablemente menor en dESCs expuestas a 30 y 100 μM de Pb (**Figura 46; A,C**) y a 50 y 100 μM de Cu (**Figura 46B,D**) en comparación a las dESCs no expuestas, aunque las diferencias no fueron significativas, debido en parte a la alta variabilidad encontrada en la expresión de estos genes dentro de la condición decidual no expuesta. La expresión de $ER\alpha$ fue solamente significativamente diferente para dESCs expuestas a 50 y 100 μM de Cu en comparación a las dESCs no expuestas ($p < 0,05$) (**Figure 46D**).

También se midió la expresión del marcador de receptividad endometrial $HOXA10$ por RT-qPCR en ndESCs y dESCs expuestas a Cu o Pb para determinar si la exposición a dichos metales pesados afecta al estado de receptividad del endometrio. Tanto las ndESCs como las dESCs expuestas a Pb (30 y 100 μM) o a Cu (50 y 100 μM) vieron disminuida los niveles de mRNA de $HOXA10$ en comparación con los controles no expuestos (0 μM) (**Figura 46; E,F**). Esta reducción fue significativa para las dosis 30 y 100 μM de Pb en comparación con las ndESCs no expuestas ($p < 0,05$) (**Figure 46E**) y a la dosis de 50 μM de Cu en las ndESCs ($p < 0,001$) y dESCs ($p < 0,01$) en comparación a sus respectivos controles no expuestos (**Figura 46F**). Sin embargo, a dosis más altas de Cu (100 μM), el efecto sobre la disminución de la expresión de $HOXA10$ fue menor, sin llegar a ser significativo. Esta falta de relación dosis-respuesta es típica de los disruptores endocrinos, ya que muchos de ellos muestran un comportamiento no monotónicos y efectos a bajas dosis, no observables a altas dosis.

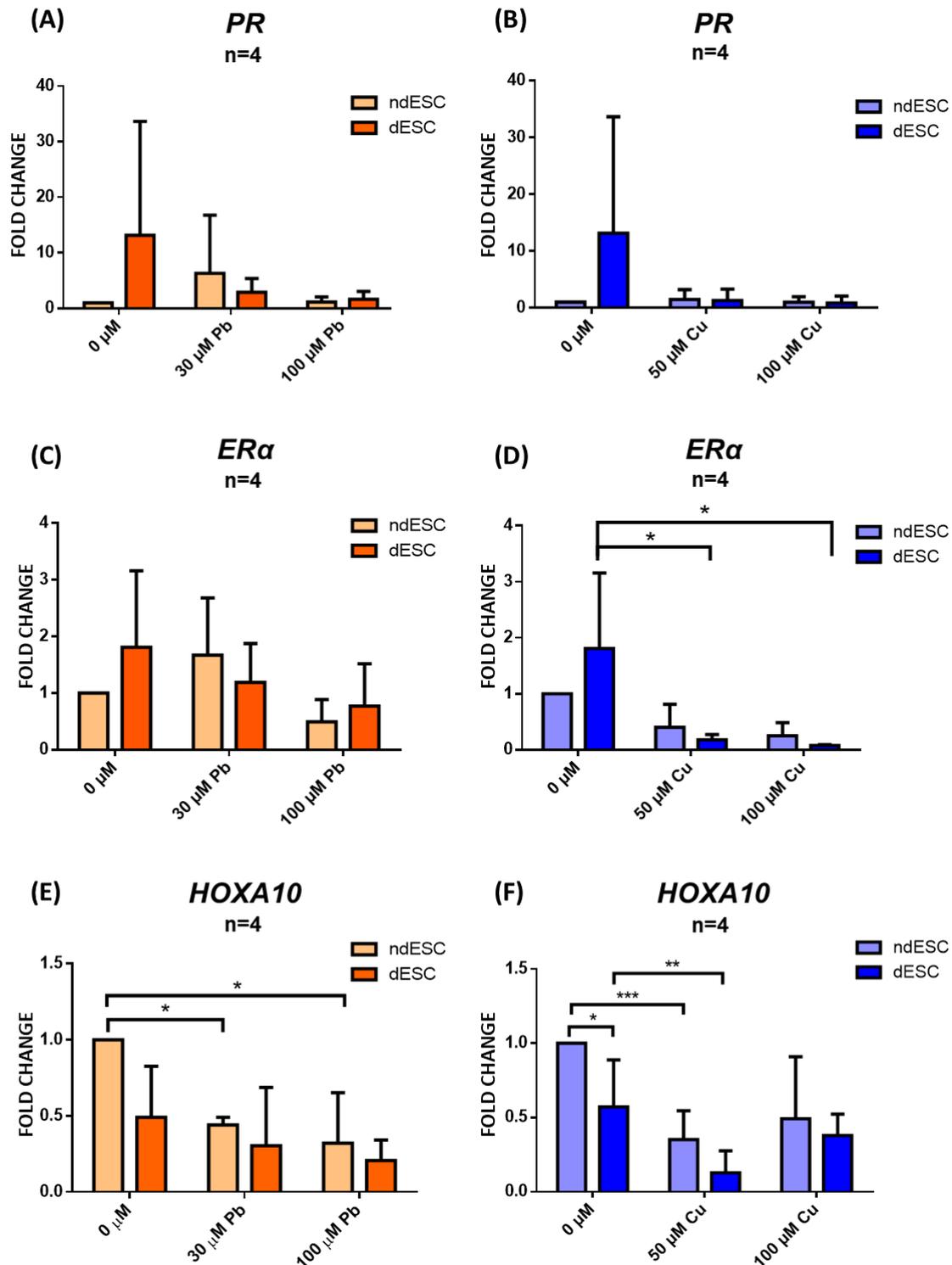


Figura 46. Efecto de la exposición al Cu y Pb sobre la expresión génica de los receptores esteroideos (*ERα* y *PR*) y del gen *HOXA10* durante la decidualización. (A,B) Fold changes para la expresión del mRNA del *PR* en ndESCs y dESCs expuestas a Pb (A) o Cu (B). (C,D) Fold changes para la expresión del mRNA del *ERα* en ndESCs y dESCs expuestas a Pb (C) o Cu (D). (E,F) Fold changes para la expresión del mRNA de *HOXA10* en ndESCs y dESCs expuesta a Pb (E) o Cu (F). En naranja se muestran los resultados para el Pb (0,30, 100 μM); en azul los resultados para el Cu (0,50, 100 μM). Los valores de fold changes se calcularon por el método $2^{-\Delta\Delta ct}$, se normalizaron frente al housekeeping interno GAPDH, y se referenciaron frente a las

ndESCs no expuestas (fold change = 1). Los datos para los niveles de mRNA para *PR*, *ER α* , y *HOXA10* se expresaron como el fold change medio \pm SD (n=4) (* p < 0,05 ** p < 0,01; *** p < 0,001). Figura sacada del artículo Pérez-Debén et al., 2020.

2.5 La exposición a Cu y Pb incrementa de manera leve la apoptosis en dESCs

Para determinar si la disminución observada en los niveles de secreción de PRL en dESCs expuestas a metales pesados fue debido a un efecto citotóxico del Cu y Pb sobre la viabilidad celular, se midió la apoptosis en dESCs y ndESCs expuestas a diferentes dosis de Cu (50 y 100 μ M) o Pb (30 y 100 μ M) durante 7-8 días por medio de un ensayo TUNEL (**Figura 47; A,B y Figura 48; A-O**). La exposición a Pb no afectó a la tasa de apoptosis de las ndESCs con respecto al control no expuesto, mostrando una tasa media de apoptosis de < 2% (**Figura 47A y Figura 48; E-H**). Sin embargo, una concentración de 100 μ M de Cu incrementó significativamente la tasa de apoptosis, alcanzando un valor máximo de ~7% (p < 0,001) (**Figura 47; A,B y Figura 48; I,J**). En las dESCs expuestas a Cu (50 y 100 μ M) no se observó un incremento significativo de la apoptosis en comparación con las dESCs no expuestas a metales pesados (**Figura 47A,B**). Sin embargo, la dosis 100 μ M de Pb sí produjo una disminución significativa de la apoptosis respecto a las dESCs no expuestas (p < 0,05) (**Figura 47; A,B y Figura 48; M,N**). Además, las ESCs expuestas a 100 μ M de Cu mantuvieron una tasa de apoptosis similar en ambas condiciones, decidual y no decidual (**Figura 47; A,B y Figura 48; I,J,Ñ,O**).

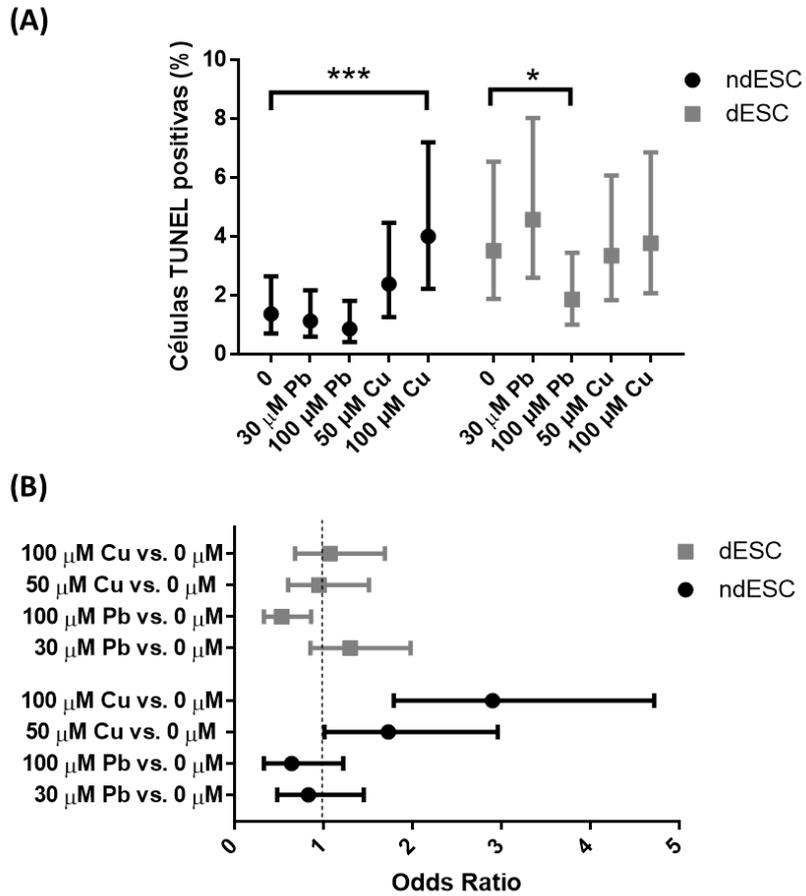


Figura 47. Análisis de la apoptosis en ESCs expuestas a Cu o Pb durante la deciduación por medio de un ensayo TUNEL. (A) Estimación del porcentaje medio de células ndESC y dESC TUNEL positivas expuestas a Pb (0, 30, 100 μ M) o a Cu (0, 50, 100 μ M) ($*p < 0,05$; $***p < 0,001$). **(B)** Valores del Odds Ratio (OR) para los resultados del ensayo TUNEL para ndESC y dESC expuestas a Pb (30, 100 μ M) o a Cu (50, 100 μ M) comparadas a los controles no expuestos. Figura sacada del artículo Pérez-Deben et al., 2020.

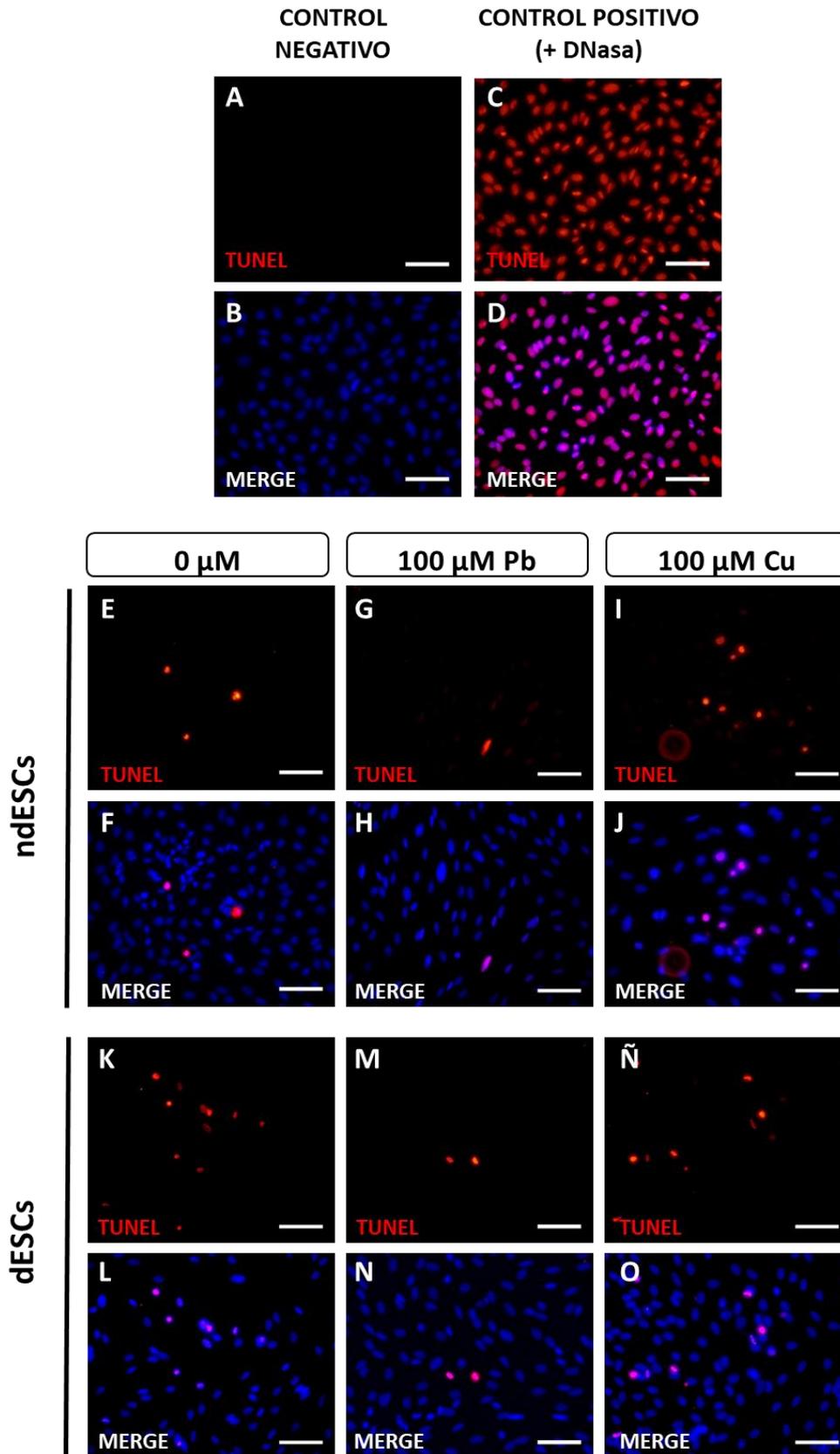


Figura 48. Apoptosis en ESCs expuestas a Cu o Pb durante la decidualización por medio de un ensayo TUNEL. (A-D) Micrografías fluorescentes representativas de las células TUNEL positivas (en rojo) referenciadas al total de células (azul, DAPI) para los controles negativo (sin la

transferasa terminal) y positivo (con DNasa). **(E-J)** Micrografías fluorescentes representativas de las células TUNEL positivas (rojo) versus el total de ndESCs (DAPI, azul) no expuestas a metales pesados (E,F) o expuestas a 100 μM de Pb (G,H) o a 100 μM de Cu (I,J). **(K-O)** Micrografías fluorescentes representativas de las células TUNEL positivas (rojo) versus el total de células dESCs (DAPI, azul) no expuestas a metales pesados (K,L) o expuestas a 100 μM de Pb (M,N) o a 100 μM de Cu (Ñ,O). Se incluye barra de escala de 300 μm . El 'merge' representa la superposición de ambas señales (roja y azul). El porcentaje de células TUNEL positivas de las imágenes de esta figura se corresponden con las gráficas de la figura 31. Figura sacada del artículo Pérez-Deben et al., 2020.

2.6 La exposición a Cu y Pb altera el estado proliferativo de las ESCs durante la decidualización.

El estado proliferativo de las ESCs expuestas a Cu y Pb se evaluó por medio de la tinción inmunofluorescente de Ki67 después de 7-8 días de cultivo para las ESCs no decidualizadas y decidualizadas. El porcentaje de células Ki67 positivas disminuyó significativamente y de manera dosis dependiente cuando las ndESCs fueron expuestas a Pb (30 y 100 μM) ($p < 0,001$) o a Cu (50 y 100 μM) ($p < 0,001$) en comparación con las ndESCs no expuestas (**Figura 49; A,B y Figura 50; A,B; E-L**). Se observó una disminución significativa de la señal Ki67 en el proceso de decidualización en dESCs no expuestas ($p < 0,05$) y en las dESCs expuestas a 50 μM de Cu ($p < 0,001$) en comparación con sus respectivos equivalentes no deciduales (**Figura 49A y Figura 50; A-D; I,J; P,Q**). El porcentaje de células Ki67 positivas permaneció similar para las dosis 30 y 100 μM de Pb en ambas condiciones (ndESCs y dESCs). En las dESCs, la dosis de Pb 30 μM incrementó significativamente el porcentaje de células positivas para Ki67 ($p < 0,05$), mientras que las dosis 50 y 100 μM de Cu disminuyeron significativamente dicho porcentaje ($p < 0,05$) en comparación con las dESCs no expuestas (**Figura 49; A,B y Figura 50; B,D; M-S**). Además, la exposición a Cu tuvo un mayor efecto en disminuir del estado proliferativo de las ESCs que el Pb, aunque no se detectó señal para Ki67 en las dESCs expuestas a 100 μM de Cu (**Figura 49; A,B y Figura 50; E-L, M-S**).

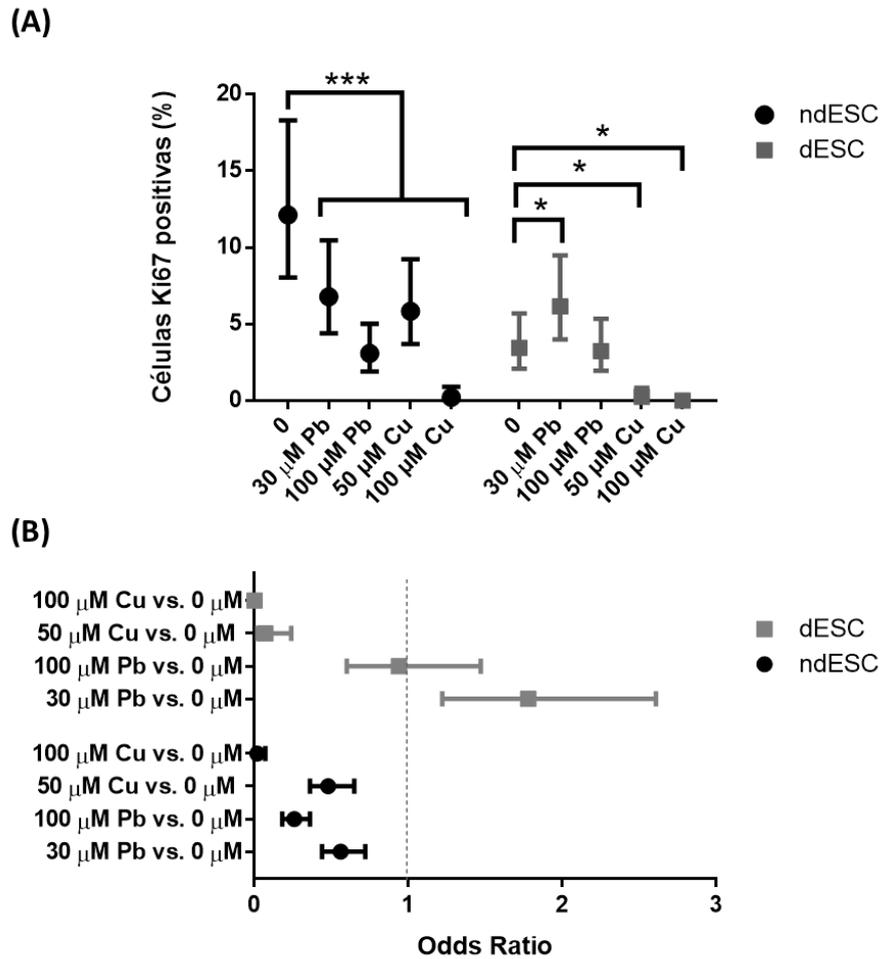


Figura 49. Inmunocitoanálisis del marcador de proliferación nuclear fluorescente Ki67 para el estudio del estado proliferativo de las ESCs expuestas a Cu y Pb durante la decidualización. (A) Porcentaje medio de las ndESCs y dESCs positivas para Ki67 tras el tratamiento con Pb (0, 30, 100 μM) o Cu (0, 50, 100 μM) (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; ### $p < 0,001$). Los asteriscos (*) indican la significancia entre las comparativas de cada dosis con su control no expuesto dentro de cada condición (decidual y no decidual) por separado. Las almohadillas (#) indican la significancia para la comparación de cada dosis entre condición decidual frente a no decidual. **(B)** Valores de Odds ratio (OR) para los datos de células Ki67 positivas en las condiciones no decidual y decidual. La significancia se estableció de acuerdo con el valor OR de cada dosis frente a 0 μM en ambas condiciones (no decidual y decidual). Figura sacada del artículo Pérez-Debén et al., 2020.

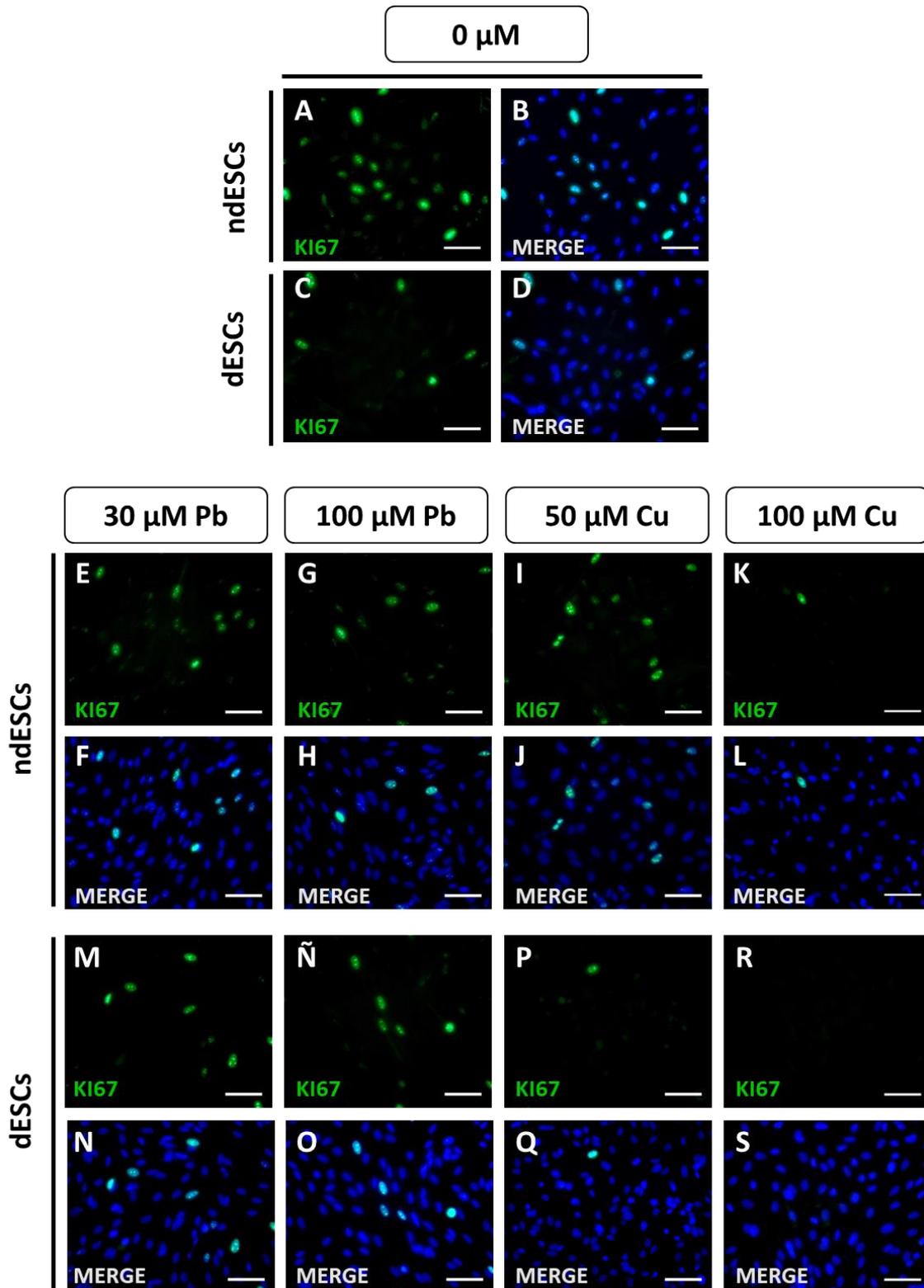


Figura 50. Estudio del estado proliferativo de las ESCs expuestas a Cu y Pb durante la deciduación mediante el marcador de proliferación celular fluorescente Ki67. (A-D) Micrografías representativas de la inmunofluorescencia para Ki67 (verde) y contratinción con DAPI nuclear (azul) de las ndESCs (A,B) y dESCs (C,D) sin tratar con los metales pesados. (E-L) Micrografías de fluorescencia representativas de la inmunotinción para Ki67 (verde) y para la contratinción con DAPI nuclear (azul) en las ndESC expuestas a Pb (E-H) o a Cu (I-L). (M-S)

Micrografías de fluorescencia representativas de la inmunotinción con Ki67 (verde) y contratinción con DAPI nuclear (azul) en dESCs expuestas a Pb (M-O) o a Cu (P-S). La barra de escala representa 300 μm . El ‘merge’ representa la superposición de ambas señales (verde y azul). El porcentaje de células Ki67 positivas de las imágenes de esta figura se corresponden con las gráficas de la figura 33. Figura sacada del artículo Pérez-Debén et al., 2020.

2.7 La exposición a Cu y Pb afecta a la adhesión trofoblástica de las EECs

Para evaluar el efecto funcional de la exposición a metales pesados en el proceso de adhesión trofoblástica, se llevó a cabo un modelo *in vitro* cocultivando esferoides JAR en monocapas de EECs previamente expuestas a Pb (0, 30, 100 μM) o a Cu (0, 50, 100 μM) durante 24h. La adhesividad se evaluó a las 24 h tras el cocultivo (**Figura 22**). En la monocapa de EECs no expuestas a metales pesados se alcanzó un porcentaje medio de adhesión del 66,7%. El cocultivo de esferoides JAR con monocapas de EECs expuestas a Pb (**Figura 51A**) o a Cu (**Figura 51B**) redujo aproximadamente un $\sim 28\%$ y un $\sim 39\%$ el porcentaje de esferoides JAR adheridos respectivamente, pero no se encontraron diferencias significativas con respecto a los controles no expuestos. En general, la exposición a Cu tuvo un mayor efecto ($\sim 27\%$ de adhesión) que el Pb ($\sim 40\%$ de adhesión) en la adhesión trofoblástica.

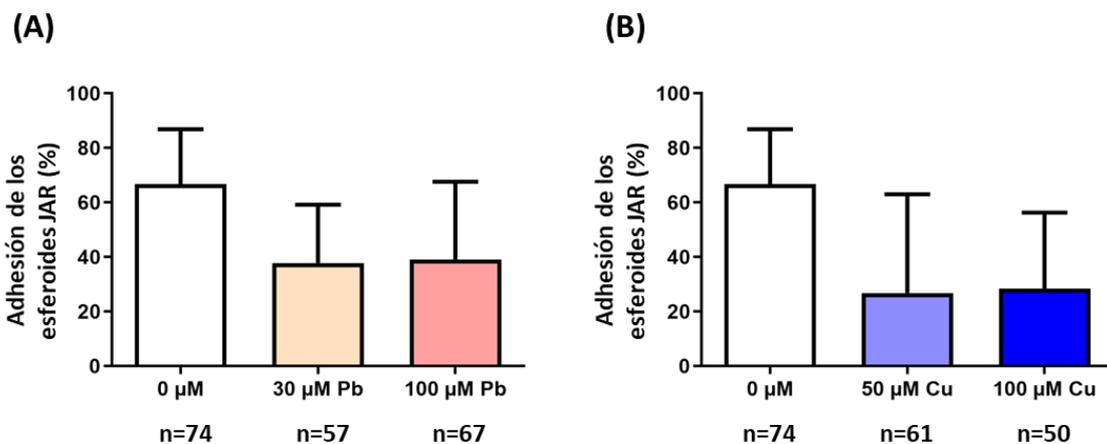


Figura 51. La exposición a Cu y Pb afecta a la adhesión de los esferoides JAR a las EECs. (A,B) Porcentaje medio de la adhesión de los esferoides JAR sobre monocapas de EECs expuestas a Pb (A) o a Cu (B) respecto al total de esferoides sembrados. Con la ‘n’ se designa el número total de esferoides JAR analizados en cada condición. Figura sacada del artículo Pérez-Debén et al., 2020.

