



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA

Septiembre, 2018

**“EXPRESIÓN, LOCALIZACIÓN Y ESTUDIO FUNCIONAL DE PGRMC1 EN EL
ENDOMETRIO HUMANO A LO LARGO DEL CICLO MENSTRUAL”**

Doctoranda:

Stefania Salsano

Director: Carlos Simón Valles

Codirector: Francisco Domínguez Hernández

Tutor: Carles Soler Vázquez



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

Dr. Carlos Simón Valles, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático de Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, Director científico de Igenomix, Profesor Clínico Adjunto en el Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Stanford (USA) y Profesor Adjunto del Departamento de Obstetricia y Ginecología en el Baylor College of Medicine (Houston, USA).

CERTIFICO:

Que el trabajo de investigación titulado: “**Expresión, localización y estudio funcional de la proteína PGRMC1 en el endometrio humano a lo largo del ciclo menstrual**” ha sido realizado íntegramente por Stefania Salsano 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 21 de septiembre de 2018.

Fdo. Dr. Carlos Simón Valles



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.

CERTIFICO:

Que el trabajo de investigación titulado: **“Expresión, localización y estudio funcional de la proteína PGRMC1 en el endometrio humano a lo largo del ciclo menstrual”** ha sido realizado íntegramente por Stefania Salsano 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 21 de septiembre de 2018.

Fdo. Dr. Francisco Domínguez Hernández

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en los laboratorios de la Fundación IVI y parte también en el laboratorio del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO, Madrid), durante una estancia de un mes.

Agradecemos también el Servicio de Proteómica del CBMSO que pertenece a ProteoRed, PRB2-ISCIH apoyado por la subvención PT13/0001 y la Unidad Genómica de la IIS La Fe de Valencia.

El presente proyecto de investigación con código 1405-FIVI-024-FD ha sido financiado por la Fundación IVI y por el programa Santiago Grisolia de la Generalitat Valenciana para la formación de personal investigador, en centros de investigación de la Comunitat Valenciana (GRISOLIA/2015/2018).

AGRADECIMIENTOS

Desde que empecé el camino académico en mi país, mi Italia bonita, me he dejado llevar por mis instintos, y aquellos diferentes caminos han convergido todos llevándome hasta aquí. Lo que antes solo era interés, curiosidad y ganas de conocer, aprender más a cerca de la medicina reproductiva, se ha convertido en una realidad, una gran pasión que he podido empezar a vivir y tocar con manos. Hace 4 años decidí empezar este duro y intenso camino del doctorado. Ahora, cuando ya lo tienes acabado, te sientas y ves aquí escrito el trabajo de todos estos años, fruto de un gran esfuerzo, después de muchos resultados sin explicaciones o miles de experimentos salidos mal. Pero todas las dificultades no te han hecho caer o perder las ganas, sino que han sido un estímulo para repetir una y otra vez y para aprender aún más. Lo más increíble es ver la evolución desde el principio y el crecimiento que ha conllevado, tanto a nivel científico como personal. El cigoto se ha convertido en un blastocisto y la verdad que agradezco la ciencia para haberme nutrido durante todo este tiempo, para haber sido el endometrio que me ha acogido para que lo descubriera y haberme hecho nacer una segunda vez, trayéndome a un mundo tan fascinante.

Pero, lo que sin duda ha permitido que me implantara con tanta pasión al endometrio de la ciencia, han sido las personas que me he encontrado y me han acompañado durante este camino, desde los principios ovulatorios. Mi crecimiento, el despertarme y sentirme feliz cada día han sido posibles gracias a cada uno de vosotros:

A ti antes de todo, *Paco*, mi codirector de tesis, mi amigo, mi apoyo, el mejor jefe que todos querrían tener. No ha pasado ningún día que no me haya sentido más afortunada de tenerte a ti. Poco a poco me has llevado por la mano, guiándome en todo lo que no conocía, pero también haciéndome probar todas las ideas que ocurrían en mi cabeza loca y caótica, dándome total libertad y haciéndome crecer. En ti siempre he encontrado palabras de apoyo y a la vez de estímulo. Pero además también te has convertido en un gran amigo. No olvidaré nunca nuestros viajes, nuestras comidas y cenas, nuestras risas y mis lagrimas en los momentos difíciles. Gracias por haberme permitido crecer en este último año,

porque sin tu apoyo y tu permisividad, no hubiera sido posible empezar todo lo que me espera por delante. Te seré agradecida para siempre.

A ti, *Carlos*, mi director. Gracias por lo que me has hecho aprender y por tu don especial medico y científico a la vez. Nunca olvidaré los lab meetings mensuales tan estimulantes que teníamos. Han sido determinantes durante los primeros años y los he echado mucho de menos al final. Gracias para haber sido siempre disponible conmigo. Ha sido un honor y un gran prestigio tenerte como director de tesis.

A ti, *Alicia*, mi Aly super woman. No tengo palabras más bonitas para describir los años pasados a tu lado. No ha sido una simple relación entre doctorando y técnico. Ha sido muchísimos más. Desde el primer minuto, cuando entré en el laboratorio y estabas con tu barrigón en espera de Alvaro, ya sabíamos que íbamos a ser grandes amigas. He sido tu sombra, me has enseñado todo lo que se hasta ahora y me has ayudado en todo lo que me haya hecho falta. Cada momento pasado entre la bancada de laboratorio o de cultivo celular, ha sido un momento precioso. De risas, de contarnos nuestro día día, de planear como locas nuestros super experimentos de "Nature" que ahora quedan allí en el cajón (algún día saldrán). Pero es muchísimos más, te doy las gracias por haber sido como una hermana mayor siempre escuchándome, apoyándome, secando mis lagrimas, dándome fuerza y consejos, incluso solo con tu mirada y tus abrazos. Te agradezco por los innumerables e inolvidables momentos pasados dentro y fuera del laboratorio. Gracias a ti, mi mano derecha, mi sombrita, mi equipo perfecto, mi compañera amiga, cada día en Fundación ha sido estupendo, haciendome saborear la alegría y la tranquilidad cuando más lo necesitaba.

A ti, *Diego*, mi mejor amigo. Es increíble como la amistad verdadera se haga sentir hasta incluso desde USA. Cada día de estos años de tesis, no te has perdido nada. Has estado siempre a mi lado, apoyándome como nadie puede imaginar. Nuestras llamadas DIARIAS hablando de ciencia, vida, locuras, viajes, en una mezcla poliglota de italiano, español, inglés, no tienen precio. Eres parte de mi familia, como un segundo hermano. Tenemos un cariño especial, una conexión tan fuerte y la misma visión de la ciencia. Sabes la estima y el aprecio que te tengo. No tengo palabras mas sinceras y bonitas para decirte gracias! Gracias por

estar en mi vida, incluso desde allí tan lejos. Espero que algún día nuestras vidas se crucen otra vez y podamos trabajar juntos.

A ti, *Hannes*, mi rubio latino bellissimo. Hemos sido los Giris del laboratorio y hoy, que acabamos los dos, te doy las gracias por el gran amigo que has demostrado ser conmigo. Gracias por apoyar mis locuras, por haberme ayudado en los momentos difíciles (también informáticos), por haber sido mi Mc Giver, para bailar conmigo, por tu “extraordinaria” ternura, por tus abrazos fuertes y por nuestros brainstorming de trabajo y de vida. Sabes cuanta estima te tengo y te doy las gracias por haber contribuido tu también a mi crecimiento. Ti voglio un bene infinito! Volveremos a trabajar juntos, estoy segura!

A te, *Livia*, che arrivasti cosí un giorno per caso a prendermi a Roma, e dopo averti accolta a casa a Valencia, ho sentito che l’affetto che iniziavo a provare era segno di una splendida amicizia che stava per nascere. In cosí breve tempo sei diventata cosí speciale e ti ringrazio per tutta la pace e l’appoggio che mi hai dato. Sei única.

A cada uno de vosotros del laboratorio: *Patry, Sonia, Horten, Irene, Silvia, Roberto, Ana Corachan, Ana Buigues, Almudena, Patricia* y todos los nuevos con los cuales no he llegado a compartir mucho tiempo. Y a ti...*Amparo*! Cuantas risas increíbles me has regalado. Que bonito ha sido acercarme tanto a ti en estos últimos años. Gracias también para haber sido nuestra aliada para los experimentos del cajón “Nature”. Has sido muy especial para mi.

A toda *Fundación IVI*, un gran equipo de humanidad y profesionalidad. De cada uno de vosotros he podido aprender algo y todos de vuestra manera habéis contribuido a que tenga un buen recuerdo de mi Doctorado. Alfredo...tus Buenos días de todas la mañanas! Loreto...Tu sonrisa, positividad y alegría, no tienen precio! Bellissima!

No puedo no sentirme tan afortunada y agradecida de haber compartido cada día, desde el primero que pisé el laboratorio, con todos vosotros.

Y fuera de mi laboratorio, un GRAZIE SPECIALE:

A ti, *Anapilar*. La ciencia nos ha juntado y te has vuelto una gran amiga y gran apoyo para mi. Gracias para haberme enseñado tus clonaciones. No olvidaré nunca mis pausas, bajando a verte en la sala de “Bichos”, allí con la bufanda, tapada por el frio, con la música y contando los agregados de tus gusanos

bonicos. He aprendido mucho de ti. Lo bonito también de la ciencia es que no obstante los ámbitos diferentes, hablamos el mismo lenguaje, y confrontándonos podemos aprender muchísimos el uno del otro. Eres mi loca, un regalo grande que me llevo de nuestra experiencia como comitee organizador del Congreso Nacional de Jovenes Investigadores en Biomedicina. Gracias por haber llegado en mi vida, por todos tus consejos en estos últimos años de tesis, para haberme ayudado y estimulado tanto, levantándome cuando hacía falta.

A ti, *Tamara*. Todo empezó con un simple correo para un protocolo de tinción de F-actina, mientras que estabas en San Francisco. De allí ya sentimos que era como si nos conociéramos desde siempre y nació nuestra preciosa amistad, TAN FUERTE. Nunca hemos tenido el placer de poder trabajar juntas, pero estoy segura que sería increíble! Siempre guardaré por dentro nuestras conversaciones INFINITAS y todo lo que hemos compartido. Gracias por todos tus consejos y por escucharme cada vez que haya hecho falta, y por seguir haciéndolo. La decidualización nos unió a las dos, juntos con Aly, otro gran regalo precioso que me llevo de la tesis. Eres una gran amiga, persona y investigadora!

A ti, *Rocio*. Un día mientras me dabas prácticas, hablando de nuestra pasión por el baile, nació todo. El IVI y nuestro amigo en común nos hicieron empezar este cariño tan fuerte y esta amistad increíble. Siempre te estaré agradecida por todo lo que has hecho por mi. En aquel momento difícil de mi vida te sentí más cerca que nunca y has sido mi fuerza, mi empujón. Gracias por haber sido mi guía ayudándome en tomar decisiones en el momento que lo he necesitado. Gracias por escucharme siempre, por haber compartido tantos momentos y por ayudarme también cuando fuimos a Roma. Eres una persona especial y una gran amiga en la que siempre confiaré.

A *Conbiopreval*! Gracias chicos por haberme acogido en el comitee organizador durante 3 años. Esta será una de las mejores experiencias que me llevo del Doctorado. Inolvidable, porque no solo me ha hecho aprender como es posible llevar la organización de un congreso, haciéndome relacionar y opinar con predocs de áreas tan distintas de la mía, sino también porque ha traído a mi vida amigos importantes. Gracias chicos!

A ti, *Jesus*. Llegaste en mi vida, con una moneda lanzada en el aire, cuando empezaba mi último año tesis y cada día difícil ha podido ser más leve gracias a

ti. Has vivido intensamente cada paso de este año intenso, has estado a mi lado llenándome de ternura, trayendo tranquilidad a mis días de loca perdida, la paz y el equilibrio que necesitaba para además poder vivir uno de los años más bonitos de mi doctorado. Te digo gracias por la paciencia infinita que has demostrado hacía mi, por tu amor que ni un solo día me ha faltado, por hacerme reír siempre, por ayudarme sin ninguna queja, apoyarme en los días más agotadores que he podido tener, pero sobretodo por escucharme SIEMPRE. Aunque a veces te canse y desconectas, se que siempre me escuchas.

Y no por últimos porque menos importantes, tengo que decir un GRACIAS inmenso a MI FAMILIA.

Grazie a voi, tutto ciò non sarebbe stato possibile, mai! So che sarà stato duro dover accettare la lontananza di una figlia e di una sorella, però é stato grazie al vostro e al mio di sacrificio, se sono potuta giungere qui oggi. Vi chiedo scusa se qualche volta ho preso delle scelte non condivise, ma ho sempre ritrovato l'amore di genitori comprensivi e pronti ad aiutarmi in qualsiasi istante. Spero possiate considerarvi fieri di me. Questo dottorato concluso non é solo un traguardo per me ma anche per voi. Siete fantastici. Vi amo.

Y a todos los amigos y los familiares que no he nombrado, que pero han estado igualmente allí...

Gracias a todos!Grazie a tutti!

Stefania

ÍNDICE

ABREVIATURAS	19
INTRODUCCIÓN	27
1. El endometrio humano	29
2. Control endocrino del ciclo ovárico y ciclo endometrial	31
2.1 <i>Ciclo ovárico y ciclo endometrial</i>	31
3. Decidualización endometrial	34
3.1 <i>Cambios tisulares: características celulares y ultraestructurales de las células deciduales</i>	36
3.2 <i>Marcadores de decidualización</i>	37
3.3 <i>Inducción de la decidualización: importancia del papel de cAMP y progesterona</i>	40
3.4 <i>Ciclo celular de las células deciduales</i>	41
3.5 <i>Protocolos de decidualización in vitro</i>	41
4. Acción esteroidea: estradiol y progesterona	43
4.1 <i>Vía clásica de la progesterona: receptores nucleares (nPR)</i>	44
4.1.1 <i>Mecanismo de acción de los receptores clásicos de progesterona</i>	45
4.1.2 <i>Expresión endometrial de los nPR</i>	46
4.2 <i>Vía no clásica de la progesterona</i>	47
4.2.1 <i>Receptores PAQR y PGRMC</i>	49
5. Ventana de implantación	51
6. Receptividad endometrial: enfoque -ómico endometrial	53
6.1 <i>Transcriptómica endometrial</i>	53
6.2 <i>Proteómica endometrial</i>	54
7. PGRMC1	55
7.1 <i>Estructura de PGRMC1</i>	56
7.2 <i>Sublocalización celular de PGRMC1</i>	58
7.2.1 <i>Localización nuclear y acción genómica de PGRMC1</i>	59

7.3 Funciones putativas de PGRMC1 y asociaciones clínicas reproductivas.....	59
7.4 Modificación de la señalización de PGRMC1 mediante fosforilación.....	61
7.5 PGRMC1 y la mediación del metabolismo del colesterol.....	62
7.6 PGRMC1 y el ciclo celular	62
8. PGRMC1 y su interacción con SERBP1	63
8.1 Secuencia y mecanismo de interacción PGRMC1-SERBP1	64
8.2 Modelo putativo de la vía de transducción de señal de P4-PGRMC1 y de la entrada en el ciclo celular	65
OBJETIVOS.....	69
MATERIALES Y MÉTODOS	73
1. Muestras	75
1.1 Separación células endometriales estromales (ESC)/epiteliales (EEC) y cultivo celular.	
76	
2. Inmunohistoquímica PGRMC1 y SERBP1 en Tejido endometrial	76
3. Decidualización in vitro	77
3.1 Decidualización in vitro en combinación con AG-205 y P4-BSA	78
4. ELISA para el análisis de PRL	79
5. Tinción de F-actina con Rodamina-faloidina.....	79
6. Inmunofluorescencia de PGRMC1, SERBP1 y PRAB y estudios de Colocalización	80
7. Sobreexpresión de PGRMC1 en ESC	81
8. Extracción del Proteoma Subcelular	83
9. Western Blot	83
10. Microarray de expresión de las muestras decidualizadas mediante protocolo largo en presencia de AG-205 y P4-BSA	84
11. Extracción de ARN, transcripción inversa y PCR a tiempo real	85
12. Clonaje de PGRMC1 en el vector PGEX6P-1	86
13. Expresión y purificación de la proteína GST y proteína de fusión para ensayos de Pull-down	89
14. Preparación de los lisados ESC y ensayos de pulldown PGRMC1-GST	91

15. Cuantificación de proteínas en los experimentos de Pull-down y digestión en gel concentrante	92
16. Análisis del los experimentos de Pull-down mediante cromatografía líquida en fase reversa acoplada a espectrometría de masas en tándem (RP-LC-MS/MS).....	94
18. Análisis estadístico	97
RESULTADOS.....	99
1. Inmunolocalización y expresión de ARNm de PGRMC1 y SERBP1 en el endometrio humano durante el ciclo menstrual.....	101
2. Co-localización de PGRMC1 y SERBP1 en ESC y Tejido endometrial humano	104
3. La proteína PGRMC1 cambia su localización en ESC durante el proceso decidualización in vitro	105
4. La sobreexpresión de PGRMC1 inhibe la Decidualización in vitro de las ESC	109
5. La inhibición de la actividad de PGRMC1 mediante AG205 puede inducir la decidualización en las ESC, en ausencia de la entrada de Progesterona	113
6. La ausencia de la entrada de progesterona y AG205 inducen cambios de localización de los receptores de progesterona durante la decidualización en las ESC	115
7. Alteraciones en los Perfiles Transcriptómicos Globales en las ESC decidualizadas con diferentes tratamientos	118
8. El análisis mediante espectrometría de masas de los experimentos de Pull-down revela diferentes interacciones proteicas de PGRMC1 en las ESC	126
DISCUSIÓN	141
CONCLUSIONES.....	157
BIBLIOGRAFÍA.....	161
APÉNDICE.....	185