2.8 La exposición a Cu y Pb altera la capacidad de migración de las EECs

La capacidad de migración de las EECs expuestas a Cu y Pb se evaluó *in vitro* con ensayos de cicatrización o ‘wound healing’. Para ello, la monocapa de EECs se expuso previamente y

durante 24h a Cu (0, 50, 100 μM) o a Pb (0, 30, 100 μM). Luego, se realizó una herida o raspado a mitad de cada monocapa de EECs ($n=4$) e inmediatamente fueron de nuevo expuestas a Cu (0, 50, 100 μM) o a Pb (0, 30, 100 μM) durante 48 h. La anchura de la herida se midió a tiempo 0 y las 24 y 48 h después de hacer la herida. Las EECs no expuestas a metales pesados alcanzaron un porcentaje de cierre de la herida del 70% a las 48 h (**Figura 52; A-C, O, P**). La exposición a 30 μM y 100 μM de Pb no tuvo efecto significativo en la tasa de cierre de la herida (**Figura 52; D-I, O**) ni a las 24 h ni a las 48 h respecto a las EECs no expuestas. Sin embargo, las EECs expuestas a 50 y 100 μM de Cu sí vieron reducida su capacidad de migración, consiguiendo un menor porcentaje de cierre de la herida (~47% y ~29%, respectivamente) en comparación con las células no expuestas, a las 48h de haber hecho la herida. Esta reducción fue sólo significativa para la dosis 100 μM de Cu ($p < 0,05$) (**Figura 52; J-Ñ, P**).

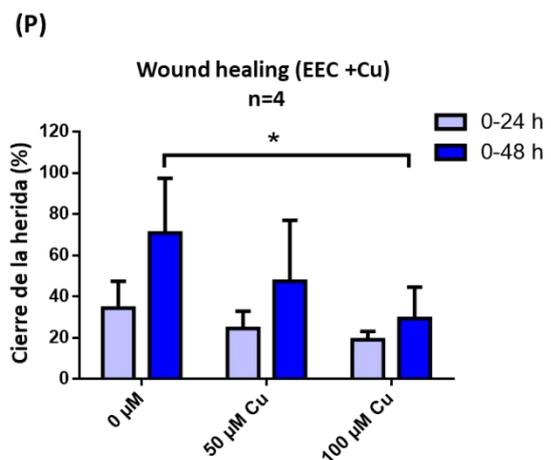
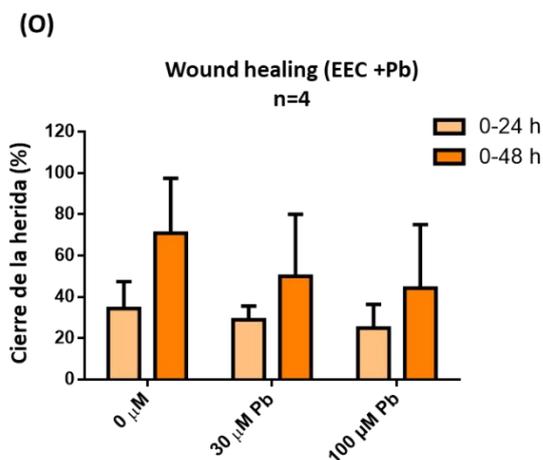
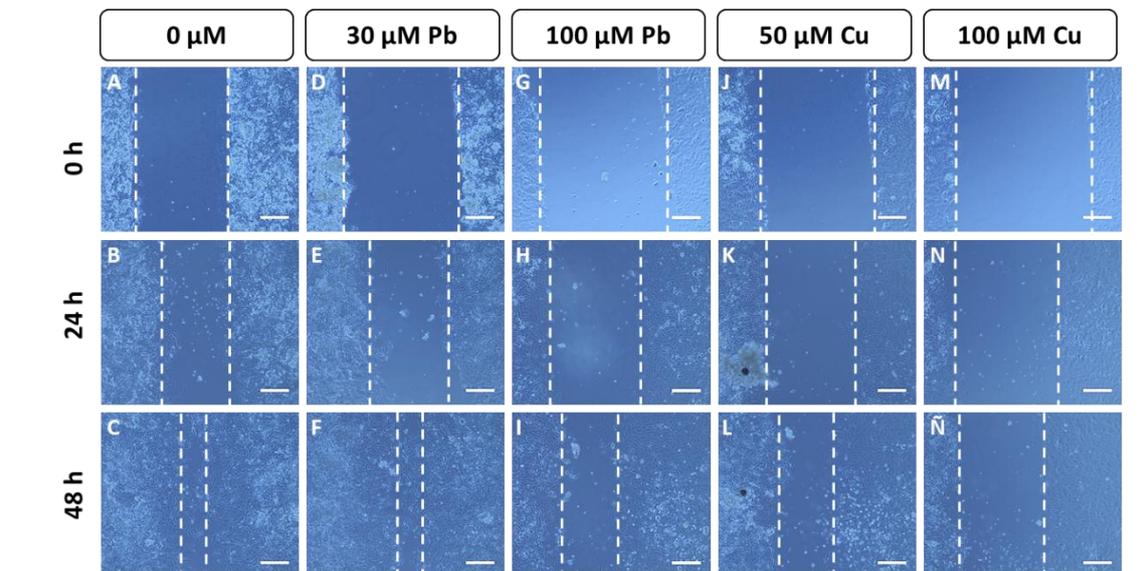


Figura 52. Efecto del Cu y Pb en la reconstrucción/cicatrización de la capa epitelial endometrial. (A-Ñ) Imágenes representativas de la anchura de la herida para cada punto de tiempo en las monocapas de EECs expuestas a Pb (0, 30, 100 μM) o a Cu (0, 50, 100 μM). La anchura de la herida se midió por análisis de imagen a las 24 y 48 h tras el raspado o 'scratching', haciendo 3-4 medidas a lo largo de la herida. La barra representa una escala de 100 μm . **(O)** Cuantificación del porcentaje de cierre para las EECs tratadas con Pb durante 24 y 48 h. **(P)** Cuantificación del porcentaje de cierre para las EECs tratadas con Cu durante 24 y 48 h (* $p < 0,05$). Figura sacada del artículo Pérez-Debén et al., 2020.

2.9 La exposición a Cu y Pb no altera el estado ROS de las ESCs

Finalmente, para analizar si el Cu y Pb podrían alterar el estado oxidativo del ambiente endometrial, se analizó la producción ROS en las ESCs expuestas a Pb (0,30 y 100 μM) o a Cu (0,50 y 100 μM) durante 24 h (n=4). Aunque no se observaron diferencias significativas en la producción de ROS por parte de las ESCs para ninguna de las dosis de Cu y Pb analizadas en comparación con la de las ESCs no expuestas (**Figura 53; A-M**), sí que se observó un incremento de la fluorescencia en las ESCs expuestas a 50 y 100 μM de Cu (**Figura 53; A, J-M**). Como cabría esperar, sólo se encontraron diferencias significativas entre el control positivo y todas las demás dosis ($p < 0,05$) (**Figura 53A**).

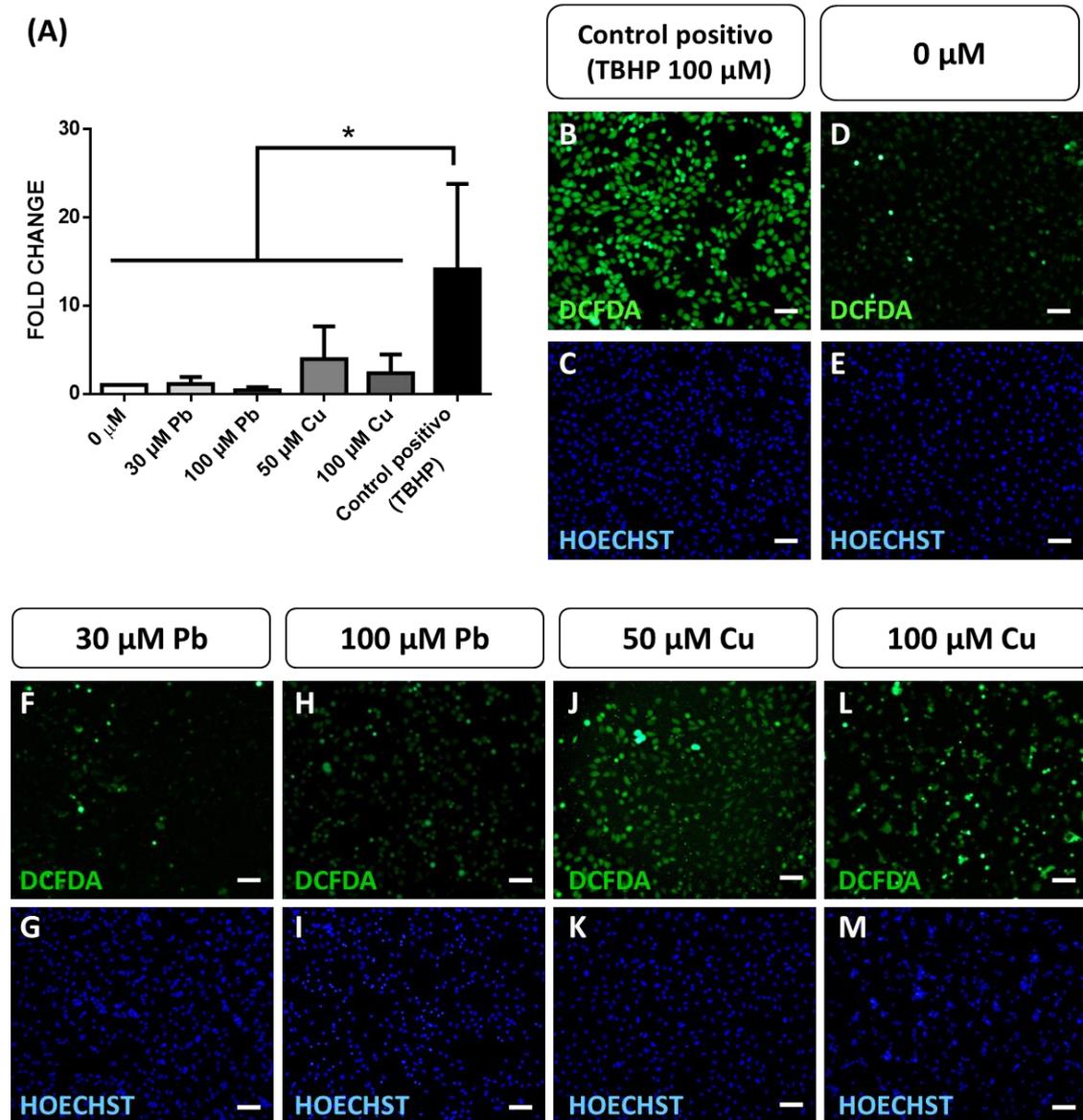


Figura 53. Medición de la producción de ROS en ESCs expuestas a Cu o Pb. (A) Cuantificación relativa de los fold changes en la producción de ROS por análisis de fluorescencia de las células teñidas con DCFH-DA expuestas a Pb (30 y 100 μM) o a Cu (50 y 100 μM) durante 24 h. El número de células positivas para ROS se normalizó con el número de células por pocillo y se expresó como fold change de las células no expuestas. Se representó el fold change medio \pm SD ($n = 4$) ($*p < 0,05$). (B,C) Micrografías de fluorescencia representativas del control positivo, que fueron expuestas a 100 μM de TBHP para inducir la producción de ROS, teñidas para DCFDA (verde) y Hoechst (azul). (D-M) Micrografías de fluorescencia representativas de la producción de ROS en ESCs no expuestas a metales pesados (D) y ESCs tratadas con Pb (30 y 100 μM) (F,H) o con Cu (50 y 100 μM) (J,L) durante 24 h, teñidas para DCFDA (verde) y Hoechst (azul). La barra de escala representa 300 μm. Figura sacada del artículo Pérez-Debén et al., 2020.

DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

1. Discusión parte I: Estudio proteómico de la receptividad endometrial

1.1 Transcriptómica y proteómica, dos aproximaciones complementarias, pero no comparables en el estudio de la receptividad endometrial

Se ha invertido mucho esfuerzo en intentar comprender tanto los mecanismos moleculares que llevan al endometrio humano a un estado receptivo durante la “ventana de implantación” (Revel, 2012; Ruiz-Alonso *et al.*, 2012; von Grothusen *et al.*, 2014) así como los que conducen a un estado de no receptividad (Brosens *et al.*, 2014). El fallo recurrente de implantación o ‘RIF’ en inglés, es uno de los principales factores limitantes del éxito de los TRA y por tanto una de las ‘alteraciones endometriales’ con más afán por estudiar a nivel -ómico, sobre todo en aquellos casos en los que se trata de RIF idiopáticos donde ni el embrión ni una patología endometrial de base son los desencadenantes. Aproximadamente, dos tercios de los fallos de implantación reportados son causados por una receptividad endometrial inadecuada, mientras que el embrión por sí mismo es el responsable de sólo un tercio de los casos (Achache H *et al.* 2006; Ledee-Bataille N *et al.* 2002). Todo esto apunta a que la causa mayoritaria de los RIF idiopáticos sea un defecto en los mecanismos moleculares del endometrio implicados en la adquisición de la receptividad endometrial, ya sea a nivel transcriptómico y/o proteómico. El establecimiento de la receptividad endometrial es un proceso crucial para conseguir implantación con éxito. La regulación de la expresión génica en este proceso tan complicado puede ocurrir a diferentes niveles, tales como la transcripción y traducción. Así pues, los análisis a nivel del genoma completo o también llamados análisis Genome-wide, han proporcionado información sobre todo de los cambios de expresión a nivel de mRNA a lo largo del ciclo endometrial (Talbi *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2014). Cada vez hay más evidencias que apoyan el concepto de un perfil de expresión génica receptivo (Díaz-Gimeno *et al.*, 2010; Bhagwat *et al.*, 2013; Garrido-Gómez *et al.*, 2013) que puede estar alterado en pacientes con RIF (Koler *et al.*, 2009; Díaz-Gimeno *et al.*, 2010; Ruiz-Alonso *et al.*, 2014). De hecho, recientemente y por primera vez se ha desarrollado una herramienta basada en transcriptómica capaz de establecer y validar la huella o firma de expresión génica endometrial asociada al RIF (Koot *et al.*, 2016). Sin embargo, las tecnologías empleadas para los análisis transcriptómicos (microarrays y RNAseq), no necesariamente representan bien los niveles de proteínas presente en los tejidos. Por lo tanto, la proteómica también se ha utilizado para

clarificar los cambios de expresión de proteínas entre un endometrio no receptivo y otro receptivo (DeSouza et al., 2005; Domínguez et al. 2009; Chen Q et al., 2015; Garrido-Gomez T 2014). En lo que respecta a la metodología iTRAQ, un método de análisis proteómico libre de gel basado en marcaje isobárico, hasta la fecha se ha utilizado para revelar el proteoma de tejidos eutópicos y ectópicos endometriales (Marianowski P et al., 2013) y para evaluar los efectos del agonista de la GnRH en el perfil proteómico endometrial (Meng Y., 2014).

En esta primera parte de la tesis se ha empleado la metodología iTRAQ para caracterizar los proteomas de un endometrio receptivo (donantes fértiles), un endometrio refractario (mujeres portadoras de un DIU-Cu) y un endometrio con RIF con el fin de identificar proteínas diferencialmente expresadas que puedan servir como potenciales biomarcadores de la receptividad endometrial. Hasta ahora, este es el primer estudio que ha llevado a cabo un análisis proteómico comparativo y cuantitativo entre tres diferentes estados de receptividad endometrial usando la metodología iTRAQ. Comparado con los primeros ensayos proteómicos basados en gel (2DE), el iTRAQ muestra un mayor poder de resolución pues permite detectar un mayor número de proteínas entre las cuales se incluyen proteínas de membrana, proteínas muy ácidas, muy básicas y proteínas muy grandes y pequeñas. Además permite hacer pool o agrupaciones de hasta 8 muestras por análisis de MS disminuyendo con ello la variación técnica (Christoforou and Lilley, 2012). Algunos de los estudios proteómicos basados en gel y llevados a cabo en endometrios en fases LH+2 (prereceptiva) y LH+7 (receptiva) identificaron 9 (Mahonar et al., 2014), 16 (Bissonnette et al., 2016), 31 (Li et al., 2006) y 32 (Domínguez et al., 2009) PDEs respectivamente, sin llegar a observarse cambios comunes en proteínas entre estos cuatro estudios. Sólo 8 PDEs mostraron un solapamiento entre los trabajos de Li y Domínguez. En el presente trabajo hemos conseguido detectar entre 2.500 y 3.500 proteínas por experimento iTRAQ, con 1.889 proteínas comunes entre los 4 experimentos iTRAQs llevados a cabo. Entre ellas se encuentran proteínas previamente descritas en endometrio humano y encontradas diferencialmente expresadas en condiciones de receptividad diferentes o entre distintas fases del ciclo endometrial como son: la apolipoproteína A1 (Brosens *et al.*, 2009), la antitrobina III (Hannan *et al.*, 2010), la anexina A4 (Brosens *et al.*, 2009; Domínguez *et al.*, 2009), y la estatmina 1 (Domínguez *et al.*, 2009). En nuestro estudio, al realizar los análisis diferenciales entre grupos, se llegaron a detectar un total de 133 PDEs entre los grupos DIU y Fértil, y 158 PDEs entre los grupos DIU y RIF. Esta discrepancia en el número de PDEs obtenidas entre los estudios previos y el nuestro puede deberse a las diferentes sensibilidades de las aproximaciones proteómicas empleadas ('basadas en gel' frente a 'libres de gel'), así como a las diferencias en las proteínas producidas por el tipo de tejido empleado (estado de fertilidad,

tiempo exacto de la toma de la muestra, edad, etc). La proteómica y la transcriptómica, aunque son métodos complementarios que proporcionan información diversa, podrían ser comparables a la hora de mejorar nuestro conocimiento sobre la receptividad endometrial y la identificación de biomarcadores claves. Sin embargo, la relación entre mRNA y proteínas es bastante compleja y no siempre suele haber una correlación directa entre ellos. Además, muchos de los estudios en los que integran proteoma y transcriptoma muestran que el mRNA es un pobre indicador de los niveles de expresión de proteínas. Esto es debido en parte a las modificaciones postranscripcionales y postraduccionales, a la cantidad de proteína activa, que viene dada entre otros factores por su localización y vida media, y por el método experimental usado para medir proteínas y mRNA, que también afectan a esta correlación (Hack et al., 2004).

En la literatura existen dos estudios transcriptómicos basados en microarrays en los que estudian cómo afecta un DIU inerte y el Cu en la expresión génica endometrial. En uno de ellos, el de Horcajadas (Horcajadas et al., 2006), se compararon los perfiles transcriptómicos endometriales de mujeres portadoras de un DIU inerte de plástico, antes (Pre-DIU) y durante su uso (DIU). En el otro, el de Carrascosa (Carrascosa et al., 2017), se estudia el efecto del Cu en el patrón de expresión génica de células endometriales estromales decidualizadas *in vitro*, con el fin de evaluar el efecto adicional que podrían tener los DIU de Cu frente a los inertes, debido a la liberación de iones de Cu en el endometrio. Estos estudios podrían compararse con los resultados obtenidos de nuestra comparación entre los grupos DIU-Cu y fértil, aunque se aplicaron diferentes metodologías (microarrays frente a iTRAQ) y diferentes tratamientos hormonales (LH+7 en ciclo natural en el de Horcajadas; MPA+E2 en cultivo *in vitro* en el de Carrascosa y P+5 en nuestro estudio) entre ellos. Comparando los 147 genes diferencialmente expresados obtenidos en el trabajo de Horcajadas con nuestras 133 PDEs de la comparativa DIU-Cu frente a Fértil, sólo 8 genes/proteínas fueron compartidas entre ambos trabajos. Al comparar los 129 genes diferencialmente expresados en el trabajo de Carrascosa con nuestras 133 PDEs, también sólo 8 genes/proteínas se correspondieron entre ambos trabajos. Al comparar los tres trabajos, sólo dos proteínas, la plastina 2 (PLSL) y el inhibidor serin proteasa 1 (SERPING1), fueron compartidas, pero no mostraron el mismo patrón de expresión en los tres trabajos. La PLSL y la SERPING1 estuvieron sobreexpresadas en los trabajos que utilizaron Cu, con unos fold change de 2.68 (células tratadas con Cu/ células sin Cu; Carrascosa et al., 2017) y 1.25 (DIU-Cu/Fértil; Pérez-Debén S. et al., 2019) para la PLSL y unos fold changes de 3.11 (células tratadas con Cu/ células sin Cu; Carrascosa et al., 2017) y de 1.22 (DIU-Cu/Fértil; Pérez-Debén S. et al., 2019) para la SERPING1. Sin embargo, estuvieron menos expresadas en

el grupo de mujeres con DIU inerte en el trabajo de Horcajadas (FC DIU/pre-DIU = -2.63 para la PLSL y de -2.83 para la SERPING1). Esta baja correlación obtenida en cuanto al número de genes/proteínas compartidas entre los estudios transcriptómicos y el nuestro, proteómico, junto al distinto patrón de expresión seguido en ellos, apoya la idea de que el mRNA no refleja los niveles de proteínas. A pesar de ello, la similitud obtenida en cuanto al patrón de expresión de estas dos proteínas en los grupos con Cu, hacen pensar que el Cu pueda tener un efecto añadido sobre los DIU inertes. La plastina 2, de hecho, ha sido seleccionada en nuestro trabajo como posible candidata con implicación en la receptividad endometrial, presentando una mayor expresión en el grupo DIU que en el RIF y Fértil. La proteína SERPING1, también parece tener un papel importante en la receptividad endometrial o en el mecanismo de acción del Cu sobre la misma, ya que es una proteína que juega un papel importante en regular los sistemas del complemento, coagulación, fibrinólisis, y los procesos de inflamación (Valencia RM, et al 2019). Concretamente bloquea la acción de proteínas que promueven la inflamación incrementando la permeabilidad de las paredes de los vasos sanguíneos. Se sabe que el Cu es capaz de incrementar la reacción inflamatoria que ocurre a nivel endometrial en presencia de un DIU. Ante esta situación proinflamatoria, es posible que a nivel endometrial se activen otras proteínas que intenten compensar esta sobreinflamación como es el caso de la SERPING1.

1.2 La plastina 2, la lactotransferrina y la lisozima en el endometrio y sus posibles roles en la receptividad endometrial

Las plastinas son una familia de proteínas de unión a actina muy conservadas a lo largo de la evolución y que se expresan en muchos tejidos de los mamíferos superiores (Lin *et al.*, 1993). Están implicadas en la regulación o dinámica del citoesqueleto de actina de las células eucariotas, que es esencial para funciones celulares tan fundamentales como la división celular, el tráfico intracelular, la morfología y motilidad celular. Aunque la plastina 2, también conocida como L-plastina, se expresa principalmente en células del linaje hematopoyético y en células cancerosas de tejidos sólidos (no hematopoyéticos), también se ha visto expresada a nivel endometrial en cultivo primario de células endometriales estromales (Leavitt *et al.*, 1994). La expresión de esta proteína se asocia a células con alto potencial replicativo e invasivo, lo que conlleva una reorganización constante del citoesqueleto. El endometrio cumple estos requisitos, pues es un tejido que se divide activamente en cada ciclo endometrial, llegando a ser bastante invasivo en patologías como la endometriosis. El gen que codifica para la plastina 2 contiene elementos de respuesta potencial a la progesterona y estrógeno cadena arriba de su promotor (Lin *et al.*, 1993), sugiriendo que la plastina 2 está sujeta a la regulación por esteroides ováricos. Además, la plastina 2 puede jugar un papel subyacente en el

mantenimiento del fenotipo diferenciado adhesivo y secretor regulado hormonalmente, de las células del estroma endometrial a través de su interacción con las estructuras de los microfilamentos de actina en los sitios de adhesión y secreción de proteínas (Leavitt *et al.*, 1994). Esto está en parte apoyado por nuestra validación externa de la PLSL por inmunohistoquímica, la cual muestra que esta proteína se expresa durante la fase secretora del ciclo endometrial, especialmente en la fase secretora temprana en el compartimento estromal y a lo largo de la fase secretora media en el epitelio luminal. Por lo tanto la PLSL podría jugar un papel relevante en el proceso de 'la transformación de la membrana plasmática' del epitelio endometrial luminal, en la que dicho epitelio varía su morfología según la fase del ciclo menstrual (Murphy, 2004). Dicho proceso supone no sólo una serie de cambios estructurales a nivel de la membrana plasmática y citoesqueleto (Thie *et al.*, 1995; Murphy, 2004) con la formación de protuberancias citoplasmáticas o pinópodo (Murphy, 2000), sino también cambios a nivel bioquímicos y moleculares a nivel celular que son de vital importancia para que el endometrio adopte un fenotipo receptivo (Nikas and Makrigiannakis, 2003).

En humanos, la expresión de la lactotransferrina ha sido caracterizada a nivel endometrial, especialmente en un número restringido de células epiteliales glandulares localizadas en la *zona basalis* del endometrio (Walmer *et al.*, 1995). El gen de la lactotransferrina tiene un elemento de respuesta a estrógeno (ERE) en su promotor (Teng *et al.*, 2002), responsable de su regulación al alza en presencia de estrógeno (Teng *et al.*, 1992). Además, se ha detectado la expresión de esta proteína durante fase proliferativa pero no en la fase secretora (Teng *et al.*, 2002) del ciclo endometrial. En nuestro ensayo de inmunohistoquímica, apenas se detectó la expresión de esta proteína en dichas fases, aunque se observó un ligero incremento en la fase secretora temprana en los tres compartimentos endometriales con una señal muy débil en el compartimento del epitelio glandular. Sin embargo, la TRFL si fue detectada por western blot en los tres grupos de nuestro estudio, presentando una mayor expresión en el grupo DIU.

Finalmente, la lisozima es una proteína con propiedades antimicrobianas que participa en la defensa inmune innata en el endometrio humano (King *et al.*, 2003). El hecho de que estas tres proteínas sean más abundante en un endometrio con un DIU-Cu, podría estar relacionado con un incremento en la respuesta inmune endometrial desencadenada cuando un objeto extraño, como es el DIU, es introducido en la cavidad uterina. Estas proteínas se expresan principalmente en células del sistema inmune, y una de las funciones contraceptivas de los DIU es causar una respuesta inflamatoria local que evita que cualquier embrión pueda implantar. De hecho, está descrito que los DIU potencian aún más la respuesta secretora local,

es decir, una mayor liberación de proteínas procedentes del endometrio (lisozima, proteinasa neutral, IgA) y de los leucocitos (lisozima, lactotransferrina), sugiriendo que una característica del DIU es que está principalmente asociado con cambios en la respuesta secretora local (Tauber *et al.*, 1993).

1.3 La dualidad del RIF y las limitaciones del estudio

Existen dos puntos de vista respecto al origen endometrial del RIF, bien como una patología per sé con una firma transcriptómica específica (Macklon, 2017), en la que una perturbación constitutiva a nivel molecular de la función endometrial debe existir, o bien como un desplazamiento de la ventana de implantación, induciendo una desincronización entre el embrión y el endometrio receptivo (Valdes *et al.*, 2017). En nuestro estudio encontramos que los perfiles proteómicos de los tres grupos de estudio (fértil, DIU y RIF) difirieron el uno del otro, pero no se encontraron diferencias significativas individuales entre los endometrios de donantes fértiles y de pacientes con RIF. Esto sugeriría bien que un RIF idiopático puede no tener un origen propiamente endometrial, en la que otros factores desconocidos estarían implicados en su etiología, como podría ser el caso de la exposición a contaminantes ambientales o disruptores endocrinos, que al alterar los niveles hormonales endógenos podrían afectar a la capacidad endometrial de adquirir la receptividad endometrial, o bien la tecnología proteómica aquí aplicada no fue lo suficientemente capaz de encontrar las PDEs entre mujeres fértiles y pacientes con RIF a nivel endometrial.

Según muestra el PCA, los grupos RIF y DIU mostraron tener un patrón proteómico más estable, apareciendo como grupos bien definidos e independientes, sin embargo, el grupo de mujeres fértiles presentó un patrón proteómico endometrial más heterogéneo, con una distribución dispersa, solapando mayoritariamente con el grupo RIF y en menor proporción con el grupo DIU. Esto apoyaría el hecho de no haber encontrado diferencias significativas entre los grupos RIF y fértil. Aunque el tamaño muestral utilizado en nuestro estudio no es lo suficientemente alto como para sacar conclusiones al respecto, esta distribución aleatoria podría deberse a la alta heterogeneidad del estatus de receptividad endometrial presente en este grupo de mujeres, indicando que hay una gran cantidad de proteínas cuyos niveles de expresión varían mucho de unas mujeres fértiles a otras sin llegar a afectar a la receptividad endometrial. Esta heterogeneidad en el grupo fértil no parece ser inusual, pues en otro estudio se ha visto este patrón de distribución, incluso a nivel transcriptómico entre pacientes con RIF y con aborto recurrente (Huang J *et al.*, 2017). Sin embargo, también hay que tener en cuenta que estas mujeres fueron clasificadas como controles fértiles por haber tenido algún embarazo

con éxito en años/meses anteriores, pero desafortunadamente no implica necesariamente que sigan siendo fértiles en el momento en el que donaron la biopsia. Esto sería una limitación de nuestro estudio. Otra limitación, quizás más importante de este estudio, es que no se evaluó previamente la dotación cromosómica o composición genética de los embriones transferidos, pues muchas veces embriones de buena calidad morfológica son portadores de alguna aneuploidía responsable del fallo de implantación, y en estos casos el RIF no sería debido al factor endometrial sino al factor embrionario. Según esto, asumimos que dentro de nuestras pacientes con RIF habrá mujeres de todo tipo, con factor endometrial alterado y/o con factor embrionario, sin embargo, todas ellas presentaron un perfil proteómico endometrial bastante parecido según los resultados del PCA (agrupan de manera conjunta).

Muchas veces, la ausencia de significación estadística no implica necesariamente que no exista relación entre el factor de estudio y la respuesta. Puede ocurrir que, aún existiendo tal asociación o una diferencia relevante, el estudio haya sido incapaz de detectarla como estadísticamente significativa. Por eso, al analizar el poder estadístico asociado al análisis diferencial multivariante del iTRAQ (**Figura suplementaria 1. Anexo I**) sólo el 26% de las proteínas (500 proteínas) consiguieron un poder estadístico del 50% y aproximadamente el 6% (114 proteínas) consiguieron un poder estadístico del 90%. En general, considerando que una baja proporción de las proteínas consiguieron un alto poder estadístico, podríamos asumir que nuestra aproximación proteómica tiene la limitación de no ser capaz de detectar la mayoría del total de las diferencias en realidad existentes. Sin embargo, aquellas detectadas como significativas podemos asegurar que fueron detectadas con un alto grado de confianza. Sin embargo, se necesitaría un tamaño muestral mayor para poder detectar el total de las diferencias. Otra limitación de nuestro estudio fue la falta de una adecuada validación de los resultados del iTRAQ usando otra cohorte adicional representativa de los tres grupos de estudio. Aunque usamos una cohorte externa para validar las tres proteínas seleccionadas (TRFL, LYSC y PLSL) por inmunohistoquímica, las muestras procedieron únicamente de donantes fértiles. No hubo disponibilidad ni de muestras de endometrio de mujeres portadoras de un DIU, ni de mujeres con RIF para dicha validación.

Ya que una posible limitación de nuestro estudio es el pequeño tamaño muestral (Fértil =10, RIF=8 y DIU=10), las conclusiones sacadas de este estudio deberían ser consideradas preliminares, especialmente en vista de la heterogeneidad que suele haber entre poblaciones. Considerando la limitación implícita que lleva también el reclutar muestras biológicas a partir de humanos, podemos decir que, a pesar del bajo poder estadístico obtenido, una 'n' de 10 por grupo es un tamaño muestral relativamente alto al hablar de muestras humanas. Además,

a diferencias de otros trabajos proteómicos basados en iTRAQ, en el que sólo un experimento iTRAQ es llevado a cabo, bien haciendo pools y usando réplicas técnicas o simplemente analizando 2-3 muestras independientes por grupos, nosotros hemos llevado a cabo 4 análisis iTRAQ usando una 'n' aproximada de 10 por grupo a modo de réplicas biológicas sin la necesidad de hacer pools. Usar una técnica proteómica no basada en gel como es el iTRAQ, ofrece una mayor cobertura y sensibilidad al detectar un mayor número y rango de proteínas ofreciendo una cuantificación más precisa de perfiles proteómicos globales. Todo esto da más poder e inferencia estadística a nuestro estudio. Además, otro punto fuerte de este trabajo es que todas las muestras son recogidas en el mismo momento, obtenidas en el día P+5, ayudando a disminuir la varibilidad de los resultados.

Dado que no se detectaron PDEs entre los grupos fértil y RIF, era de esperar haber obtenido más proteínas compartidas entre las comparaciones por pares Fértil frente a DIU y RIF frente a DIU. Sólo 54 proteínas significantes (40,6%) de las 158 PDEs para la comparación Fértil frente a DIU y 54 (34,2%) de las 133 PDEs para la comparación RIF frente a DIU fueron compartidas entre ambas comparaciones. Esto resalta que un endometrio con RIF no es tan similar a un endometrio fértil como lo que cabría esperar viendo nuestros datos proteómicos, ya que cada comparación por pares tuvo sus PDEs específicas (79 para la comparación Fértil frente a DIU, y 104 para la comparación RIF frente a IUD). Sólo podemos decir que hay 54 proteínas diferencialmente expresadas para las cuales su abundancia fue casi la misma en los grupos Fértil y RIF, mostrando fold changes similares en las comparaciones Fértil frente a DIU y RIF frente a DIU (**Tabla 11**). En el caso de las PDEs exclusivas de cada comparativa, la abundancia de esas proteínas en los grupos Fértil y RIF no fue similar entre ellos, sino que presentaron un nivel de expresión intermedio entre los otros dos grupos comparados (DIU-RIF-Fértil o DIU-Fértil-RIF), pero sin llegar a ser tan diferentes como para obtener diferencias significativas. Por tanto, el límite entre un endometrio fértil y otro con RIF está muy próximo, suponiendo sólo un pequeño cambio en los niveles de expresión de ciertas proteínas, que ni siquiera resultan estar diferencialmente expresadas. Esto respalda cada vez más la idea de que un endometrio con RIF y uno fértil son muy parecidos entre sí en cuanto a su perfil de expresión proteico y que dichos cambios pueden o deben de ocurrir con bastante frecuencia en la población como para explicar que la tasa de implantación incluso usando TRAs, seleccionando un embrión de buena calidad y un endometrio preparado hormonalmente, siga siendo baja (~30%).

1.4 Ahondando en las rutas funcionales con potencial implicación en la receptividad endometrial

Adicionalmente se procedió a realizar un análisis funcional *in silico* para ver en qué rutas están enriquecidas las proteínas diferencialmente significativas que han salido en cada análisis diferencial por pares (Fértil frente a DIU: 133 y RIF frente a DIU: 158; C vs RIF: 0), para poder dar un sentido biológico a los resultados y así simplificar la interpretación de dichos resultados comparando funciones en lugar de proteínas, y también poder ver si las distintas proteínas obtenidas en cada comparativa (Fértil frente a DIU y RIF frente a DIU) comparten funciones parecidas.

Al analizar las rutas KEGG de enriquecimiento funcional de ambas comparaciones Fértil frente a DIU y RIF frente a DIU, vimos que se compartieron más funciones que proteínas individuales. Ambas comparaciones compartieron 10 rutas KEGG, lo que supone aproximadamente un 83% (10 rutas de 12 significativas) para la comparación Fértil frente a DIU, y aproximadamente un 57% (10 rutas de 17 significativas) para la comparación RIF frente a DIU. Sin embargo, hablando de proteínas ambas comparaciones compartieron 54 proteínas, suponiendo un 40,60% para la comparación Fértil frente a DIU (54 de 133 PDEs) y un 34,17% para la comparación RIF frente a DIU (54 de 158 PDEs). Esto viene a decir que aunque ambas comparaciones compartieran sólo 54 proteínas, el resto de proteínas diferencialmente expresadas en cada comparativa deden de participar en funciones comunes, lo que apoyarían en parte la similitud estadística encontrada entre los grupos Fértil y RIF.

Entre las 10 rutas KEGG compartidas entre las comparativas 'Fértil frente a DIU' y 'RIF frente a DIU', las rutas metabólicas (metabolismo de aminoácidos, ácidos grasos y ácidos carboxílico) fueron las que tuvieron una mayor representación. Esto demuestra que mecanismos capaces de alterar el propio metabolismo celular podrían ser muy relevantes en la disrupción o alteración de la adquisición de la receptividad endometrial. De hecho, los ácidos grasos son una importante fuente de energía y la ruta de la β -oxidación de los ácidos grasos ha resultado ser vital para el oocito y el desarrollo embrionario en ratones (Downs *et al.*, 2009; Dunning *et al.*, 2010) y también para la decidualización de las células endometriales estromales humanas (Tsai *et al.*, 2014). En ambas comparaciones RIF frente a DIU y Fértil frente a DIU, las proteínas implicadas en la ruta de la β -oxidación de los ácidos grasos, tales como la enoil-CoA hidratasa mitocondrial (ECHM), la hidroxiacil-Coenzima A deshidrogenasa mitocondrial (HCDH), y las subunidades alfa y beta de la proteína trifuncional hidroxiacil-CoA deshidrogenasa/3-cetoacil-CoA tiolasa/enoil-CoA hidratasa (ECHA, ECHB), estuvieron todas menos expresadas en el grupo DIU que en los otros dos grupos (**Tabla suplementaria 4**). Se ha visto que el bloqueo de esta ruta altera a la decidualización (Tsai *et al.*, 2014), por lo que no

sería sorprendente que la regulación a la baja o disminución de la expresión de estas proteínas podría también alterar la receptividad endometrial.

Dentro de las rutas enriquecidas específicas de la comparación DIU frente a RIF, la ruta de 'las cascadas del complemento y coagulación' fue una de las más significativamente afectadas con un $-\log(p\text{-valor}) > 4$. Dicha ruta mostró 8 PDEs asociadas, todas ellas sobreexpresadas en el grupo DIU (**Tabla suplementaria 5B, Anexo I**). Dicha ruta también fue una de las más afectadas en otro estudio transcriptómico endometrial en el que se compararon pacientes con RIF y pacientes con aborto recurrente (Huang et al., 2017), pero a diferencia de nuestro estudio, esta ruta estuvo sobreexpresada en el grupo RIF. En el trabajo de Huang y colaboradores la ruta incluyó a 6 genes, dos de los cuales también aparecieron diferencialmente expresados en nuestro estudio, el componente del complemento 3 (C3) y la SERPING1. Aunque los grupos de estudios comparados en ambos trabajos, no fueron los mismos, el hecho de que esta ruta esté significativamente enriquecida en procesos endometriales adversos (RIF, aborto recurrente y refractariedad endometrial originada por un DIU) y que estos dos genes estén sobreexpresados en uno de los dos grupos comparados y downregulado en el otro, sugiere que ambas condiciones (ya sea una sobreexpresión como una regulación a la baja) están afectando a la receptividad uterina pero en diferente forma, y que un fino balance entre ambas condiciones es necesario para conseguir un estado de receptividad. Por ejemplo, en el caso de C3, un mediador de la inmunidad innata se ha visto que ratones deficientes en C3 mostraron efectos adversos en cuanto al desarrollo placentario y fetal (Chow et al., 2009). Por otro lado, una expresión incrementada de C3 se relacionó con abortos en humanos y en ratones (Laissue et al., 2016).

La red de correlación DIU para la comparación Fértil frente a DIU con las proteínas correlacionadas organizadas o dispuestas de acuerdo con la terminología del GO para 'procesos biológicos', mostró que el '*proceso de transcripción-traducción*' fue uno de los tres procesos biológicos principales del GO afectados por ser portadora de un DIU. Esto apoya los resultados del análisis funcional KEGG donde las rutas '*ribosoma*' y '*esplíceosoma*', relacionadas con la síntesis y degradación de proteínas respectivamente, fueron las dos rutas KEGG significantes específicas para la comparación Fértil frente a DIU. Sin embargo, este proceso biológico del GO no aparece en la red de correlación DIU para la comparación RIF frente a DIU, indicando que los grupos RIF y DIU, aunque más diferentes entre sí según indica el PCA, parecen ser más similares en cuanto a las funciones de transcripción y traducción. El que las funciones de transcripción y traducción se comporten más o menos igual en estos dos grupos, podría llevar finalmente a una 'no implantación' del embrión, que es lo que

funcionalmente ocurre en ambas condiciones. Sin embargo, es de esperar que haya diferencias para estas funciones entre un endometrio fértil y uno refractario (DIU), pues a nivel funcional un endometrio receptivo no se puede comportar de igual manera que un endometrio totalmente refractario. Los otros dos procesos biológicos del GO presentes en la red de correlación DIU para ambas comparaciones Fértil frente a DIU y RIF frente a DIU fueron el proceso del *'transporte iónico'* y el *'sistema inmune'*. Por lo tanto, la condición DIU parece introducir cambios más consistentes en estos dos procesos biológicos.

2. Discusión parte II: El Cu y el Pb y su papel disruptor en la función endometrial

Siguiendo en la línea de la receptividad endometrial, y en vista de que el DIU de cobre (un DIU inerte no hormonal, basado únicamente en la presencia de Cu), fue el que más cambios produjo en el perfil proteómico endometrial siendo capaz de producir un endometrio refractario a la implantación y que es también un metal pesado con capacidad disruptiva, la segunda parte del trabajo se ha centrado en analizar el efecto *in vitro* de dos metales pesados, el cobre y plomo, sobre la receptividad endometrial y su posible relación con el fallo de implantación. El plomo (Pb) es otro metal pesado presente en el tabaco y por tanto de exposición habitual, el cual ha sido detectado en el endometrio de mujeres fumadoras en niveles incrementados (Rzymiski *et al.*, 2015) y está relacionado con abortos espontáneos (Hertz-Picciotto, 2000). Tanto las mujeres portadoras de un DIU de cobre como las mujeres fumadoras están constantemente expuestas a dichos metales y hay muchos estudios que contrastan el efecto que podrían tener estos metales a nivel endocrino. Sin embargo, no se conoce muy bien los mecanismos moleculares por los cuales estos metales podrían estar afectando a la función endometrial.

Como se ha comentado anteriormente dos fuentes de exposición a dichos metales pesados habituales en mujeres en edad reproductiva pueden ser el haber llevado recientemente un DIU de Cu (bajo prescripción médica como medida anticonceptiva) y el humo del tabaco (hábito de consumo) respectivamente. Sin embargo, muchas otras fuentes de exposición menos controlables a dichos metales pesados y a otros EDCs, tales como la contaminación atmosférica (Rzymiski *et al.*, 2015), los alimentos y el agua (U.S Environmental Protection Agency, 1980; Claye *et al.*, 1996) y exposición ocupacional (Krizek *et al.*, 1997; Peraza *et al.*, 1998) podrían darse de manera simultánea desencadenando un efecto sinérgico negativo en la fertilidad y promover una acumulación significativa en el organismo.

Generalmente se asume que la exposición crónica y acumulación de ciertos metales pesados como el Cu y el Pb pueden producir efectos adversos en los organismos expuestos. Además, se ha descrito una significativa correlación entre la concentración de metales pesados en alimentos consumidos y en sangre (Khan *et al.*, 2014). En el agua y el suelo, las concentraciones de cromo, mercurio y cobre están en el rango de 1-800 µg/L (0,016-12,6 µM de Cu) y 40-459 mg/Kg (0,63-7,22 mM de Cu) respectivamente (Kazantzis, 1981; Jung and Thornton, 1997). En el pescado, las cantidades de níquel, cromo, mercurio, plomo y cobre rondan de 81-328 mg/g, y en cereales, la cantidad de cobre oscila de 1-14 µg/g (15-220.3 µM)

(Plöckinger *et al.*, 1993). En humanos, se estima que la ingesta diaria de Cu oscila entre 1,46-1,63 mg/d (Tamaya *et al.*, 1976), y que la exposición a Pb conlleva a una acumulación significativa del mismo en el pelo y uñas del pie (3,8-10,1 µg/g) (Wilhelm *et al.*, 1994) y en la leche materna (36 mg/L o 173,7 µM) (Plöckinger *et al.*, 1993). Se han detectado incluso altos niveles de Cu en sangre de mujeres portadoras de un DIU de Cu, indicando que los iones de Cu son capaces de difundir a través del tejido endometrial e incrementar los niveles de Cu en sangre hasta casi el doble que en las mujeres no usuarias de dicho DIU (Okerete *et al.*, 1972). De hecho, se han detectado niveles de Cu en el fluido uterino de mujeres portadoras de un DIU de Cu del rango de 92,84-300 µM (Arancibia *et al.*, 2003). Además, se utilizaron concentraciones de Pb del rango de 10-1000 µM en el cultivo de células Ishikawa, usadas como modelo celular endometrial, para medir los efectos del Pb sobre la viabilidad (Guyot *et al.*, 2015). Por tanto, las dosis de Cu (50 y 100 µM) y Pb (30 y 100 µM) utilizadas en este trabajo encajan con aquellas detectadas en mujeres, resaltando así su relevancia fisiológica.

Con el propósito de comprender mejor la repercusión reproductiva de estos dos metales pesados (Cu y Pb) a nivel endometrial, diferentes aspectos funcionales y moleculares relacionados principalmente con la viabilidad, proliferación, apoptosis y decidualización *in vitro* en presencia de estos dos metales pesados se analizaron en las ESCs. También se analizó la viabilidad, las capacidades de migración y adhesión tipo embrionaria en EECs expuestas a Cu y Pb.

Ciertos metales divalentes, entre ellos el Cu²⁺ and Pb²⁺, han sido descritos como metaloestrógenos, por mostrar propiedades parecidas a las de los estrógenos en la línea celular de cáncer de mama MCF7 a dosis de 1 µM (Darbre, 2006). Esta respuesta estrogénica viene caracterizada por un incremento en la proliferación celular, una disminución de la concentración del ERα a nivel de proteína y de mRNA, y un incremento en la expresión de los genes regulados por estrógenos (Martin *et al.*, 2002, 2003). Nuestros resultados del ensayo MTS mostraron que el Cu y el Pb ejercen efectos opuestos en la viabilidad celular. Por un lado, la viabilidad se vio completamente afectada o comprometida a la dosis de 200 µM de Cu, indicando que esta dosis es citotóxica. Por el otro lado, el Pb no afectó significativamente (negativamente) a la viabilidad celular o la incrementó, sobre todo a tiempo final.

El ensayo MTS es probablemente el indicador colorimétrico de viabilidad celular más comúnmente utilizado basado en medir la actividad mitocondrial y ha sido usado en muchos estudios para evaluar la citotoxicidad. Existen datos de proliferación publicados que apoyan nuestros resultados de MTS para el Pb, el cual incrementó ligeramente la viabilidad en ambas

células, ESCs y EECs, probablemente debido a una mayor tasa de proliferación celular (Martin *et al.*, 2003; Darbre, 2006), llegando a ser significativa a tiempo final. Sin embargo, nuestros resultados de MTS para el cobre difirieron de los descritos por Martin *et al.*, 2003 en su definición de metaloestrógenos. A pesar de ello, existe controversia acerca del papel del Cu y Pb en la proliferación/viabilidad celular. Por un lado se ha visto que el D-gluconato de Cu (100-250 μM) fue capaz de incrementar la proliferación en células inmortalizadas estromales endometriales humanas (línea celular HESC) (Li *et al.*, 2017b). Sin embargo, existen también otros datos que apoyan nuestros resultados para el Cu. La línea celular de células de ovario de hámster chino (CHO-K1) mostró una viabilidad reducida cuando se expusieron a concentraciones de Cu > 90 μM (Grillo *et al.*, 2009). Además el TC50 (concentración tóxica al 50%) del Cu en células primarias humanas EECs fue de 170 μM , mostrando una disminución dosis dependiente en la viabilidad celular (Wu *et al.*, 2012). Respecto al Pb, también se le ha descrito un efecto citotóxico en las células neuronales de rata PC12 expuestas a dosis de plomo mayores a 10 μM (Kumar *et al.*, 2015). Esta diferencia en los resultados puede estar asociada a métodos de detección diferentes, diferentes fuentes de Cu (forma orgánica, sal metálica, o extractos procedentes de discos metálicos), o a diferentes sensibilidades por parte del tipo celular al Cu y Pb.

El endometrio es un tejido altamente dinámico, cuya función más importante es la de alcanzar un estado receptivo para que un blastocisto competente pueda implantar. Durante la preparación para la implantación embrionaria, las células estromales experimentan un proceso de diferenciación conocido como decidualización en el que los fibroblastos proliferantes se especializan y se diferencian en células secretoras, las cuales producen factores que ayudan al endometrio a alcanzar dicho estado de receptividad (Gellersen and Brosens, 2014). Con el fin de analizar el potencial efecto del Cu y Pb en el proceso de decidualización *in vitro*, se decidualizaron las ESCs con P4+E2 en presencia de Cu y Pb durante 7-8 días y se midió la PRL secretada. En base a nuestros resultados del MTS y a referencias bibliográficas, seleccionamos dos concentraciones de Cu (50 y 100 μM) y otras dos de Pb (30 y 100 μM), para examinar los efectos de estos dos metales pesados en el proceso de decidualización humano *in vitro*. Tanto la exposición a Cu como a Pb disminuyó de manera significativa y dosis dependiente los niveles de PRL secretados por las células, perjudicando así a la decidualización. Esta tendencia de disminución de manera dosis dependiente también se observó a nivel transcripcional (mRNA), pero sin llegar a detectarse diferencias significativas debido a la alta variabilidad observada en la condición decidual 0 μM . De hecho, el efecto del Cu sobre la decidualización *in vitro* ya había sido analizado, pero sobre la línea celular HESC y no sobre cultivo primario. En dicho trabajo de

Li et al., 2017, dosis de 100 y 200 μM de D-gluconato de Cu significativamente disminuyeron la transcripción de los marcadores de decidualización IGFBP-1 (del inglés 'Insulin-like growth factor binding protein 1', o bien, proteína 1 de unión al factor de crecimiento tipo insulina) y PRL (Li et al., 2017b). Sin embargo, no existen datos acerca del efecto del Pb sobre la decidualización.

Además de afectar a la secreción de PRL, la exposición a Cu y Pb también afectó negativamente a la expresión de los receptores esteroideos $ER\alpha$ y PR en las dESCs. La expresión de dichos receptores a nivel endometrial está regulada por las variaciones cíclicas de las concentraciones de estrógeno y progesterona que tiene lugar durante el ciclo menstrual. De manera general, el estradiol aumenta la expresión de ER y PR, mientras que la progesterona disminuye la expresión de ambos receptores (Lessey BA et al., 1988). Por el contrario, la expresión del PR en las células estromales endometriales tratadas juntamente con estradiol y progesterona fue significativamente mayor que en células tratadas únicamente con progesterona (Tsutsumi Ryo et al., 2009). En lo referente a los metales pesados, algunos de ellos (Cu, Co, Ni, Pb, Hg y Cd), descritos como metaloestrógenos, disminuyeron los niveles de expresión del $ER\alpha$ e incrementaron los del PR (Beth Martie et al., 2002; García Morales P et al., 1994). En otros trabajos, metales como el Cd y el Zn no afectaron a la expresión del PR (Tsutsumi Ryo et al., 2009; García Morales P et al., 1994). En nuestro trabajo, ambos receptores experimentaron un incremento en sus niveles de expresión en presencia de E2+P4 respecto a la condición control (0 μM), debida principalmente al efecto de los estrógenos. Además, puede estar habiendo un efecto estrogénico añadido por parte de los protocolos de estimulación ovárica, ya que las biopsias endometriales se cogieron el día de la punción ovárica. Dichos receptores regulan o están implicados en el proceso de decidualización por mediar la transducción de señal desencadenada por las hormonas P4 y E2. Por lo tanto, es posible pensar que, si la secreción de PRL se está viendo afectada por la presencia de Cu y Pb, puede deberse también a una incorrecta señalización por parte de la P4 y el E2, puesto que la expresión de sus receptores se está viendo afectada (disminuida) por ambos metales durante el proceso de decidualización.

Por otra parte, el Cu y el Pb también afectaron a la expresión del marcador de receptividad endometrial *HOXA10*, implicado también en el proceso de decidualización e implantación embrionaria (Lim et al., 1999; Bagot et al., 2000; Taylor, 2000). En el útero adulto, *HOXA10* se expresa tanto en células estromales como en epiteliales endometriales y sigue un patrón dependiente del ciclo menstrual, ya que su expresión está regulada por las hormonas sexuales 17β -estradiol y progesterona (Ma L, Benson GV et al., 1998; Taylor HS et

al., 1998). La expresión de HOXA10 alcanza su máximo en el momento de la implantación del embrión, en la fase secretora media, y decrece tras la implantación (Geeta Godbole et al., 2017). Dicho aumento de la expresión de HOXA10 es necesario para la decidualización de las células estromales (Rahman Ma et al., 2006; Klima HU et al 2005). También se ha visto que el uso del DIU de Cu está asociado con una hipermetilación del promotor y por tanto con una concomitante disminución de la expresión endometrial de dicho gen HOXA10 (Tetrault et al., 2009). Aunque poco se sabe de la influencia del Pb sobre la expresión del gen HOXA10, en nuestro estudio, tanto el Cu como el Pb redujeron la expresión del gen HOXA10, pudiendo afectar al proceso de decidualización, lo que explicaría los bajos niveles de PRL detectados en las células decidualizadas en presencia de ambos metales. Todos estos resultados junto con el de la PRL, apoyan la idea de que el Cu y el Pb podrían perjudicar al proceso de decidualización *in vitro*, afectando negativamente a la expresión de los receptores esteroideos y posiblemente limitando la implantación embrionaria al afectar también negativamente a la expresión del gen HOXA10, siendo el Cu el metal pesado con el mayor efecto nocivo sobre la decidualización. Además, la adhesividad trofoblástica de las EECs y la capacidad de regeneración epitelial (cicatrización de la herida) se vio también comprometida en presencia de Cu, alcanzando menos de un 27% de adhesión y menos de un 47% de cicatrización, para la dosis más baja de Cu (50 μ M) en comparación con la condición 0 μ M. Un endometrio portador de un DIU de Cu es un endometrio completamente refractario a la adhesión embrionaria, exhibiendo unos perfiles transcriptómicos y proteómicos alterados durante la ventana de implantación como se ha estudiado en la primera parte de este trabajo (Carrascosa et al., 2017; Horcajadas et al., 2006; Pérez-Debén et al., 2019). Aunque se trata de un proceso reversible, recuperándose tanto el perfil normal de expresión génica endometrial en LH+7 así como la fertilidad un año después de la retirada de un DIU inerte (Horcajadas et al., 2006), el uso prolongado de un DIU de Cu libera iones al lumen endometrial, los cuales pueden depositarse, acumularse y persistir en el endometrio uterino haciendo que éste sea refractario al embrión incluso por un periodo más largo de tiempo una vez el DIU haya sido extraído. Estos resultados deberían ser tenidos en cuenta en mujeres que quieran quedarse embarazadas de manera inmediata después de haber llevado un DIU de Cu.

Otra característica del proceso de decidualización *in vitro* es la inducción de un cambio en la forma celular de las ESCs, pasando de una forma fibroblástica alargada a una forma más redondeada o poligonal con núcleos agrandados adoptando un fenotipo epiteloide secretor altamente especializado a las que se les denomina como células deciduales (Gellersen and Brosens, 2014). Sin embargo, esta reorganización del citoesqueleto no siempre ocurre en

cultivo in vitro y por eso se considera un sistema complementario a la hora de comprobar la decidualización in vitro. Esto depende del tipo de hormonas utilizadas para la decidualización y del número de días de cultivo. En la mayoría de los estudios in vitro, esta reorganización del citoesqueleto ocurre principalmente cuando el estímulo de decidualización comprende a algún análogo del del adenosín 3':5' monofosfato cíclico (cAMP) (Krikun *et al.*, 2004; Samalecos *et al.*, 2009; Ujvari *et al.*, 2017); Pan-Castillo *et al.* 2018). Es más, el cAMP es capaz por sí solo de inducir la típica morfología redondeada de las células decidualizadas incluso después de 3-4 días de cultivo, mientras que el análogo de la progesterona, acetato de medroxyprogesterona (MPA) no lo puede hacer por sí sólo, y las células mantienen su morfología fibroblástica (Krikun *et al.*, 2004; Samalecos *et al.*, 2009; Ujvari *et al.*, 2017). Además, el E2 por sí sólo o en combinación con MPA, no produjeron cambios en la morfología de las células estromales, pero sí hubo secreción de PRL e IGFBP-1 al medio por parte de las células tratadas con E2+MPA (Yuhki M *et al.*, 2011). Por eso, muchos protocolos de decidualización están basados en el uso combinado de MPA + cAMP. En dicho trabajo se llevó a cabo un proceso de decidualización de mayor duración (7-8 días) y más parecido al que ocurre fisiológicamente, en presencia de P4+E2, pero sin cAMP y el estímulo de decidualización pareció no inducir el típico cambio del citoesqueleto propio de una célula decidualizada ni siquiera a 0 μ M. Sin embargo, la decidualización ocurrió porque se detectó secreción de PRL en dicha condición, en las dESCs no expuestas. Aunque no se observó la morfología típica de una célula decidual, la tinción con F-actina nos permitió observar que la integridad celular se mantenía tras los 7-8 días de decidualización en presencia de Cu o Pb, y que la disminución de PRL observada en presencia de dichos metales no fue debido a un descenso en el número de células. Esto fue, posteriormente corroborado en los ensayos TUNEL que llevamos a cabo.

Un trabajo previo de Carrascosa *et al.*, 2018 mostró que el Cu no incrementa la apoptosis inducida por el propio proceso de decidualización, aunque en su trabajo las dESCs sólo fueron expuestas al Cu durante los dos últimos días de un tratamiento de decidualización de 6 días (Carrascosa *et al.*, 2018). Para esclarecer si la apoptosis afecta a las dESCs expuestas a Cu/Pb, los ensayos TUNEL mostraron que ni el Cu ni el Pb incrementaron significativamente la apoptosis de las dESCs en comparación a las dESCs no expuestas. Por lo tanto, el crítico descenso en la secreción de PRL por parte de las dESCs expuestas a Pb y Cu no parece estar explicado por una mayor tasa de apoptosis. Sin embargo, no se pueden excluir otras formas de muerte celular por no haber sido testadas en este trabajo.

La decidualización es un proceso de diferenciación celular en el que las dESCs dejan de proliferar para especializarse en células secretoras. De hecho, en el presente trabajo, las dESCs

no expuestas a metales pesados mostraron una menor tinción (señal) para Ki67 en comparación con su equivalente no decidual (0 μM). Además, después de 7-8 días de exposición al metal pesado, el porcentaje de ndESCs positivas para Ki67 disminuyó de manera dosis-dependiente. En consonancia con esta disminuida capacidad de proliferar de las ESCs expuestas a Pb y Cu, está también la reducida capacidad de migración epitelial sobre todo de las EECs expuestas a Cu 100 μM . El endometrio es un tejido con alta tasa de renovación o cambio, pero en presencia de Cu o Pb, su habilidad de regenerarse podría verse comprometida debido a la disminuida tasa de proliferación de las ESCs así como la capacidad de migración de las EECs. Además, el Cu y Pb podrían tener un efecto negativo en la implantación, reduciendo la expresión del gen *HOXA10* en las ESCs y también disminuyendo la adhesividad epitelial a los esferoides JAR.

El Cu y Pb pueden inducir estrés oxidativo incrementando la formación de ROS (Hermes-Lima *et al.*, 1991; Beltran-Garcia *et al.*, 2000; Nuran Ercal *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2015) y/o disminuyendo los niveles de glutatión, un antioxidante celular (Nuran Ercal *et al.*, 2001; Speisky *et al.*, 2009), lo cual acaba produciendo subsecuentemente daño en el DNA y apoptosis (Tchounwou *et al.*, 2008; Grillo *et al.*, 2010; Linder, 2012; Kumar *et al.*, 2015). Aunque se observó un incremento en la producción de ROS en las ESC tratadas con Cu, no se detectaron diferencias significativas en las ESCs expuestas ni a Cu ni a Pb. Sin embargo, sí se detectó un incremento significativo en la apoptosis en ndESC expuestas a 100 μM de Cu después de 7 días de exposición. De acuerdo con estos resultados, el Cu y el Pb no parecen causar estrés oxidativo después de 24 h de exposición, aunque una exposición prolongada podría tener resultados diferentes e incluso causar daño a nivel de DNA en las ESCs expuestas a Cu, tales como lo muestran los resultados del TUNEL.