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
AF	Activation function (función activadora de la transcripción)
AG-205	Antagonista de PGRMC1
AH	Ácido hialurónico
uma	Unidad de masa atómica
mRNA	Messenger RNA (ARN mensajero)
TRA	Tecnología de reproducción asistida
BL21	Células competentes (cepa de <i>Escherichia coli</i>)
BSA	Bovine serum albumin (albumina de suero bovino)
BUS	B-upstream segment (segmento B-upstream)
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
cDNA	Complementary DNA (ADN complementario)
CIP	Calf-intestinal alkaline phosphatase (fosfatasa alcalina)
COS	Controlled ovarian stimulation (estimulación ovárica controlada)
COX-2	Ciclooxigenasa-2
cRNA	Complementary RNA (ARN complementario)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole (4',6-Diamino 2-Fenil-indol)
DIGE	Differential in gel electrophoresis (electroforesis diferencial en gel)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco)
DTT	1,4-dithiothreitol
E2	Estradiol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etilendiamminotetraacético)
EEC	Epithelial endometrial cells (células endometriales epiteliales)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
EP	Early proliferative phase (fase proliferativa temprana)
ERA	Endometrial receptivity array (array de receptividad endometrial)
NR-ERA	Endometrial receptivity array - non receptive array de receptividad Endometrial no receptivo

ABREVIATURAS

R-ERA	Endometrial receptivity array – receptive (array de receptividad endometrial receptivo)
ES	Early secretory phase (fase secretora temprana)
dESC	Decidualized endometrial stromal cells (células estromales endometriales decidualizadas)
ESC	Endometrial stromal cells (células estromales endometriales)
ESI	Electrospray ionization (ionización mediante electroespray)
FDR	False discovery rate (tasas de descubrimientos falsos)
FOXO1	Forkhead Box Protein O1 (factor de transcripción FOXO1)
FSH	Follicle stimulating hormone (hormona folículo estimulante)
GFP	Green fluorescent protein (proteína verde fluorescente)
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone (hormona liberadora de gonadotropina)
GST	Glutación S-transferasa
HRE	Hormone response element (elementos de respuesta)
HRP	Horseradish peroxidase (peroxidasa de rábano)
H-score	Puntuación H
HSP	Heat shock protein (proteína de choque térmico)
ICC	Immunocytochemistry (inmunocitoquímica)
IGF	Insulin Growth factor (factor de crecimiento insulínico)
IGFBP-1	Insulin-like growth factor-binding protein 1 (proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina-1)
IL-8	Interleucina-8
IMC	Índice de masa corporal
IOP	Insuficiencia ovárica primaria
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
IU-IVI	Instituto Universitario-IVI
Kd	Constante de disociación
KGN	Línea celular tumoral de células de la granulosa
LB	Luria Bertani broth (caldo Luria Bertani)
LBD	Ligand binding domain (dominio de unión al ligando)
Lef	Lymphoid enhancer-binding factor (factor estimulador linfoide)
LH	Luteinizing hormone (hormona luteinizante)

ABREVIATURAS

LP	Late proliferative phase (fase proliferativa tardía)
LS	Late secretory phase (fase secretora tardía)
MAPK	MAP quinasa
MEC	Matriz extracelular
MPA	Medroxiprogesterona
mPR	Membrane progesterone receptor (receptor de membrana de la progesterona)
MS	Middle secretory phase (fase secretora mediana)
NaCl	Sodium chloride (Cloruro de sodio)
ndESC	Non decidualized endometrial stromal cells (células estromales endometriales no decidualizadas)
NF-kB	Nuclear factor kB (factor nuclear kB)
nPR	Nuclear progesterone receptor (receptores de progesterona nucleares)
NR	No receptivo
NTD	N-terminal domain (dominio amino terminal)
ORF	Open Reading frame (Marco abierto de lectura)
P4	Progesterona
P4-BSA	Progesterone conjugated to bovine serum albumin (progesterona conjugada a albumina de suero bovino)
PAQR	Progesterone and AdipoQ receptor (receptor de Progestina y AdipoQ)
PBS	Phosphate buffered saline (solución salina tamponada con fosfato)
PBS-T	Phosphate buffered saline with tween 20 (solución salina tamponada con fosfato-tween)
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
pET	Personalized embryo transfer (transfer embrionario personalizado)
PFA	Paraformaldehído
PGRMC1	Progesterone receptor membrane component 1 (Receptor de la progesterona componente de Membrana 1)

ABREVIATURAS

pH	Potencial de hidrógeno
PKA	Proteína quinasa A
PR-A	Progesterone receptor-A (receptor de progesterona A)
PR-B	Progesterone receptor-B (receptor de progesterona B)
PRE	Progesterone response element (elementos de respuestas a la progesterona)
PRL	Prolactina
PSM	Peptide-spectrum match (coincidencia del espectro peptídico)
PVDF	Polyvinylidene difluoride (fluoruro de polivinilideno)
R	Receptivo
RIN	RNA integrity number (número de integridad del ARN)
RIPA	Radio-immunoprecipitation assay (tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación)
RP-LC-MS/MS	Reverse phase-liquid chromatography-mass spectrometry (cromatografía líquida en fase reversa acoplada a espectrometría de masas)
RU486	Mifepristona
DE	Sesviación estándar
SDS	Dodium dodecyl sulfated (dodecilsulfato sódico)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfated gel polyacrylamide electrophoresis (electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida)
SERBP1	SERPINE1 mRNA binding protein 1 (proteína de unión al ARNm de la SERPINA1)
SIGC	Línea celular de la granulosa
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein (proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides)
STAR	Steroidogenic Acute Regulatory Protein (proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda)
SUMO	Pequeña proteína modificadora parecida a la ubiquitina
TBS	TRIS-buffered saline (solución salina tamponada con tris)
Tcf	T-cell factor (factor derivado de las células T)
TF	Transcription factor (factor de transcripción)
TFA	Trifluoroacetic acid (ácido trifluoroacético)

ABREVIATURAS

TMB	Tetramethylbenzidine (solución de reactivo de Tetrametilbenzidina)
Tris-HCl	Tris hydrochloride (Tris hidroximetil cloridrato)
uNK	Uterine natural killer cell (célula natural killer uterina)
WOI	Window of implantation (ventana de implantación)

INTRODUCCIÓN

1. El endometrio humano

El endometrio, un tejido sensible a las hormonas esteroideas y a los factores proteicos locales, es el revestimiento de la mucosa del útero que deriva de la capa interna del mesénquima ductal paramesonéfrico embrionario (Huang et al. 2014). El desarrollo y la función del endometrio en primates de orden superior que menstrúan (incluidos los humanos) es complejo en comparación con la mayoría de otros mamíferos (Brenner and Slayden 2004; Jabbour et al. 2006). El endometrio humano se ha dividido clásicamente en dos capas principales: la capa funcional superior transitoria y la capa basal inferior permanente, adyacente al miometrio (Ferenczy and Bergeron 1991). La capa funcional está revestida por epitelio luminal, que contiene epitelio glandular superficial y estroma (Figura 1A, B). Es la capa en la que se produce la proliferación endometrial, los cambios de secreción, la implantación y el desprendimiento menstrual, regenerándose por completo sucesivamente y después del parto (Ferenczy and Guralnick 1983)(Gargett, Chan, and Schwab 2008). La capa funcional se puede dividir en la zona esponjosa más profunda con una zona estromal poco organizada y una zona compacta superficial con un estroma más compacto (Ferenczy 1980) (Wynn 1989) (Figura 1B). El estrato basal, situado entre la zona esponjosa y el miometrio, contiene la parte terminal de las glándulas endometriales y el estroma densamente organizado. Este estrato no se desprende durante la menstruación o en el parto, permaneciendo después del cese de la ciclicidad ovárica como un endometrio postmenopáusico atrófico e inactivo (Chhieng and Hui 2011), pudiendo además repoblar todas las células en la zona funcional después del desprendimiento menstrual. En esta zona basal probablemente es donde se encuentran las células madre, responsables en parte de la regeneración del tejido (Gargett and Masuda 2010). Los otros componentes del endometrio, es decir, los vasos sanguíneos y las células inmunitarias, existen en ambas capas (Bulmer, Longfellow, and Ritson 1991) (Spencer, Gimble, and Lopez 2011).

El acceso a todo el grosor del endometrio, que contiene tanto el estrato basal como un estrato funcional, generalmente requiere histerectomía y por lo tanto, particularmente cuando se estudia endometrio de mujeres sanas o con endometrio benigno, los investigadores han considerado principalmente el estrato

INTRODUCCIÓN

funcional que se obtiene fácilmente con una biopsia endometrial ambulatoria (Hapangama et al. 2008). Sin embargo, se ha postulado que la respuesta hormonal, por ejemplo, difiere entre el estrato funcional y el basal (Pranishnikov 1978) (Padykula et al. 1989).

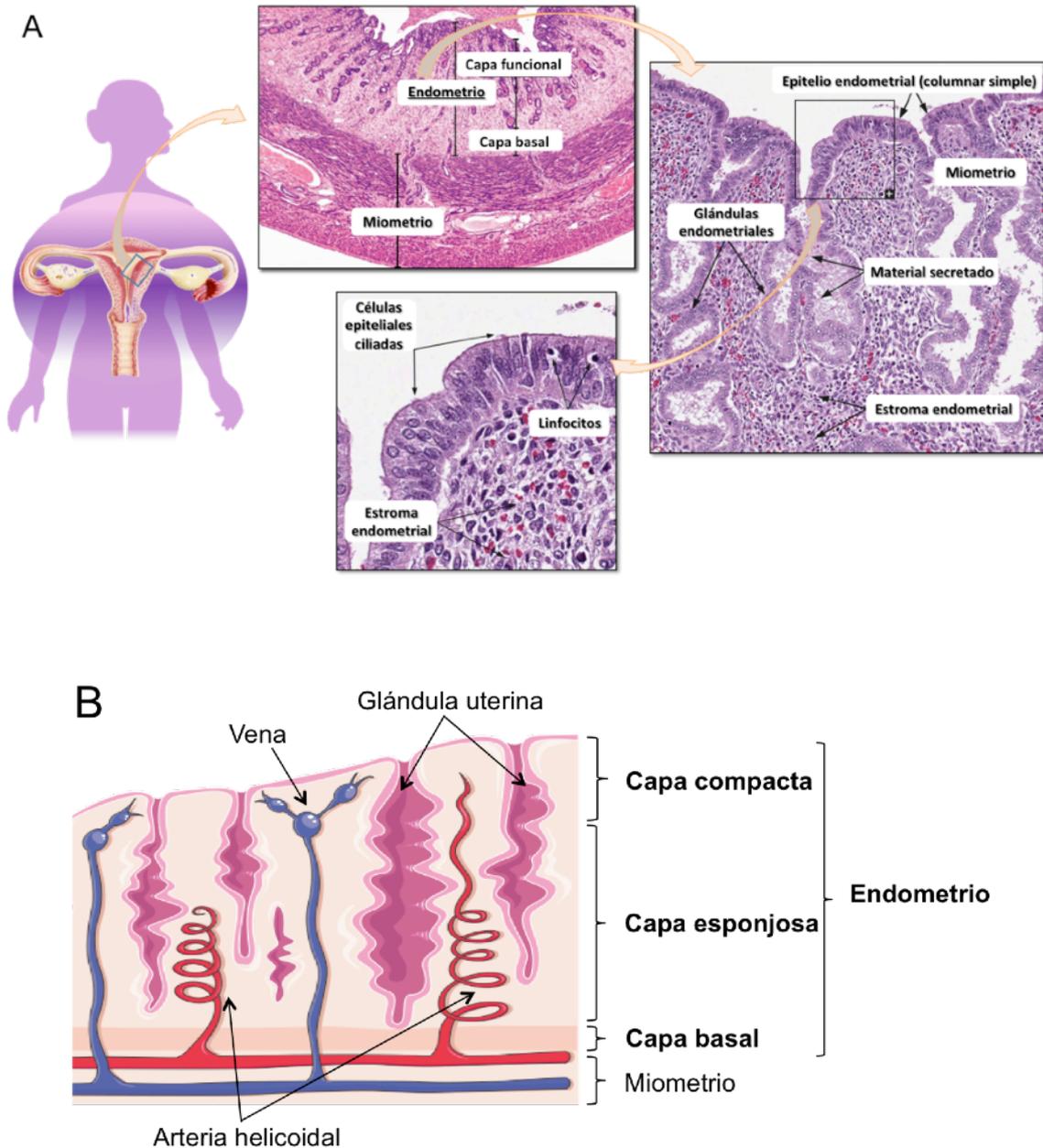


Figura 1. Estructura del endometrio. Secciones uterinas y endometriales in vivo (A). Descripción esquemática de las capas endometriales (B).

2. Control endocrino del ciclo ovárico y ciclo endometrial

La reproducción en los humanos depende de la función de unas neuronas específicas del hipotálamo que secretan hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y junto al eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, representan la vía central de regulación de la fertilidad. En las mujeres, la secreción pulsátil de GnRH estimula la hipófisis para secretar dos gonadotropinas, la hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) en momentos específicos, creando así el entorno hormonal apropiado para el desarrollo folicular ovárico y controlando el ciclo reproductivo (I. J. Clarke et al. 1987)(Wildt et al. 1981) (Marshall and Griffin 1993). Las frecuencias de pulso de GnRH más altas estimulan la síntesis y liberación de LH, mientras que las frecuencias de pulso de GnRH más bajas favorecen la síntesis y liberación de FSH (Wildt et al. 1981)(Wildt et al. 1981) (Knobil 1980) (Dalkin et al. 1989). Las gonadotropinas activan la gametogénesis y estimulan el ovario para la síntesis de hormonas esteroideas, estrógeno y progesterona, así como varios péptidos claves autocrinos, paracrinos y endocrinos. Dichas hormonas esteroideas a su vez estimulan la proliferación endometrial y afectan a muchos órganos terminales. Estrógeno y progesterona forman centralmente circuitos de retroalimentación tanto negativos como positivos. Aunque tengan cierta retroalimentación a nivel del hipotálamo para modular la función de la GnRH, la retroalimentación más dinámica ocurre a nivel de la pituitaria anterior para regular la respuesta a la GnRH.

La foliculogénesis, la ovulación, la luteinización y el crecimiento y disminución del endometrio durante el ciclo menstrual dependen de los factores autocrinos, paracrinos y endocrinos mencionados anteriormente producidos a partir de este eje.

2.1 Ciclo ovárico y ciclo endometrial

La duración de un ciclo endometrial es la cantidad de días entre el primer día de sangrado menstrual de un ciclo y el inicio de la menstruación del ciclo siguiente. La duración media de un ciclo endometrial es de 28 días, con la mayoría

INTRODUCCIÓN

de las longitudes de ciclo entre 25 y 30 días. El ciclo ovárico y endometrial pueden dividirse en dos fases: (1) fase folicular y (2) fase lútea (en el ovario) o (1) fase proliferativa y (2) fase secretora (en el endometrio). Más detalladamente, las fases proliferativa y secretora del ciclo endometrial podrían ser subdivididas de tal manera: “fase proliferativa temprana-media” (early-midproliferative phase) (días 1-8); “fase proliferativa tardía” (late proliferative phase) (días 9-14); “fase secretora temprana” (early secretory phase) (días 15-18); “fase secretora media” (middle secretory phase) (días 19-22); “fase secretora tardía” (late secretory phase) (días 23-28) (Figura 2).

La fase folicular comienza desde el primer día de la menstruación hasta la ovulación. El desarrollo de folículos ováricos caracteriza esta fase. El aumento de LH se inicia por un drástico aumento del estradiol producido por el folículo preovulatorio, dando como resultado la posterior ovulación. El aumento de LH estimula la luteinización de las células de la granulosa y estimula la síntesis de la progesterona responsable del aumento de FSH a mitad del ciclo. Además, el aumento de LH estimula la reanudación de la meiosis y la finalización de la división de reducción en el ovocito con la liberación del primer corpúsculo polar. La fase lútea dura 14 días en la mayoría de las mujeres (Figura 2).

Las hormonas esteroideas ováricas regulan la función endometrial y la menstruación humana. Durante los años reproductivos de una mujer, el estradiol circulante, derivado de los ovarios y la progesterona, inducen cambios cíclicos en el endometrio como preparación para la implantación del blastocisto (H. N. Jabbour et al. 2006)(Henriet, Gaide Chevronnay, and Marbaix 2012). Durante la fase proliferativa (folicular) del ciclo endometrial, los niveles circulantes de estradiol estimulan la proliferación de las células epiteliales endometriales, así como el crecimiento y la vascularización de las glándulas. El estradiol aumenta la síntesis endometrial de su propio receptor intracelular, lo que aumenta su efecto y la producción de receptores de progesterona, preparando el endometrio para responder a la producción lútea de progesterona.