En esta segunda parte de la tesis, deben de asumirse ciertas limitaciones inherentes a los ensayos *in vitro* con cultivo celular primario, tales como la alta variabilidad entre muestras humanas y el limitado número de biopsias endometriales disponibles para la realización de los ensayos. Además, no se midió el grado de exposición basal a Cu y Pb en las mujeres de las cuales se recolectaron las biopsias endometriales. Sin embargo, en caso de existir una exposición basal, este efecto sería considerado de manera igual en todas las condiciones porque en todos los experimentos se han incluido células no expuestas a metales pesados como controles.

En resumen, esta segunda parte de la tesis muestra que el Cu y Pb a concentraciones detectables en la población femenina general tiene un efecto adverso en células

endometriales primarias expuestas a ellos *in vitro*. Por lo tanto, el Cu y Pb podrían actuar como disruptores reproductivos, reduciendo la expresión de receptores esteroides y de *HOXA10* e inhibiendo la decidualización en las ESCs. Además, la presencia de estos metales pesados también comprometió otras funciones endometriales, incluyendo la regeneración endometrial y la capacidad de adhesión embrionaria.

CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

Conclusiones parte I

1. El análisis de los perfiles proteómicos endometriales de los tres grupos de mujeres estudiados difirieron los unos de los otros, sobre todo para los grupos DIU y RIF. Sin embargo, el grupo de mujeres fértiles mostró un perfil proteómico más heterogéneo, solapando íntegramente con las muestras del grupo RIF y con parte de las del grupo DIU. El análisis diferencial reveló la existencia de proteínas diferencialmente expresadas entre los grupos Fértil y DIU (133 PDEs) y entre los grupos RIF y DIU (158 DEPs), sin embargo, no se detectaron proteínas diferencialmente significativas entre los grupos RIF y Fértil.
2. El análisis de enriquecimiento funcional reveló una desregulación del metabolismo energético a nivel endometrial en los casos de DIU, y una regulación a la alza de la ruta del 'sistema del complemento y coagulación'.
3. El DIU de cobre introduce en el endometrio de esas pacientes cambios consistentes en procesos biológicos relacionados con el 'transporte iónico' y el 'sistema inmune'.
4. En definitiva, el análisis proteómico llevado a cabo no reveló diferencias significativas entre los grupos RIF y fértil. Por el contrario, la presencia de un DIU sí introdujo más cambios a nivel proteómico respecto a los grupos RIF y Fértil.

Conclusiones parte II

1. El Cu y el Pb ejercieron diferentes efectos sobre la viabilidad de los cultivos primarios de células endometriales estromales (ESCs) y epiteliales (EECs). Mientras que el Cu afectó negativamente a la viabilidad de manera dosis dependiente, el Pb no afectó a la viabilidad o la incrementó significativamente.
2. El Cu y el Pb afectaron negativamente a la decidualización de las células estromales, disminuyendo la expresión de los receptores esteroideos *PR* y *Era* y el gen *HOXA10*.
3. El Cu y el Pb disminuyeron la capacidad proliferativa de las células estromales de manera dosis dependiente. Además, estas células vieron comprometida su tasa de proliferación, así como la capacidad de migración de las EECs.
4. El Cu y Pb redujeron la adhesividad epitelial, especialmente para el caso del Cu.
5. El Cu y el Pb no parecen causar estrés oxidativo sobre las ESCs.
6. En definitiva, el Cu y Pb podrían actuar como disruptores reproductivos, reduciendo la expresión de receptores esteroideos y de *HOXA10* e inhibiendo la decidualización en

las ESCs. Además, la presencia de estos metales pesados también comprometió otras funciones endometriales, incluyendo la regeneración endometrial y la capacidad de adhesión embrionaria.

BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- A User ' s Guide to Principal Components by J . Edward Jackson. Review by : Brian D Marx *J Am Stat Assoc* 2014;**87**:p.1242.
- Al-Saleh I, Shinwari N, Al-Amodi M. Accumulation of mercury in ovaries of mice after the application of skin-lightening creams. *Biol Trace Elem Res* 2009;**131**:43–54.
- Altmäe S, Martínez-Conejero JA, Salumets A, Simón C, Horcajadas JA, Stavreus-Evers A. Endometrial gene expression analysis at the time of embryo implantation in women with unexplained infertility. *Mol Hum Reprod* 2010;**16**:178–187.
- Andersen AN, Gianaroli L, Felberbaum R, Mouzon J de, Nygren KG, Deneede B van, Sutter P de, Kyurkchiev S, Erb K, Gissler M, *et al.* Assisted reproductive technology in Europe, 2001. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2005;**20**:1158–1176. Oxford University Press.
- Aoyama H, Hojo H, Takahashi KL, Shimizu-Endo N, Araki M, Takeuchi-Kashimoto Y, Saka M, Teramoto S. Two-generation reproduction toxicity study in rats with methoxychlor. *Congenit Anom (Kyoto)* 2012;**52**:28–41.
- Arancibia V, Peña C, Allen HE, Lagos G. Characterization of copper in uterine fluids of patients who use the copper T-380A intrauterine device. *Clin Chim Acta* 2003;**332**:69–78.
- Azeh Engwa G, Udoka Ferdinand P, Nweke Nwalo F, N. Unachukwu M. Mechanism and Health Effects of Heavy Metal Toxicity in Humans. *Poisoning Mod World - New Tricks an Old Dog?* 2019; IntechOpen.
- Baart EB, Martini E, Berg I van den, Macklon NS, Galjaard R-JH, Fauser BCJM, Opstal D Van. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2006;**21**:223–233.
- Bagot CN, Troy PJ, Taylor HS. Alteration of maternal Hoxa10 expression by in vivo gene transfection affects implantation. *Gene Ther* 2000;**7**:1378–1384. Nature Publishing Group.
- Basavarajappa MS, Craig ZR, Hernández-Ochoa I, Paulose T, Leslie TC, Flaws JA. Methoxychlor reduces estradiol levels by altering steroidogenesis and metabolism in mouse antral follicles in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;**253**:161–169.
- Belhadj H, Sivin I, Diaz S, Pavez M, Tejada AS, Brache V, Alvarez F, Shoupe D, Breaux H, Mishell DR, *et al.* Recovery of fertility after use of the Levonorgestrel 20 mcg/d or copper T 380 Ag intrauterine device. *Contraception* 1986;**34**:261–267.
- Bell MR. Endocrine-disrupting actions of PCBs on brain development and social and reproductive behaviors. *Curr Opin Pharmacol* 2014;**19**:134–144. Elsevier Ltd.
- Beltran-Garcia MJ, Espinosa A, Herrera N, Perez-Zapata AJ, Beltran-Garcia C, Ogura T. Formation of copper oxychloride and reactive oxygen species as causes of uterine injury during copper oxidation of Cu-IUD. *Contraception* 2000;**61**:99–103.
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Source J R Stat Soc Ser B J R Stat Soc Ser B J R Stat Soc B* 1995;**57**:289–300.
- Bergh PA, Navot D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil Steril* 1992;**58**:537–542.

- Bermejo A, Cerrillo M, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Simón C, Pellicer A, Garcia-Velasco JA. Impact of final oocyte maturation using gonadotropin-releasing hormone agonist triggering and different luteal support protocols on endometrial gene expression. *Fertil Steril* 2014;**101**:138-146.e3. Elsevier Inc.
- Bern HA, Mills KT, Dorothy HL, Ostrander PL, Iguchi T. Altered mammary responsiveness to estradiol and progesterone in mice exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Cancer Lett* 1992;**63**:117–124.
- Bhagwat SR, Chandrashekar DS, Kakar R, Davuluri S, Bajpai AK, Nayak S, Bhutada S, Acharya K, Sachdeva G. Endometrial Receptivity: A Revisit to Functional Genomics Studies on Human Endometrium and Creation of HGEx-ERdb. *PLoS One* 2013;**8**:e58419.
- Bhattacharya P, Keating AF. Impact of environmental exposures on ovarian function and role of xenobiotic metabolism during ovotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;**261**:227–235.
- Blockeel C, Vaerenbergh I Van, Fatemi HM, Lommel L Van, Devroey P, Bourgain C. Gene expression profile in the endometrium on the day of oocyte retrieval after ovarian stimulation with low-dose hCG in the follicular phase. *Mol Hum Reprod* 2011;**17**:33–41.
- Bolstad BM. preprocessCore: A collection of pre-processing functions. R package version 1.36.0. 2016; Available from: <https://github.com/bmbolstad/preprocessCore>.
- Bolstad BM, Speed TP, Irizarry RA, Astrand M. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 2003;**19**:185–193.
- Bongso A, Gajra B, Lian NP, Wong PC, Soon-chye N, Ratnam S. Establishment of human endometrial cell cultures. *Hum Reprod* 1988;**3**:705–713.
- Borgeest C, Symonds D, Mayer LP, Hoyer PB, Flaws JA. Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse. *Toxicol Sci* 2002;**68**:473–478.
- Borthwick JM, Charnock-Jones DS, Tom BD, Hull ML, Teirney R, Phillips SC, Smith SK. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2003;**9**:19–33.
- Brar AK, Frank GR, Kessler CA, Cedars MI, Handwerger S. Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. *Endocrine* 1997;**6**:301–307. Humana Press Inc.
- Braza-Boïls A, Gilabert-Estellés J, Ramón LA, Gilabert J, Marí-Alexandre J, Chirivella M, España F, Estellés A. Peritoneal Fluid Reduces Angiogenesis-Related MicroRNA Expression in Cell Cultures of Endometrial and Endometriotic Tissues from Women with Endometriosis. *PLoS One* 2013;**8**:1–10.
- Brezova V, Valko M, Breza M, Morris H, Telser J, Dvoranova D, Kaiserova K, Varecka L, Mazur M, Leibfritz D. Role of Radicals and Singlet Oxygen in Photoactivated DNA Cleavage by the Anticancer Drug Camptothecin: An Electron Paramagnetic Resonance Study. *J Phys Chem B* 2003;**107**:2415–2425.
- Brosens JANJ, Hayashi N, White JO. Progesterone Receptor Regulates Decidual Prolactin Expression in Differentiating Human Endometrial Stromal Cells. *Endocrinology* 1999;**140**:4809–4820. Endocrine Society.
- Brosens JJ, Hodgetts A, Feroze-Zaidi F, Sherwin JRA, Fusi L, Salker MS, Higham J, Rose GL,

- Kajihara T, Young SL, *et al.* Proteomic analysis of endometrium from fertile and infertile patients suggests a role for apolipoprotein A-I in embryo implantation failure and endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2009;**16**:273–285.
- Brosens JJ, Salker MS, Teklenburg G, Nautiyal J, Salter S, Lucas ES, Steel JH, Christian M, Chan YW, Boomsma CM, *et al.* Uterine selection of human embryos at implantation. *Sci Rep* 2014;**4**:1–8.
- Burney RO, Talbi S, Hamilton AE, Kim CV, Nyegaard M, Nezhat CR, Lessey BA, Giudice LC. Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. *Endocrinology* 2007;**148**:3814–3826.
- Carrascosa JP, Cotán D, Jurado I, Oropesa-Ávila M, Sánchez-Martín P, Savaris RF, Tan J, Sánchez-Alcázar JA, Tan SL, Horcajadas JA. The effect of copper on endometrial receptivity and induction of apoptosis on decidualized human endometrial stromal cells. *Reprod Sci* 2018;**25**:985–999.
- Carson DD. Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Mol Hum Reprod* 2002;**8**:871–879.
- Casado-vela J, Rodriguez-suarez E, Iloro I, Ametzazurra A, Alkorta N, Garci JA, Matorras R, Nagore D, Simo L, Elortza F. Comprehensive Proteomic Analysis of Human Endometrial Fluid Aspirate research articles. *J Proteome Res* 2009;4622–4632.
- Caserta D, Graziano A, Monte G Lo, Bordi G, Moscarini M. Heavy metals and placental fetal-maternal barrier: A mini-review on the major concerns. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013;**17**:2198–2206.
- Caserta D, Mantovani A, Marci R, Fazi A, Ciardo F, Rocca C La, Maranghi F, Moscarini M. Environment and women's reproductive health. *Hum Reprod Update* 2011;**17**:418–433.
- Cavallini A, Lippolis C, Vacca M, Nardelli C, Castegna A, Arnesano F, Carella N, Depalo R. The Effects of Chronic Lifelong Activation of the AHR Pathway by Industrial Chemical Pollutants on Female Human Reproduction. In Tuukkanen J, editor. *PLoS One* 2016;**11**:e0152181.
- Cederroth CR, Zimmermann C, Nef S. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. *Mol Cell Endocrinol* 2012;**355**:192–200. Elsevier Ireland Ltd.
- Chard T. 11 Frequency of implantation and early pregnancy loss in natural cycles. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1991;**5**:179–189.
- Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Fenwick P, Smith SK. Leukaemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at this time. *J Reprod Fertil* 1994;**101**:421–426. Journals of Reproduction and Fertility Ltd.
- Chatterjee A, Chatterji U. Arsenic abrogates the estrogen-signaling pathway in the rat uterus. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;**8**:
- Chattopadhyay S, Ghosh D. The involvement of hypophyseal-gonadal and hypophyseal-adrenal axes in arsenic-mediated ovarian and uterine toxicity: Modulation by hCG. *J Biochem Mol Toxicol* 2010;**24**:29–41.
- Chen H, Boutros PC. VennDiagram: A package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics* 2011;**12**:35. BioMed Central Ltd.

- Chen JICC, Hannan NJ, Mak Y, Nicholls PK, Zhang J, Rainczuk A, Stanton PG, Robertson DM, Salamonsen LA, Stephens AN. Proteomic characterization of midproliferative and midsecretory human endometrium. *J Proteome Res* 2009;**8**:2032–2044.
- Chen Q, Zhang A, Yu F, Gao J, Liu Y, Yu C, Zhou H, Xu C. Label-free proteomics uncovers energy metabolism and focal adhesion regulations responsive for endometrium receptivity. *J Proteome Res* 2015;**14**:1831–1842. American Chemical Society.
- Chenau J, Michelland S, Sidibe J, Seve M. Peptides OFFGEL electrophoresis: A suitable pre-analytical step for complex eukaryotic samples fractionation compatible with quantitative iTRAQ labeling. *Proteome Sci* 2008;**6**:1–8.
- Choe L, D’Ascenzo M, Relkin NR, Pappin D, Ross P, Williamson B, Guertin S, Pribil P, Lee KH. 8-Plex quantitation of changes in cerebrospinal fluid protein expression in subjects undergoing intravenous immunoglobulin treatment for Alzheimer’s disease. *Proteomics* 2007;**7**:3651–3660.
- Choe SY, Kim SJ, Kim HG, Lee JH, Choi Y, Lee H, Kim Y. Evaluation of estrogenicity of major heavy metals. *Sci Total Environ* 2003;**312**:15–21.
- Christoforou AL, Lilley KS. Isobaric tagging approaches in quantitative proteomics: The ups and downs. *Anal Bioanal Chem* 2012;**404**:1029–1037.
- Claye SS, Idouraine A, Weber CW. In vitro mineral binding capacity of five fiber sources and their insoluble components for copper and zinc. *Plant Foods Hum Nutr* 1996;**49**:257–269.
- Cohen J. [Fecundity following IUD use (author’s transl)]. *Contracept Fertil Sex (Paris)* 1981;**9**:465–468.
- Cole DC, Wainman B, Sanin LH, Weber JP, Muggah H, Ibrahim S. Environmental contaminant levels and fecundability among non-smoking couples. *Reprod Toxicol* 2006;**22**:13–19.
- Cork BA, Tuckerman EM, Li TC, Laird SM. Expression of interleukin (IL)-11 receptor by the human endometrium in vivo and effects of IL-11, IL-6 and LIF on the production of MMP and cytokines by human endometrial cells in vitro. *Mol Hum Reprod* 2002;**8**:841–848.
- Cox DR. *Principles of statistical inference*. . *Methods Mol Biol* 2007;**404**..
- Crawford BR, deCatanzaro D. Disruption of blastocyst implantation by triclosan in mice: Impacts of repeated and acute doses and combination with bisphenol-A. *Reprod Toxicol* 2012;**34**:607–613. Elsevier Inc.
- Crellin NK, Kang HG, Swan CL, Chedrese PJ. Inhibition of basal and stimulated progesterone synthesis by dichlorodiphenyldichloroethylene and methoxychlor in a stable pig granulosa cell line. *Reproduction* 2001;**121**:485–492.
- Critchley HOD, Robertson KA, Forster T, Henderson TA, Williams ARW, Ghazal P. Gene expression profiling of mid to late secretory phase endometrial biopsies from women with menstrual complaint. *Am J Obstet Gynecol* 2006;**195**:406.e1-16. Mosby Inc.
- Darbre PD. Metalloestrogens: An emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast. *J Appl Toxicol* 2006;**26**:191–197.
- Daston GP, Gooch JW, Breslin WJ, Shuey DL, Nikiforov AI, Fico TA, Gorsuch JW. Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data. *Reprod Toxicol* 1997;**11**:465–481.
- DeSouza L, Diehl G, Yang ECC, Guo J, Rodrigues MJ, Romaschin AD, Colgan TJ, Siu KWM.

- Proteomic analysis of the proliferative and secretory phases of the human endometrium: Protein identification and differential protein expression. *Proteomics* 2005;**5**:270–281.
- Development Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. R Found Stat Comput Vienna, Austria 2008; Available from: <http://www.r-project.org>.
- Díaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Alama P, Pellicer A, Simón C. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Rev Iberoam Fertil y Reprod Humana* 2010;**95**:50–60.
- Díaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Alamá P, Pellicer A, Simón C. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril* 2011;**95**:. Elsevier Inc.
- Díaz-Gimeno P, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Bosch N, Martínez-Conejero JA, Alamá P, Garrido N, Pellicer A, Simón C. The accuracy and reproducibility of the endometrial receptivity array is superior to histology as a diagnostic method for endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2013;**99**:508–517.
- Díaz-Gimeno P, Ruíz-Alonso M, Blesa D, Simón C. Transcriptomics of the human endometrium. *Int J Dev Biol* 2014;**58**:127–137.
- Diedrich K, Fauser BCJM, Devroey P, Griesinger G. The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update* 2007;**13**:365–377.
- Domínguez F, Avila S, Cervero A, Martín J, Pellicer A, Castrillo JL, Simón C. A combined approach for gene discovery identifies insulin-like growth factor-binding protein-related protein I as a new gene implicated in human endometrial receptivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;**88**:1849–1857.
- Dominguez F, Gadea B, Mercader A, Esteban FJ, Pellicer A, Simón C. Embryologic outcome and secretome profile of implanted blastocysts obtained after coculture in human endometrial epithelial cells versus the sequential system. *Fertil Steril* 2010;**93**:.
- Domínguez F, Garrido-Gómez T, López JA, Camafeita E, Quiñonero A, Pellicer A, Simón C. Proteomic analysis of the human receptive versus non-receptive endometrium using differential in-gel electrophoresis and MALDI-MS unveils stathmin 1 and annexin A2 as differentially regulated. *Hum Reprod* 2009;**24**:2607–2617.
- Downs SM, Mosey JL, Klinger J. Fatty acid oxidation and meiotic resumption in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 2009;**76**:844–853.
- Duffus JH. Effect of Cr(VI) exposure on sperm quality. *Ann Occup Hyg* 2002;**46**:269–270.
- Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL. Beta-Oxidation Is Essential for Mouse Oocyte Developmental Competence and Early Embryo Development1. *Biol Reprod* 2010;**83**:909–918.
- Edgell TA, Rombauts LJF, Salamonsen LA. Assessing receptivity in the endometrium: the need for a rapid, non-invasive test. *Reprod Biomed Online* 2013;**27**:486–496.
- Ehrenstein C, Shu P, Wickenheiser EB, Hirner A V, Dolfen M, Emons H, Obe G. Methyl mercury uptake and associations with the induction of chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Chem Biol Interact* 2002;**141**:259–274.
- Elnashar AM, Aboul-Enein GI. *Endometrial receptivity*. 2004;
- Enders AC, Nelson DM. Pinocytotic activity of the uterus of the rat. *Am J Anat* 1973;**138**:277–

299.

- EPA. *U.S. EPA. Exposure Factors Handbook (1997, Final Report). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/P-95/002F a-c, 1997. 1997;*
- Ernoul E, Gamelin E, Guette C. Improved proteome coverage by using iTRAQ labelling and peptide OFFGEL fractionation. *Proteome Sci* 2008;**6**:1–13.
- Evans GE, Martínez-Conejero JA, Phillipson GTM, Simón C, McNoe LA, Sykes PH, Horcajadas JA, Lam EYN, Print CG, Sin IL, *et al.* Gene and protein expression signature of endometrial glandular and stromal compartments during the window of implantation. *Fertil Steril* 2012;**97**:1365-1373.e2. Elsevier Inc.
- Falcón M, Viñas P, Luna A. Placental lead and outcome of pregnancy. *Toxicology* 2003;**185**:59–66.
- Fanchin R. Assessing uterine receptivity in 2001: ultrasonographic glances at the new millennium. *Ann N Y Acad Sci* 2001;**943**:185–202. New York Academy of Sciences.
- Fang JL, Vanlandingham M, Juliar BE, Olson G, Patton RE, Beland FA. Dose-response assessment of the dermal toxicity of triclosan in B6C3F1 mice. *Toxicol Res (Camb)* 2015;**4**:867–877. Royal Society of Chemistry.
- Farina M, Rocha JBT, Aschner M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: Evidence from experimental studies. *Life Sci* 2011;**89**:, p. 555–563. Elsevier Inc.
- Feng Y, Hurst J, Almeida-De-Macedo M, Chen X, Li L, Ransom N, Wurtele ES. A massive human co-expression-network and its medical applications. *Chem Biodivers* 2012;**9**:868–887.
- Feng Y, Zhang P, Zhang Z, Shi J, Jiao Z, Shao B. Endocrine Disrupting Effects of Triclosan on the Placenta in Pregnant Rats. *PLoS One* 2016;**11**:e0154758.
- Ferguson KK, O'Neill MS, Meeker JD. Environmental contaminant exposures and preterm birth: A comprehensive review. *J Toxicol Environ Heal - Part B Crit Rev* 2013;**16**:69–113.
- Fields S. Proteomics: Proteomics in genomeland. *Science (80-)* 2001;**291**:1221–1224.
- Florea AM, Büsselberg D. Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *BioMetals* 2006;**19**:419–427.
- Fraitjes MJP, Cooper RL, Buckalew A, Jayaraman S, Mills L, Laws SC. Characterization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to atrazine and metabolites in the female rat. *Toxicol Sci* 2009;**112**:88–99.
- Garrido-Gomez T, Dominguez F, Quiñonero A, Diaz-Gimeno P, Kapidzic M, Gormley M, Ona K, Padilla-Iserte P, McMaster M, Genbacev O, *et al.* Defective decidualization during and after severe preeclampsia reveals a possible maternal contribution to the etiology. *Proc Natl Acad Sci* 2017;**114**:E8468–E8477.
- Garrido-Gómez T, Quiñonero A, Antúnez O, Díaz-Gimeno P, Bellver J, Simón C, Domínguez F. Deciphering the proteomic signature of human endometrial receptivity. *Hum Reprod* 2014;**29**:1957–1967.
- Garrido-Gómez T, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Diaz-Gimeno P, Vilella F, Simón C. Profiling the gene signature of endometrial receptivity: Clinical results. *Fertil Steril* 2013;**99**:1078–1085.
- Garrido N, Navarro J, García-Velasco J, Remohí J, Pellicer A, Simón C. The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility. *Hum Reprod Update* 2002;**8**:95–103.

- Gellersen B, Brosens IA, Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: Mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin Reprod Med* 2007;**25**:445–453.
- Gellersen B, Brosens J. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: A decidualizing affair. *J Endocrinol* 2003;**178**:357–372.
- Gellersen B, Brosens JJ. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr Rev* 2014;**35**:851–905.
- Gemzell-Danielsson K, Berger C, Lalitkumar PGL. Emergency contraception - Mechanisms of action. *Contraception* 2013a;**87**:, p. 300–308.
- Gemzell-Danielsson K, Mansour D, Fiala C, Kaunitz AM, Bahamondes L. Management of pain associated with the insertion of intrauterine contraceptives. *Hum Reprod Update* 2013b;**19**:419–427.
- Giudice LC. Application of functional genomics to primate endometrium: Insights into biological processes. *Reprod Biol Endocrinol* 2006;**4**:S4.
- Goldman JM, Davis LK, Murr AS, Cooper RL. Atrazine-induced elevation or attenuation of the LH surge in the ovariectomized, estrogen-primed female rat: Role of adrenal progesterone. *Reproduction* 2013;**146**:305–314.
- Gollenberg AL, Hediger ML, Lee PA, Himes JH, Buck Louis GM. Association between lead and cadmium and reproductive hormones in peripubertal U.S. Girls. *Environ Health Perspect* 2010;**118**:1782–1787.
- Gore AC. Environmental toxicant effects on neuroendocrine function. *Endocrine* 2001;**14**:235–246.
- Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, Toppari J, Zoeller RT. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr Rev* 2015;**36**:1–150. Endocrine Society.
- Gore AC, Heindel JJ, Zoeller RT. Endocrine disruption for endocrinologists (and others). *Endocrinology* 2006;**147**:.
- Goshe MB, Smith RD. Stable isotope-coded proteomic mass spectrometry. *Curr Opin Biotechnol* 2003;**14**:101–109.
- Grandjean P, Landrigan P. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet* 2006;**368**:2167–2178.
- Grillo CA, Reigosa MA, Fernández Lorenzo de Mele MA. Does over-exposure to copper ions released from metallic copper induce cytotoxic and genotoxic effects on mammalian cells? *Contraception* 2010;**81**:343–349. Elsevier Inc.
- Grillo CA, Reigosa MA, Lorenzo de Mele MF. Effects of copper ions released from metallic copper on CHO-K1 cells. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 2009;**672**:45–50.
- Grothusen C von, Lalitkumar S, Rao Boggavarapu N, Gemzell-Danielsson K, Lalitkumar PG. Recent advances in understanding endometrial receptivity: Molecular basis and clinical applications. *Am J Reprod Immunol* 2014;**72**:148–157.
- Gundacker C, Fröhlich S, Graf-Rohrmeister K, Eibenberger B, Jessenig V, Gicic D, Prinz S, Wittmann KJ, Zeisler H, Vallant B, *et al.* Perinatal lead and mercury exposure in Austria. *Sci Total Environ* 2010;**408**:5744–5749.
- Guyot E, Solovyova Y, Tomkiewicz C, Leblanc A, Pierre S, Balkhi S El, Frère-Belda MA Le, Lecuru

- F, Poupon J, Barouki R, *et al.* Determination of heavy metal concentrations in normal and pathological human endometrial biopsies and in vitro regulation of gene expression by metals in the Ishikawa and Hec-1b endometrial cell line. *PLoS One* 2015;**10**:1–14.
- Hagenfeldt K, Johannisson E, Brenner P. Intrauterine contraception with the Copper-T device. 3. Effect upon endometrial morphology. *Contraception* 1972;**6**:207–218.
- Hambartsoumian E. Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. *Am J Reprod Immunol* 1998;**39**:137–143. Blackwell Publishing Ltd.
- Hamilton KJ, Arao Y, Korach KS. Estrogen hormone physiology: Reproductive findings from estrogen receptor mutant mice. *Reprod Biol* 2014;**14**:3–8. Elsevier B.V.
- Han VK, Bassett N, Walton J, Challis JR. The expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) genes in the human placenta and membranes: evidence for IGF-IGFBP interactions at the feto-maternal interface. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;**81**:2680–2693. The Endocrine Society.
- Hannan NJ, Stephens AN, Rainczuk A, Hincks C, Rombauts LJF, Salamonsen LA. 2D-DiGE analysis of the human endometrial secretome reveals differences between receptive and nonreceptive states in fertile and infertile women. *J Proteome Res* 2010;**9**:6256–6264.
- Hansen J, Bross P, Westergaard M, Nielsen M, Eiberg H. The genomic structure of the human mitochondrial chaperoin genes: Hsp60 and Hsp10 are localised head to head on chromosome 2 separated by a bidirectional promoter. *Hum Genet* 2003;**112**:71–77.
- Haouzi D, Assou S, Dechanet C, Anahory T, Dechaud H, Vos J De, Hamamah S. Controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization alters endometrial receptivity in humans: protocol effects. *Biol Reprod* 2010;**82**:679–686. Oxford University Press (OUP).
- Haouzi D, Assou S, Mahmoud K, Tondeur S, Rème T, Hedon B, Vos J De, Hamamah S. Gene expression profile of human endometrial receptivity: comparison between natural and stimulated cycles for the same patients. *Hum Reprod* 2009a;**24**:1436–1445.
- Haouzi D, Bissonnette L, Gala A, Assou S, Entezami F, Perrochia H, Dechaud H, Hugues J-N, Hamamah S. Endometrial receptivity profile in patients with premature progesterone elevation on the day of HCG administration. *Biomed Res Int* 2014;**2014**:951937.
- Haouzi D, Dechaud H, Assou S, Vos J De, Hamamah S. Insights into human endometrial receptivity from transcriptomic and proteomic data. *Reprod Biomed Online* 2012;**24**:23–34.
- Haouzi D, Mahmoud K, Fourar M, Bendhaou K, Dechaud H, Vos J De, Rème T, Dewailly D, Hamamah S. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum Reprod* 2009b;**24**:198–205.
- Hermes-Lima M, Pereira B, Bechara EJ. Are free radicals involved in lead poisoning? *Xenobiotica* 1991;**21**:1085–1090.
- Hertz-Picciotto I. The evidence that lead increases the risk for spontaneous abortion. *Am J Ind Med* 2000;**38**:300–309.
- Hess A, Nayak N, Giudice L. Oviduct and Endometrium Cyclic Changes in the Primate Oviduct and Endometrium. *Knobil Neill's Physiol Reprod* 2006;, p. 337–381. Elsevier Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780125154000500142>.
- Hipwell AE, Kahn LG, Factor-Litvak P, Porucznik CA, Siegel EL, Fichorova RN, Hamman RF, Klein-

- Fedyshin M, Harley KG. Exposure to non-persistent chemicals in consumer products and fecundability: A systematic review. *Hum Reprod Update* 2019;**25**:51–71. Oxford University Press.
- Hong Y, Wang J, Zhang P, Yang S, Song K, Yu F, Liu W. Histopathological and gene expression analysis of mice exposed to diethylstilbestrol. *Toxicol Mech Methods* 2010;**20**:105–111.
- Horcajadas JA, Mínguez P, Dopazo J, Esteban FJ, Domínguez F, Giudice LC, Pellicer A, Simón C. Controlled ovarian stimulation induces a functional genomic delay of the endometrium with potential clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;**93**:4500–4510. Endocrine Society.
- Horcajadas JA, Riesewijk A, Polman J, Os R van, Pellicer A, Mosselman S, Simón C. Effect of controlled ovarian hyperstimulation in IVF on endometrial gene expression profiles. *Mol Hum Reprod* 2005;**11**:195–205.
- Horcajadas JA, Sharkey AM, Catalano RD, Sherwin JRA, Domínguez F, Burgos LA, Castro A, Peraza MR, Pellicer A, Simón C. Effect of an intrauterine device on the gene expression profile of the endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;**91**:3199–3207.
- Hörth P, Miller CA, Preckel T, Wenz C. Efficient Fractionation and Improved Protein Identification by Peptide OFFGEL Electrophoresis. *Mol Cell Proteomics* 2006;**5**:1968–1974.
- Hu H, Pepper L, Goldman R. Effect of repeated occupational exposure to lead, cessation of exposure, and chelation on levels of lead in bone. *Am J Ind Med* 1991;**20**:723–735.
- Hu S, Yao G, Wang Y, Xu H, Ji X, He Y, Zhu Q, Chen Z, Sun Y. Transcriptomic changes during the pre-receptive to receptive transition in human endometrium detected by RNA-Seq. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;**99**:E2744–E2753.
- Huang J, Qin H, Yang Y, Chen X, Zhang J, Laird S, Chiu Wang C, Fung Chan T, Chiu Li T, Wang CC, et al. A comparison of transcriptomic profiles in endometrium during window of implantation between women with unexplained recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Reproduction* 2017;**153**:749–758.
- Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, Beeregowda KN. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol* 2014;**7**:60–72. Slovak Toxicology Society.
- Jameil N Al. Maternal serum lead levels and risk of preeclampsia in pregnant women: A cohort study in a maternity hospital, Riyadh, Saudi Arabia. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;**7**:3182–3189. E-Century Publishing Corporation.
- Jameson JL, DeGroot LJ, Kretser DM (David M. De. *Endocrinology : Adult and pediatric. volume 1*. 2010; Saunders/Elsevier.
- Jaroenporn S, Malaivijitnond S, Wattanasirmit K, Watanabe G, Taya K, Cherdshewasart W. Assessment of fertility and reproductive toxicity in adult female mice after long-term exposure to Pueraria mirifica herb. *J Reprod Dev* 2007;**53**:995–1005.
- Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull* 2003;**68**:167–182.
- John NJ, Linke M, Denker H-W. Quantitation of Human Choriocarcinoma Spheroid Attachment to Uterine Epithelial Cell Monolayers. *Vitr Cell Dev Biol* 1993;**29 A**:461–468.
- Johnson MD, Kenney N, Stoica A, Hilakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G, Clarke R, Sholler PF, Lirio AA, Foss C, et al. Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat Med* 2003;**9**:1081–1084.