Al final de la fase folicular, cuando los niveles de estradiol son más altos, la respuesta cambia de retroalimentación negativa a positiva a través de un mecanismo que aún no está bien descrito. La acción de la retroalimentación positiva del estradiol inicia un gran aumento continuo en la liberación de GnRH

INTRODUCCIÓN

(Moenter, Caraty, and Karsch 1990)(Moenter et al. 1991) que, junto con un aumento en la respuesta de las gonadotropinas a la GnRH (Adams, Norman, and Spies 1981)(Aiyer, Fink, and Greig 1974)(I. J. Clarke et al. 1988) (Crowder and Nett 1984), provoca un aumento en la liberación de LH de la hipófisis, iniciando la ovulación. Tras la ovulación, el cuerpo lúteo secreta altos niveles de progesterona para mantener la receptividad endometrial en caso de que ocurra la fecundación del óvulo y posterior implantación embrionaria.

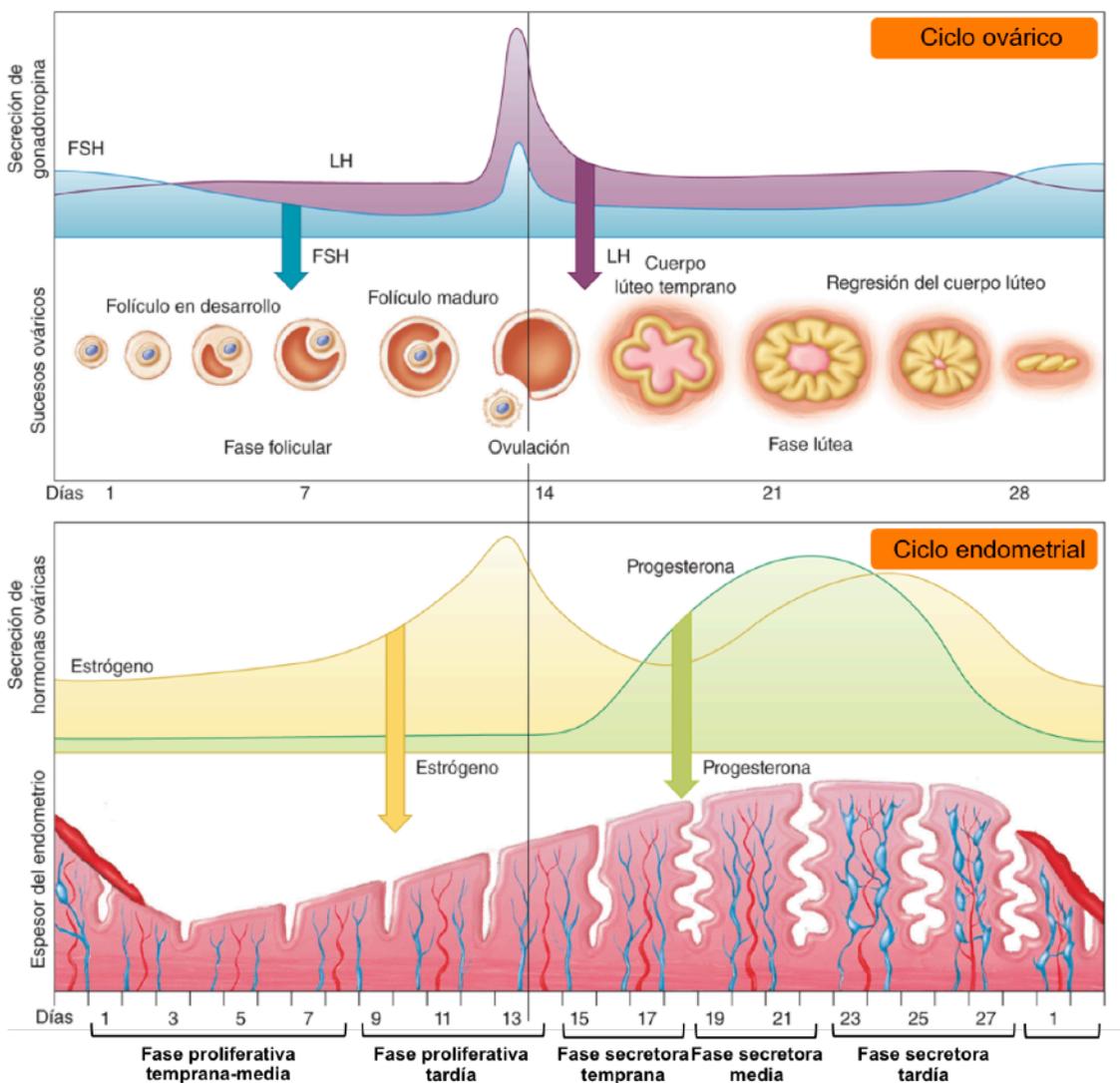


Figura 2. Esquema del ciclo ovárico y ciclo endometrial (Figura adaptada de Stuart Ira Fox: *Fisiología humana*, 14e).

INTRODUCCIÓN

En ausencia de embarazo, el cuerpo lúteo retrocede (acaba atrofiado), causando una fuerte disminución en los niveles circulantes de progesterona. La retirada de progesterona resultante da como resultado la menstruación. Esta ampliamente aceptado que esta fuerte disminución es el factor desencadenante de la menstruación en las mujeres. Los estudios en humanos, utilizando antagonistas de la progesterona como la mifepristona (o RU486) durante la fase secretora media, han aumentado nuestro conocimiento de los eventos endometriales locales durante la menstruación humana, proporcionando pruebas de que la retirada de progesterona es importante en la fisiología menstrual.

La caída de progesterona desencadena una respuesta inflamatoria local en el endometrio que involucra infiltración de leucocitos, liberación de citoquinas, edema y activación de metaloproteinasas de la matriz (H. N. Jabbour et al. 2006). El resultado es un colapso de las glándulas endometriales, una constricción de los vasos sanguíneos, ruptura del tejido y el desprendimiento de los dos tercios superiores del endometrio (la capa funcional) durante la fase menstrual del ciclo.

3. Decidualización endometrial

Durante la fase secretora (después de la ovulación hasta la menstruación) del ciclo endometrial, la progesterona actúa sobre un endometrio que ha estado expuesto a estrógenos. El endometrio responde al rápido aumento de la progesterona con cambios secretores en las células luminales, mayor desarrollo de las glándulas, *decidualización* de las células del estroma y desarrollo de vasos en espiral.

El término decidua se deriva del verbo latino “decidere”, que significa morir, desprenderse o separarse. La decidualización del endometrio se produce solo en especies en las que la placentación implica la ruptura del epitelio luminal y la invasión de los tejidos maternos por el trofoblasto, aunque se ha descrito una reacción similar a la decidualización en algunas especies con placenta no invasiva, como las ovejas (Johnson et al. 2003).

INTRODUCCIÓN

El proceso de decidualización convierte las células del estroma endometrial alargadas en células deciduales más esféricas, aumentando su producción de prolactina, de la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGFBP-1) y glucógeno (J J Brosens, Hayashi, and White 1999) (Dunn, Kelly, and Critchley 2003). La decidualización es iniciada por la Adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y ocurre en las células del estroma perivascular antes de extenderse en una "onda" a través del compartimiento del estroma. El proceso de decidualización va acompañado de cambios marcados en la diferenciación celular; es decir, conversión de las células estromales endometriales (ESC) similares a fibroblastos en células deciduales de tipo epitelial rodeadas por una matriz extracelular (MEC), enriquecida en proteínas similares a membranas basales tales como colágeno IV y laminina (Wewer et al. 1985) (Church et al. 1996) (Iwahashi et al. 1996) (Schatz et al. 1999). Generalmente, a la diferenciación celular sigue la detención del ciclo celular y la inhibición de la proliferación celular, como en el caso de la decidualización de las células estromales endometriales (Rider et al. 2005) (Loercher et al. 2005) (Derynck and Wagner 1995).

Durante la decidualización, más de 33 genes efectores epigenéticos se modulan en las ESC, sugiriendo que la modificación epigenética compleja proporciona un amplio rango de plasticidad requerida para la transformación de las ESCs en células deciduales (Grimaldi et al. 2012). Además, una decidualización alterada está fuertemente asociada con la pérdida recurrente del embarazo, lo que sugiere la importancia de una maduración celular decidual adecuada para mantener el embarazo (Salker et al. 2010) (Lucas et al. 2016).

Cabe resaltar que durante el proceso de decidualización hay una extensa comunicación bidireccional (crosstalk) entre células estromales uterinas e inmunes. La población de leucocitos uterinos está compuesta en gran parte por células natural killer (uNK), una población especializada. Después de la ovulación, el número de células uNK aumenta dramáticamente, y constituyen muchas veces una proporción sustancial (30% -40%) de células en el compartimiento estromal. La población de células uNK sigue siendo prominente en la decidua temprana pero, en ausencia de embarazo, desaparece antes de la menstruación (Croy et al. 2006) (Figura 3).

INTRODUCCIÓN

3.1 Cambios tisulares: características celulares y ultraestructurales de las células deciduales

Durante la fase proliferativa, las ESCs tienen una apariencia similar a los fibroblastos, con un retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi bien desarrollados, poco citoplasma y núcleos alargados (Cornillie, Lauweryns, and Brosens 1985) (Lawn, Wilson, and Finn 1971). La transformación decidual, tanto *in vivo* como *in vitro*, se asocia con redondeo del núcleo, aumento del número de nucléolos, dilatación del retículo endoplásmico rugoso y del aparato de Golgi, y acumulación de glucógeno y gotas de lípidos en el citoplasma en expansión (Kajihara et al. 2014) (Figura 3).

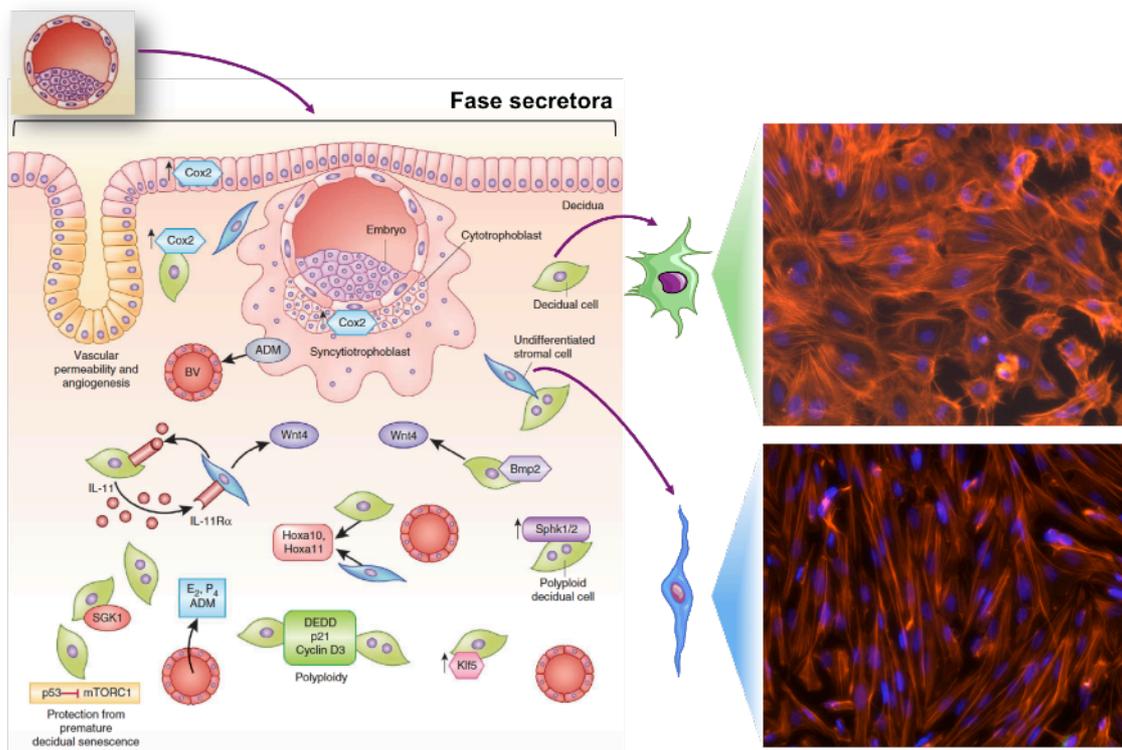


Figura 3. Redes de señalización durante el proceso de decidualización. Las moléculas clave para la decidualización están representadas en este dibujo. La decidua está compuesta de células estromales (ESC) diferenciadas (deciduales) muchas de las cuales están diferenciadas terminalmente (poliploides). La decidualización implica la coordinación de varios procesos, incluida la poliploidía, y varios tipos de moléculas, como receptores de citoquinas, enzimas, morfógenos, hormonas y factores de transcripción. ADM, adrenomedulina; BV, vaso sanguíneo; DEDD, proteína que contiene el dominio efector de la muerte; IL-11R α , receptor de interleuquina 11 α ; mTORC1, complejo 1 diana de rapamicina en mamíferos; SGK1, quinasa regulada por suero y glucocorticoides 1; Sphk1/2, esfingosina quinasa 1/2 (Figura adaptada de Cha J y cols, 2012).

INTRODUCCIÓN

En la fase de secretora temprana y media del ciclo, las extensiones citoplásmicas delgadas se extienden hacia el tejido conectivo edematoso, liberando posiblemente glucógeno y otros productos secretores en el espacio extracelular. En la fase secretora tardía, las células que se van decidualizando muestran extensiones similares a pseudópodos que engloban a la matriz extracelular (MEC) y aumenta el número de fagosomas y lisosomas intracelulares. La decidualización de las ESCs exhibe actividad fagocítica, lo que puede contribuir a la intensa remodelación de la MEC (Cornillie, Lauweryns, and Brosens 1985).

3.2 Marcadores de decidualización

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica sintetizada y secretada a partir de células especializadas de la glándula pituitaria anterior, las lactotropas. Pero, aunque la principal fuente de síntesis y secreción de PRL es la glándula pituitaria anterior, también otros órganos y tejidos en el cuerpo tienen esta capacidad, cómo hipotálamo (Alonso et al. 1988) (Harlan et al. 1989), placenta (Handwerker 1991), decidua (Andersen 1990) (Clementes et al. 1983), glándula mamaria (Nolin and Witorsch 1976), sistema inmune (Gala and Shevach 1994). La PRL es altamente versátil, con funciones biológicas múltiples en diferentes especies que se dividen en las siguientes categorías generales: reproducción, embarazo y lactancia, crecimiento y desarrollo, metabolismo, modulación inmune, transporte de electrolitos, regulación de la epidermis, comportamiento y carcinogénesis (Marano and Ben-Jonathan 2014).

El líquido amniótico contiene una cantidad abundante de prolactina (PRL), con niveles que alcanzan su máximo entre las 18 y 26 semanas de embarazo. Las concentraciones de PRL amniótica pueden exceder los niveles circulantes desde 50 a 100 veces (N Ben-Jonathan et al. 1996) (Kletzky et al. 1985). En 1978, se descubrió que la fuente de la PRL amniótica no es la pituitaria sino la decidua (Golander et al. 1978) (Riddick et al. 1978). La producción de PRL endometrial se demostró antes del embarazo, alrededor del día 22 del ciclo, en las ESCs en el proceso de decidualización (Maslar and Riddick 1979) (Daly, Maslar, and Riddick 1983).

INTRODUCCIÓN

La proporción de células que expresan PRL en la decidua aumenta durante el embarazo (Daly, Maslar, and Riddick 1983), y el nivel de expresión se correlaciona positivamente con el tamaño de la célula decidual (W. X. Wu et al. 1995).

Se ha sugerido que la PRL en la unidad uteroplacentaria estimula el crecimiento y la invasión del trofoblasto, promueve la angiogénesis, modula la supervivencia de las células natural killer uterinas (uNK), previene el rechazo inmunitario y regula el transporte de agua a través del amnios hacia el compartimiento materno (H. Jabbour and Critchley 2001) (Stefanoska et al. 2013) (Nira Ben-Jonathan, LaPensee, and LaPensee 2008) (Corbacho, Martínez De La Escalera, and Clapp 2002) (Tyson, Mowat, and McCoshen 1984). Otro producto proteico importante de un endometrio no gestante durante la fase secretora media y tardía, y que se produce en abundancia en la decidua, es la IGF-binding protein-1 (IGFBP-1), también conocida como proteína placentaria 12 (Bohn and Kraus 1980) y α_1 -globulina endometrial dependiente de progesterona (α_1 -PEG) (Bell et al. 1988) (Rutanen et al. 1985).

La familia del factor de crecimiento insulínico (IGF) es importante en el desarrollo cíclico endometrial durante el ciclo menstrual y en el proceso de implantación (Giudice 1997). Los miembros del sistema IGF incluyen los péptidos IGF, las proteínas de unión a IGF (IGFBPs) y los receptores de IGF. En el endometrio humano, los miembros de esta familia sufren cambios únicos en la expresión a lo largo del ciclo menstrual y en la gestación temprana (Giudice et al. 1991) (Giudice et al. 1994) (Giudice et al. 1993) (Giudice, Dsupin, and Irwin 1992). La expresión célula-específica de los ARNm que codifican los IGF y sus receptores subrayan los potenciales roles autocrino (estromal) y paracrino (epitelial-estromal) para los IGF en la función celular endometrial (Irwin et al. 1993) (Frost, Mazella, and Tseng 1993).