- Johnstone EB, Louis GMB, Parsons PJ, Steuerwald AJ, Palmer CD, Chen Z, Sun L, Hammoud AO, Dorais J, Peterson CM. Increased urinary cobalt and whole blood concentrations of cadmium and lead in women with uterine leiomyomata: Findings from the ENDO Study. *Reprod Toxicol* 2014;**49**:27–32.
- Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 2011;**283**:65–87.
- Jung MC, Thornton I. Environmental contamination and seasonal variation of metals in soils, plants and waters in the paddy fields around a Pb-Zn mine in Korea. *Sci th Total Environ* 1997;**198**:105–121.
- Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, Osteen K, Taylor RN, Lessey BA, Giudice LC, *et al.* Global Gene Profiling in Human Endometrium during the Window of Implantation. 2002;**143**:2119–2138.
- Kassambara A, Mundt F. Factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses. *R Packag version* 2017;**1**..
- Katz-Jaffe MG, Gardner DK. Can proteomics help to shape the future of human assisted conception? *Reprod Biomed Online* 2008;**17**.; p. 497–501. Reproductive Healthcare Ltd.
- Kawaguchi M, Morohoshi K, Masuda J, Watanabe G, Morita M, Imai H, Taya K, Himi T. Maternal isobutyl-paraben exposure decreases the plasma corticosterone level in dams and sensitivity to estrogen in female offspring rats. *J Vet Med Sci* 2009;**71**:1027–1033.
- Kazantzis G. Role of cobalt, iron, lead, manganese, mercury, platinum, selenium, and titanium in carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1981;**Vol. 40**:143–161.
- Kelce WR, Wilson EM. Environmental antiandrogens: Developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications. *J Mol Med* 1997;**75**:198–207. Springer Verlag.
- Khan K, Khan H, Lu Y, Ihsanullah I, Nawab J, Khan S, Shah NS, Shamshad I, Maryam A. Evaluation of toxicological risk of foodstuffs contaminated with heavy metals in Swat, Pakistan. *Ecotoxicol Environ Saf* 2014;**108**:224–232. Elsevier.
- Kim HS, Kim YJ, Seo YR. An Overview of Carcinogenic Heavy Metal: Molecular Toxicity Mechanism and Prevention. *J Cancer Prev* 2015;**20**:232–240. Korean Society of Cancer Prevention.
- Kimmel CA, Grant LD, Sloan CS, Gladen BC. Chronic low-level lead toxicity in the rat. I. Maternal toxicity and perinatal effects. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980;**56**:28–41.
- King AE, Critchley HOD, Kelly RW. Innate immune defences in the human endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;**1**:116.
- Kitajima M, Khan KN, Fujishita A, Masuzaki H, Koji T, Ishimaru T. Expression of the arylhydrocarbon receptor in the peri-implantation period of the mouse uterus and the impact of dioxin on mouse implantation. *Arch Histol Cytol* 2004;**67**:465–474.
- Koler M, Achache H, Tsafirir A, Smith Y, Revel A, Reich R. Disrupted gene pattern in patients with repeated in vitro fertilization (IVF) failure. *Hum Reprod* 2009;**24**:2541–2548.
- Koot YEM, Hooff SR Van, Boomsma CM, Leenen D Van, Koerkamp MJAG, Goddijn M, Eijkemans MJC, Fauser BCJM, Holstege FCP, Macklon NS. An endometrial gene expression signature accurately predicts recurrent implantation failure after IVF. *Sci Rep* 2016;**6**:19411.
- Krikun G, Mor G, Alvero A, Guller S, Schatz F, Sapi E, Rahman M, Caze R, Qumsiyeh M,

- Lockwood CJ. A novel immortalized human endometrial stromal cell line with normal progesterational response. *Endocrinology* 2004;**145**:2291–2296.
- Krizek M, Senft V, Motán J. Copper and the human body. *Cas Lek Ces* 1997;**136**:698–701.
- Kumar V, Tripathi VK, Jahan S, Agrawal M, Pandey A, Khanna VK, Pant AB. Lead Intoxication Synergies of the Ethanol-Induced Toxic Responses in Neuronal Cells—PC12. *Mol Neurobiol* 2015;**52**:1504–1520.
- Labarta E, Martínez-Conejero JA, Alamá P, Horcajadas JA, Pellicer A, Simón C, Bosch E. Endometrial receptivity is affected in women with high circulating progesterone levels at the end of the follicular phase: a functional genomics analysis. *Hum Reprod* 2011;**26**:1813–1825.
- Laks DR. Assessment of chronic mercury exposure within the U.S. population, national health and nutrition examination survey, 1999-2006. *BioMetals* 2009;**22**:1103–1114.
- Leavitt J, Chen ZP, Lockwood CJ, Schatz F. Regulation of synthesis of the Transformation-induced Protein, Leukocyte Plastin, by Ovarian Steroid Hormones. *Cancer Res* 1994;**54**:3447–3454.
- Lédée N, Petitbarat M, Rahmati M, Dubanchet S, Chaouat G, Sandra O, Perrier-d’Hauterive S, Munaut C, Foidart JM. New pre-conception immune biomarkers for clinical practice: Interleukin-18, interleukin-15 and TWEAK on the endometrial side, G-CSF on the follicular side. *J Reprod Immunol* 2011;**88**:118–123.
- Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. The SVA package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics* 2012;**28**:882–883.
- Lemini C, Jaimez R, Avila ME, Franco Y, Larrea F, Lemus AE. In vivo and in vitro estrogen bioactivities of alkyl parabens. *Toxicol Ind Health* 2003;**19**:69–79.
- Lessey BA. The use of integrins for the assessment of uterine receptivity. *Fertil Steril* 1994;**61**:812–814.
- Lessey BA. Integrins and the endometrium: New markers of uterine receptivity. *Ann N Y Acad Sci* 1997;**828**:, p. 111–122. Blackwell Publishing Inc.
- Lessey BA. Endometrial integrins and the establishment of uterine receptivity. *Hum Reprod* 1998;**13**:247–258. Oxford University Press (OUP).
- Lessey BA. Assessment of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2011;**96**:522–529.
- Lessey BA, Castelbaum AJ. Integrins in the endometrium of women with endometriosis. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* 1995;**102**:347–348.
- Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, Buck CA, Schinnar R, Bilker W, Strom BL. Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;**79**:643–649. The Endocrine Society.
- Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, Sun J. Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertil Steril* 1995;**63**:535–542. Elsevier Inc.
- Li J, Tan Z, Li M, Xia T, Liu P, Yu W. Proteomic analysis of endometrium in fertile women during the pre-receptive and receptive phases after luteinizing hormone surge. *Fertil Steril* 2011;**95**:1161–1163.
- Li Y, Kang Z-LL, Qiao N, Hu L-MM, Ma Y-JJ, Liang X-HH, Liu J-LL, Yang Z-MM. Effects of Excess

- Copper Ions on Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells. *Biol Trace Elem Res* 2017a;**177**:10–15. Biological Trace Element Research.
- Li Y, Kang ZL, Qiao N, Hu LM, Ma YJ, Liang XH, Liu JL, Yang ZM. Effects of Excess Copper Ions on Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells. *Biol Trace Elem Res* 2017b;**177**:10–15. Biological Trace Element Research.
- Lim H, Ma L, Ma W, Maas RL, Dey SK. Hoxa-10 Regulates Uterine Stromal Cell Responsiveness to Progesterone during Implantation and Decidualization in the Mouse. *Mol Endocrinol* 1999;**13**:1005–1017.
- Lim KJH, Odukoya OA, Ajjan RA, Li TC, Weetman AP, Cooke ID. The role of T-helper cytokines in human reproduction. *Fertil Steril* 2000;**73**:136–142. Elsevier.
- Lin CS, Park T, Zong Ping Chen, Leavitt J. Human plastin genes. Comparative gene structure, chromosome location, and differential expression in normal and neoplastic cells. *J Biol Chem* 1993;**268**:2781–2792.
- Linder MC. The relationship of copper to DNA damage and damage prevention in humans. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 2012;**733**:83–91. Elsevier B.V.
- Liu S, Jiang L, Meng X, Han X, Cheng D, Zhang T, Miao Y. Effects of Aroclor 1254 on in vivo oocyte maturation in the mouse. *PLoS One* 2014;**9**:e102064. Public Library of Science.
- Liu Y, Lee KF, Ng EHY, Yeung WSB, Ho PC. Gene expression profiling of human peri-implantation endometria between natural and stimulated cycles. *Fertil Steril* 2008;**90**:2152–2164.
- Luderer U, Kesner JS, Fuller JM, Krieg EF, Meadows JW, Tramma SL, Yang H, Baker D. Effects of gestational and lactational exposure to heptachlor epoxide on age at puberty and reproductive function in men and women. *Environ Res* 2013;**121**:84–94.
- Macklon N. Recurrent implantation failure is a pathology with a specific transcriptomic signature. *Fertil Steril* 2017;**108**:9–14. Elsevier Inc.
- Macklon NS, Gaast MH Van Der, Hamilton A, Fauser BCJM, Giudice LC. The impact of ovarian stimulation with recombinant FSH in combination with GnRH antagonist on the endometrial transcriptome in the window of implantation. *Reprod Sci* 2008;**15**:357–365.
- Manohar M, Khan H, Sirohi VK, Das V, Agarwal A, Pandey A, Siddiqui WA, Dwivedi A. Alteration in endometrial proteins during early-and mid-secretory phases of the cycle in women with unexplained infertility. *PLoS One* 2014;**9**:e111687. Public Library of Science.
- Marions L, Gemzell Danielsson K. Expression of cyclo-oxygenase in human endometrium during the implantation period. *Mol Hum Reprod* 1999;**5**:961–965.
- Martin MB, James Voeller H, Gelmann EP, Jianming L, Stoica EG, Hebert EJ, Reiter R, Singh B, Danielsen M, Pentecost E, et al. Role of cadmium in the regulation of AR gene expression and activity. *Endocrinology* 2002;**143**:263–275.
- Martin MB, Reiter R, Pham T, Avellanet YR, Camara J, Lahm M, Pentecost E, Pratap K, Gilmore BA, Divekar S, et al. Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 2003;**144**:2425–2436.
- Massányi P, Lukác N, Uhrín V, Toman R, Pivko J, Rafay J, Forgás Z, Somosy Z, Lukáč N, Uhrín V, et al. Female reproductive toxicology of cadmium. *Acta Biol Hung* 2007;**58**:287–299.
- Mathew BB. Free radicals and antioxidants: A review. *J Pharm Res* 2011;**4**:4340–4343.

- Matsubayashi H, Kitaya K, Yamaguchi K, Nishiyama R, Takaya Y, Ishikawa T. Is a high serum copper concentration a risk factor for implantation failure? *BMC Res Notes* 2017;**10**:1–6. BioMed Central.
- McGivern RF, Sokol RZ, Berman NG. Prenatal lead exposure in the rat during the third week of gestation: long-term behavioral, physiological, and anatomical effects associated with reproduction. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991;**110**:206–215.
- McMichael AJ, Vimpani G V., Robertson EF, Baghurst PA, Clark PD. The Port Pirie cohort study: Maternal blood lead and pregnancy outcome. *J Epidemiol Community Health* 1986;**40**:18–25.
- Mering C von, Huynen M, Jaeggi D, Schmidt S, Bork P, Snel B. STRING: A database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Res* 2003;**31**:258–261.
- Merrill MA La, Vandenberg LN, Smith MT, Goodson W, Browne P, Patisaul HB, Guyton KZ, Kortenkamp A, Cogliano VJ, Woodruff TJ, *et al.* Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat Rev Endocrinol* 2020;**16**:45–57. Nature Research.
- Mertzaniidou A, Wilton L, Cheng J, Spits C, Vanneste E, Moreau Y, Vermeesch JR, Sermon K. Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Hum Reprod* 2013;**28**:256–264.
- Meseguer M, Aplin JD, Caballero-Campo P, O'Connor JE, Martín JC, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Human Endometrial Mucin MUC1 Is Up-Regulated by Progesterone and Down-Regulated In Vitro by the Human Blastocyst1. *Biol Reprod* 2001;**64**:590–601. Oxford University Press (OUP).
- Milo GE, Malarkey WB, Powell JE, Blakeslee JR, Yohn S. Effects of Steroid Hormones in Fetal Bovine Serum on Plating and Cloning of Human Cells in vitro Reviewed work (s): Published by : Society for In Vitro Biology Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/20170259> . Your use of the JSTOR archive indicates y. *Sociiety Vitr Biol* 1976;**12**:23–30.
- Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Corica A, Diaz JI, Williams S, Bocca S, Oehninger S. In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod* 2005;**20**:2104–2117.
- Mirkin S, Nikas G, Hsiu JG, Díaz J, Oehninger S. Gene expression profiles and structural/functional features of the peri-implantation endometrium in natural and gonadotropin-stimulated cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;**89**:5742–5752.
- Montazeri M, Sanchez-Lopez JA, Caballero I, Maslehat Lay N, Elliott S, López-Martín S, Yáñez-Mó M, Fazeli A. Activation of Toll-like receptor 3 reduces actin polymerization and adhesion molecule expression in endometrial cells, a potential mechanism for viral-induced implantation failure. *Hum Reprod* 2015;**30**:893–905.
- Morais S, e Costa FG, Lourdes Pereir M de. Heavy Metals and Human Health. *Environ Heal - Emerg Issues Pract* 2012; InTech.
- Munné S. Preimplantation genetic diagnosis of structural abnormalities. *Mol Cell Endocrinol* 2001;**183 Suppl 1**:S55-8.
- Murphy CR. Understanding the apical surface markers of uterine receptivity. *Hum Reprod* 2000;**15**:2451–2454.

- Murphy CR. Uterine receptivity and the plasma membrane transformation. *Cell Res* 2004;**14**:259–267.
- Murray MJ, Meyer WR, Zaino RJ, Lessey BA, Novotny DB, Ireland K, Zeng D, Fritz MA. A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertil Steril* 2004;**81**:1333–1343.
- Myers ER, Silva S, Barnhart K, Groben PA, Richardson MS, Robboy SJ, Leppert PY, Coutifaris C. Interobserver and intraobserver variability in the histological dating of the endometrium in fertile and infertile women. *Fertil Steril* 2004;**82**:1278–1282. Elsevier Inc.
- Nagaoka SI, Hassold TJ, Hunt PA. Human aneuploidy: Mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet* 2012;**13**:493–504.
- Neal AP, Stansfield KH, Guilarte TR. Enhanced nitric oxide production during lead (Pb²⁺) exposure recovers protein expression but not presynaptic localization of synaptic proteins in developing hippocampal neurons. *Brain Res* 2012;**1439**:88–95.
- Neal AP, Worley PF, Guilarte TR. Lead exposure during synaptogenesis alters NMDA receptor targeting via NMDA receptor inhibition. *Neurotoxicology* 2011;**32**:281–289.
- Nelson DI, Concha-Barrientos M, Driscoll T, Steenland K, Fingerhut M, Punnett L, Prüss-Üstün A, Leigh J, Corvalan C. The global burden of selected occupational diseases and injury risks: Methodology and summary. *Am J Ind Med* 2005;**48**:400–418.
- Nesvizhskii AI. Protein identification by tandem mass spectrometry and sequence database searching. *Methods Mol Biol* 2007;**367**:87–119.
- Newbold R. Cellular and molecular effects of developmental exposure to diethylstilbestrol: implications for other environmental estrogens. *Environ Health Perspect* 1995;**103**:83–87.
- Nikas G. Pinopodes as markers of endometrial receptivity in clinical practice. *Hum Reprod* 1999;**14**:, p. 99–106. Oxford University Press.
- Nikas G, Makrigiannakis A. Endometrial Pinopodes and Uterine Receptivity. *Ann N Y Acad Sci* 2003;**997**:120–123.
- Nishihama Y, Yoshinaga J, Iida A, Konishi S, Imai H, Yoneyama M, Nakajima D, Shiraishi H. Association between paraben exposure and menstrual cycle in female university students in Japan. *Reprod Toxicol* 2016;**63**:107–113. Elsevier Inc.
- Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 2001;**345**:1400–1408.
- Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the Endometrial Biopsy. *Fertil Steril* 1950;**1**:3–25. Elsevier BV.
- Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 1975;**122**:262–263.
- Nuran Ercal BSP, Hande Gurer-Orhan BSP, Nukhet Aykin-Burns BSP. Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal induced Oxidative Damage. *Curr Top Med Chem* 2001;**1**:529–539.
- Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 1999;**27**:29–34.
- Okada H, Nie G, Salamonsen LA. Requirement for proprotein convertase 5/6 during

- decidualization of human endometrial stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;**90**:1028–1034.
- Okada H, Tsuzuki T, Murata H. Decidualization of the human endometrium. *Reprod Med Biol* 2018;**17**:220–227. John Wiley and Sons Ltd.
- Okerete T, Sternlieb I, Morell AG, Herbert Scheinberg L. Systemic Absorption of Intrauterine Copper. *Am Assoc Adv Sci* 1972;**177**:358–360.
- Ong SE, Mann M. Mass Spectrometry–Based Proteomics Turns Quantitative. *Nat Chem Biol* 2005;**1**:252–262.
- Ortiz ME, Croxatto HB. Copper-T intrauterine device and levonorgestrel intrauterine system: biological bases of their mechanism of action. *Contraception* 2007;**75**:16–30.
- Parmar T, Gadkar-Sable S, Savardekar L, Katkam R, Dharma S, Meherji P, Puri CP, Sachdeva G. Protein profiling of human endometrial tissues in the midsecretory and proliferative phases of the menstrual cycle. *Fertil Steril* 2009;**92**:1091–1103. Elsevier Ltd.
- Patel S, Zhou C, Rattan S, Flaws JA. Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on the Ovary1. *Biol Reprod* 2015;**93**:. Oxford University Press (OUP).
- Patlolla AK, Barnes C, Yedjou C, Velma V. R, Tchounwou PB. Oxidative stress, DNA damage, and antioxidant enzyme induced by hexavalent chromium in Sprague-Dawley Rats. *Env Toxicol* 2009;**24**:66–73.
- Peng J, Gygi SP. Proteomics: the move to mixtures. *J Mass Spectrom* 2001;**36**:1083–1091.
- Peng S, Hajela RK, Atchison WD. Characteristics of block by Pb²⁺ of function of human neuronal L-, N-, and R-type Ca²⁺ channels transiently expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol* 2002;**62**:1418–1430.
- Peraza MA, Ayala-fierro F, Barber DS, Casarez E, Rael LT. Effects of Micronutrients on Metal Toxicity. *Environ Heal* 1998;**106**:203–216.
- Pérez-Debén S, Bellver J, Alamá P, Salsano S, Quiñonero A, Sebastian-Leon P, Díaz-Gimeno P, Domínguez F. iTRAQ comparison of proteomic profiles of endometrial receptivity. *J Proteomics* 2019;**203**:103381. Elsevier.
- Pérez-Debén S, Gonzalez-Martin R, Palomar A, Quiñonero A, Salsano S, Dominguez F. Copper and lead exposures disturb reproductive features of primary endometrial stromal and epithelial cells. *Reprod Toxicol* 2020;**93**:106–117. Elsevier Inc.
- Perkins M, Wright RO, Amarasiriwardena CJ, Jayawardene I, Rifas-Shiman SL, Oken E. Very low maternal lead level in pregnancy and birth outcomes in an eastern Massachusetts population. *Ann Epidemiol* 2014;**24**:915–919. Elsevier Inc.
- Petracco RG, Kong A, Grechukhina O, Krikun G, Taylor HS. Global gene expression profiling of proliferative phase endometrium reveals distinct functional subdivisions. *Reprod Sci* 2012;**19**:1138–1145.
- Petro EML, Leroy JLMR, Covaci A, Fransen E, Neubourg D De, Dirtu AC, Pauw I De, Bols PEJ. Endocrine-disrupting chemicals in human follicular fluid impair in vitro oocyte developmental competence. *Hum Reprod* 2012;**27**:1025–1033.
- Petroff BK, Roby KF, Gao X, Son D, Williams S, Johnson D, Rozman KK, Terranova PF. A review of mechanisms controlling ovulation with implications for the anovulatory effects of polychlorinated dibenzo-p-dioxins in rodents. *Toxicology* 2001;**158**:91–107.

- Plöckinger B, Dadak C, Meisinger V. Lead, mercury and cadmium in newborn infants and their mothers. *Z Geburtshilfe Perinatol* 1993;**197**:104–107.
- Ponnampalam AP, Weston GC, Trajstman AC, Susil B, Rogers PAW. Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling. *Mol Hum Reprod* 2004;**10**:879–893.
- Punyadeera C, Dassen H, Klomp J, Dunselman G, Kamps R, Dijcks F, Ederveen A, Goeij A de, Groothuis P. Oestrogen-modulated gene expression in the human endometrium. *Cell Mol Life Sci* 2005;**62**:239–250.
- Quaas A, Dokras A. Diagnosis and Treatment of Unexplained Infertility Diagnosis and Treatment of Unexplained Infertility continued Diagnosis of Unexplained Infertility: The Basic Infertility Evaluation. *Rev Obs Gynecol Rev Obstet Gynecol* 2008;**1**:69–76.
- Quansah R, Armah FA, Essumang DK, Luginaah I, Clarke E, Marfoh K, Cobbina SJ, Nketiah-Amponsah E, Namujju PB, Obiri S, *et al.* Association of arsenic with adverse pregnancy outcomes/infant mortality: A systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect* 2015;**123**:412–421. Public Health Services, US Dept of Health and Human Services.
- Rahman SN, Fatima P, Chowdhury AQ, Rahman MW. Blood level of lead in women with unexplained infertility. *Mymensingh Med J* 2013;**22**:508–512.
- Rai P, Kota V, Sundaram CS, Deendayal M, Shivaji S. Proteome of human endometrium: Identification of differentially expressed proteins in proliferative and secretory phase endometrium. *Proteomics - Clin Appl* 2010;**4**:48–59.
- Rana SVS. Perspectives in endocrine toxicity of heavy metals - A review. *Biol Trace Elem Res* 2014;**160**:1–14.
- Rasmussen LM, Sen N, Liu X, Craig ZR. Effects of oral exposure to the phthalate substitute acetyl tributyl citrate on female reproduction in mice. *J Appl Toxicol* 2017;**37**:668–675. John Wiley and Sons Ltd.
- Rattan S, Zhou C, Chiang C, Mahalingam S, Brehm E, Flaws JA. Exposure to endocrine disruptors during adulthood: Consequences for female fertility. *J Endocrinol* 2017;**233**:R109–R129. BioScientifica Ltd.
- Revel A. Defective endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2012;**97**:1028–1032.
- Reyes JL, Molina-Jijón E, Rodríguez-Muñoz R, Bautista-García P, Debray-García Y, Namorado MDC. Tight junction proteins and oxidative stress in heavy metals-induced nephrotoxicity. *Biomed Res Int* 2013;**2013**..
- Riesewijk A. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod* 2003;**9**:253–264.
- Rochester JR, Bolden AL. Bisphenol S and F: A systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol a substitutes. *Environ Health Perspect* 2015;**123**:643–650. Public Health Services, US Dept of Health and Human Services.
- Rogers JA, Metz L, Yong VW. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol Immunol* 2013;**53**:421–430.
- Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, *et al.* Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 2004;**3**:1154–1169.

- RStudio: Integrated Development for R. RStudio 2015; Boston Available from: <http://www.rstudio.com/>.
- Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, Bosch E, Mercader A, Vidal C, los Santos MJ De, Giles J, Labarta E, Domingo J, *et al.* Preimplantation genetic screening using fluorescence in situ hybridization in patients with repetitive implantation failure and advanced maternal age: two randomized trials. *Fertil Steril* 2013;**99**:1400–1407.
- Ruiz-Alonso M, Blesa D, Díaz-Gimeno P, Gómez E, Fernández-Sánchez M, Carranza F, Carrera J, Vilella F, Pellicer A, Simón C. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril* 2013;**100**:818–824.
- Ruiz-Alonso M, Blesa D, Simón C. The genomics of the human endometrium. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2012;**1822**:1931–1942.
- Ruiz-Alonso M, Galindo N, Pellicer A, Simón C. What a difference two days make: Personalized embryo transfer (pET) paradigm: A case report and pilot study. *Hum Reprod* 2014;**29**:1244–1247.
- Rzymiski P, Rzymiski P, Tomczyk K, Niedzielski P, Jakubowski K, Poniedziałek B, Opala T. Metal status in human endometrium: Relation to cigarette smoking and histological lesions. *Environ Res* 2014;**132**:328–333.
- Rzymiski P, Tomczyk K, Rzymiski P, Poniedziałek B, Opala T, Wilczak M. Impact of heavy metals on the female reproductive system. *Ann Agric Environ Med* 2015;**22**:259–264.
- Samalecos A, Reimann K, Wittmann S, Schulte HM, Brosens JJ, Bamberger AM, Gellersen B. Characterization of a novel telomerase-immortalized human endometrial stromal cell line, St-T1b. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;**7**:76.
- Sangha GK, Kaur K, Khera KS. Cypermethrin induced pathological and biochemical changes in reproductive organs of female rats. *J Environ Biol* 2013;**34**:99–105.
- Sapmaz-Metin M, Topcu-Tarladacalisir Y, Kurt-Omurlu I, Karaoz Weller B, Unsal-Atan S. A morphological study of uterine alterations in mice due to exposure to cadmium. *Biotech Histochem* 2017;**92**:264–273.
- Scotchie JG, Fritz MA, Young SL, Mocanu M, Lessey BA. Proteomic Analysis of the Luteal Endometrial Secretome. *Reprod Sci* 2009;**16**:883–893.
- Sebastian-Leon P, Garrido N, Remohí J, Pellicer A, Diaz-Gimeno P. Asynchronous and pathological windows of implantation: two causes of recurrent implantation failure. *Hum Reprod* 2018;**33**:626–635.
- Sedelaar JPM, Isaacs JT. Tissue culture media supplemented with 10% fetal calf serum contains a castrate level of testosterone. *Prostate* 2009;**69**:1724–1729.
- Sengupta P, Banerjee R, Nath S, Das S, Banerjee S. Metals and female reproductive toxicity. *Hum Exp Toxicol* 2015;**34**:679–697.
- Shannon P, Markiel A, Owen Ozier 2, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003;**13**:2498–2504.
- Sharma S, Godbole G, Modi D. Decidual Control of Trophoblast Invasion. *Am J Reprod Immunol* 2016;**75**:341–350. Blackwell Publishing Ltd.