IGFBP-1 es secretada exclusivamente por parte de la decidua en la unidad materna fetal y no es en absoluto una proteína placentaria. En humanos, la IGFBP-1 es un producto principal del endometrio secretor tardío (16 $\mu\text{g/g}$ de proteína), y su producción aumenta varios órdenes de magnitud en la decidua gestante (1224 $\mu\text{g/g}$ de proteína) (Giudice 1997), alcanzando sus niveles máximos alrededor de las 16 semanas de gestación, precediendo a los de PRL (Wathen et al. 1993).

INTRODUCCIÓN

IGFBP-1 regula la biodisponibilidad de IGF-1, la cual puede cambiar en base a su estado de fosforilación. Aunque el hígado produce una única isoforma altamente fosforilada, las células deciduales producen principalmente variantes no- o hipofosforiladas que son menos efectivas en el secuestro de IGF-1 (Carter et al. 2004). También ha sido reportado que IGFBP-1 estimula la invasión del trofoblasto (Gleeson et al. 2001).

La decidualización también se asocia con la expresión alterada de numerosos ligandos, receptores, intermediarios de señal y factores de transcripción, que a su vez coordinan la expresión de redes de transcripción específicas de diferenciación. Además, varios reguladores deciduales clave se regulan positivamente en la diferenciación de las ESCs a nivel de proteína pero no a nivel de ARNm, incluida la proteína supresora de tumores p53 (Pohnke et al. 2004) y el supresor de metástasis CD82 (KAI-1) (Birgit Gellersen et al. 2007). La decidualización también está asociada a cambios profundos en el citoesqueleto, representados por una disminución en la α actina y una reducción de la cadena 2 de la miosina fosforilada activa (Fazleabas and Strakova 2002) (Schwenke et al. 2013) (Ihnatovych et al. 2007).

Estudios de microarray han demostrado que la decidualización implica la reprogramación secuencial de familias enteras de genes relacionados funcionalmente, involucradas en la organización de la matriz extracelular, adhesión celular, organización citoesquelética, transducción de señal, metabolismo, diferenciación y apoptosis (Popovici, Kao, and Giudice 2000) (Brar et al. 2001) (Tierney et al. 2003). Se piensa que esta reprogramación de las células endometriales sea esencial para una controlada invasión del trofoblasto y la formación de una placenta funcional (Jan J. Brosens, Pijnenborg, and Brosens 2002).

Garrido-Gómez y cols. utilizaron, por otro lado, enfoques proteómicos y secretómicos para caracterizar el fenotipo decidual en cultivos primarios tratados con estradiol y progesterona. Identificaron 47 proteínas intracelulares y 18 secretadas diferencialmente expresadas. El análisis funcional destacó, también en este caso, una abundancia de proteínas involucradas en la organización del citoesqueleto y en la composición de la ECM, chaperonas moleculares, citoquinas y quimiocinas (Garrido-Gomez et al. 2011a).

INTRODUCCIÓN

En consecuencia, se han propuesto una variedad de factores y cambios celulares que pueden servir como marcadores putativos de decidualización, aunque pocos son tan específicos y bien definidos como PRL e IGFBP-1.

De tal manera, PRL e IGFBP-1, hoy en día, se consideran marcadores establecidos y ampliamente utilizados para evaluar el estado de diferenciación de las ESC en cultivo, junto a la distribución de los filamentos de F-actina, señal de una remodelación del citoesqueleto.

3.3. Inducción de la decidualización: importancia del papel de cAMP y progesterona

La decidualización depende de la convergencia de las vías de señalización de cAMP y progesterona, así como de la inducción y/o activación de los factores de transcripción (TF, transcription factors) nucleares deciduales (Birgit Gellersen and Brosens 2014) (J J Brosens, Hayashi, and White 1999).

En cultivo primarios, el tratamiento prolongado de ESC con estradiol y progesterona aumenta la producción de cAMP e induce genes marcadores de decidualización. Sin embargo, esta inducción puede ser bloqueada con un inhibidor de proteína quinasa A (PKA), lo que subraya la importancia de la vía de cAMP en la respuesta de las ESC a las hormonas ováricas (Matsuoka et al. 2010) (Yoshino et al. 2003) (Brar et al. 1997). La diferenciación de ESCs dependiente de progesterona coincide pues con un aumento gradual en los niveles de cAMP intracelular y es inhibida en presencia de un inhibidor de PKA.

Se ha demostrado que la señalización de cAMP altera profundamente la ruta de las pequeñas proteínas SUMO (Small Ubiquitin-like modifier) en ESC, de una manera dependiente del tiempo, lo que lleva a la hiposumoilación de la forma activada de la isoforma A del receptor de la progesterona (PR-A) y a la activación transcripcional de los genes específicos de la decidua (Jones et al. 2006).

El momento de la respuesta decidua en la fase secretora del ciclo es, por lo tanto, crucial y depende de la convergencia de las vías de cAMP y progesterona. Aunque la decidualización depende de niveles elevados de progesterona, existe una clara evidencia que sugiere que el inicio de este proceso requiere niveles elevados

INTRODUCCIÓN

de cAMP intracelular (Jan J. Brosens, Pijnenborg, and Brosens 2002) (B Gellersen and Brosens 2003) (J J Brosens, Hayashi, and White 1999) (B Gellersen et al. 1994) (Christian, Zhang, et al. 2002) (Christian, Pohnke, et al. 2002) (Mak et al. 2002) y que tal elevación intracelular es primordial para el estado decidualizado de las ESC (Telgmann et al. 1997).

3.4 Ciclo celular de las células deciduales

La decidualización *in vitro* de las ESC en respuesta al tratamiento con análogo de cAMP, estradiol (E2) y medroxiprogesterona (MPA) se ha visto asociada con un paro inicial del ciclo celular en G0/G1, y detención en fases G2/M en etapas posteriores, y el compromiso de miembros de la vía de p53 (Logan et al. 2012).

Se ha demostrado que el cAMP (que se desencadena por el pico de la hormona luteinizante) tiene una respuesta inicial de decidualización más rápida, mientras que la progesterona tiene una respuesta más lenta y persistente (B Gellersen and Brosens 2003) (Tierney et al. 2003). Tanto el cAMP como la progesterona activan los mecanismos moleculares de la parada del ciclo celular, que involucra muchas proteínas reguladoras del ciclo celular. El cAMP, mediante la regulación positiva del factor de transcripción FOXO1 (Forkhead Box Protein O1) y del receptor de progesterona A (PR-A), activa la regulación negativa de la ciclina D1 (Qian et al. 2005) (Schmidt et al. 2002) (Takano et al. 2007) y la inhibición de la proteína retinoblastoma, deteniendo las células en la fase G1 e impidiendo la entrada en la fase S (Cobrinik 2005) (Cloke et al. 2008). En las células epiteliales y estromales de endometrio, se ha demostrado que el tratamiento con progesterona, sin cAMP, detiene el ciclo celular en la fase G2/M al disminuir la expresión de la proteína ciclina B1 (L. Tang et al. 2009).

3.5 Protocolos de decidualización *in vitro*

Se han establecido numerosos protocolos para inducir la decidualización *in vitro* (Birgit Gellersen and Brosens 2014) (Tabla 1). Los protocolos comúnmente

INTRODUCCIÓN

utilizados implican el tratamiento de las células con 1) estradiol y progesterona (o un progestágeno), 2) un factor o análogo inductor de cAMP, o 3) una combinación de análogo de cAMP y progesterona o progestágeno. La duración del tratamiento varía profundamente entre los estudios, que van de unas pocas horas a 10 o más días.

Tratamiento	Duración	Chequeo final	Referencia
<i>Explantos endometriales</i>			
P4 ± E2	6-10 días	Secreción PRL	Daly DC y cols., 1983
P4	2-28 días	Secreción PRL	Maslar IA y cols., 1986
<i>Cultivos primarios de ESC</i>			
8-Br-cAMP	12-24 horas	Inducción promotor PRL	Telgmann R y cols., 1997
8-Br-cAMP	1-3 días	ARNm PRL, ARNm IGFBP-1	Samalecos A y cols., 2009
8-Br-cAMP	2 días	Análisis microarray	Popovici RM y cols., 2000
8-Br-cAMP	24-48 horas	Análisis microarray	Tierney EP y cols., 2003
CRH	8 días	Secreción PRL	Ferrari A y cols., 1995
db-cAMP	4 días	Secreción PRL	Tang B y cols., 1993
FSH ± LH o hCG	4-6 días	Secreción PRL	Tang B y cols., 1993
MPA	10-20 días	ARNm PRL, ARNm IGFBP-1	Tseng L y cols., 1992
MPA + 8-Br-cAMP	4-10 días	Secreción PRL	Brosens JJ y cols., 1999
MPA + E2 + activina A	10 días	Secreción PRL	Josens RL y cols., 2002
MPA + E2 + PGE2	3 días	Secreción PRL	Frank GR y cols., 1994
MPA + IGF-1	28 días	Secreción PRL	Rosenberg y cols., 1991
MPA + RLN	6 días	Secreción PRL	Telgmann y cols., 1997
MPA + RLN ± E2	5 días	Secreción PRL	Huang JR y cols., 1987
MPA o P4	20 días	Secreción PRL	Zhu HH y cols., 1990
P4 + cortisona + 8-Br-cAMP	4 días	ARNm PRL, ARNm IGFBP-1	Kuroda K y cols., 2013
P4 + DES + EGF	25 días	Secreción PRL	Irwin JC y cols., 1991
P4 + DHT + 8-Br-cAMP	4-8 días	Secreción PRL e IGFBP-1, ARNm PRL	Cloke B y cols., 2008
P4 + E2	10-15 días	Secreción PRL	Irwin JC y cols., 1989
P4 + E2	14 días	Secreción IGFBP1	Hess AP y cols., 2007
P4 + E2 + EGF	10 días	Análisis microarray	Popovici RM y cols., 2000
P4 + E2 + IL-11	12 días	Secreción PRL e IGFBP-1	Dimitriadis E y cols., 2002
<i>Explantos deciduales</i>			
P4	3-10 días	Secreción PRL	Hamaguchi M y cols., 1990

Birgit Gellersen and Jan J. Brosens et al. 2014

Tabla 1. Tratamientos decidualogénicos utilizados para decidualización *in vitro* de las ESCs. Abreviaturas: DES, dietilestilbestrol; E2, estradiol; P4, progesterona.

INTRODUCCIÓN

El cAMP de acción rápida induce, *in vitro*, un fenotipo totalmente decidual dentro de los 3 primeros días, mientras que la progesterona de acción lenta genera una respuesta tardía entre 14-23 días de tratamiento para inducir un fenotipo completamente decidual (Birgit Gellersen and Brosens 2014). Por lo tanto, el cAMP y la progesterona siguen dos vías separadas.

4. Acción esteroidea: estradiol y progesterona

Los estrógenos, la progesterona y los andrógenos son las tres principales hormonas esteroides ováricas clásicas que ejercen sus efectos sobre las células endometriales, principalmente a través de sus receptores afines (Ov D Slayden and Brenner 2004). El 17 β -estradiol (E2) y las estronas son los dos principales estrógenos disponibles para un endometrio sin embrión implantado, y éstos ejercen sus funciones celulares a través de receptores nucleares, ER α y ER β , que son factores de transcripción inducibles por hormonas (Vani et al. 2008) (Crandall and Barrett-Connor 2013).

La progesterona (P4) es una hormona esteroidea sintetizada por la placenta, los ovarios y las glándulas suprarrenales, y es esencial para las funciones reproductivas, como la ovulación y la iniciación y mantenimiento del embarazo (Morel et al. 2016). En particular, las funciones fisiológicas de la progesterona incluyen también la regulación de otros tejidos, incluidos el cerebro, las mamas y los huesos (Brisken 2013) (Xiu et al. 2016) (Rossetti et al. 2016).

Los principales objetivos uterinos para la progesterona son las células estromales y epiteliales en el endometrio, las células del músculo liso en el miometrio y los fibroblastos estromales y las células epiteliales glandulares en el cuello uterino.

Los efectos de la progesterona en estas células están mediados principalmente por la unión del ligando a receptores de progesterona nucleares (nPR) específicos (PR-A y PR-B), que representan la vía de señalización clásica, y sus acciones pleiotrópicas se deben a variaciones específicas del tipo celular en la señalización de nPR.

INTRODUCCIÓN

Estos nPR, unidos a sus ligandos, se unen posteriormente a regiones reguladoras de genes que incluyen elementos de respuestas a la progesterona (Progesterone Response Element, PRE), para iniciar la transcripción de genes que responden a la progesterona (Jacobsen and Horwitz 2012).

La etiología de las patologías uterinas, que incluyen endometriosis, leiomioma, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino y pérdida recurrente del embarazo, se han asociado con una señalización de la comunicación aberrante.

4.1 Vía clásica de la progesterona: receptores nucleares (nPR)

Los nPR tienen dos isoformas de receptores bien descritos: PR-A (94 kDa) y PR-B (120 kDa) (Grimm, Hartig, and Edwards 2016) (Lessey, Alexander, and Horwitz 1983) (J D Graham et al. 1995) (J. Dinny Graham and Clarke 1997) (Figura 4). Aunque PR-A es estructuralmente una versión truncada de la isoforma B, ha adquirido funciones divergentes, especialmente en el útero. Ambas isoformas están codificadas por un único gen, pero se transcriben a partir de diferentes promotores para generar distintas subclases de ARNm de PR (C. L. Clarke and Graham 2012). Las isoformas PR-A y PR-B comparten dominios con función activadora de la transcripción (AF) AF-1 y AF-2; la isoforma PR-B contiene un segmento N-terminal específico AF-3, que contiene el segmento B-upstream (BUS), ausente en la isoforma PR-A (Figura 4).

Tanto PR-A como PR-B contienen ambos el dominio de unión al ligando C-terminal (LBD) y la región de bisagra (dominio h) (Figura 4). Un motivo consenso para conjugación de la proteína SUMO está presente en el dominio N-terminal (NTD) de PR-A y PR-B, y la sumoilación modula la actividad transcripcional ligando-dependiente sobre los promotores que contienen los elementos de respuestas a la progesterona (Progesterone Response Element, PRE) (Abdel-Hafiz and Horwitz 2012). El NTD codifica una secuencia rica en prolina, que tiene un sitio de unión para el dominio SH3 de SRC tirosina quinasa, una proteína que contribuye a la señalización de progesterona extranuclear (Hill et al. 2012).

INTRODUCCIÓN

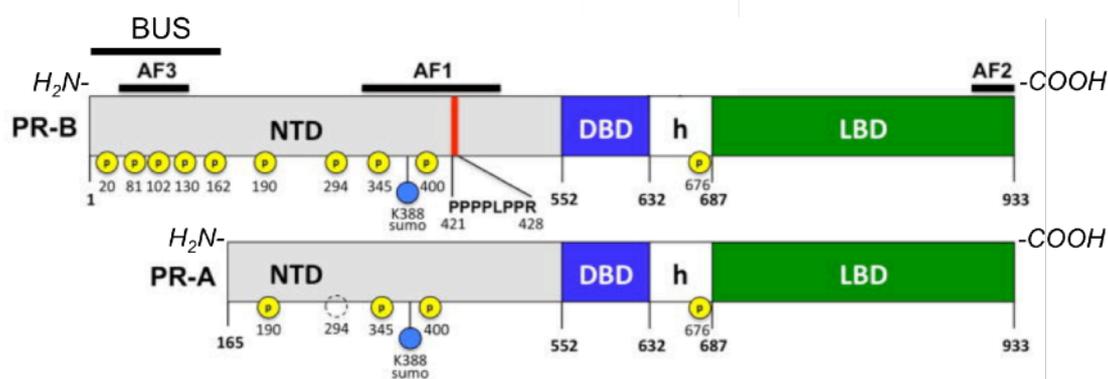


Figura 4. Dominios del receptor de progesterona y modificaciones postraduccionales. PR-B es la isoforma del receptor de longitud completa; PR-A carece de 164 aminoácidos en el extremo N-terminal. Dominio de unión al ligando (LBD), dominio de unión al ADN (DBD), dominio amino terminal (NTD), bisagra (h), funciones de activación transcripcional AF1, AF2, AF3. Motivo de poliprolina (421-427) que se une al dominio SH3 de la tirosina quinasa c-Src, fosforilaciones de serina (P), sumoilación (SUMO) (Figura adaptada de [Krista K. Hill](#) y cols, 2012).

4.1.1. Mecanismo de acción de los receptores clásicos de progesterona

El receptor nPR no unido a su ligando existe en ambos compartimentos subcelulares, citoplasma y núcleo, y reside en complejos con proteínas de choque térmico (Heat shock proteins, HSP), tales como HSP70 y HSP90 (Kosano et al. 1998). La unión de la progesterona a nPR induce la disociación de HSP, la dimerización del nPR, su translocación desde el citoplasma al núcleo y retención en este último del nPR dimerizado, que se une a determinados elementos de respuesta (HREs) con consecuente activación de la transcripción de genes específicos. Numerosos factores de transcripción (AP1, SP1, STAT) están involucrados en la acción de nPR, y pueden activar o inhibir las actividades transcripcionales (Stoecklin et al. 1999) (Owen et al. 1998) (Figura 5). Las modificaciones postraduccionales de nPR, como la fosforilación de serina N-terminal y la acetilación de lisina, también pueden alterar la actividad transcripcional de nPR y afectar la selectividad del promotor (Abdel-Hafiz and Horwitz 2014).