- Sharpe R, Franks S. Environment, lifestyle and infertility--an inter-generational issue. *Nat Cell Biol* 2002;Suppl:s33-40.
- Shilov I V., Seymour SL, Patel AA, Loboda A, Tang WH, Keating SP, Hunter CL, Nuwaysir LM, Schaeffer DA. The Paragon Algorithm, a Next Generation Search Engine That Uses Sequence Temperature Values and Feature Probabilities to Identify Peptides from Tandem Mass Spectra. *Mol Cell Proteomics* 2007;**6**:1638–1655.
- Signorile PG, Spugnini EP, Mita L, Mellone P, D'Avino A, Bianco M, Diano N, Caputo L, Rea F, Viceconte R, *et al.* Pre-natal exposure of mice to bisphenol A elicits an endometriosis-like phenotype in female offspring. *Gen Comp Endocrinol* 2010;**168**:318–325. Academic Press Inc.
- Simmen FA, Simmen RCM. Orchestrating the menstrual cycle: Discerning the music from the noise. *Endocrinology* 2006;**147**:1094–1096.
- Simon A, Laufer N. Assessment and treatment of repeated implantation failure (RIF). *J Assist Reprod Genet* 2012;**29**:1227–1239.
- Simón C, Mercader A, Garcia-Velasco J, Nikas G, Moreno C, Remohí J, Pellicer A. Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;**84**:2638–2646.
- Simon C, Oberyé J, Bellver J, Vidal C, Bosch E, Horcajadas JA, Murphy C, Adams S, Riesewijk A, Mannaerts B, *et al.* Similar endometrial development in oocyte donors treated with either high- or standard-dose GnRH antagonist compared to treatment with a GnRH agonist or in natural cycles. *Hum Reprod* 2005;**20**:3318–3327.
- Smith KW, Souter I, Dimitriadis I, Ehrlich S, Williams PL, Calafat AM, Hauser R. Urinary paraben concentrations and ovarian aging among women from a fertility center. *Environ Health Perspect* 2013;**121**:1299–1305.
- Speisky H, Gómez M, Burgos-Bravo F, López-Alarcón C, Jullian C, Olea-Azar C, Aliaga ME. Generation of superoxide radicals by copper-glutathione complexes: Redox-consequences associated with their interaction with reduced glutathione. *Bioorganic Med Chem* 2009;**17**:1803–1810. Elsevier Ltd.
- Stanford JB, Mikolajczyk RT. Mechanisms of action of intrauterine devices: Update and estimation of postfertilization effects. *Am J Obstet Gynecol* 2002;**187**:1699–1708. Mosby Inc.
- Stevens VC. Some reproductive studies in the baboon. *Hum Reprod Update* 1997;**3**:533–540.
- Stoker TE, Perreault SD, Bremser K, Marshall RS, Murr A, Cooper RL. Acute exposure to molinate alters neuroendocrine control of ovulation in the rat. *Toxicol Sci* 2005;**84**:38–48.
- Su Y-S, Gelman A, Hill J, Yajima M. Journal of Statistical Software. *J Stat Softw* 2005;**14**:142.
- Sumpter JP, Jobling S. Male sexual development in “a sea of oestrogen”. *Lancet (London, England)* 1993;**342**:124–125.
- Sutton DJ, Tchounwou PB. Mercury induces the externalization of phosphatidyl-serine in human renal proximal tubule (HK-2) cells. *Int J Environ Res Public Health* 2007;**4**., p. 138–144.
- Swiersz L, Giudice LC. Unexplained infertility and the role of uterine receptivity. *Infertil Clin North Am* 1997;**8**:523–543.

- Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, Shay N Le, Nezhat CN, Kempson R, Lessey BA, *et al.* Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* 2006;**147**:1097–1121.
- Tamada H, Higashiyama C, Takano H, Kawate N, Inaba T, Sawada T. The effects of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor on preimplantation-embryo development and implantation in the rat. *Life Sci* 1999;**64**:1967–1973.
- Tamaya T, Nakata Y, Ohno Y, Nioka S, Furuta N, Okada H. The Mechanism of Action of the Copper Intrauterine Device**Presented at the Twentieth Memorial and General Meeting of The Japanese Society of Fertility and Sterility, October 2 to 4, 1975, Sendai, Japan. *Fertil Steril* 1976;**27**:767–772. Elsevier Masson SAS.
- Tambor V, Fučíková A, Lenčo J, Kacerovský M, Řeháček V, Stulík J, Pudil R. Application of proteomics in biomarker discovery: A primer for the clinician. *Physiol Res* 2010;**59**:471–497. Czech Academy of Sciences.
- Tanaka N, Miyazaki K, Tashiro H, Mizutani H, Okamura H. Changes in adenylyl cyclase activity in human endometrium during the menstrual cycle and in human decidua during pregnancy. *J Reprod Fertil* 1993;**98**:33–39.
- Tanrikut E, Karaer A, Celik O, Celik E, Otlu B, Yilmaz E, Ozgul O. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology Role of endometrial concentrations of heavy metals (cadmium, lead, mercury and arsenic) in the aetiology of unexplained infertility. *Eur J Obs Gynecol Reprod Bio* 2014;**179**:187–190.
- Tapia A, Gangi LM, Zegers-Hochschild F, Balmaceda J, Pommer R, Trejo L, Pacheco IM, Salvatierra AM, Henríquez S, Quezada M, *et al.* Differences in the endometrial transcript profile during the receptive period between women who were refractory to implantation and those who achieved pregnancy. *Hum Reprod* 2008;**23**:340–351.
- Tarantino G, Valentino R, Somma C Di, D'Esposito V, Passaretti F, Pizza G, Brancato V, Orio F, Formisano P, Colao A, *et al.* Bisphenol A in polycystic ovary syndrome and its association with liver-spleen axis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2013;**78**:447–453.
- Tauber PF, Manfred G, Cramer U, Zaneveldf LJD. Effect of the intrauterine contraceptive device on protein components of human uterine fluid. *Contraception* 1993;**48**:494–512.
- Taylor HS. The Role of HOX Genes in the Development and Function of the Female Reproductive Tract. *Semin Reprod Med* 2000;**18**:081–090.
- Taylor HS, Arici A, Olive D, Igarashi P. HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *J Clin Invest* 1998;**101**:1379–1384. American Society for Clinical Investigation.
- Taylor HS, Igarashi P, Olive DL, Arici A. Sex Steroids Mediate HOXA11 Expression in the Human Peri-Implantation Endometrium 1. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;**84**:1129–1135. The Endocrine Society.
- Tchounwou PB, Ishaque AB, Schneider J. Cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma cells (HepG2) exposed to cadmium chloride. *Mol Cell Biochem* 2001;**222**:21–28.
- Tchounwou PB, Newsome C, Williams J, Glass K. Copper-Induced Cytotoxicity and Transcriptional Activation of Stress Genes in Human Liver Carcinoma (HepG(2)) Cells. *Met Ions Biol Med* 2008;**10**:285–290.

- Tchounwou PB, Yedjou CG, Foxx DN, Ishaque AB, Shen E. Lead-induced cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Mol Cell Biochem* 2004;**255**:161–170.
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy metals toxicity and the environment. *EXS* 2012;**101**:133–164.
- Tei C, Maruyama T, Kuji N, Miyazaki T, Mikami M, Yoshimura Y. Reduced expression of $\alpha\beta 3$ integrin in the endometrium of unexplained infertility patients with recurrent IVF-ET failures: Improvement by danazol treatment. *J Assist Reprod Genet* 2003;**20**:, p. 13–20.
- Teng CT, Gladwell W, Beard C, Walmer D, Teng CS, Brenner R. Lactoferrin gene expression is estrogen responsive in human and rhesus monkey endometrium. *Mol Hum Reprod* 2002;**8**:58–67.
- Teng CT, Liu Y, Yang N, Walmer D, Panella T. Differential Molecular Mechanism of the Estrogen Action That Regulates Lactoferrin Gene in Human and Mouse. *Mol Endocrinol* 1992;**6**:1969–1981.
- Tetrault AM, Richman SM, Fei X, Taylor HS. Decreased endometrial HOXA10 expression associated with use of the copper intrauterine device. *Fertil Steril* 2009;**92**:1820–1824. Elsevier Ltd.
- Thie M, Harrach-Ruprecht B, Sauer H, Fuchs P, Denker HW. Cell adhesion to the apical pole of epithelium: a function of cell polarity. - PubMed - NCBI. *Eur J Cell Biol* 1995;**66**:180–191.
- Thomas Zoeller R, Brown TR, Doan LL, Gore AC, Skakkebaek NE, Soto AM, Woodruff TJ, Saal FS Vom. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: A statement of principles from the Endocrine Society. *Endocrinology* 2012;**153**:4097–4110.
- Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, Harton GL, Lavery SA, Moutou C, Robinson MD, Schmutzler AG, Scriven PN, *et al.* ESHRE PGD Consortium “Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)”. *Hum Reprod* 2005;**20**:35–48.
- Tiemann U. In vivo and in vitro effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, methoxychlor, and lindane on the female reproductive tract of mammals: a review. *Reprod Toxicol* 2008;**25**:316–326.
- Timeva T, Shterev A, Kyurkchiev S. Recurrent implantation failure: The role of the endometrium. *J Reprod Infertil* 2014;**15**:173–183. Avicenna Research Institute.
- Tsai J-H, Chi MM-Y, Schulte MB, Moley KH. The Fatty Acid Beta-Oxidation Pathway Is Important for Decidualization of Endometrial Stromal Cells in Both Humans and Mice¹. *Biol Reprod* 2014;**90**:1–12.
- Tseng LH, Chen I, Chen MY, Yan H, Wang CN, Lee CL. Genome-based expression profiling as a single standardized microarray platform for the diagnosis of endometrial disorder: an array of 126-gene model. *Fertil Steril* 2010;**94**:114–119.
- Tsutsumi R, Hiroi H, Momoeda M, Hosokawa Y, Nakazawa F, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y. Induction of early decidualization by cadmium, a major contaminant of cigarette smoke. *Fertil Steril* 2009;**91**:1614–1617.
- Turpeenniemi-Hujanen T, Feinberg RF, Kauppila A, Puistola U. Extracellular matrix interactions in early human embryos: implications for normal implantation events. *Fertil Steril* 1995;**64**:132–138.

- U.S Environmental Protection Agency. *Ambient water quality criteria for nickel; 440/5-80-060. Ambient water quality criteria for lead; 440/5-80-057. Ambient water quality criteria for chromiun; 440/5-80-035.* 1980; Washington DC.
- Uhlén M, Björling E, Agaton C, Szigartyo CA-K, Amini B, Andersen E, Andersson A-C, Angelidou P, Asplund A, Asplund C, *et al.* A Human Protein Atlas for Normal and Cancer Tissues Based on Antibody Proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2005;**4**:1920–1932.
- Ujvari D, Jakson I, Babayeva S, Salamon D, Rethi B, Gidlöf S, Hirschberg AL. Dysregulation of in vitro decidualization of human endometrial stromal cells by insulin via transcriptional inhibition of forkhead box protein O1. *PLoS One* 2017;**12**:1–18.
- Vaerenbergh I Van, Fatemi HM, Blockeel C, Lommel L Van, In'T Veld P, Schuit F, Kolibianakis EM, Devroey P, Bourgain C. Progesterone rise on HCG day in GnRH antagonist/rFSH stimulated cycles affects endometrial gene expression. *Reprod Biomed Online* 2011;**22**:263–271.
- Vaerenbergh I Van, McIntire R, Lommel L Van, Devroey P, Giudice L, Bourgain C. Gene expression during successful implantation in a natural cycle. *Fertil Steril* 2010;**93**:268.e15-268.e18. Elsevier Inc.
- Valdes CT, Schutt A, Simon C. Implantation failure of endometrial origin: it is not pathology, but our failure to synchronize the developing embryo with a receptive endometrium. *Fertil Steril* 2017;**108**:15–18. Elsevier Inc.
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Lee DH, Shioda T, Soto AM, Saal FS vom, Welshons W V., *et al.* Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* 2012;**33**:378–455.
- Vanneste E, Voet T, Caignec C Le, Ampe M, Konings P, Melotte C, Debrock S, Amyere M, Vikkula M, Schuit F, *et al.* Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 2009;**15**:577–583.
- Venuto L, Lindsay LA, Murphy CR. Moesin is involved in the cytoskeletal remodelling of rat decidual cells. *Acta Histochem* 2008;**110**:491–496.
- Vetillard A, Bailhache T. Cadmium: An Endocrine Disrupter That Affects Gene Expression in the Liver and Brain of Juvenile Rainbow Trout1. *Biol Reprod* 2005;**72**:119–126.
- Vinketova K, Mourdjeva M, Oreshkova T. Human Decidual Stromal Cells as a Component of the Implantation Niche and a Modulator of Maternal Immunity. *J Pregnancy* 2016;**2016**:. Hindawi Limited.
- Vizca JA, Csordas A, Griss J, Lavidas I, Mayer G, Perez-riverol Y, Reisinger F, Ternent T, Xu Q, Wang R, *et al.* 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res* 2016;**44**:447–456.
- Waddington CH. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol* 2012;**41**:10–13.
- Walmer DK, Padin CJ, Wrona MA, Healy BE, Bentley RC, Tsao M-S, Kohier MF, McLachlan JA, Gray KD. Malignant Transformation of the Human Endometrium Is Associated with Overexpression of Lactoferrin Messenger RNA and Protein. *Cancer Res* 1995;**55**:1168–1175.
- Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ. Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications. *Angew Chemie - Int Ed* 2005;**44**:7342–7372.
- Wang S, Shi X. Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem*

- 2001;**222**:3–9.
- Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, Franz M, Grouios C, Kazi F, Lopes CT, *et al.* The GeneMANIA prediction server: Biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res* 2010;**38**:214–220.
- Wasinger VC, Cordwell SJ, Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995;**16**:1090–1094.
- Wato E, Asahiyama M, Suzuki A, Funyu S, Amano Y. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 9) Effects of 2- or 4-week repeated dose studies and fertility study of di(2-ethylhexyl)adipate (DEHA) in female rats. *J Toxicol Sci* 2009;**34 Suppl 1**:SP101-9.
- Wetendorf M, DeMayo FJ. The progesterone receptor regulates implantation, decidualization, and glandular development via a complex paracrine signaling network. *Mol Cell Endocrinol* 2012;**357**:108–118.
- WHO, Environmental health criteria 165: inorganic lead 1995; World Health Organization.
- Wide M. Interference of lead with implantation in the mouse: effect of exogenous oestradiol and progesterone. *Teratology* 1980;**21**:187–191.
- Wide M. Retained developmental capacity of blastocysts transferred from lead-intoxicated mice. *Teratology* 1983;**28**:293–298.
- Wilhelm M, Lombeck I, Ohnesorge FK. Cadmium, copper, lead and zinc concentrations in hair and toenails of young children and family members: a follow-up study. *Sci Total Environ* 1994;**141**:275–280.
- Windham GC, Lee D, Mitchell P, Anderson M, Petreas M, Lasley B. Exposure to organochlorine compounds and effects on ovarian function. *Epidemiology* 2005;**16**:182–190.
- Wood GW, Hausmann E, Choudhuri R. Relative role of CSF-1, MCP-1/JE, and RANTES in macrophage recruitment during successful pregnancy. *Mol Reprod Dev* 1997;**46**:62–70.
- Wright DL, Afeiche MC, Ehrlich S, Smith K, Williams PL, Chavarro JE, Batsis M, Toth TL, Hauser R. Hair mercury concentrations and in vitro fertilization (IVF) outcomes among women from a fertility clinic. *Reprod Toxicol* 2015;**51**:125–132. Elsevier Inc.
- Wu D, Kimura F, Zheng L, Ishida M, Niwa Y, Hirata K, Takebayashi A, Takashima A, Takahashi K, Kushima R, *et al.* Chronic endometritis modifies decidualization in human endometrial stromal cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2017;**15**:16. BioMed Central Ltd.
- Wu J, Wang L, He J, Zhu C. In vitro cytotoxicity of Cu 2+, Zn 2+, Ag + and their mixtures on primary human endometrial epithelial cells. *Contraception* 2012;**85**:509–518. Elsevier Inc.
- Xin F, Susiarjo M, Bartolomei MS. Multigenerational and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals: A role for altered epigenetic regulation? *Semin Cell Dev Biol* 2015;**43**:66–75. Academic Press.
- Xuying Wan X, Jiangbo Zhu J, Yongfei Zhu Y, Yuping Zhu Y, Xili Ma X, Yiwen Zheng Y, Fei Wang F, Zhen Liu Z, Tianbao Zhang T, Wan X, *et al.* Rat ovarian follicle bioassay reveals adverse effects of cadmium chloride (CdCl₂) exposure on follicle development and oocyte maturation. *Toxicol Ind Health* 2010;**26**:609–618.
- Yanaihara A, Otsuka Y, Iwasaki S, Aida T, Tachikawa T, Irie T, Okai T. Differences in gene expression in the proliferative human endometrium. *Fertil Steril* 2005;**83**:1206–1215.

Elsevier Inc.

- Yang J, Ao N, Du J, Wang X, He Y. Protective effect of liraglutide against ER stress in the liver of high-fat diet-induced insulin-resistant rats. *Endocrine* 2015;**49**:106–118. Humana Press Inc.
- Ye L, Su ZJ, Ge RS. Inhibitors of testosterone biosynthetic and metabolic activation enzymes. *Molecules* 2011;**16**:9983–10001.
- Yedjou CG, Tchounwou PB. In-vitro cytotoxic and genotoxic effects of arsenic trioxide on human leukemia (HL-60) cells using the MTT and alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assays. *Mol Cell Biochem* 2007;**301**:123–130.
- Yoshizawa K, Brix AE, Sells DM, Jokinen MP, Wyde M, Orzech DP, Kissling GE, Walker NJ, Nyska A. Reproductive lesions in female Harlan Sprague-Dawley rats following two-year oral treatment with dioxin and dioxin-like compounds. *Toxicol Pathol* 2009;**37**:921–937.
- Younglai E V., Holloway AC, Foster WG. Environmental and occupational factors affecting fertility and IVF success. *Hum Reprod Update* 2005;**11**:43–57.
- Yu G, Wang L-G, Han Y, He Q-Y. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *Omi A J Integr Biol* 2012a;**16**:284–287.
- Yu M-H, Tsunoda H, Tsunoda M. *Environmental toxicology : biological and health effects of pollutants*. 2012b;. CRC Press.
- Zhao F, Zhou J, Zowalaty AE El, Li R, Dudley EA, Ye X. Timing and recovery of postweaning exposure to diethylstilbestrol on early pregnancy in CD-1 mice. *Reprod Toxicol* 2014;**49**:48–54. Elsevier Inc.
- Zhao W, Shi Z, Yuan F, Li G, Sun Y, Zhang Y, Wang Z. Melatonin modulates the effects of diethylstilbestrol (DES) on the anterior pituitary of the female wistar rat. *Folia Histochem Cytobiol* 2010;**48**:278–283. Via Medica.
- Zipper J, Medel M, Prager R. Alterations in fertility induced by unilateral intrauterine instillation of cytotoxic compounds in rats. *Am J Obstet Gynecol* 1968;**101**:971–978.

ANEXOS

IX. ANEXOS

Anexo I: Resultados adicionales. Tablas y Figuras suplementarias

Figura suplementaria 1. Poder estadístico del estudio iTRAQ. Se utilizó la función 'pow' del paquete 'sample size' de R para estimar el poder estadístico a través del gráfico 'power plot'. Para dicha estimación se utilizó un tamaño muestral de 10 por grupo, un nivel de significancia del 0,05 ($\alpha = 0,05$), un fold change de 1,5 para un total de 1.889 proteínas analizadas.

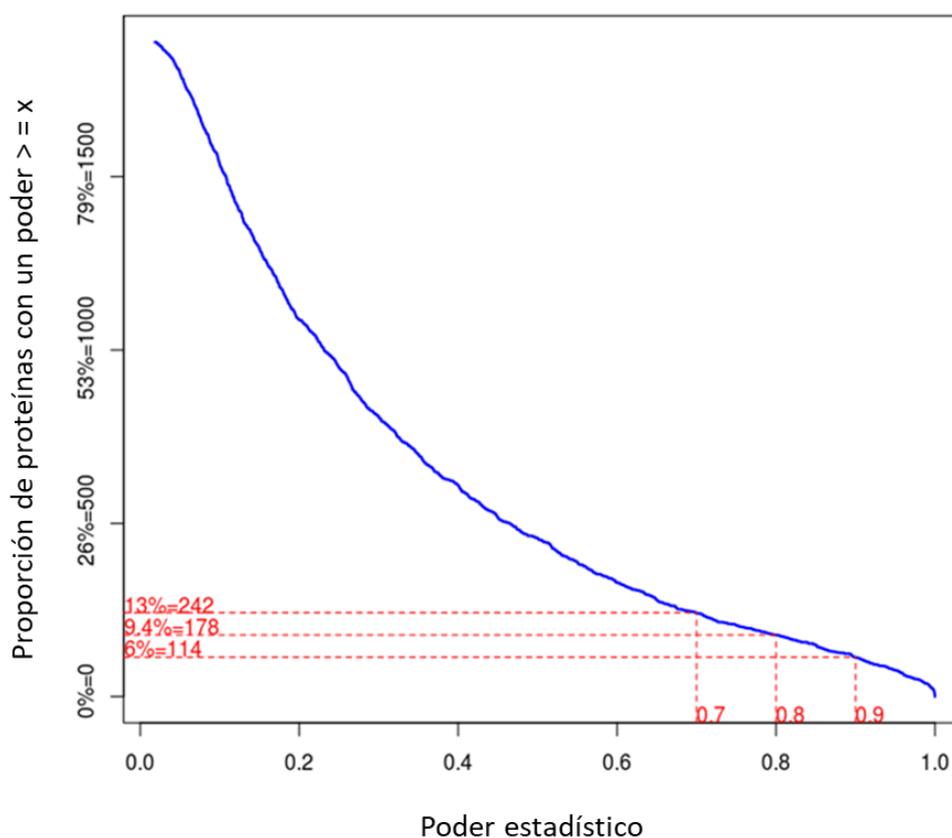


Tabla suplementaria 1. Lista de las 188 proteínas diferencialmente expresadas obtenidas tras el análisis ANOVA. El fold change promedio (FC) está expresado como la media del ratio de expresión de cada proteína en las muestras de un grupo (numerador) respecto a las muestras del otro grupo (denominador). ^aAccession code o número de identificación de la proteína de acuerdo a la base de datos Expsy. ^cp-valor ajustado de la comparación ANOVA.

Tabla suplementaria 1. 188 PDEs del ANOVA

Accession code ^a	Protein description	Gene name	FC(DIU/F)	FC(RIF/DIU)	FC(RIF/F)	adj.P.Val ^b
O00299	Chloride intracellular channel protein 1	<i>CLIC1</i>	1.275	-1.283	-1.007	< 0.01
O15143	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	<i>ARPC1B</i>	1.292	-1.320	-1.021	< 0.01
O95479	GDH/6PGL endoplasmic bifunctional protein	<i>H6PD</i>	1.189	-1.338	-1.125	< 0.01
P00450	Ceruloplasmin	<i>CP</i>	1.223	-1.366	-1.125	< 0.01
P01876	Ig alpha-1 chain C region	<i>IGHA1</i>	1.189	-1.376	-1.157	< 0.01
P02788	Lactotransferrin	<i>LTF</i>	1.347	-1.395	-1.035	< 0.01
P04179	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	<i>SOD2</i>	1.275	-1.366	-1.072	< 0.01
P05109	Protein S100-A8	<i>S100A8</i>	1.376	-1.395	-1.014	< 0.01
P05155	Plasma protease C1 inhibitor	<i>SERPIN1</i>	1.223	-1.366	-1.117	< 0.01
P05164	Myeloperoxidase	<i>MPO</i>	1.301	-1.320	-1.007	< 0.01
P06702	Protein S100-A9	<i>S100A9</i>	1.347	-1.434	-1.064	< 0.01
P13796	Plastin-2	<i>LCP1</i>	1.257	-1.424	-1.133	< 0.01
P19971	Thymidine phosphorylase	<i>TYMP</i>	1.275	-1.320	-1.042	< 0.01
P21333	Filamin-A	<i>FLNA</i>	1.266	-1.310	-1.035	< 0.01
P24158	Myeloblastin	<i>PRTN3</i>	1.275	-1.310	-1.028	< 0.01
P26447	Protein S100-A4	<i>S100A4</i>	1.320	-1.329	-1.007	< 0.01
P30084	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	<i>ECHS1</i>	-1.223	1.357	1.117	< 0.01
P30740	Leukocyte elastase inhibitor	<i>SERPIN1</i>	1.248	-1.329	-1.064	< 0.01
P40261	Nicotinamide N-methyltransferase	<i>NNMT</i>	1.231	-1.376	-1.117	< 0.01
P43490	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	<i>NAMPT</i>	1.275	-1.376	-1.079	< 0.01
P49913	Cathelicidin antimicrobial peptide	<i>CAMP</i>	1.329	-1.414	-1.064	< 0.01
P61626	Lysozyme C	<i>LYZ</i>	1.347	-1.338	1.014	< 0.01
P62249	40S ribosomal protein S16	<i>RPS16</i>	1.366	-1.223	1.110	< 0.01
P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform	<i>RPS4X</i>	1.404	-1.240	1.141	< 0.01
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	<i>LCN2</i>	1.329	-1.414	-1.064	< 0.01
P80365	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 2	<i>HSD11B2</i>	-1.214	1.357	1.117	< 0.01
Q01995	Transgelin	<i>TAGLN</i>	1.366	-1.275	1.079	< 0.01
Q16836	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	<i>HADH</i>	-1.197	1.376	1.149	< 0.01
Q5SSJ5	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	<i>HP1BP3</i>	1.347	-1.189	1.141	< 0.01
Q9Y2Q3	Glutathione S-transferase kappa 1	<i>GSTK1</i>	-1.072	1.347	1.257	< 0.01
Q9Y490	Talin-1	<i>TLN1</i>	1.257	-1.376	-1.094	< 0.01
Q9Y696	Chloride intracellular channel protein 4	<i>CLIC4</i>	1.347	-1.320	1.021	< 0.01
O00151	PDZ and LIM domain protein 1	<i>PDLIM1</i>	1.214	-1.292	-1.064	0.01
O00584	Ribonuclease T2	<i>RNASET2</i>	-1.266	1.266	1.000	0.01
O15231	Zinc finger protein 185	<i>ZNF185</i>	-1.248	1.310	1.050	0.01
O75874	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	<i>IDH1</i>	-1.266	1.257	1.000	0.01

Tabla suplementaria 1. Continuación

Accession code ^a	Protein description	Gene name	FC(DIU/F)	FC(RIF/DIU)	FC(RIF/F)	adj.P.Val ^b
O75915	PRA1 family protein 3	<i>ARL6IP5</i>	-1.141	1.320	1.157	0.01
O95831	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	<i>AIFM1</i>	-1.157	1.310	1.133	0.01
P00167	Cytochrome b5	<i>CYB5A</i>	-1.223	1.310	1.079	0.01
P00736	Complement C1r subcomponent	<i>C1R</i>	1.214	-1.283	-1.057	0.01
P00751	Complement factor B	<i>CFB</i>	1.117	-1.338	-1.197	0.01
P00966	Argininosuccinate synthase	<i>ASS1</i>	1.248	-1.301	-1.042	0.01
P01009	Alpha-1-antitrypsin	<i>SERPINA1</i>	1.021	-1.301	-1.275	0.01
P01023	Alpha-2-macroglobulin	<i>A2M</i>	1.214	-1.301	-1.079	0.01
P01857	Ig gamma-1 chain C region	<i>IGHM1</i>	1.214	-1.310	-1.087	0.01
P05787	Keratin, type II cytoskeletal 8	<i>KRT8</i>	-1.266	1.231	-1.028	0.01
P09466	Glycodelin	<i>PAEP</i>	1.165	-1.329	-1.133	0.01
P09543	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	<i>CNP</i>	1.064	1.231	1.301	0.01
P10412	Histone H1.4	<i>HIST1H1E</i>	1.292	-1.248	1.028	0.01
P16401	Histone H1.5	<i>HIST1H1B</i>	1.266	-1.223	1.035	0.01
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	<i>ATP5A1</i>	-1.223	1.338	1.094	0.01
P26038	Moesin	<i>MSN</i>	1.214	-1.320	-1.079	0.01
P26885	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2	<i>FKBP2</i>	-1.320	1.072	-1.231	0.01
P30040	Endoplasmic reticulum resident protein 29	<i>ERP29</i>	-1.283	1.189	-1.079	0.01
P35232	Prohibitin	<i>PHB</i>	-1.157	1.301	1.133	0.01
P35573	Glycogen debranching enzyme	<i>AGL</i>	1.301	-1.197	1.079	0.01
P40939	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	<i>HADHA</i>	-1.231	1.283	1.042	0.01
P46781	40S ribosomal protein S9	<i>RPS9</i>	1.283	-1.173	1.094	0.01
P48047	ATP synthase subunit O, mitochondrial	<i>ATP5O</i>	-1.117	1.283	1.141	0.01
P53007	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	<i>SLC25A1</i>	-1.173	1.338	1.141	0.01
P55084	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	<i>HADHB</i>	-1.266	1.292	1.014	0.01
P61604	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	<i>HSPE1</i>	-1.283	1.157	-1.110	0.01
P62280	40S ribosomal protein S11	<i>RPS11</i>	1.338	-1.189	1.125	0.01
P62753	40S ribosomal protein S6	<i>RPS6</i>	1.301	-1.125	1.157	0.01
Q02252	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	<i>ALDH6A1</i>	-1.214	1.329	1.094	0.01
Q13011	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	<i>ECH1</i>	-1.072	1.329	1.240	0.01
Q15043	Zinc transporter ZIP14	<i>SLC39A14</i>	-1.157	1.320	1.141	0.01
Q15056	Eukaryotic translation initiation factor 4H	<i>EIF4H</i>	-1.275	-1.000	-1.275	0.01
Q15942	Zyxin	<i>ZYX</i>	1.110	-1.338	-1.206	0.01
Q16890	Tumor protein D53	<i>TPD52L1</i>	-1.320	1.141	-1.157	0.01