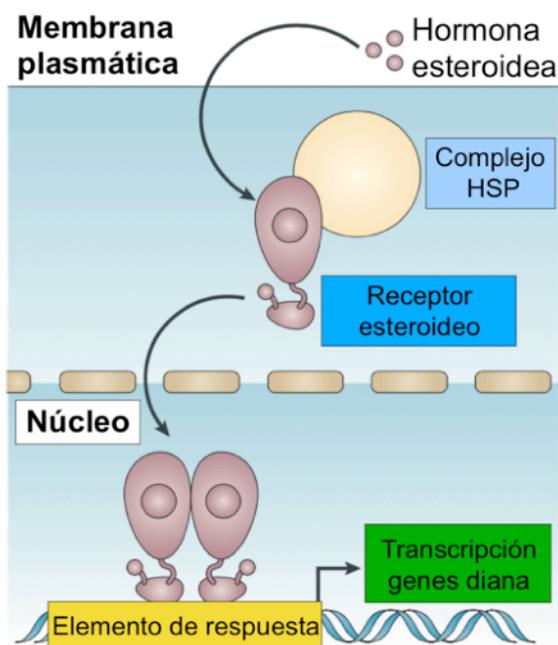


Figura 5. Esquema del mecanismo de acción de los receptores clásicos esteroideos. Los receptores de esteroides, como por ejemplo el receptor clásico de la progesterona, se sintetizan en formas inactivas que están asociadas con complejos de proteína de choque térmico (HSP) en el citoplasma y / o el núcleo. La unión de la progesterona a su receptor (PR-A y PR-B) causa la disociación de los receptores de los complejos de HSP y permite la unión a elementos de respuesta específicos (HREs) en genes diana (Figura adaptada de Christopher K. Glass y Sumito Ogawa, 2005),

4.1.2 Expresión endometrial de los nPR

Se han utilizado enfoques farmacológicos (p.ej., RU486/mifepristona) para estudiar las funciones del nPR en el útero; sin embargo, los modelos de ratones mutantes deficientes en su expresión de cada isoforma nPR han sido muy instructivos para dilucidar las acciones fisiológicas de los PR (revisado en (Lydon et al. 1996) (Mulac-Jericevic and Conneely 2004).

Aunque la capa endometrial basal muestra una expresión persistente a lo largo del ciclo menstrual, los nPR tienen diferentes expresiones a nivel temporal y de localización en la capa funcional (Lessey et al. 1988) (Snijders et al. 1992). El nPR está ampliamente presente durante la fase proliferativa del ciclo, con elevada expresión de ambas isoformas, PR-A y PR-B (Koshiyama et al. 1995) (J. D. Wang et al. 1994) (H. Wang et al. 1998). Pero, después de la ovulación, hay una disminución significativa de estos receptores en las células epiteliales glandulares de la capa funcional. En cambio, nPR persiste en el compartimento del estroma de la capa funcional a lo largo de la fase secretora, particularmente en la región perivascular.

INTRODUCCIÓN

Análisis inmunohistoquímicos del tejido humano han revelado que la isoforma predominante durante la fase secretora es PR-A, mientras que PR-B disminuye en ambas células estromales y glandulares en la segunda mitad del ciclo (H. Wang et al. 1998) (J J Brosens, Hayashi, and White 1999) (Mote et al. 2001). Por lo tanto, las células del estroma endometrial siguen siendo sensibles a la progesterona a lo largo de la fase secretora. Sin embargo, el compartimento estromal se caracteriza por una considerable heterogeneidad celular. De hecho, estudios de colocalización, con doble marcaje para nPR y PRL, han mostrado una subpoblación de ESC en la decidua que retienen elevados niveles de expresión de nPR, pero a la vez una señal muy débil para PRL. Por otro lado, aquellas células que secretan PRL presentan no solamente características morfológicas deciduales, sino que también muestran inmunoreactividad muy baja para nPR (J. D. Wang et al. 1994).

4.2 Vía no clásica de la progesterona

Se cree que las acciones de la progesterona, en el sistema reproductivo femenino, están principalmente mediadas por los clásicos nPR.

Sin embargo, no todas las acciones fisiológicas de la progesterona pueden explicarse por la activación de los nPR. De hecho, se conoce que la progesterona actúa también a través de vías de señalización no clásica (Mueck et al. 2014) que pueden ser dependientes o independientes de la regulación transcripcional o genómica (Vicent et al. 2013). Además de la modulación de la transcripción génica por nPR, varios segundos mensajeros y vías de transducción de señales desempeñan un papel importante para ejercer efectos hormonales rápidos, en cuestión de segundos, mediados por una señalización no clásica (Mani et al. 2012) (Contrò, R. Basile, and Proia 2015).

Dichas respuestas rápidas a la progesterona están mediadas por la activación de receptores de la membrana celular, citoplasmáticos o cascadas de señalización intracelular independientes del receptor clásico (Frye et al. 2006) (Dressing et al. 2011). Pero, en general, los receptores de las vías no clásica suelen localizarse en la superficie celular y están estructuralmente relacionados con

INTRODUCCIÓN

receptores acoplados a proteína G y receptores transmembrana únicos (Gerdes, D Wehling, M Leube, B Falkenstein 1998) (Saner et al. 2003) (Zhu, Bond, and Thomas 2003) (Price, Hansen, and Oliver 2005) (Younglai et al. 2006) (Behera et al. 2009) (Lee et al. 2010), con la consecuente asociación a la actividad de la tirosina quinasa y posterior activación de la vía de las MAP quinasa (MAPK) (Migliaccio et al. 1998) (Lange 2004).

El soporte para una vía alternativa a una mediación de las acciones de la progesterona proviene principalmente de estudios de cuerpos lúteos de rata. Por ejemplo, se ha visto que la progesterona reduce la tasa de apoptosis en los cuerpos lúteos (Kuranaga et al. 2000) y además, inyecciones de un antagonista de la progesterona, RU486 (mifepristona), promueve la desaparición del cuerpo lúteo en ratas (Telleria et al. 2001). Al igual que los estudios que involucran células luteales de los primates, estas observaciones son consistentes con una participación de nPR. Sin embargo, las células lúteas de rata no expresan nPR (Goyeneche et al. 2003) (Park and Mayo 1991). Estos hallazgos cuestionan el mecanismo a través del cual la progesterona promueve la viabilidad de las células lúteas. También existen discrepancias en el mecanismo de acción antiapoptótica de la progesterona con respecto a las células de la granulosa. La progesterona previene la apoptosis de las células de la granulosa (J J Peluso 2003) (J J Peluso and Pappalardo 1994) (J J Peluso and Pappalardo 1998) después del pico de LH (Svensson et al. 2000) (Quirk, Cowan, and Harman 2004). Pero es muy importante destacar, que solo las células de la granulosa aisladas después del pico de LH, expresan nPR (Park and Mayo 1991) (Quirk, Cowan, and Harman 2004). Por lo tanto, en las células de la granulosa aisladas antes del pico de LH, la progesterona debe ser capaz de activar una vía antiapoptótica que sea independiente de la vía de los nPR. Los nPR se expresan después de la exposición a LH (hCG), pero solo de forma transitoria, durante un período de aproximadamente 2-4 h en el período preovulatorio (Park and Mayo 1991) (Svensson et al. 2000) (Quirk, Cowan, and Harman 2004) (Park-Sarge et al. 1995) (Natraj and Richards 1993). Durante este tiempo, las células de la granulosa se vuelven más resistentes a la apoptosis (Svensson et al. 2000) (Quirk, Cowan, and Harman 2004).

La relevancia fisiológica de los receptores no clásicos no está clara, ya que su capacidad para unir progesterona es relativamente baja, en comparación con los

INTRODUCCIÓN

nPR, y algunos estudios sugieren que niquiera son activados por la progesterona (Krietsch et al. 2006). Sin embargo, las acciones no clásicas de la progesterona se han demostrado estar asociadas con la modulación del comportamiento sexual (Frye et al. 2006), maduración meiótica en ovocitos de *Xenopus* (Finidori-Lepicard et al. 1981a) y la reacción acrosómica en espermatozoides humanos (Foresta, Rossato, and Di Virgilio 1993), así como la regulación del flujo de iones en neuronas (Viéro et al. 2006), miocitos vasculares (Barbagallo et al. 2001) y células epiteliales (G. M. Head et al. 1999).

Los efectos de la progesterona en el estroma endometrial probablemente se ven facilitados a través del nPR localizado en las ESC, donde los niveles relativamente altos de nPR se mantienen a lo largo de la fase secretora del ciclo, lo que permite a la nPR actuar como factor de transcripción para regular directamente la transcripción de genes (Ov D Slayden and Brenner 2004). Sin embargo, el nPR es indetectable en las células epiteliales de las glándulas localizadas en la zona funcional durante la mitad de la fase secretora tardía del ciclo, por lo tanto, la vía de regulación de los efectos de la progesterona sobre el epitelio uterino no se acaban de entender completamente (Ov Daniel Slayden and Keator 2007).

4.2.1 Receptores PAQR y PGRMC

Se han identificado dos familias de receptores de progesterona de membrana no clásicos, que incluyen el receptor de Progestina y AdipoQ (*PAQR*) y la familia del componente de membrana del receptor de progesterona (*PGRMC*) (Y. T. Tang et al. 2005) (Cahill 2007b) (John J Peluso 2007) (Thomas 2008) (Thomas and Pang 2012) (Figura 6).

Los miembros de la familia *PAQR*, con supuesta actividad de unión a la progesterona, pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G e incluyen receptores de progesterona de membrana α , β y γ (también llamados Paqr7, Paqr8 y Paqr5, respectivamente). Cada gen ha sido clonado y parcialmente caracterizado en mamíferos (Zhu, Bond, and Thomas 2003). Si bien se ha demostrado que estos receptores tienen acciones biológicas *in vitro* (Karteris et al. 2006), otros han cuestionado la validez de los receptores de membrana (mPR)

INTRODUCCIÓN

como receptores de progesterona de *bona fide* (Karteris et al. 2006).

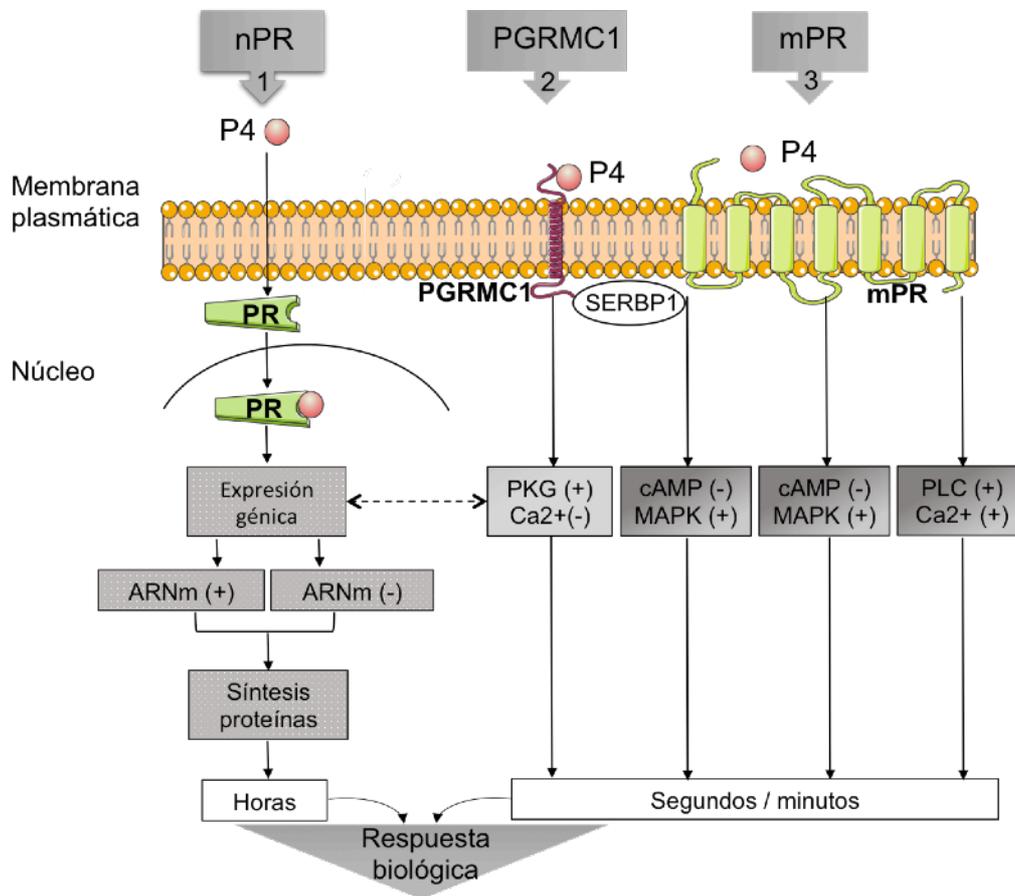


Figura adaptada de Kowalik M.K. et al., 2013

Figura 6. Vías de señalización celular clásica y no clásica de la progesterona. (Figura tomada de Magdalena K. Kowalik Q, Robert Rekawiecki, Jan Kotwica 2013).

La segunda familia de receptores de progesterona no clásicos es la familia *PGRMC*, que incluye PGRMC1, PGRMC2, neudecina y neuferricina. Los respectivos genes de PGRMC1 y PGRMC2 se clonaron originalmente como proteína de dominio hem-1 o HPR6.6 y Dg6, respectivamente (Falkenstein et al. 1996) (Meyer et al. 1996) (Gerdes et al. 1998). Curiosamente, las acciones de los miembros de las familias *PGRMC* y *PAQR* pueden estar relacionadas, ya que se ha demostrado una interacción física entre PGRMC1 y PAQR7 en células cultivadas (Thomas, Pang, and Dong 2014) (Sueldo, Liu, and Peluso 2015) (Figura 6).

5. Ventana de implantación

El endometrio humano es un tejido altamente dinámico, especializado, con la capacidad de sufrir cambios dramáticos en respuesta a las hormonas esteroideas, que no es receptivo al embrión durante la mayor parte del ciclo menstrual. La coordinación del desarrollo embrionario, el estado endometrial y la comunicación entre el embrión y el endometrio (Cha J, Vilella F, Dey S 2013) son cruciales para un embarazo exitoso. La implantación del embrión representa el paso más crítico del proceso reproductivo en muchas especies. Consiste en un fenómeno biológico único, mediante el cual el blastocisto se conecta íntimamente con la superficie endometrial materna para formar la placenta, que proporcionará una interfaz entre el feto en crecimiento y la circulación materna (Denker 1993) (Aplin 2000).

La implantación implica una secuencia compleja de eventos de señalización que son cruciales para el establecimiento del embarazo. Se ha postulado que una gran cantidad de mediadores moleculares identificados, bajo la influencia de las hormonas ováricas, están involucrados en esta interacción temprana feto-materna. Estos mediadores abarcan una gran variedad de moléculas interrelacionadas que incluyen moléculas de adhesión, citoquinas, factores de crecimiento, lípidos y otros (Lessey et al. 1992) (Simón, Martín, and Pellicer 2000).

La receptividad endometrial consiste en la adquisición de ligandos de adhesión junto con la pérdida de componentes inhibidores que pueden actuar como una barrera para un embrión adherido (Aplin 2000). Una implantación exitosa requiere por tanto un endometrio receptivo, un embrión normal y funcional en la etapa de desarrollo del blastocisto y un diálogo sincronizado entre los tejidos maternos y embrionarios (Simón, Martín, and Pellicer 2000).

El proceso de implantación se puede clasificar en tres etapas: aposición, adhesión e invasión (Enders and Schlafke 1967). Durante la aposición y adhesión de blastocisto, las células de trofoblasto se adhieren al epitelio endometrial receptivo. El blastocisto posteriormente se anclará a la lámina basal endometrial y a la matriz extracelular estromal (MEC). A continuación se produce la penetración invasiva de blastocisto a través del epitelio luminal (Enders and Schlafke 1967). Sorprendentemente, la adquisición de la receptividad endometrial se limita a un

INTRODUCCIÓN

período muy corto, entre los días 20 y 24 de un ciclo menstrual regular (día LH + 7 a LH + 11), en el cual el tejido endometrial adquiere un estado morfológico, funcional y transitorio dependiente de las hormonas esteroideas ováricas que permite la adhesión del blastocisto (Psychoyos 1973). A lo largo de este período, que se denomina comúnmente “ventana de implantación” o “window of implantation” (WOI), el endometrio humano está preparado para la adhesión del blastocisto. Dicha ventana de implantación dura entre 12 h y 2 días, y varía de mujer a mujer (Ruiz-Alonso et al. 2013). El epitelio luminal adquiere el fenotipo receptivo al adquirir cambios estructurales y funcionales específicos relacionados con la reorganización del citoesqueleto (Martín et al. 2000) (Thie and Denker 2002).

El factor más estudiado en el proceso de implantación es el propio embrión, aunque el factor endometrial también se ha estudiado ampliamente desde la década del 1970, cuando apareció por primera vez el método "estándar de oro" para la evaluación del estado endometrial (Noyes, Hertig, and Rock 1975). El método de Noyes describe la apariencia morfológica "específica" de los diferentes compartimentos del endometrio a lo largo del ciclo menstrual. De tal manera se distinguen diferentes fases del ciclo sobre la base de las características histológicas e incluso la datación endometrial durante la fase lútea. Estos artículos clásicos han sido los más citados en nuestro campo y seguidos como "la" herramienta de diagnóstico para la datación endometrial y la investigación endometrial en todo el mundo. Sin embargo, la precisión y la relevancia funcional de los criterios de fechado de Noyes han sido cuestionadas y examinadas en muchos estudios retrospectivos (Shoupe et al. 1989) (Balasch et al. 1992), prospectivos (Creus et al. 2002) (Ordi et al. 2003) y aleatorizados (Murray et al. 2004) (Coutifaris et al. 2004) concluyendo que la datación endometrial histológica no proporciona información clínica útil y por tanto, debe abandonarse como una herramienta de diagnóstico. Además, esta metodología no tiene la capacidad de discriminar entre parejas fértiles e infértiles (Coutifaris et al. 2004).

6. Receptividad endometrial: enfoque -ómico endometrial

6.1 Transcriptómica endometrial

En las últimas décadas, muchos grupos de investigación han investigado sobre los eventos moleculares en el endometrio, utilizando el enfoque molecular preferido en modelos animales y/o humanos, con el objetivo de definir los mecanismos básicos involucrados en la receptividad endometrial. El desarrollo de la tecnología de microarray (Schena et al. 1995) ha permitido analizar la expresión de miles de genes al mismo tiempo en una muestra específica. Esta tecnología nos permite abordar, de forma global, la genómica del desarrollo endometrial.

Dos estudios independientes han demostrado la identificación genómica de diferentes fases del ciclo menstrual basadas en el perfil de grupos de genes que se expresan de una manera específica para cada etapa (Ponnampalam et al. 2004) (Talbi et al. 2006). Talbi y sus colegas han examinado las firmas moleculares bioquímicas del endometrio humano para probar su posible aplicación como herramienta de fenotipado molecular (Talbi et al. 2006).

En medicina reproductiva, uno de los desafíos más importantes ha sido poder identificar y diagnosticar la ventana de receptividad endometrial. Debido a la necesidad de trasladar a las clínicas de reproducción asistida un método de datación preciso, objetivo y molecular para el estado de receptividad del endometrio, Díaz-Gimeno y cols. (Ruiz-Alonso et al. 2013) (Díaz-Gimeno et al. 2011) en nuestro laboratorio desarrollaron el “Endometrial receptivity array” (ERA), un microarray de expresión personalizado que identifica la firma transcriptómica de la ventana de implantación (WOI). El ERA puede determinar el estado de receptividad endometrial de una paciente, independientemente de la apariencia histológica del endometrio, comparando el perfil transcriptómico de una muestra de prueba para controlar muestras en ciclo natural (7 días después del pico de la hormona luteinizante) o de reemplazo hormonal (5 días después de la administración de progesterona después de estrógeno cebado). El microarray del ERA contiene 238 genes diferencialmente expresados entre estos perfiles y estas diferencias se implementan en un predictor computacional que puede diagnosticar objetivamente la WOI personal de la paciente (Ruiz-Alonso et al.

INTRODUCCIÓN

2013) (Díaz-Gimeno et al. 2011). La grandeza de la herramienta ERA reside en la ruptura de la idea de que la WOI es constante y siempre permite la implantación (Díaz-Gimeno et al. 2014), complementando la tecnología de reproducción asistida (ART) con la medicina personalizada, identificando los desplazamientos de WOI e introduciendo el concepto de transfer embrionario personalizado (pET) (Ruiz-Alonso et al. 2013). El test ERA diagnostica los perfiles transcriptómicos como 'receptivos' cuando el endometrio está listo para la adhesión embrionaria y 'no receptivo' cuando no lo es. En este caso, también nos aporta información sobre el estado 'preceptivo' y 'postreceptivo'. Los resultados del ERA fueron reproducibles en los mismos pacientes hasta 29-40 meses después de la primera prueba (Díaz-Gimeno et al. 2013).

Estos avances tecnológicos, junto con el creciente interés en la investigación del papel del endometrio en la implantación, están permitiendo nuevas investigaciones en esta área con una profundidad sin precedentes, mejorando el conocimiento de la receptividad humana de las siguientes maneras: refinando nuestro conocimiento global del endometrio, incluidos los últimos hallazgos en el campo de la ómica (proteómica, transcriptómica, lipidómica y metabolómica); aplicando técnicas de alto rendimiento y análisis masivo de datos; la evolución de las técnicas actuales para hacerlas menos invasivas, lo que permite la transferencia de embriones en el mismo ciclo.

6.2 Proteómica endometrial

Dado que las proteínas traducidas de los genes transcritos son los efectores finales en los tejidos, nuestro grupo llevó a cabo también una firma proteómica de receptividad endometrial (Garrido-Gómez et al. 2014). La proteómica del endometrio humano ya se había abordado previamente en diferentes artículos (DeSouza et al. 2005) (Domínguez et al. 2009) (Parmar et al. 2009) (Hannan et al. 2010) comparando muestras endometriales obtenidas a lo largo del ciclo menstrual. Para comparar y cuantificar los perfiles de expresión total de mezclas de proteínas complejas, uno de los métodos más utilizados es la electroforesis diferencial en gel (DIGE) (Ünlü, Morgan, and Minden 1997).

INTRODUCCIÓN

Gracias a la técnica del DIGE (Difference In Gel Electrophoresis) y a la estrategia de espectrometría de masas, nuestro laboratorio obtuvo información sobre la firma proteómica de la receptividad endometrial, analizando muestras de endometrio ya diagnosticadas como receptivas (R) o no receptivas (NR) mediante la prueba de diagnóstico establecida, ERA, comentada previamente (Garrido-Gómez et al. 2014). De tal manera, se pudieron identificar 24 proteínas desreguladas estadísticamente significativas mediante la comparación de muestras endometriales ERA-R y ERA-NR. Los pathways estadísticamente significativos asociados a esta comparación entre muestras ERA-R y ERA-NR se relacionaron al proceso de biosíntesis de los carbohidratos y al empalme (splicing) del ARNm nuclear mediante la maquinaria del espliceosoma. Entre estas proteínas se identificó una sobreexpresión de PGRMC1 (Progesterone Receptor Membrane Component 1) en muestras endometriales ERA-NR versus ERA-R (Garrido-Gómez et al. 2014).

Como ya hemos mencionado, PGRMC1 es un receptor no clásico de progesterona muy poco estudiado en la biología reproductiva, cuya función y mecanismo de acción sigue siendo difícil de interpretar. El mismo patrón de disminución durante la ventana de implantación de la fase secretora media se identificó también por otros grupos tanto a nivel transcriptómico (Kao et al. 2002) como proteómico (Chen et al. 2009). Desde entonces ha sido la primera vez que la expresión de la proteína PGRMC1 ha sido asociada a la receptividad endometrial humana.

7. PGRMC1

PGRMC1 ha recibido una gran atención en varias disciplinas biomédicas, incluida la biología reproductiva. PGRMC1 está altamente expresado en tejidos reproductivos femeninos de ratón (Zhang et al. 2008), rata (J J Peluso et al. 2006) (Intlekofer and Petersen 2011) (Lodde and Peluso 2011), mono (Keator, Mah, and Slayden 2012), vaca (Alberto M Luciano et al. 2010) (Slonina, Kowalik, and Kotwica 2012) y humano (Engmann et al. 2006a) (Zhang et al. 2008) (John J Peluso, Liu, et al. 2009a) (John J Peluso, Gawkowska, et al. 2009). Se expresa también en los

INTRODUCCIÓN

espermatozoides humanos (R. M. Lösel et al. 2008) y ha sido localizado por inmunocitoquímica (ICC) en las membranas celulares externas de los sincitiotrofolastos de placenta humana (Zhang et al. 2008).

A cerca de su expresión y función en el endometrio humano la información es escasa. Un estudio reciente demostró, por ejemplo, que PGRMC1 es necesario para la función reproductiva femenina en hembras de ratón, donde la inhibición condicional de este gen da como resultado una alteración de la fertilidad y contribuye al desarrollo de quistes endometriales consistentes con el envejecimiento prematuro (McCallum et al. 2016).

Sin embargo, en los folículos ováricos, PGRMC1 ha sido profundamente estudiado, donde se encuentra altamente expresado, en particular en células de la granulosa humanas (Engmann et al. 2006b), así como en todos los ovarios de mamíferos examinados hasta el momento, incluidos ratones (Cai and Stocco 2005), ratas (J J Peluso et al. 2006), monos (Bishop et al. 2012) y vacas (Kowalik and Kotwica 2008) (A M Luciano et al. 2011).

7.1 Estructura de PGRMC1

PGRMC1 es una proteína de 195aa (25 kDa) unida a la membrana celular, que contiene un péptido luminal corto, un único dominio transmembrana N-terminal y un dominio de unión a hemo C-terminal relacionado con el citocromo b5 (I. S. Ahmed, Rohe, Twist, Mattingly, et al. 2010) (Figura 7). Los primeros 20 aminoácidos codifican para el dominio extracelular; los aminoácidos 21-40 codifican el dominio transmembrana, que la ancla a la membrana celular; y los aminoácidos 70-170 representan el dominio de unión al citocromo P450 b5 (Cahill 2007b) (Figura 7). Presenta, además, sitios de unión a la progesterona de alta afinidad (constante de disociación, $K_d = 11$ nM) y baja afinidad (286 nM) (Meyer et al. 1996).

Los estudios de modificación química sugieren que el sitio de unión a la progesterona se encuentra dentro del dominio citoplásmico de PGRMC1, justo distal al dominio transmembrana (Falkenstein et al. 2001a). Dado que la progesterona es permeable a la membrana, este sitio de unión debería ser

INTRODUCCIÓN

relativamente accesible para la progesterona a pesar de que reside en el lado citoplásmico de la membrana. Curiosamente, la reducción de cualquier segmento de aminoácidos elimina la unión de progesterona, lo que sugiere que se requiere toda la molécula de PGRMC1 para la unión eficaz a la progesterona (John J Peluso, Romak, and Liu 2008).

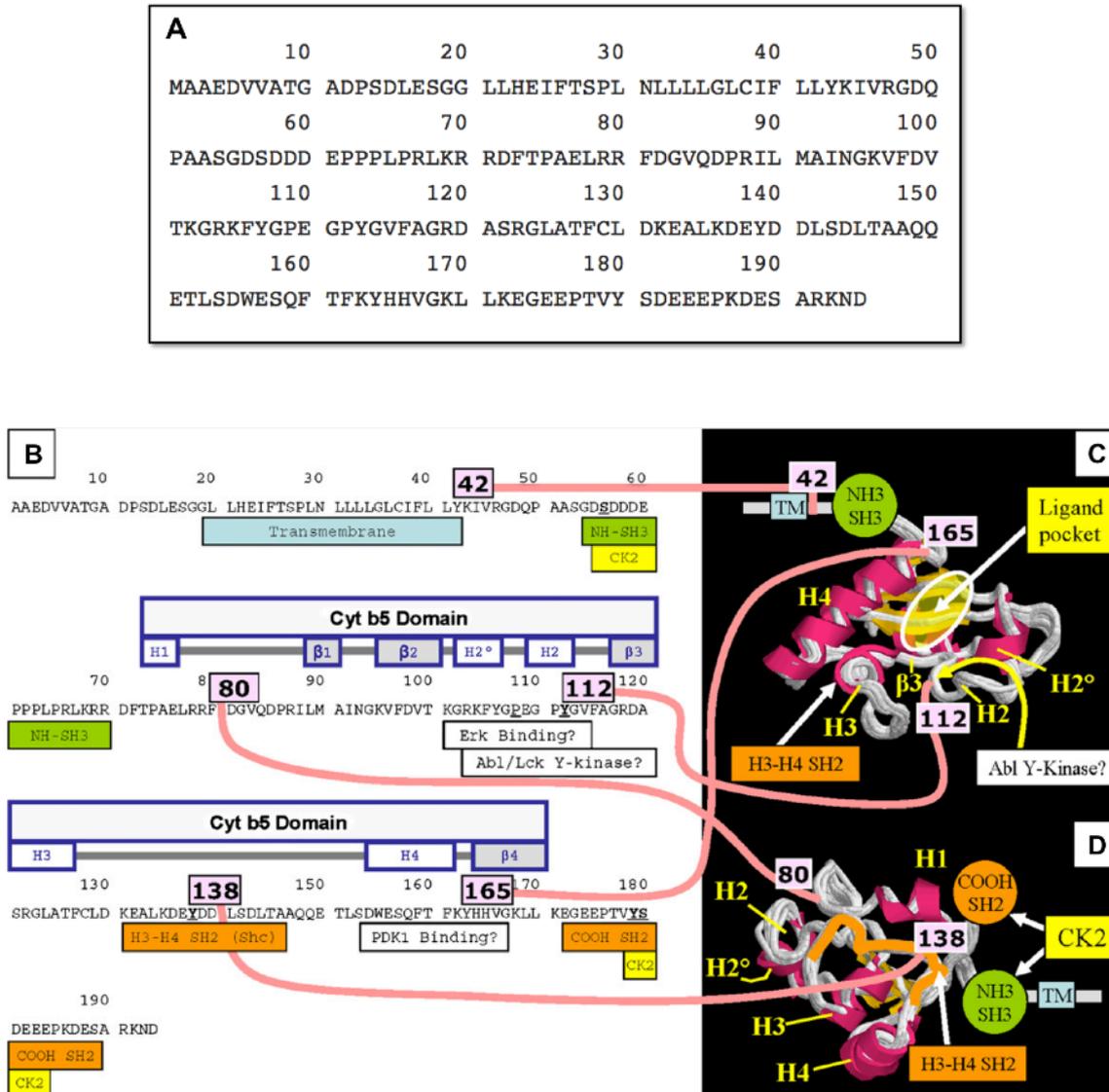


Figura 7. Estructura de PGRMC1. Secuencia proteica de PGRMC1 (A). Modelo de PGRMC1 usando la estructura por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de Arabidopsis (B, C, D). La secuencia de aminoácidos de PGRMC1 (SwissProt O00264) está representada con los motivos funcionales debajo de la secuencia (B). Vista desde el lado del sitio de unión del ligando (C). Vista desde el lado opuesto al que contiene el sitio de unión al ligando (D) (Figura tomada de (Cahill 2007b)).

INTRODUCCIÓN

Evidencias cristalográficas de PGRMC1 publicadas recientemente en (Kabe, Nakane, et al. 2016) han confirmado muchas predicciones estructurales, pareciéndose a estructuras conocidas de proteínas relacionadas (Cahill 2007b) (Rohe et al. 2009) (Mifsud and Bateman 2002). Además, han surgido nuevos avances en nuestro conocimiento de la función PGRMC1 (Kabe, Yamamoto, et al. 2016). Lo más importante, es que la unión a moléculas de hemo dimeriza la proteína. Dicha dimerización resulta ser necesaria para su interacción con la enzima citocromo P450 (Kabe, Yamamoto, et al. 2016) (Figura 8).

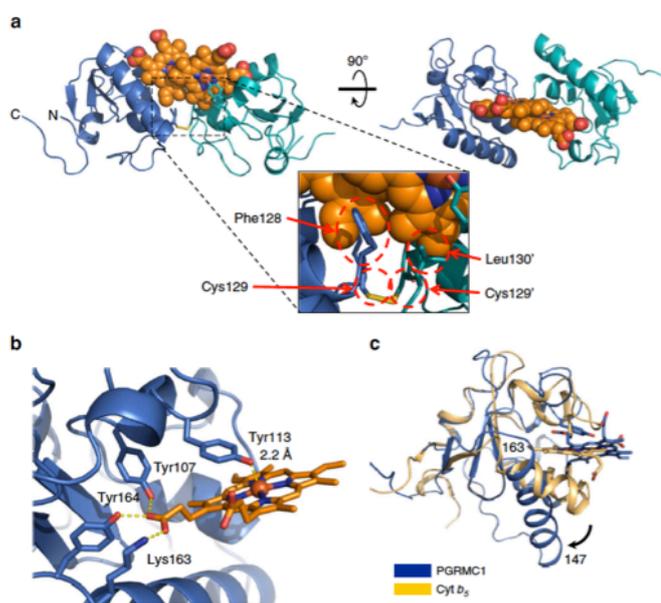


Figura 8. Estructura por cristalografía de rayos X de PGRMC1. (a) Estructura del dímero PGRMC1 formado a través de moléculas hemo apiladas. Dos subunidades PGRMC1 (estructuras en verde y azul) dimerizan mediante el apilamiento de las moléculas de hemo. (b) Coordinación de PGRMC1 por parte de la molécula de hemo con el residuo de Tyr113. Comparación de PGRMC1 (azul) y citocromo b5 (amarillo). (c) PGRMC1 tiene una hélice más larga (a.a.147-163), que es desplazada de la molécula hemo (flecha) (Kabe, Yamamoto, et al. 2016).