Tabla suplementaria 1. Continuación

Accession code ^a	Protein description	Gene name	FC(DIU/F)	FC(RIF/DIU)	FC(RIF/F)	adj.P.Val ^b
Q6NVY1	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial	<i>HIBCH</i>	-1.231	1.310	1.064	0.01
Q8WX93	Palladin	<i>PALLD</i>	1.248	-1.257	-1.007	0.01
Q93062	RNA-binding protein with multiple splicing	<i>RBPM5</i>	1.231	-1.266	-1.028	0.01
Q93099	Homogentisate 1,2-dioxygenase	<i>HGD</i>	-1.189	1.310	1.094	0.01
Q99623	Prohibitin-2	<i>PHB2</i>	-1.157	1.347	1.165	0.01
Q9NRD9	Dual oxidase 1	<i>DUOX1</i>	-1.102	1.347	1.223	0.01
Q9NZU5	LIM and cysteine-rich domains protein 1	<i>LMCD1</i>	1.266	-1.248	1.014	0.01
Q9ULC5	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 5	<i>ACSL5</i>	-1.141	1.329	1.165	0.01
Q9Y2W2	WW domain-binding protein 11	<i>WBP11</i>	-1.257	-1.007	-1.257	0.01
Q9Y3Z3	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	<i>SAMHD1</i>	-1.028	1.275	1.248	0.01
O14638	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3	<i>ENPP3</i>	-1.133	1.292	1.141	0.02
O75521	Enoyl-CoA delta isomerase 2, mitochondrial	<i>ECI2</i>	-1.181	1.283	1.087	0.02
O75937	DnaJ homolog subfamily C member 8	<i>DNAJC8</i>	-1.181	-1.072	-1.266	0.02
O94788	Retinal dehydrogenase 2	<i>ALDH1A2</i>	1.240	-1.248	-1.007	0.02
P00568	Adenylate kinase isoenzyme 1	<i>AK1</i>	1.094	-1.283	-1.173	0.02
P01024	Complement C3	<i>C3</i>	1.149	-1.320	-1.149	0.02
P01834	Ig kappa chain C region	<i>IGKC</i>	1.157	-1.301	-1.125	0.02
P02760	Protein AMBP	<i>AMBP</i>	1.133	-1.292	-1.141	0.02
P02774	Vitamin D-binding protein	<i>GC</i>	1.050	-1.292	-1.231	0.02
P05783	Keratin, type I cytoskeletal 18	<i>KRT18</i>	-1.275	1.173	-1.087	0.02
P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	<i>GPI</i>	1.165	1.102	1.283	0.02
P06748	Nucleophosmin	<i>NPM1</i>	-1.275	1.141	-1.117	0.02
P08123	Collagen alpha-2(I) chain	<i>COL1A2</i>	-1.231	1.223	1.000	0.02
P08729	Keratin, type II cytoskeletal 7	<i>KRT7</i>	1.102	-1.301	-1.189	0.02
P09622	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	<i>DLD</i>	-1.141	1.301	1.141	0.02
P09960	Leukotriene A-4 hydrolase	<i>LTA4H</i>	1.248	-1.214	1.028	0.02
P0CG05	Ig lambda-2 chain C regions	<i>IGLC2</i>	1.050	-1.283	-1.223	0.02
P11216	Glycogen phosphorylase, brain form	<i>PYGB</i>	1.257	-1.181	1.064	0.02
P12277	Creatine kinase B-type	<i>CKB</i>	-1.248	1.257	1.007	0.02
P27144	Adenylate kinase 4, mitochondrial	<i>AK4</i>	-1.157	1.275	1.102	0.02
P27338	Amine oxidase [flavin-containing] B	<i>MAOB</i>	1.283	-1.102	1.165	0.02
P35579	Myosin-9	<i>MYH9</i>	1.189	-1.283	-1.079	0.02
P37108	Signal recognition particle 14 kDa protein	<i>SRP14</i>	-1.214	1.257	1.035	0.02
P39023	60S ribosomal protein L3	<i>RPL3</i>	1.283	-1.125	1.141	0.02
P46782	40S ribosomal protein S5	<i>RPS5</i>	1.094	1.173	1.292	0.02
P62277	40S ribosomal protein S13	<i>RPS13</i>	1.283	-1.165	1.110	0.02
P62899	60S ribosomal protein L31	<i>RPL31</i>	-1.165	1.292	1.110	0.02

Tabla suplementaria 1. Continuación

Accession code ^a	Protein description	Gene name	FC(DIU/F)	FC(RIF/DIU)	FC(RIF/F)	adj.P.Val ^b
P83731	60S ribosomal protein L24	<i>RPL24</i>	1.283	-1.125	1.141	0.02
Q13418	Integrin-linked protein kinase	<i>ILK</i>	1.141	-1.275	-1.110	0.02
Q15102	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	<i>PAFAH1B3</i>	-1.117	-1.133	-1.266	0.02
Q15181	Inorganic pyrophosphatase	<i>PPA1</i>	-1.275	1.189	-1.072	0.02
Q56VL3	OCIA domain-containing protein 2	<i>OCIAD2</i>	-1.028	1.275	1.248	0.02
Q9BSD7	Cancer-related nucleoside-triphosphatase	<i>NTPCR</i>	-1.165	1.292	1.110	0.02
Q9NSC7	Alpha-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 1	<i>ST6GALNAC1</i>	-1.266	1.157	-1.094	0.02
Q9UIJ7	GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial	<i>AK3</i>	-1.266	1.117	-1.133	0.02
Q9Y394	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7	<i>DHRS7</i>	-1.157	1.292	1.117	0.02
O60716	Catenin delta-1	<i>CTNND1</i>	-1.102	1.257	1.141	0.03
O75367	Core histone macro-H2A.1	<i>H2AFY</i>	1.257	-1.181	1.064	0.03
P02790	Hemopexin	<i>HPX</i>	1.057	-1.283	-1.206	0.03
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	<i>ATP5B</i>	-1.157	1.275	1.102	0.03
P07686	Beta-hexosaminidase subunit beta	<i>HEXB</i>	1.257	-1.117	1.125	0.03
P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	<i>HNRNPC</i>	-1.257	1.181	-1.064	0.03
P08697	Alpha-2-antiplasmin	<i>SERPINF2</i>	1.141	-1.257	-1.102	0.03
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	<i>HSPD1</i>	-1.240	1.173	-1.057	0.03
P16949	Stathmin	<i>STMN1</i>	-1.173	-1.087	-1.275	0.03
P21397	Amine oxidase [flavin-containing] A	<i>MAOA</i>	1.214	-1.240	-1.021	0.03
P27635	60S ribosomal protein L10	<i>RPL10</i>	1.266	-1.087	1.165	0.03
P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	<i>HNRNPA3</i>	-1.266	1.125	-1.133	0.03
P55196	Afadin	<i>MLLT4</i>	1.110	-1.266	-1.149	0.03
P55809	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial	<i>OXCT1</i>	-1.206	1.223	1.014	0.03
P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-I	<i>EIF4A1</i>	1.214	-1.214	1.000	0.03
P61204	ADP-ribosylation factor 3	<i>ARF3</i>	1.087	1.181	1.275	0.03
P62316	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	<i>SNRPD2</i>	-1.257	1.189	-1.057	0.03
P67809	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	<i>YBX1</i>	-1.257	1.173	-1.072	0.03
P68371	Tubulin beta-4B chain	<i>TUBB4B</i>	-1.157	1.248	1.079	0.03
Q14789	Golgin subfamily B member 1	<i>GOGB1</i>	-1.206	-1.035	-1.240	0.03
Q15424	Scaffold attachment factor B1	<i>SAFB</i>	-1.231	1.189	-1.035	0.03
Q92945	Far upstream element-binding protein 2	<i>KHSRP</i>	-1.248	1.035	-1.206	0.03
Q96KP4	Cytosolic non-specific dipeptidase	<i>CNDP2</i>	-1.248	1.173	-1.064	0.03
Q9Y6M7	Sodium bicarbonate cotransporter 3	<i>SLC4A7</i>	-1.110	1.266	1.141	0.03
O00217	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial	<i>NDUFS8</i>	-1.133	1.266	1.117	0.04
O14558	Heat shock protein beta-6	<i>HSPB6</i>	1.189	-1.197	-1.007	0.04

Tabla suplementaria 1. Continuación

Accession code ^a	Protein description	Gene name	FC(DIU/F)	FC(RIF/DIU)	FC(RIF/F)	adj.P.Val ^b
O43294	Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein	<i>TGFB111</i>	1.223	-1.173	1.042	0.04
P01871	Ig mu chain C region	<i>IGHM</i>	1.141	-1.275	-1.117	0.04
P02749	Beta-2-glycoprotein 1	<i>APOH</i>	-1.125	-1.149	-1.283	0.04
P02787	Serotransferrin	<i>TF</i>	1.042	-1.266	-1.214	0.04
P07737	Profilin-1	<i>PFN1</i>	1.223	-1.231	-1.007	0.04
P07954	Fumarate hydratase, mitochondrial	<i>FH</i>	-1.223	1.206	-1.014	0.04
P08603	Complement factor H	<i>CFH</i>	1.050	-1.266	-1.206	0.04
P09012	U1 small nuclear ribonucleoprotein A	<i>SNRPA</i>	-1.165	1.257	1.079	0.04
P15880	40S ribosomal protein S2	<i>RPS2</i>	1.248	-1.157	1.079	0.04
P21796	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	<i>VDAC1</i>	-1.042	1.257	1.206	0.04
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein	<i>AZGP1</i>	-1.117	-1.141	-1.266	0.04
P27105	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	<i>STOM</i>	1.240	-1.165	1.064	0.04
P37802	Transgelin-2	<i>TAGLN2</i>	1.197	-1.257	-1.042	0.04
P40763	Signal transducer and activator of transcription 3	<i>STAT3</i>	1.231	-1.181	1.050	0.04
P51659	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	<i>HSD17B4</i>	-1.042	1.257	1.206	0.04
P54577	Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic	<i>YARS</i>	1.223	-1.133	1.087	0.04
Q14980	Nuclear mitotic apparatus protein 1	<i>NUMA1</i>	-1.266	1.110	-1.133	0.04
Q15293	Reticulocalbin-1	<i>RCN1</i>	-1.231	1.197	-1.028	0.04
Q96AC1	Fermitin family homolog 2	<i>FERMT2</i>	1.133	-1.257	-1.102	0.04
Q96RQ9	L-amino-acid oxidase	<i>IL4I1</i>	1.214	-1.214	1.000	0.04
Q99959	Plakophilin-2	<i>PKP2</i>	-1.248	1.141	-1.094	0.04
Q9H0U4	Ras-related protein Rab-1B	<i>RAB1B</i>	-1.050	1.257	1.197	0.04
Q9ULR3	Protein phosphatase 1H	<i>PPM1H</i>	-1.223	1.206	-1.014	0.04
O15355	Protein phosphatase 1G	<i>PPM1G</i>	-1.189	-1.035	-1.231	0.05
O60488	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4	<i>ACSL4</i>	-1.181	1.257	1.064	0.05
O60701	UDP-glucose 6-dehydrogenase	<i>UGDH</i>	-1.133	1.266	1.117	0.05
P01034	Cystatin-C	<i>CST3</i>	-1.141	-1.094	-1.240	0.05
P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	<i>HLA-DRA</i>	1.214	-1.223	-1.007	0.05
P02768	Serum albumin	<i>ALB</i>	1.050	-1.266	-1.206	0.05
P04004	Vitronectin	<i>VTN</i>	-1.035	-1.206	-1.248	0.05
P05090	Apolipoprotein D	<i>APOD</i>	1.231	-1.165	1.057	0.05
P10515	Dihydropyridyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	<i>DLAT</i>	-1.181	1.240	1.050	0.05
P14618	Pyruvate kinase PKM	<i>PKM</i>	1.149	-1.240	-1.079	0.05
P14923	Junction plakoglobin	<i>JUP</i>	-1.094	1.257	1.149	0.05
P18124	60S ribosomal protein L7	<i>RPL7</i>	1.248	-1.072	1.165	0.05
P30825	High affinity cationic amino acid transporter 1	<i>SLC7A1</i>	-1.189	1.223	1.028	0.05

Tabla suplementaria 1. Continuación

Accession code ^a	Protein description	Gene name	FC(DIU/F)	FC(RIF/DIU)	FC(RIF/F)	adj.P.Val ^b
P47813	Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal	<i>EIF1AX</i>	-1.181	1.248	1.064	0.05
P49790	Nuclear pore complex protein Nup153	<i>NUP153</i>	-1.223	1.223	1.000	0.05
P49821	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	<i>NDUFB1</i>	-1.035	1.248	1.197	0.05
P61247	40S ribosomal protein S3a	<i>RPS3A</i>	1.223	-1.133	1.079	0.05
Q13247	Serine/arginine-rich splicing factor 6	<i>SRSF6</i>	-1.102	1.248	1.133	0.05
Q13435	Splicing factor 3B subunit 2	<i>SF3B2</i>	-1.206	-1.000	-1.206	0.05
Q14011	Cold-inducible RNA-binding protein	<i>CIRBP</i>	-1.223	1.206	-1.014	0.05
Q96DB5	Regulator of microtubule dynamics protein 1	<i>RMDN1</i>	-1.240	1.173	-1.057	0.05
Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain	<i>TUBA1C</i>	-1.125	1.257	1.110	0.05
Q9NVP1	ATP-dependent RNA helicase DDX18	<i>DDX18</i>	1.240	-1.133	1.094	0.05

Tabla suplementaria 2. Lista de las 12 rutas KEGG significativas para la comparación Fértil frente a DIU. Las rutas están ordenadas de acuerdo a su significancia (p-valor ajustado) y están referenciadas conforme a su identificador (ID) en la especie *Homo sapiens* (código hsa). El 'Gene ratio' muestra el ratio del número de genes incluidos en cada ruta respecto al número de proteínas/genes anotados en la base de datos KEGG (80) de las 133 PDEs obtenidas en la comparación Fértil frente a DIU. El 'Bg Ratio' denota el ratio del número total de genes que la base de datos KEGG tiene incluidos en cada una de esas rutas respecto al número total de genes anotados en la base de datos KEGG (7,009). 'Count' indica el recuento de genes/proteínas incluidos en cada una de las 12 rutas KEGG significativas.

Tabla suplementaria 2. 11 rutas KEGG significativas de la comparación Fértil frente a DIU

ID	KEGG pathway	GeneRatio	BgRatio	p.adjust	geneID	Count
hsa03010	Ribosoma	15/80	137/7009	1.59E-09	RPL10; RPL10A; RPL18; RPL24; RPL3; RPL7; RPS11; RPS13; RPS15; RPS16; RPS2; RPS3A; RPS4X; RPS6; RPS9	15
hsa00280	Degradación de la valina, leucine e isoleucina	8/80	48/7009	1.74E-06	ALDH6A1; ECHS1; HADH; HADHA; HADHB; HIBCH; IL4I1; OXCT1	8
hsa00410	Metabolismo de la b-alanina	5/80	31/7009	0.0005	ALDH6A1; CNBP2; ECHS1; HADHA; HIBCH	5
hsa00380	Metabolismo del triptófano	5/80	40/7009	0.0014	ECHS1; HADH; HADHA; IL4I1; MAOB	5

Tabla suplementaria 2. Continuación

ID	KEGG pathway	GeneRatio	BgRatio	p.adjust	geneID	Count
hsa00062	Elongación de los ácidos grasos	4/80	25/7009	0.0022	ECHS1; HADH; HADHA; HADHB	4
hsa00650	Metabolismo del butanoato	4/80	28/7009	0.0029	ECHS1; HADH; HADHA; OXCT1	4
hsa00640	Metabolismo del propanato	4/80	32/7009	0.0042	ALDH6A1; ECHS1; HADHA; HIBCH	4
hsa03040	Esplíceosoma	7/80	134/7009	0.0066	HNRNPA3; HNRNPC; HNRNPM; SNRNP70; SNRPD2; SNW1; WBP11	7
hsa00071	Degradación de los ácidos grasos	4/80	44/7009	0.0111	ECHS1; HADH; HADHA; HADHB	4
hsa01200	Metabolismo del carbón	6/80	113/7009	0.0116	ALDH6A1; ECHS1; FH; HADHA; HIBCH; IDH1	6
hsa01212	Metabolismo de los ácidos grasos	4/80	48/7009	0.0116	ECHS1; HADH; HADHA; HADHB	4
hsa01100	Rutas metabólicas	25/80	1239/7009	0.0116	AGL; AK2; ALDH1A2; ALDH6A1; ALPL; ASS1; CKB; CNDP2; ECHS1; FH; HADH; HADHA; HADHB; HEXB; HIBCH; IDH1; IL4I1; LTA4H; MAOB; NAMPT; NNMT; PYGB; ST6GALNAC1; TYMP; UQCRB	25

Tabla suplementaria 3. Lista de las 17 rutas KEGG significativas para la comparación RIF frente a DIU. Las rutas están ordenadas de acuerdo a su significancia (p-valor ajustado) y están referenciadas conforme a su identificador (ID) en la especie *Homo sapiens* (código hsa). El 'Gene ratio' muestra el ratio del número de genes incluidos en cada ruta respecto al número de proteínas/genes anotados en la base de datos KEGG (78) de las 158 PDEs obtenidas en la comparación RIF frente a DIU. El 'Bg Ratio' denota el ratio del número total de genes que la base de datos KEGG tiene incluidos en cada una de esas rutas respecto al número total de genes anotados en la base de datos KEGG (7.009). 'Count' indica el recuento de genes/proteínas incluidos en cada una de las 17 rutas KEGG significativas.

Tabla suplementaria 3. 17 rutas KEGG significativas de la comparación RIF frente a DIU

ID	KEGG pathway	GeneRatio	BgRatio	p.adjust	geneID	Count
hsa00280	Degradación de la valina, leucine e isoleucina	8/78	48/7009	2.71E-06	ALDH6A1; DLD; ECHS1; HADH; HADHA; HADHB; HIBCH; OXCT1	8
hsa00071	Degradación de los ácidos grasos	7/78	44/7009	1.40E-05	ACSL4; ACSL5; ECHS1; ECI2; HADH; HADHA; HADHB	7
hsa01100	Rutas metabólicas	32/78	1239/7009	2.13E-05	ACSL4; ACSL5; AK1; AK4; ALDH1A2; ALDH6A1; ASS1; ATP5A1; ATP5B; ATP5O; CKB; DLAT; DLD; ECHS1; ENPP3; H6PD; HADH; HADHA; HADHB; HGD; HIBCH; HSD17B4; IDH1; MAOA; NAMPT; NDUFS8; NDUFV1; NNMT; NTPCR; PKM; TYMP; UGDH	32
hsa04610	Cascadas del complemento y coagulación	8/78	79/7009	3.55E-05	A2M; C1R; C3; CFB; CFH; SERPINA1; SERPINF2; SERPING1	8
hsa04146	Peroxisoma	8/78	83/7009	4.04E-05	ACSL4; ACSL5; ECH1; ECI2; GSTK1; HSD17B4; IDH1; SOD2	8
hsa01200	Metabolismo del carbón	9/78	113/7009	4.04E-05	ALDH6A1; DLAT; DLD; ECHS1; H6PD; HADHA; HIBCH; IDH1; PKM	9
hsa01212	Metabolismo de Iso ácidos grasos	6/78	48/7009	0.0001191	ACSL4; ACSL5; ECHS1; HADH; HADHA; HADHB	6
hsa00640	Metabolismo del propanato	5/78	32/7009	0.00018801	ALDH6A1; DLD; ECHS1; HADHA; HIBCH	5
hsa00062	Elongación de los ácidos grasos	4/78	25/7009	0.0010524	ECHS1; HADH; HADHA; HADHB	4
hsa00650	Metabolismo del butanoato	4/78	28/7009	0.00149472	ECHS1; HADH; HADHA; OXCT1	4
hsa00410	Metabolismo de la beta-alanina	4/78	31/7009	0.00203602	ALDH6A1; ECHS1; HADHA; HIBCH	4
hsa00380	Metabolismo del triptófano	4/78	40/7009	0.00502514	ECHS1; HADH; HADHA; MAOA	4
hsa00760	Metabolismo de la nicotina y nicotamina	3/78	29/7009	0.01770397	ENPP3; NAMPT; NNMT	3
hsa00020	Ciclo del citrato (TCA)	3/78	30/7009	0.01821396	DLAT; DLD; IDH1	3
hsa00061	Biosíntesis de ácidos grasos	2/78	13/7009	0.03082971	ACSL4; ACSL5	2
hsa00620	Metabolismo del piruvato	3/78	40/7009	0.03231888	DLAT; DLD; PKM	3
hsa00190	Fosforilación oxidativa	5/78	133/7009	0.04786518	ATP5A1; ATP5B; ATP5O; NDUFS8; NDUFV1	5

Tabla suplementaria 4. Rutas KEGG comunes para las comparaciones Fértil frente a DIU y RIF frente a DIU. Se describen las proteínas implicadas en cada una de las 10 rutas KEGG comunes para cada una de las comparaciones junto a su correspondiente fold change. Los fold changes están expresados como la media del ratio de expresión de cada proteína en la condición Fértil o RIF respecto a la condición DIU. Los fold changes negativos indican que la proteína está ‘downregulada’ o su expresión está disminuida en los grupos Fértil o RIF. Los fold change positivos indican que la proteína está ‘upregulada’ o su expresión aumentada en los grupos Fértil o RIF.

Tabla suplementaria 4. 10 rutas KEGG compartidas al comparar DIU con Fértil y RIF

KEGG pathways	Protein name Uniprot	Gene name	FC (F/IUD)	FC (RIF/IUD)
Degradación de la valina, leucina e isoleucina (hsa002800)				
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHM	<i>ECHS1</i>	1.22	1.36
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	ECHA	<i>HADHA</i>	1.23	1.28
Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	ECHB	<i>HADHB</i>	1.27	1.29
Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial	SCOT1	<i>OXCT1</i>	1.21	1.23
Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	MMSA	<i>ALDH6A1</i>	1.22	1.33
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	HCDH	<i>HADH</i>	1.2	1.38
3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial	HIBCH	<i>HIBCH</i>	1.23	1.31
L-amino-acid oxidase	OXLA	<i>IL4I1</i>	-1.21	-
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	DLDH	<i>DLD</i>	-	1.3
Metabolismo de la beta-Alanina (hsa00410)				
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHM	<i>ECHS1</i>	1.22	1.36
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	ECHA	<i>HADHA</i>	1.23	1.28
Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	MMSA	<i>ALDH6A1</i>	1.22	1.33
3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial	HIBCH	<i>HIBCH</i>	1.23	1.31
Cytosolic non-specific dipeptidase	CNDP2	<i>CNDP2</i>	1.25	-
Metabolismo del Triptófano (hsa00380)				
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHM	<i>ECHS1</i>	1.22	1.36
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	ECHA	<i>HADHA</i>	1.23	1.28
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	HCDH	<i>HADH</i>	1.2	1.38
L-amino-acid oxidase	OXLA	<i>IL4I1</i>	-1.21	-
Amine oxidase [flavin-containing] B	AOFB	<i>MAOB</i>	-1.28	-
Amine oxidase [flavin-containing] A	AOFA	<i>MAOA</i>	-1.24	-1.24

Tabla suplementaria 4. Continuación

KEGG pathways	Protein name Uniprot	Gene name	FC (F/IUD)	FC (RIF/IUD)
<i>Elongación de los ácidos grasos (hsa00062)</i>				
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHM	<i>ECHS1</i>	1.22	1.36
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	ECHA	<i>HADHA</i>	1.23	1.28
Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	ECHB	<i>HADHB</i>	1.27	1.29
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	HCDH	<i>HADH</i>	1.2	1.38
<i>Metabolismo del butanoato (hsa00650)</i>				
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHM	<i>ECHS1</i>	1.22	1.36
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	ECHA	<i>HADHA</i>	1.23	1.28
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	HCDH	<i>HADH</i>	1.2	1.38
Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial	SCOT1	<i>OXCT1</i>	1.21	1.23
<i>Metabolismo del propanoato (hsa00640)</i>				
Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	MMSA	<i>ALDH6A1</i>	1.22	1.33
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHM	<i>ECHS1</i>	1.22	1.36
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	ECHA	<i>HADHA</i>	1.23	1.28
3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial	HIBCH	<i>HIBCH</i>	1.23	1.31
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	DLDH	<i>DLD</i>	-	1.3
<i>Degradación de los ácidos grasos (hsa00071)</i>				
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHM	<i>ECHS1</i>	1.22	1.36
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	HCDH	<i>HADH</i>	1.2	-
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	ECHA	<i>HADHA</i>	1.23	1.28
Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	ECHB	<i>HADHB</i>	1.27	1.29
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4	ACSL4	<i>ACSL4</i>	-	1.25
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 5	ACSL5	<i>ACSL5</i>	-	1.33
Enoyl-CoA delta isomerase 2, mitochondrial	ECI2	<i>ECI2</i>	-	1.28
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	HCDH	<i>HADH</i>	-	1.38
<i>Metabolismo del carbón (hsa01200)</i>				
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	ECHA	<i>HADHA</i>	1.23	1.28
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHM	<i>ECHS1</i>	1.22	1.36
Enoyl-CoA delta isomerase 2, mitochondrial	FUMH	<i>FH</i>	1.22	
3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial	HIBCH	<i>HIBCH</i>	1.23	1.31
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDHC	<i>IDH1</i>	1.26	1.26

Tabla suplementaria 4. Continuación

KEGG pathways	Protein name Uniprot	Gene name	FC (F/IUD)	FC (RIF/IUD)
Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	MMSA	<i>ALDH6A1</i>	1.22	1.33
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	DLDH	<i>DLD</i>	-	1.3
Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	ODP2	<i>DLAT</i>	-	1.24
GDH/6PGL endoplasmic bifunctional protein	G6PE	<i>H6PD</i>	-	-1.34
Pyruvate kinase PKM	KPYM	<i>PKM</i>	-	-1.24
Metabolismo de los ácidos grasos (hsa01212)				
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHM	<i>ECHS1</i>	1.22	1.36
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	HCDH	<i>HADH</i>	1.2	1.38
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	ECHA	<i>HADHA</i>	1.23	1.28
Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	ECHB	<i>HADHB</i>	1.27	1.29
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4	ACSL4	<i>ACSL4</i>	-	1.25
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 5	ACSL5	<i>ACSL5</i>	-	1.33
Rutas metabólicas (hsa01212)				
Adenylate kinase 2	KAD2	<i>AK2</i>	1.22	-
aldehyde dehydrogenase 6 family member A1	MMSA	<i>ALDH6A1</i>	1.22	1.33
alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	PPBT	<i>ALPL</i>	1.23	-
creatine kinase B	KCRB	<i>CKB</i>	1.25	1.26
CNDP dipeptidase 2	CNDP2	<i>CNDP2</i>	1.25	-
enoyl-CoA hydratase, short chain, 1, mitochondrial	ECHM	<i>ECHS1</i>	1.22	1.36
fumarate hydratase	FUMH	<i>FH</i>	1.22	-
hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	HCDH	<i>HADH</i>	1.2	1.38
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	ECHA	<i>HADHA</i>	1.23	1.28
Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	ECHB	<i>HADHB</i>	1.27	1.29
3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase	HIBCH	<i>HIBCH</i>	1.23	1.31
isocitrate dehydrogenase 1	IDHC	<i>IDH1</i>	1.26	1.26
Alpha-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 1	SIA7A	<i>ST6GALNAC1</i>	1.27	-
ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	QCR7	<i>UQCRB</i>	1.21	-
amylase-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase	GDE	<i>AGL</i>	-1.3	-
aldehyde dehydrogenase 1 family member A2	AL1A2	<i>ALDH1A2</i>	-1.24	-1.25
argininosuccinate synthase 1	ASSY	<i>ASS1</i>	-1.25	-1.3
hexosaminidase subunit beta	HEXB	<i>HEXB</i>	-1.26	-
interleukin 4 induced 1	OXLA	<i>IL4I1</i>	-1.21	-
leukotriene A4 hydrolase	LKHA4	<i>LTA4H</i>	-1.25	-
monoamine oxidase B	AOFB	<i>MAOB</i>	-1.28	-

Tabla suplementaria 4. Continuación

KEGG pathways	Protein name Uniprot	Gene name	FC (F/IUD)	FC (RIF/IUD)
nicotinamide phosphoribosyltransferase	NAMPT	NAMPT	-1.28	-1.37
nicotinamide N-methyltransferase	NNMT	NNMT	-1.23	-1.37
phosphorylase, glycogen brain	PYGB	PYGB	-1.26	-
thymidine phosphorylase	TYPH	TYMP	-1.27	-1.32
acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	ACSL4	ACSL4	-	1.25
acyl-CoA synthetase long-chain family member 5	ACSL5	ACSL5	-	1.33
adenylate kinase 4	KAD4	AK4	-	1.27
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle	ATPA	ATP5A1	-	1.34
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	ATPB	ATP5B	-	1.28
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit	ATPO	ATP5O	-	1.28
dihydrolipoamide S-acetyltransferase	ODP2	DLAT	-	1.24
dihydrolipoamide dehydrogenase	DLDH	DLD	-	1.3
ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3	ENPP3	ENPP3	-	1.3
homogentisate 1,2-dioxygenase	HGD	HGD	-	1.31
hydroxysteroid	DHB4	HSD17B4	-	1.25
NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S8	NDUS8	NDUFS8	-	1.26
NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit V1	NDUV1	NDUFV1	-	1.25
nucleoside-triphosphatase, cancer-related	NTPCR	NTPCR	-	1.29
UDP-glucose 6-dehydrogenase	UGDH	UGDH	-	1.26
adenylate kinase 1	KAD1	AK1	-	-1.29
hexose-6-phosphate dehydrogenase	G6PE	H6PD	-	-1.34
monoamine oxidase A	AOFA	MAOA	-	-1.24
pyruvate kinase, muscle	KPYM	PKM	-	-1.24

Tabla suplementaria 5. Rutas KEGG específicas de las comparativas Fértil frente a DIU y RIF frente a DIU. Se describen las proteínas incluidas en cada una de las rutas KEGG específicas, 2 rutas específicas para la comparación Fértil frente a DIU (Tabla suplementaria 14 A) y 7 para la comparación RIF frente a DIU (Tabla suplementaria 14 B). Los fold changes están expresados como la media del ratio de expresión de cada proteína en la condición Fértil o RIF respecto a la condición DIU. Los fold changes negativos indican que la proteína está ‘downregulada’ o su expresión está disminuida en los grupos Fértil o RIF. Los fold change positivos indican que la proteína está ‘upregulada’ o su expresión aumentada en los grupos Fértil o RIF.