Un antagonista específico de PGRMC1, denominado AG-205, interacciona específicamente con el dominio de unión al citocromo b5/hemo (I. S. Ahmed, Rohe, Twist, Mattingly, et al. 2010), compitiendo con hemo por el dominio de unión de PGRMC1 (I. S. Ahmed, Rohe, Twist, Mattingly, et al. 2010), lo que explicaría la interrupción inducida por AG-205 de los dímeros/oligómeros de PGRMC1.

7.2 Sublocalización celular de PGRMC1

PGRMC1 se localiza a diferentes niveles subcelulares, como el retículo

INTRODUCCIÓN

endoplásmico, el núcleo y la membrana plasmática, en la mayoría de las células estudiadas (Cahill 2007b) (R. M. Lösel et al. 2008) (Zhang et al. 2008). Curiosamente, PGRMC1 se detecta en la membrana plasmática y el citoplasma y, ocasionalmente, en los núcleos de las células de la granulosa de los folículos preantrales y antrales en crecimiento (J J Peluso et al. 2006). Este patrón de expresión es consistente con que PGRMC1 es un mediador de las acciones de la progesterona en las células de la granulosa.

7.2.1 Localización nuclear y acción genómica de PGRMC1

Como PGRMC1 está presente también en el núcleo (J J Peluso et al. 2010) (John J Peluso, DeCerbo, and Lodde 2012), es probable que la activación de PGRMC1 nuclear regule la expresión génica.

Para evaluar este hecho, se llevaron a cabo experimentos para identificar genes cuya expresión fuera dependiente de PGRMC1 (J J Peluso et al. 2010) (John J Peluso, Lodde, and Liu 2012). Estos estudios son difíciles de evaluar porque la expresión de genes dependientes de PGRMC1 puede no ser el evento inicial desencadenado por PGRMC1 activado por la progesterona (P4). Por lo tanto, se realizaron estudios para identificar factores de transcripción, cuya actividad se regula por la activación de P4-PGRMC1. Se seleccionaron un total de 48 factores de transcripción y Tcf/Lef se identificó como un factor de transcripción cuya actividad es reprimida por la progesterona (John J Peluso, Lodde, and Liu 2012). Cabe destacar que PGRMC1 no posee un dominio de unión a ADN como tal, entonces, PGRMC1 podría funcionar más como una proteína molde (scaffold) en un complejo transcripcional.

7.3 Funciones putativas de PGRMC1 y asociaciones clínicas reproductivas

PGRMC1 ha sido atribuido al control de diversas funciones, debido sobretodo a sus diferentes localizaciones subcelulares, que confieren más dificultad a la hora de atribuirle una función y un mecanismo de acción claros. De

INTRODUCCIÓN

hecho, todas las funciones biológicas asociadas abarcan diferentes ámbitos fisiológicos. Además, PGRMC1 se une a múltiples ligandos y por eso se le atribuyen varias propuestas funcionales fisiológicas. PGRMC1, puede unirse a otros esteroides: andrógenos, corticoides y hormonas sintéticas (como la progestina R5020), aunque la funcionalidad de la mayoría de estas interacciones receptor-ligando es desconocida (Rohe et al. 2009).

PGRMC1 se ha visto implicado en la mediación de la respuesta a la progesterona, biosíntesis del colesterol, modulación de la actividad del citocromo P450 (I. S. A. Ahmed, Chamberlain, and Craven 2012) (I. S. Ahmed, Rohe, Twist, Mattingly, et al. 2010), esteroidogénesis (Hughes et al. 2007) (Rohe et al. 2009), contractilidad del miometrio (W. Wu et al. 2011), maduración de los ovocitos (Alberto M Luciano et al. 2010), proliferación celular y supervivencia de las células ováricas *in vitro* (John J Peluso, Romak, and Liu 2008). Se cree que está involucrada, además, en cánceres del tracto reproductivo femenino, guía neuronal, tráfico de membranas y regulación de la vía del mevalonato (Cahill 2007b) (I. S. A. Ahmed, Chamberlain, and Craven 2012) (R. M. Lösel et al. 2008).

Lo que está bien descrito es que PGRMC1 juega un papel clínicamente importante en la regulación de la función ovárica, como lo demuestran sus niveles disminuidos en mujeres con síndrome de ovario poliquístico (Schuster et al. 2010) o insuficiencia ovárica prematura (Mansouri et al. 2008) (Schuster et al. 2010). Igualmente, niveles bajos endometriales de ARNm de PGRMC1 y PGRMC2 se encuentran en mujeres con endometriosis, sobretudo en estroma endometrial ectópico y eutópico (Bunch et al. 2014), valores que se vuelven estadísticamente significativos en la fase secretora (Bunch et al. 2014). Otro estudio muestra la disminución de la transcripción y de la expresión proteica de PGRMC2 en macacos con endometriosis avanzada (Keator, Mah, and Slayden 2012), sin embargo, la disminución de la expresión se produjo principalmente en el tejido glandular. La regulación negativa relativa de dichos receptores, PGRMC1 y PGRMC2, de acción rápida en el endometrio en fase secretora, podría contribuir a una respuesta a la progesterona atenuada en mujeres con endometriosis, alterando así la proliferación y una apropiada diferenciación (Bunch et al. 2014).

Se ha visto, además, que algunas deleciones y mutaciones puntuales en la secuencia de PGRMC1, están asociadas a fallo ovárico precoz (Mansouri et al.

INTRODUCCIÓN

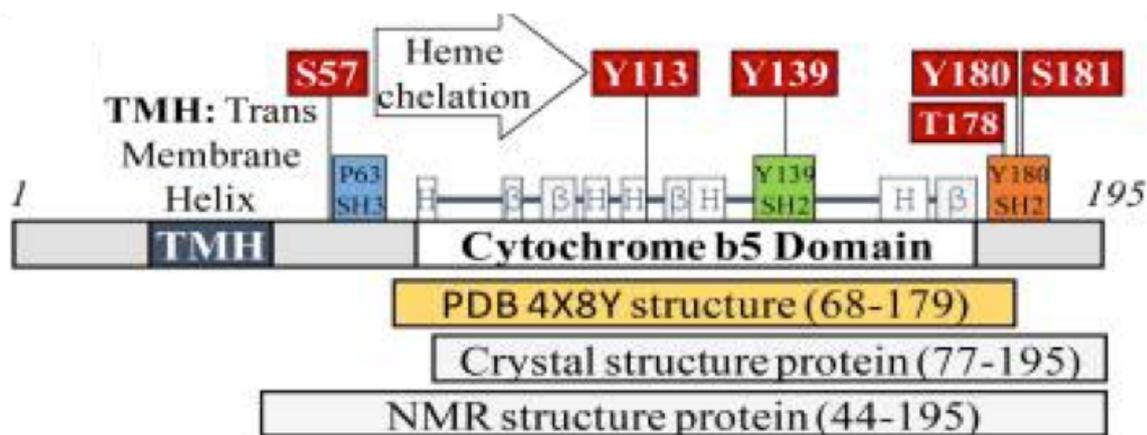
2008).

Además, una expresión reducida de PGRMC1 también se encuentra en las membranas fetales entre las mujeres con ruptura prematura de las membranas (Feng et al. 2014).

Por contra, la sobreexpresión de PGRMC1 se asocia con escaso desarrollo folicular en mujeres sometidas a estimulación ovárica controlada por gonadotropina y fecundación in vitro, como parte de su tratamiento de infertilidad (Elassar et al. 2012). En algunas pacientes infértiles, se han detectado niveles elevados de PGRMC1 en sus células ováricas (granulosa/luteales) recolectadas en el momento de la punción folicular para la recuperación de los ovocitos. Por lo tanto, el cambio en la expresión de PGRMC1 podría reflejar directamente la función ovárica alterada.

7.4 Modificación de la señalización de PGRMC1 mediante fosforilación

En la secuencia aminoacídica de PGRMC1 se encuentran sitios de sumoilación, a nivel de los residuos de lisina 136, 187 y 193 (ver [http:// sumosp. Biocuckoo.org/online.php](http://sumosp.Biocuckoo.org/online.php)).



Cahill MA 2016

Figura 9. Representación esquemática de la estructura proteica de PGRMC1, mostrando la posición de cada dominio y de los sitios de fosforilación.

INTRODUCCIÓN

Las evidencias cristalográficas de PGRMC1 publicadas por Kabe y col. 2016 también revelan ideas previamente desconocidas sobre la posible regulación de la función de PGRMC1 por fosforilación. La aparente diversidad de la función de PGRMC1 puede estar relacionada con los sitios de unión predichos para la interacción de las proteínas de señalización del dominio SH2 o SH3 (Figura 9) (Cahill 2007b) (Vicent et al. 2013). Se ha predicho que estas interacciones están reguladas por fosforilación en sitios específicos dentro de la molécula de PGRMC1 (Cahill 2007b) (Ostman, Hellberg, and Böhmer 2006). Brevemente, las secuencias consenso de dominio SH2 se centran en Y139 e Y180 (Figura 7) y podrían requerir la fosforilación de tirosina para que las proteínas SH2 se unan (Cahill 2007b) (Neubauer et al. 2008). Esta unión puede activar eventos de manera similar al reclutamiento de proteínas a receptores de hormonas fosforiladas con tirosina (Ostman, Hellberg, and Böhmer 2006).

7.5 PGRMC1 y la mediación del metabolismo del colesterol

Específicamente, PGRMC1 se une y activa a los miembros de la familia CYP51A1 (llamada, también, *lanosterol 14-alfa demetilasa*), que están involucrados en promover la síntesis de colesterol (Hughes et al. 2007), e interactúa con las proteínas SCAP e INSIG1 (Suchanek, Radzikowska, and Thiele 2005). Las interacciones con SCAP (proteína activadora a través del clivaje de SREBP) e INSIG1 controlan el metabolismo del colesterol, al regular la actividad transcripcional de la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBP), que induce la expresión de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (STAR) (Yang et al. 2002).

7.6 PGRMC1 y el ciclo celular

Para obtener una idea de cómo progesterona y PGRMC1 controlan la mitosis, se determinó la velocidad a la que las células de la granulosa entran en la etapa de metafase del ciclo celular cultivándolas con colchicina, que detiene las

INTRODUCCIÓN

células en metafase. Curiosamente, PGRMC1 se ha visto que localiza en el huso mitótico e interactúa directamente con la proteína del huso mitótico principal, β -tubulina, según lo revelado por el ensayo de *in situ* proximity ligation (Lodde and Peluso 2011).

Además, la P4 aumenta la estabilidad de los microtúbulos del huso. Dado que la progesterona reduce la velocidad del desensamblaje de β -tubulina, esto prolonga la duración de la metafase y extiende la duración del ciclo celular (Lodde and Peluso 2011). En conjunto, estos resultados sugieren que la activación de PGRMC1 mediante progesterona disminuye la velocidad de la mitosis en dos puntos al: (1) suprimir la velocidad de entrada en el ciclo celular y (2) prolongar la duración de la metafase. No se conoce cómo la activación de PGRMC1 mediante progesterona afecta a la velocidad a la que las células atraviesan el ciclo celular en ninguno de estos puntos.

8. PGRMC1 y su interacción con SERBP1

La relación entre progesterona y PGRMC1 no es una simple interacción ligando-receptor. Recientemente se ha sugerido que la proteína de unión al ARNm de la SERPINA1, SERBP1 (número de acceso XM 216160), también conocida como PAIRBP1 (proteína de unión a ARNm del PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1), podría estar implicada también en la mediación de la acción de la progesterona en las células de la granulosa inmadura, y en las células de la granulosa inmortalizadas espontáneamente (SIGC) (J J Peluso et al. 2004a). Esta hipótesis se sugiere por las siguientes observaciones: 1) la sobreexpresión de SERBP1 en SIGC aumenta la unión de 3H-P4 y la capacidad de respuesta a la progesterona y 2) un anticuerpo para SERBP1 anula la acción antiapoptótica de la progesterona en estas células (J J Peluso et al. 2004a).

SERBP1 es también una proteína de unión a ácido hialurónico (AH), por lo que indica que PGRMC1 puede correlacionarse con el AH. En un estudio, los autores encontraron que la expresión de PGRMC1 está asociada con el nivel de AH en pacientes con insuficiencia ovárica primaria (IOP) y que el AH promueve la expresión de PGRMC1 en células KGN (línea celular tumoral de células de la

INTRODUCCIÓN

granulosa) (Zhao et al. 2014). Esto indica que PGRMC1 es un gen diana del AH (Zhao et al. 2014) (Zhao et al. 2015). También demostraron que el AH promueve la expresión de PGRMC1 a través de la regulación del microRNA miR-139-5p en células de la granulosa y que este último, a su vez, promueve la apoptosis e inhibe la función de las células de la granulosa.

Debido a que SERBP1 no posee un dominio transmembrana, se ha propuesto que SERBP1 se une a una proteína transmembrana para formar un complejo receptor-membrana-P4 (J J Peluso et al. 2004a). La observación de que el tratamiento con el anticuerpo SERBP1-1 atenúa la acción antiapoptótica de la progesterona e inmunoprecipita una proteína de unión a progesterona de membrana en las células de la granulosa y lúteas (Falkenstein et al. 1996) (Meyer et al. 1998) (Nölte et al. 2000) refuerza este concepto, y coloca a SERBP1 en la vía de transducción de señal de la progesterona, que preserva la viabilidad de estos tipos de células ováricas.

8.1 Secuencia y mecanismo de interacción PGRMC1-SERBP1

Recientemente se ha identificado en PGRMC1 la secuencia de aminoácidos responsable de su interacción con SERBP1. Esto se logró generando una serie de mutaciones de delección de PGRMC1-GFP y usándolas en ensayos de pulldown (John J Peluso, Romak, and Liu 2008). A partir de estos estudios, quedó claro que el segmento PGRMC1 entre los aminoácidos 70 y 130 se une a SERBP1. Además, la transfección de la secuencia de los aminoácidos 70-130 de PGRMC1 en líneas SIGC o células primarias de la granulosa, interrumpe la interacción entre PGRMC1 endógeno y SERBP1 e induce rápidamente apoptosis en las células, incluso en presencia de progesterona, PGRMC1 y SERBP1 (John J Peluso et al. 2013).

Es posible por tanto que SERBP1 funcione como una proteína scaffold que acerca PGRMC1 a las enzimas de sumoilación (John J. Peluso 2013). Este concepto se basa en la observación de que SERBP1, se une a las enzimas que estimulan la sumoilación, incluidas las ligasas E3 SUMO y la subunidad 2 de la enzima activadora de SUMO (Lemos and Kobarg 2006). Bajo este escenario, PGRMC1 no sumoilado se uniría a SERBP1 y quedaría sumoilado, lo que daría como resultado

INTRODUCCIÓN

su liberación de SERBP1. Aunque este aspecto del mecanismo de acción de PGRMC1 requiere pruebas más claras, implicaría que la sumoilación podría ser una modificación postraduccional importante, que influiría en los eventos de la ruta P4-PGRMC1 que ocurren después de la interacción SERBP1-PGRMC1 (John J. Peluso 2013) (Figura 10).

8.2 Modelo putativo de la vía de transducción de señal de P4-PGRMC1 y de la entrada en el ciclo celular

Teniendo en cuenta los estudios de Peluso y cols., se puede delinear un mecanismo preliminar que define la cascada de señalización P4-PGRMC1 en el contexto del desarrollo del folículo ovárico. Se ha propuesto que esta cascada de transducción de señal comienza mediante la unión de P4 a PGRMC1 en o cerca de la membrana plasmática. Esta unión ocurre a concentraciones relativamente bajas de P4, ya que la constante de disociación (Kd) para la unión de PGRMC1 a P4 está entre 10 y 40 nM (John J Peluso, Romak, and Liu 2008) (John J Peluso, Liu, et al. 2009b). La unión de P4 probablemente altera la forma no sumoilada de PGRMC1 de tal manera que facilita su interacción con SERBP1, que está presente en el citoplasma (Figura 10). SERBP1 actúa como una proteína scaffold que lleva las enzimas de sumoilación muy cerca de PGRMC1. Como resultado, PGRMC1 es sumoilado y su capacidad para unir SERBP1 se reduce, liberando así PGRMC1 y facilitando su transporte al núcleo (Figura 10). Una vez en el núcleo, se propone que PGRMC1 interactúa con los sitios de unión del factor de células T y factor estimulador linfóide (Tcf/Lef) que están dentro de los promotores de los genes inmediatos tempranos. PGRMC1 en presencia de estímulos mitogénicos aumenta la actividad de Tcf/Lef, que a su vez estimula la expresión de genes inmediatos tempranos (por ejemplo, c-myc y c-jun) y posteriormente induce las células de la granulosa a entrar en el ciclo celular (Figura 10) (Peluso 2013). Este mecanismo es consistente con las observaciones de que en los folículos en crecimiento PGRMC1 se localiza en el núcleo de aproximadamente el 30% de las células de la granulosa, que es el mismo porcentaje de células de la granulosa que se encuentran en fase S del ciclo celular (Pedersen 1970).

INTRODUCCIÓN

Sin embargo, a medida que estos folículos crecen, sintetizan más P4 (Roy and Greenwald 1987). Los niveles crecientes de P4 retroalimentan para reducir la capacidad del PGRMC1 nuclear para unir estos sitios de unión a Tcf/Lef. Esto haría más difícil que los estímulos mitogénicos induzcan la expresión de genes que inician la mitosis y, en última instancia, ralentizarían la tasa de proliferación de células de la granulosa (Figura 10).