Tabla suplementaria 5 A. 2 rutas KEGG específicas para la comparación Fértil frente a DIU

KEGG pathways	Protein name Uniprot	Gene name	FC (F/IUD)
Ribosoma (hsa03010)			
ribosomal protein S15	RS15	<i>RPS15</i>	1.2
ribosomal protein L10	RL10	<i>RPL10</i>	-1.26
ribosomal protein L10a	RL10A	<i>RPL10A</i>	-1.23
ribosomal protein L18	RL18	<i>RPL18</i>	-1.21
ribosomal protein L24	RL24	<i>RPL24</i>	-1.28
ribosomal protein L3	RL3	<i>RPL3</i>	-1.29
ribosomal protein L7	RL7	<i>RPL7</i>	-1.24
ribosomal protein S11	RS11	<i>RPS11</i>	-1.34
ribosomal protein S13	RS13	<i>RPS13</i>	-1.29
ribosomal protein S16	RS16	<i>RPS16</i>	-1.36
ribosomal protein S2	RS2	<i>RPS2</i>	-1.25
ribosomal protein S3A	RS3A	<i>RPS3A</i>	-1.22
ribosomal protein S4, X-linked	RS4X	<i>RPS4X</i>	-1.41
ribosomal protein S6	RS6	<i>RPS6</i>	-1.3
ribosomal protein S9	RS9	<i>RPS9</i>	-1.28
Espliceosoma (hsa03040)			
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	ROA3	<i>HNRNPA3</i>	1.27
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)	HNRPC	<i>HNRNPC</i>	1.26
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	HNRPM	<i>HNRNPM</i>	1.23
small nuclear ribonucleoprotein U1 subunit 70	RU17	<i>SNRNP70</i>	1.23
small nuclear ribonucleoprotein D2 polypeptide	SMD2	<i>SNRPD2</i>	1.26
SNW domain containing 1	SNW1	<i>SNW1</i>	1.23
WW domain binding protein 11	WBP11	<i>WBP11</i>	1.25

Tabla suplementaria 5 B. 7 rutas KEGG específicas para la comparación RIF frente a DIU

KEGG pathways	Protein name Uniprot	Gene name	FC (RIF/IUD)
Cascadas del complemento y coagulación (hsa04610)			
alpha-2-macroglobulin	A2MG	<i>A2M</i>	-1.31
complement C1r subcomponent	C1R	<i>C1R</i>	-1.28
complement component 3	CO3	<i>C3</i>	-1.32
complement factor B	CFAB	<i>CFB</i>	-1.33
complement factor H	CFAH	<i>CFH</i>	-1.26
serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	A1AT	<i>SERPINA1</i>	-1.3
serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 2	A2AP	<i>SERPINF2</i>	-1.26

Tabla suplementaria 5B. Continuación

KEGG pathways	Protein name Uniprot	Gene name	FC (RIF/IUD)
serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	IC1	<i>SERPING1</i>	-1.36
Peroxisoma (hsa04146)			
acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	<i>ACSL4</i>	<i>ACSL4</i>	1.25
acyl-CoA synthetase long-chain family member 5	ACSL5	<i>ACSL5</i>	1.33
enoyl-CoA hydratase 1, peroxisomal	DHB4	<i>ECH1</i>	1.25
enoyl-CoA delta isomerase 2	ECH1	<i>ECI2</i>	1.33
glutathione S-transferase kappa 1	ECI2	<i>GSTK1</i>	1.28
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	GSTK1	<i>HSD17B4</i>	1.35
isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+)	IDHC	<i>IDH1</i>	1.26
superoxide dismutase 2, mitochondrial	SODM	<i>SOD2</i>	-1.37
Metabolismo del nicotinato y de la nicotinamida (hsa00760)			
ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3	ENPP3	<i>ENPP3</i>	1.3
nicotinamide phosphoribosyltransferase	NAMPT	<i>NAMPT</i>	-1.37
nicotinamide N-methyltransferase	NNMT	<i>NNMT</i>	-1.37
Metabolismo del piruvato (hsa00620)			
dihydrolipoamide S-acetyltransferase	ODP2	<i>DLAT</i>	1.24
dihydrolipoamide dehydrogenase	DLDH	<i>DLD</i>	1.3
isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+)	IDHC	<i>IDH1</i>	1.26
Ciclo citrato (ciclo TCA) (hsa00020)			
dihydrolipoamide S-acetyltransferase	ODP2	<i>DLAT</i>	1.24
dihydrolipoamide dehydrogenase	DLDH	<i>DLD</i>	1.3
pyruvate kinase, muscle	KPYM	<i>PKM</i>	-1.24
Fosforilación oxidativa (hsa00190)			
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle	ATPA	<i>ATP5A1</i>	1.34
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	ATPB	<i>ATP5B</i>	1.28
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit	ATPO	<i>ATP5O</i>	1.28
NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S8	NDUS8	<i>NDUFS8</i>	1.26
NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit V1	NDUV1	<i>NDUFV1</i>	1.25

Tabla suplementaria 6. Red de correlación Fértil y DIU para las 133 PDEs. Se muestran dos tablas de las proteínas que correlacionan con un coeficiente de correlación de Pearson mayor al $\pm 0,9$ (corr) para cada grupo endometrial (Fértil y DIU). Las correlaciones significativas aparecen resaltadas en naranja (p -valor < 0,05).

Tabla de correlación para el grupo Fértil según las 133 PDEs

Fértil (20 proteínas = nodos)					
Nodo 1		Nodo 2		Pearson corr	p-valor
UniProtKB entry name	Gene Name	UniProtKB entry name	Gene Name		
OXLA	IL4I1	S10A8	S100A8	0.9071	1
PPM1H	PPM1H	S10A9	S100A9	-0.9074	1
K1C18	KRT18	ERP29	ERP29	0.9348	0.6391
RNT2	RNASET2	ERP29	ERP29	0.9110	1
K1C18	KRT18	CH10	HSPE1	0.9355	0.6137
CH60	HSPD1	CH10	HSPE1	0.9865	0.0013
MOES	MSN	PLSL	LCP1	0.9713	0.0252
ROA3	HNRNPA3	NPM	NPM1	0.9482	0.2595
K1C18	KRT18	K2C8	KRT8	0.9216	1
CYB5	CYB5A	K2C8	KRT8	0.9001	1
CH60	HSPD1	K1C18	KRT18	0.9621	0.0756
HIBCH	HIBCH	TLN1	TLN1	-0.9241	1
SFPQ	SFPQ	APOD	APOD	0.9246	1
PPM1H	PPM1H	ECHM	ECHS1	0.9072	1

Tabla de correlación para el grupo DIU según las 133 PDEs

DIU (31 proteínas= nodos)					
Nodo 1		Nodo 2		Pearson corr	p-valor
UniProtKB entry name	Gene Name	UniProtKB entry name	Gene Name		
RL7	<i>RPL7</i>	RS4X	<i>RPS4X</i>	0.9175	1
CAMP	<i>CAMP</i>	TRFL	<i>LTF</i>	0.9470	0.285
RS13	<i>RPS13</i>	S10A9	<i>S100A9</i>	0.9686	0.036
H2AY	<i>H2AFY</i>	S10A9	<i>S100A9</i>	0.9241	1
CLIC1	<i>CLIC1</i>	CLIC4	<i>CLIC4</i>	0.9389	0.4977
MTOR	<i>MTOR</i>	LMCD1	<i>LMCD1</i>	0.9036	1
H2AY	<i>H2AFY</i>	RS13	<i>RPS13</i>	0.9039	1
IDHC	<i>IDH1</i>	IF4H	<i>EIF4H</i>	0.9049	1
ROA3	<i>HNRNPA3</i>	RNT2	<i>RNASET2</i>	0.9327	0.7259
CYB5	<i>CYB5A</i>	RNT2	<i>RNASET2</i>	0.9136	1
IDHC	<i>IDH1</i>	ROA3	<i>HNRNPA3</i>	0.9211	1
CYB5	<i>CYB5A</i>	ROA3	<i>HNRNPA3</i>	0.9140	1
RU17	<i>SNRNP70</i>	ROA3	<i>HNRNPA3</i>	0.9502	0.2214
AN32A	<i>ANP32A</i>	ROA3	<i>HNRNPA3</i>	0.9489	0.2464
CIRBP	<i>CIRBP</i>	IDHC	<i>IDH1</i>	0.9101	1
SRP14	<i>SRP14</i>	HNRPC	<i>HNRNPC</i>	0.9460	0.3046

Tabla de correlación para el grupo DIU según las 133 PDEs. Continuación

DIU (31 proteínas= nodos)					
Nodo 1		Nodo 2		Pearson corr	p-valor
UniProtKB entry name	Gene Name	UniProtKB entry name	Gene Name		
ZN185	<i>ZNF185</i>	CNDP2	<i>CNDP2</i>	0.9069	1
PPM1H	<i>PPM1H</i>	FUBP2	<i>KHSRP</i>	0.9257	1
RL18	<i>RPL18</i>	RS3A	<i>RPS3A</i>	0.9159	1
PDL1	<i>PDLIM1</i>	RS3A	<i>RPS3A</i>	0.9518	0.1961
PDL1	<i>PDLIM1</i>	RL18	<i>RPL18</i>	0.9019	1
PTBP1	<i>PTBP1</i>	HIBCH	<i>HIBCH</i>	-0.9445	0.3409
AN32A	<i>ANP32A</i>	RU17	<i>SNRNP70</i>	0.9655	0.052
NU153	<i>NUP153</i>	PPM1H	<i>PPM1H</i>	0.9021	1

Tabla suplementaria 7. Lista de los procesos biológicos, de acuerdo con la base de datos GO para las comparaciones Fértil frente a DIU (A) y RIF frente a DIU (B). Los procesos biológicos están ordenados en función de su p-valor. En amarillo aparecen resaltados los términos GO que indican los procesos biológicos significativos. El 'Gene ratio' muestra el ratio del número de genes incluidos en cada proceso biológico respecto al número de proteínas/genes anotados en la base de datos GO. De las 31 y 22 proteínas correlacionadas obtenidas para la red DIU en ambas comparaciones Fértil frente a DIU y RIF frente a DIU, 29 y 21 aparecieron anotadas en la base de datos GO respectivamente. El 'Bg Ratio' denota el ratio del número total de genes que la base de datos GO tiene incluidos en cada una de esas rutas respecto al número total de genes anotados en la base de datos KEGG (19.676). En morado aparecen resaltadas los procesos biológicos relacionados con la 'traducción y transcripción'. En fucsia los relacionados con la 'regulación y modificación de las proteínas', en azul fuerte los relacionados con el 'sistema inmune', en azul claro los relacionados con la 'señalización y diferenciación', en verde claro los relacionados con las 'respuestas a estímulos externos' y en verde fuerte los relacionados con 'procesos de transporte iónico'. Esta codificación de color se corresponde con la que aparece en las figuras 21 y 22 de la tesis.

Tabla suplementaria 7 A. Procesos biológicos (GO) para la comparación Fértil frente a DIU

Fértil vs. DIU						
ID	Description	Gene Ratio	Bg Ratio	OR	pvalue	geneID
GO:0006614	Cotraducción dependiente de SRP de proteínas dirigida a membrana	6/29	108/19676	49.955	1.02E-08	RPL7/SRP14/RPS3A/RPS13/RPS4X/RPL18
GO:0019083	Transcripción viral	6/29	111/19676	48.492	1.2E-08	RPL7/NUP153/RPS3A/RPS13/RPS4X/RPL18
GO:0006413	Iniciación de la traducción	6/29	137/19676	38.784	4.25E-08	RPL7/RPS3A/RPS13/RPS4X/RPL18/EIF4H
GO:0019058	Ciclo de vida viral	6/29	152/19676	34.799	7.9E-08	RPL7/NUP153/RPS3A/RPS13/RPS4X/RPL18
GO:0006415	Terminación de la traducción	5/29	89/19676	48.390	1.84E-07	RPL7/RPS3A/RPS13/RPS4X/RPL18
GO:0016259	Proceso metabólico selenocisteína	5/29	88/19676	49.005	1.74E-07	RPL7/RPS3A/RPS13/RPS4X/RPL18
GO:0006412	Traducción	7/29	311/19676	20.223	2.67E-07	RPL7/SRP14/RPS3A/RPS13/RPS4X/RPL18/EIF4H
GO:0034641	Procesos metabólicos de compuestos celulares nitrogenados	7/29	323/19676	19.451	3.45E-07	RPL7/RPS3A/RPS13/RPS4X/RPL18/HIBCH/CNDP2
GO:0006414	Elongación de la traducción	5/29	106/19676	40.301	4.42E-07	RPL7/RPS3A/RPS13/RPS4X/RPL18
GO:0001887	Procesos metabólicos del compuesto de selenio	5/29	113/19676	37.624	6.08E-07	RPL7/RPS3A/RPS13/RPS4X/RPL18
GO:0000184	Proceso catabólico del mRNA nuclear, degradación sin sentido	5/29	119/19676	35.646	7.86E-07	RPL7/RPS3A/RPS13/RPS4X/RPL18
GO:0016032	Proceso viral	7/29	551/19676	11.167	1.19E-05	RPL7/NUP153/RPS3A/RPS13/RPS4X/RPL18/EIF4H
GO:0008380	splicing del RNA	5/29	243/19676	16.979	2.57E-05	HNRNPC/SNRNP70/PTBP1/HNRNPA3/KHSP
GO:0033119	Regulación negativa del splicing del RNA	2/29	6/19676	358.990	3.13E-05	PTBP1/RPS13
GO:0045727	Regulación positiva de la traducción	3/29	51/19676	46.991	5.7161E-05	MTOR/RPS4X/CIRBP

Tabla suplementaria 7 A. Continuación

Fértil vs. DIU						
ID	Description	Gene Ratio	Bg Ratio	OR	pvalue	geneID
GO:0019732	Respuesta humoral antifúngica	2/29	9/19676	206.501	7.50E-05	LTF/CAMP
GO:0051028	Transporte del mRNA	3/29	69/19676	34.218	0.00014127	NUP153/HNRNPA3/KHSRP
GO:0048255	Estabilización del mRNA	2/29	14/19676	120.628	0.00018879	MTOR/CIRBP
GO:0000398	Splicing del mRNA, via espliceosoma	4/29	214/19676	14.804	0.00026105	HNRNPC/SNRNP70/P TBP1/HNRNPA3
GO:0002227	Respuesta inmune innata en mucosa	2/29	19/19676	85.304	0.00035314	LTF/CAMP
GO:0051493	Regulación de la organización del citoesqueleto	2/29	19/19676	85.304	0.00035314	S100A9/CLIC4
GO:0019731	Respuesta humoral antibacteriana	2/29	39/19676	39.204	0.00150257	LTF/CAMP
GO:0006821	Transporte del cloro	2/29	45/19676	33.713	0.00199652	CLIC1/CLIC4
GO:0006397	Procesamiento del mRNA	3/29	170/19676	13.447	0.00196293	SNRNP70/PTBP1/KHSRP
GO:0045669	Regulación positiva de la diferenciación del osteoblasto	2/29	61/19676	24.575	0.00363709	CLIC1/LTF
GO:1900034	Regulación de la respuesta celular al calor	2/29	75/19676	19.857	0.00544539	MTOR/NUP153
GO:0035264	Crecimiento del organismo multicelular	2/29	78/19676	19.062	0.00587673	MTOR/CLIC4
GO:1902476	Transporte transmembrana del cloro	2/29	91/19676	16.266	0.00791953	CLIC1/CLIC4
GO:0045454	Homeostasis redox celular	2/29	93/19676	15.908	0.00825842	LTF/CAMP
GO:0043488	Regulación de la estabilidad del mRNA	2/29	100/19676	14.768	0.00949509	ANP32A/KHSRP
GO:0034605	Respuesta celular al calor	2/29	105/19676	14.051	0.01042592	MTOR/NUP153

Tabla suplementaria 7 A. Continuación

Fértil vs. DIU						
ID	Description	Gene Ratio	Bg Ratio	OR	pvalue	geneID
GO:0006979	Respuesta al estrés oxidativo	2/29	107/19676	13.783	0.01080918	PDLIM1/IDH1
GO:0016925	Sumoilación de proteínas	2/29	114/19676	12.910	0.01219909	HNRNPC/NUP153
GO:0034765	Regulación del transporte iónico de membrana	2/29	117/19676	12.574	0.01281758	CLIC1/CLIC4
GO:0042742	Respuesta de defensa a bacterias	2/29	129/19676	11.380	0.01542541	S100A9/CAMP
GO:0051092	Regulación positiva del factor de transcripción NF-kappaB	2/29	131/19676	11.203	0.01588052	LTF/S100A9
GO:0001934	Regulación positiva de la fosforilación de proteínas	2/29	135/19676	10.865	0.01680796	MTOR/CAMP
GO:0043687	Modificación postraducciona de proteínas	2/29	460/19676	3.103	0.14675838	HNRNPC/NUP153
GO:0030154	Diferenciación celular	2/29	456/19676	3.131	0.14472282	RPS3A/CLIC4
GO:0008284	Regulación positiva de la diferenciación celular	2/29	465/19676	3.069	0.14931165	RPS4X/CAMP
GO:0043066	Regulación negativa del proceso de apoptosis	2/29	499/19676	2.854	0.16691373	LTF/RPS3A
GO:0006508	Proteólisis	2/29	518/19676	2.746	0.17691264	LTF/CNDP2
GO:0055114	Proceso de oxidación-reducción	2/29	656/19676	2.151	0.25178984	IDH1/CYB5A
GO:0000122	Regulación negativa de la transcripción a partir del promotor de la RNA polimerasa II	2/29	714/19676	1.970	0.28381367	H2AFY/LMCD1

Tabla suplementaria 7 B. Procesos biológicos (GO) para la comparación RIF frente a DIU

RIF vs. DIU						
ID	Description	GeneRatio	BgRatio	OR	pvalue	geneID
GO:0006910	Fagocitosis, reconocimiento	3/21	28/19676	130.251	0.000003374	IGHG1/IGLC2/IGKC
GO:0050871	Regulación positiva de la activación de las células B	3/21	26/19676	141.267	2.68E-06	IGHG1/IGLC2/IGKC
GO:0006911	Fagocitosis, envoltura	3/21	35/19676	101.732	6.71E-06	IGHG1/IGLC2/IGKC
GO:0042742	Respuesta de defensa a bacterias	4/21	129/19676	36.709	9.68E-06	IGHG1/IGLC2/IGKC/CAMP
GO:0006956	Complemento de activación	4/21	159/19676	29.576	2.21E-05	IGHG1/CFH/IGLC2/IGKC
GO:0050853	Vía de señalización del receptor de células B	3/21	57/19676	60.358	2.95E-05	IGHG1/IGLC2/IGKC
GO:0019732	Respuesta humoral antifúngica	2/21	9/19676	290.769	3.89E-05	LTF/CAMP
GO:0001878	Respuesta a levaduras	2/21	12/19676	206.351	7.11E-05	MPO/CAMP
GO:0045454	Homeostasis celular redox	3/21	93/19676	36.160	0.000127819	AIFM1/LTF/CAMP
GO:0002227	Respuesta inmune innata en mucosa	2/21	19/19676	121.000	0.000183502	LTF/CAMP
GO:0055114	Proceso de oxidación-reducción	5/21	656/19676	9.120	0.000529422	UGDH/AIFM1/CYB5A/MPO/HGD
GO:0006958	Vía clásica de activación del complemento	3/21	172/19676	19.206	0.00077754	IGHG1/IGLC2/IGKC
GO:0019731	Respuesta humoral antibacteriana	2/21	39/19676	55.696	0.00078501	LTF/CAMP
GO:0001895	Homeostasis de la retina	2/21	41/19676	52.850	0.000867585	LTF/IGKC
GO:0006821	Transporte de cloro	2/21	45/19676	47.873	0.00104476	CLIC1/CLIC4
GO:0038096	Vía de señalización del receptor Fc-gamma implicado en fagocitosis	3/21	205/19676	16.041	0.001290633	IGHG1/IGLC2/IGKC

Tabla suplementaria 7 B. Continuación

RIF vs. DIU						
ID	Description	GeneRatio	BgRatio	OR	pvalue	geneID
GO:0045669	Regulación positiva de la diferenciación del osteoblasto	2/21	61/19676	34.906	0.001911468	CLIC1/LTF
GO:1902476	Transporte transmembrana del cloro	2/21	91/19676	23.102	0.00419571	CLIC1/CLIC4
GO:0034765	Regulación del transporte iónico transmembrana	2/21	117/19676	17.868	0.00683794	CLIC1/CLIC4
GO:0006766	Proceso metabólico de la vitamina	2/21	137/19676	15.212	0.009267817	CYB5A/GC
GO:0050776	Regulación de la respuesta inmune	2/21	251/19676	8.201	0.029021386	IGLC2/IGKC
GO:0006898	Endocitosis mediada por receptor	2/21	262/19676	7.850	0.031405439	IGLC2/IGKC
GO:0043065	Regulación positiva del proceso de apoptosis	2/21	303/19676	6.766	0.040944081	AIFM1/KNG1
GO:0044267	Proceso metabólico de proteína celular	3/21	857/19676	3.669	0.061081352	LTF/EIF1AX/LMCD1
GO:0038095	Ruta de señalización del receptor Fc-epsilon	2/21	423/19676	4.809	0.074027414	IGLC2/IGKC
GO:0043066	Proceso de regulación negativa de la apoptosis	2/21	499/19676	4.057	0.098237165	LTF/MPO
GO:0006915	Proceso de apoptosis	2/21	607/19676	3.314	0.135896313	AIFM1/CLIC4

Tabla suplementaria 8. Lista de proteínas correlacionadas para las redes de correlación DIU.

Cada tabla resume las proteínas correlacionadas, con el coeficiente de correlación de Pearson mayor que ± 0.9 (corr), para las redes de correlación DIU obtenidas para las comparaciones RIF frente a DIU **(A)** y Fértil frente a DIU **(B)**. Las proteínas correlacionadas que ya están descritas en otras bases de datos (STRING y GeneMania) aparecen en color verde. En amarillo aparecen las proteínas correlacionadas compartidas en ambas redes.

**Tabla suplementaria 8 A. Lista de proteínas correlacionadas para la red de correlación DIU
(comparación RIF frente a DIU)**

Nodo 1		Nodo 2		corr	pvalue	GeneMania	STRING
UniProtKB entry name	Gene Name	UniProtKB entry name	Gene Name				
TRFL	LTF	CAMP	CAMP	0.9470	0.4029		
CLIC1	CLIC1	CLIC4	CLIC4	0.9389	0.7038		
IGLC2	IGLC2	CLIC4	CLIC4	-0.9340	0.9487		
CCD47	CCDC47	PERM	MPO	-0.9009	1		
LMCD1	LMCD1	AIFM1	AIFM1	-0.9107	1		
RNT2	RNASET2	CYB5	CYB5A	0.9136	1		
IGLC2	IGLC2	IGHG1	IGHG1	0.9176	1		
CFAH	CFH	IGHG1	IGHG1	0.9255	1		
RNT2	RNASET2	HGD	HGD	0.9043	1		
KNG1	KNG1	IGKC	IGKC	0.9423	0.5598		
IF1AX	EIF1AX	KAD1	AK1	0.9096	1		
UGDH	UGDH	VTDB	GC	-0.9030	1		
TAGL2	TAGLN2	SRSF6	SRSF6	-0.9187	1		

Tabla suplementaria 8 B. Lista de proteínas correlacionadas para la red DIU (comparación Fértil frente a DIU)

Nodo 1		Nodo 2		corr	pvalue	GeneMania	STRING
UniProtKB entry name	Gene Name	UniProtKB entry name	Gene Name				
RL7	RPL7	RS4X	RPS4X	0.9175	1		
CAMP	CAMP	TRFL	LTF	0.9470	0.285		
RS13	RPS13	S10A9	S100A9	0.9686	0.036		
H2AY	H2AFY	S10A9	S100A9	0.9241	1		
CLIC1	CLIC1	CLIC4	CLIC4	0.9389	0.4977		
MTOR	MTOR	LMCD1	LMCD1	0.9036	1		
H2AY	H2AFY	RS13	RPS13	0.9039	1		
IDHC	IDH1	IF4H	EIF4H	0.9049	1		
ROA3	HNRNPA3	RNT2	RNASET2	0.9327	0.7259		
CYB5	CYB5A	RNT2	RNASET2	0.9136	1		
IDHC	IDH1	ROA3	HNRNPA3	0.9211	1		
CYB5	CYB5A	ROA3	HNRNPA3	0.9140	1		
RU17	SNRNP70	ROA3	HNRNPA3	0.9502	0.2214		
AN32A	ANP32A	ROA3	HNRNPA3	0.9489	0.2464		
CIRBP	CIRBP	IDHC	IDH1	0.9101	1		
SRP14	SRP14	HNRPC	HNRNPC	0.9460	0.3046		

Tabla suplementaria 8 B. Continuación

Nodo 1		Nodo 2		corr	pvalue	GeneMania	STRING
UniProtKB entry name	Gene Name	UniProtKB entry name	Gene Name				
ZN185	<i>ZNF185</i>	CNDP2	<i>CNDP2</i>	0.9069	1		
PPM1H	<i>PPM1H</i>	FUBP2	<i>KHSRP</i>	0.9257	1		
RL18	<i>RPL18</i>	RS3A	<i>RPS3A</i>	0.9159	1		
PDLI1	<i>PDLIM1</i>	RS3A	<i>RPS3A</i>	0.9518	0.1961		
PDLI1	<i>PDLIM1</i>	RL18	<i>RPL18</i>	0.9019	1		
				-			
PTBP1	<i>PTBP1</i>	HIBCH	<i>HIBCH</i>	0.9445	0.3409		
AN32A	<i>ANP32A</i>	RU17	<i>SNRNP70</i>	0.9655	0.052		
NU153	<i>NUP153</i>	PPM1H	<i>PPM1H</i>	0.9021	1		

Anexo II. Producción científica del estudiante predoctoral

1. Publicaciones científicas internacionales

- **Pérez-Debén S**, Bellver J, Alamá P, Salsano S, Quiñonero A, Sebastian-Leon P, Díaz-Gimeno P, Domínguez F. “*iTRAQ comparison of proteomic profiles of endometrial receptivity*”. *J Proteomics* 2019; 203:103381. doi: 10.1016/j.jprot.2019.103381.
- **Pérez-Debén S**, Gonzalez-Martin R, Palomar A, Quiñonero A, Salsano S, Dominguez F. “*Copper and lead exposures disturb reproductive features of primary endometrial stromal and epithelial cells*”. *Reprod Toxicol* 2020; 93:106–117. doi: 10.1016/j.reprotox.2020.01.008.

2. Trabajos presentados en congresos internacionales

- **Pérez-Debén S**, González-Martín R, Quiñonero A, Salsano S, Domínguez F. “*Cooper and Lead, Two inorganic Metalloestrogens, Disturb Reproductive Features of Primary Endometrial Stromal (ESC) and Epithelial Cells (EEC)*”. Congreso: 66th Annual Scientific Meeting of the Society-for-Reproductive-Investigation (SRI); París, Francia; 12-16 Marzo, 2019. Tipo de presentación: Póster.
- **Pérez-Debén S**, Salsano S, Quiñonero A, Domínguez F. “*Phytoestrogens (Soy-Derived Metabolites) May Act Like Endometrial Disruptors Altering Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells*”. Congreso: 65th Annual Scientific Meeting of the Society-for-Reproductive-Investigation (SRI); San Diego, CA; 6-10 Marzo, 2018. Tipo de presentación: Comunicación oral.
- **Pérez-Debén S**, Bellver J, Alama P, Salsano S, Quiñonero A, Sebastian-Leon P, Díaz-Gimeno P, Simón C, Domínguez F. “*iTraq proteomic analysis of endometrium from fertile donors, IUD carriers and patients with recurrent implantation failure (RIF) reveals differential proteomic profiles*”. Congreso: 33rd Annual Meeting of the European-Society-of-Human-Reproduction-and-Embryology (ESHRE); Ginebra, Suiza; 2-5 Julio, 2017. Tipo de presentación: Póster.
- **Pérez-Debén S**, Bellver J, Alama P, Salsano S, Quiñonero A, Simón C, Domínguez F. “*iTraq Proteomic Comparative Analysis of Endometrium from Fertiles Donors, IUD Carriers and Patients with Recurrent Implantation Failure (RIF) Reveals No Differential Proteomic Profile in RIF versus Fertile Donors*”. Congreso: 63rd Annual Scientific Meeting of the Society-for-Reproductive-Investigation (SRI); Montreal, Canadá; 16-19 Marzo, 2016. Tipo de presentación: Póster.