Esta hipótesis está de acuerdo con el hallazgo de que a medida que el folículo antral aumenta de tamaño disminuye la frecuencia de células granulosas en la fase S del ciclo celular (Pedersen 1970) y aumenta la síntesis de esteroides (Roy and Greenwald 1987) (Hirshfield 1991). Si este mecanismo de acción se produce o no y cómo se lleva a cabo en el endometrio humano está aún por discernir.

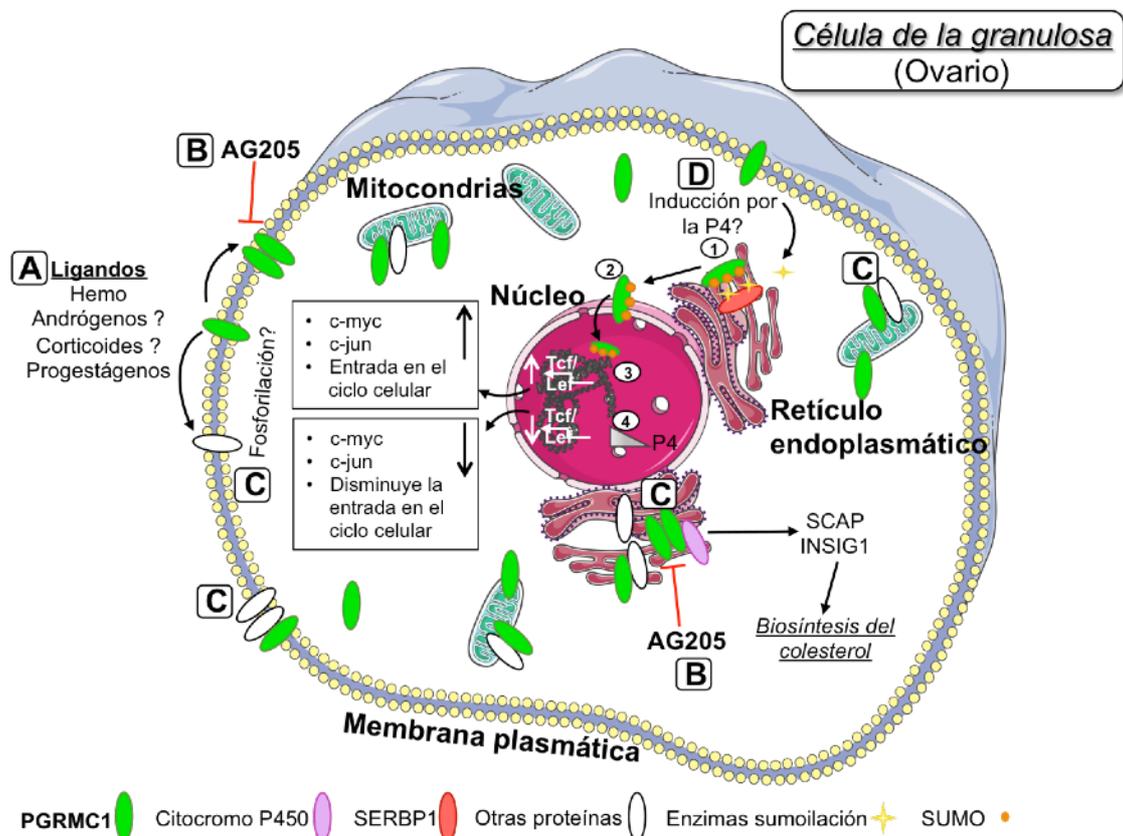


Figura 10. Resumen esquemático e hipotético de posibles mecanismos de acción propuestos para PGRMC1. (A) La proteína PGRMC1 puede unirse a diferentes ligandos: hemo, andrógenos, corticoides y progestágenos, aunque la funcionalidad de la mayoría de estas interacciones receptor-ligando es desconocida (Rohe et al. 2009). (B) PGRMC1 puede existir en la célula en forma

INTRODUCCIÓN

monomérica o dimérica. Su dimerización puede ser inhibida por el antagonista específico, AG205. (C) La estructura de PGRMC1 presenta sitios de regulación de la función por fosforilación, la cual podría activar eventos de reclutamiento de otras proteínas. PGRMC1 interacciona con el citocromo p450, involucrado en promover la síntesis de colesterol. El antagonista AG205 compite con el ligando hemo para el dominio de unión específico del citocromo p450, impidiendo así su dimerización. PGRMC1 interactúa además con las proteínas SCAP e INSIG1, las cuales controlan el metabolismo del colesterol (D). La unión de P4 probablemente altera la estructura de PGRMC1 de tal manera que facilita su interacción con SERBP1, presente en el retículo endoplasmático (1). SERBP1 llevaría las enzimas de sumoilación muy cerca de PGRMC1. Como resultado, PGRMC1 estaría sumoilado y esto facilitaría su transporte al núcleo (2). Una vez en el núcleo, se propone que PGRMC1 interactúa con los factores de transcripción Tcf/Lef. En presencia de estímulos mitogénicos, PGRMC1, aumenta la actividad de Tcf/Lef, que a su vez estimula la expresión de c-myc y c-jun, y posteriormente induce las células a entrar en el ciclo celular (Peluso 2013) (3). Sin embargo, a medida que la concentración de P4 aumenta, por un mecanismo de retroalimentación se reduciría la capacidad del PGRMC1 nuclear para unir estos sitios de unión a Tcf/Lef. Esto haría más difícil que los estímulos mitogénicos induzcan la expresión de genes que inician la mitosis y, en última instancia, ralentizarían la tasa de proliferación de las células (4).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Como los tejidos uterinos, en particular el endometrio, y los tejidos placentarios representan las dianas principales de la acción de la progesterona, es posible que algunas causas de infertilidad de origen desconocido se deriven de la alteración funcional de la activación de los receptores de la P4. Por ello, es importante investigar mejor la activación no clásica de los receptores implicados.

Debido a que en nuestros estudios previos hemos identificado una disminución de PGRMC1 en la fase receptiva del endometrio, hemos dirigido nuestro interés hacia dicho receptor para una mejor descripción y análisis funcional a nivel endometrial. Debido a este hallazgo hemos centrado parte del trabajo en la relación de PGRMC1 con el proceso de decidualización de las ESC.

Por todo ello, nuestros objetivos específicos son los siguientes:

- 1. Caracterizar la expresión y localización del receptor PGRMC1 y su proteína de interacción putativa SERBP1 en el endometrio humano a lo largo del ciclo menstrual.**
- 2. Analizar la expresión del ARNm / proteína PGRMC1 y SERBP1 en las ESC durante el proceso de decidualización *in vitro*.**
- 3. Estudiar la interacción de PGRMC1 con SERBP1 durante el ciclo menstrual y en las ESC durante el proceso de decidualización.**
- 4. Analizar la sobreexpresión de PGRMC1 en las ESC y evaluar funcionalmente su efecto sobre la decidualización *in vitro*.**
- 5. Investigar el efecto funcional del tratamiento de las ESC con Progesterona-BSA y antagonista de PGRMC1 (AG-205) sobre el proceso de decidualización.**
- 6. Buscar nuevas interacciones proteicas de PGRMC1 en el endometrio humano para comprender mejor la implicación de dicha proteína en el proceso de implantación y decidualización.**

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras

Este estudio recibió la aprobación de la Junta de Revisión Institucional del Comité de Ética del Instituto Universitario-IVI (IU-IVI) (1405-FIVI-024-FD, Valencia, España). Para los experimentos *in vivo* e *in vitro* se han utilizado un total de 72 biopsias endometriales humanas, obtenidas a partir de donantes de ovocitos (n=21 para los análisis de inmunohistoquímica, n=15 para la cuantificación de ARNm *in vivo*, y n =36 para experimentos *in vitro*), que acuden a la clínica IVI Valencia, de 18-32 años, con un índice de masa corporal (IMC) entre 20 y 25 kg/m² y ciclos menstruales regulares (21-35 días). Para las tomas de muestras fueron excluidas mujeres con endometritis, enfermedades inflamatorias pélvicas o sangrados irregulares, patologías anatómicas uterinas, ciclos menstruales irregulares (<21 o >35 días), tratamiento hormonal o embarazo dentro de los 3 meses antes de la biopsia.

Las biopsias endometriales han sido tomadas del fondo uterino, utilizando una cánula Pipelle de Cornier® (CCD Laboratories, Paris, France) en condiciones estériles.

Para los experimentos *in vitro*, la toma de las muestras endometriales coincide con el día de la recuperación de ovocitos en ciclos de estimulación ovárica controlada (COS) y, inmediatamente, fueron procesadas para separar las células del estroma y del epitelio (Domínguez F 2010).

Para los estudios inmunohistoquímicos y de cuantificación por PCR, las muestras endometriales fueron recolectadas en diferentes días del ciclo menstrual (ciclo natural) y distribuidas en cinco grupos: fase temprana-medio proliferativa (early-to-midproliferative phase) (n=4, días 1-8); fase proliferativa tardía (late proliferative) (n=4, días 9-14); fase secretora temprana (early secretory phase) (n=5, días 15-18); fase secretora mediana (middle secretory phase) (n=4, días 19-22); y fase secretora tardía (late secretory phase) (n=4, días 23-28). Los tejidos se fijaron inmediatamente en 4% vol/vol de paraformaldehído. Todas las muestras fueron obtenidas tras informar a la paciente del estudio y firmado el consentimiento informado correspondiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Separación células endometriales estromales (ESC)/epiteliales (EEC) y cultivo celular.

Para separar el estroma endometrial de la fracción epitelial, las biopsias se sometieron previamente a una disgregación mecánica mediante la utilización de bisturís. Se limpiaron primero con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium, Sigma-Aldrich) para librarlas de moco y sangre, y luego se trocearon cuidadosamente hasta alcanzar fragmentos menores de 1 mm. Tras la disgregación mecánica se llevó a cabo una disgregación enzimática suave con colagenasa de tipo IA (0,1%, Sigma-Aldrich), diluida en medio de cultivo DMEM, colocando las piezas de las biopsias troceadas en un tubo cónico en un volumen final de 10ml a 4 ° C durante la noche.

Al día siguiente las células del estroma (células individuales o agregados pequeños) y las glándulas epiteliales se separaron en base al tamaño, mediante sedimentación por gravedad y filtración por membrana. Para ello se posicionaron los tubos en posición vertical durante 5 minutos, en los cuales las células glandulares y epiteliales caen al fondo del tubo. El sobrenadante (con las células estromales) se retiró y recolectó, mientras que el sedimento (con las células glandulares y epiteliales) se lavó tres veces, durante 5 minutos, en 3-5 ml de DMEM, recolectando cada vez el sobrenadante. Finalmente, se centrifugaron los sobrenadantes recuperados, para luego resuspender los sedimentos y plantar las ESC.

Las ESC se cultivaron en medio DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12, Sigma-Aldrich) que contiene 10% de suero bovino fetal y 0,1% de antibióticos (fungizona y gentamicina) en todos los experimentos *in vitro*.

2. Inmunohistoquímica PGRMC1 y SERBP1 en Tejido endometrial

Los tejidos endometriales de las diferentes fases del ciclo endometrial fueron fijados, incluidos en parafina, cortados en secciones de 6 mm, y colocados en portaobjetos de microscopio (Thermo Fisher Scientific). Después de la

MATERIALES Y MÉTODOS

desparafinación y rehidratación en una serie de gradientes de alcohol, las secciones se enjuagaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 5 minutos. La inmunohistoquímica fue realizada en secciones endometriales empleando el kit LSAB peroxidasa (DAKO).

Las muestras fueron tratadas previamente con una solución de recuperación del antígeno inducida por calor con tampón de citrato a pH 6.0. Los cortes fueron bloqueados durante 1 hora en seroalbúmina bovina al 10% (BSA; Sigma) y luego fueron incubados durante la noche a 4°C con el anticuerpo de conejo monoclonal anti-PGRMC1 (1 mg/ml; Abcam) o de conejo policlonal anti-SERBP1 (dilución 1:500; Abcam) humanos, ambos diluidos en PBS con 3% de BSA. Incluimos, además, muestras de control negativo (incubado con PBS y 3% BSA en ausencia de los anticuerpos primarios) y positivo (riñón humano y testículo, para PGRMC1 y SERBP1, respectivamente).

Los anticuerpos secundarios están incluidos en el kit de peroxidasa LSAB (DAKO) y son válidos para los anticuerpos primarios de conejo, ratón o de cabra. La detección de inmunoreactividad fue llevada a cabo utilizando el kit de sustrato DAB, produciendo una tinción marrón. Después de una contratinción con hematoxilina durante 10 segundos y lavando con agua destilada, los cortes se montaron con medio de montaje de endurecimiento rápido Eukitt (Sigma). Los H-Scores fueron calculados por parte de tres observadores independientes ciegos (S.S., A.Q., y S.P.) y distribuidos entre completa ausencia de tinción (0) hasta una señal muy fuerte (3) (Domínguez F 2003). Los resultados han sido presentados como la media aritmética +/- desviación estándar (SD).

3. Decidualización *in vitro*

Las ESC separadas de las EEC fueron cultivadas en medio DMEM-F12 al 10% de suero bovino fetal, hasta un 70% -80% de confluencia. A continuación el medio fue reemplazado por medio fresco con el 2% de suero bovino fetal, para así inducir la decidualización *in vitro* mediante 17-acetato de medroxiprogesterona (MPA; 1mM) y 8- bromo-cAMP (0,5mM), análogo estable del adenosín monofosfato 3',5'cíclico (cAMP), durante 3 días. ESC controles fueron cultivadas en paralelo sin

MATERIALES Y MÉTODOS

tratamiento hormonal. Los medios condicionados de estas células fueron recolectados y agrupados para confirmar la decidualización mediante ELISA de la proteína PRL (Abnova). Se usaron células en paralelo para la confirmación morfológica mediante tinción de F-actina con Rodamina-faloidina. Para ello las ESC controles y decidualizadas se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% y guardadas a 4°C en PBS, hasta la realización de la tinción de los filamentos de F-actina.

3.1 Decidualización *in vitro* en combinación con AG-205 y P4-BSA

Para una mejor comprensión de la implicación en la decidualización de los receptores no clásicos de P4 y en particular de PGRMC1, hemos empleado una P4 impermeable a la membrana (P4-BSA), que evita la entrada de P4 en la célula, activando de tal manera solamente los receptores de membrana. Además, hemos introducido también un antagonista de PGRMC1, AG-205, que bloquea específicamente su activación.

La decidualización *in vitro* ha sido inducida en las ESC mediante dos protocolos, en paralelo:

- Protocolo largo (Long protocol), usando P4(1uM) /E2 (estradiol) (10nM), duración de 8 días
- Protocolo corto (Short protocol), usando cAMP (0,5mM) /MPA (1mM), duración de 4 días.

La P4 y el MPA, del protocolo largo y corto respectivamente, han sido sustituidos por P4-BSA (1uM) en combinación con AG-205 (50uM). De esta manera hemos establecido, para cada protocolo, cuatro diferentes condiciones de decidualización *in vitro*:

Protocolo Decidualización Largo (Long)	Protocolo Decidualización Corto (Short)
1) P4 / E2	1) cAMP / MPA
2) P4-BSA / E2	2) cAMP / P4-BSA
3) P4 / E2 + AG-205	3) cAMP / MPA + AG-205
4) P4-BSA / E2 + AG-205	4) cAMP / P4-BSA + AG-205

4. ELISA para el análisis de PRL

Al fin de poder evaluar la correcta decidualización inducida *in vitro* a las ESC, nos enfocamos en la secreción de unos de los mayores marcadores de decidualización, la prolactina (PRL). Después de los 4 u 8 días de estímulo de decidualización, los medios condicionados de las ESC no decidualizadas (ndESC) y decidualizadas (dESC) fueron recolectados y evaluados por duplicado para determinar la concentración de PRL, usando el kit comercial “Prolactin Human Kit” (Abnova). El siguiente kit se basa en un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). El sistema de ensayo utiliza un anticuerpo monoclonal de ratón anti-prolactina humana para la inmovilización en fase sólida (pocillos de placas de 96) y otro anticuerpo monoclonal de ratón anti-prolactina presente en la solución de conjugado anticuerpo-enzima (peroxidasa de rábano).

Las muestras se dejaron reaccionar simultáneamente con los anticuerpos, lo que resulta en que las moléculas de prolactina se intercalan entre la fase sólida y los anticuerpos ligados a la enzima. Después de una incubación de 45 minutos a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron con agua para eliminar los anticuerpos marcados no unidos. Se añadió una solución de reactivo de Tetrametilbenzidina (TMB) y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos, dando como resultado el desarrollo de un color azul. El desarrollo del color se detuvo con la adición de la solución de parada, generando así un color amarillo y se midió espectrofotométricamente a 450 nM. La concentración de prolactina resulta ser directamente proporcional a la intensidad de color de las muestras.

Los valores de cada muestra se determinaron usando un curva patrón (o estándar). El límite de detección para los correspondientes ensayos de ELISA de PRL fue de 2 ng/ml.

5. Tinción de F-actina con Rodamina-faloidina

Debido a la profunda remodelación del citoesqueleto que sufren las ESC durante el proceso de diferenciación, otra estrategia que hemos empleado para

MATERIALES Y MÉTODOS

poder verificar una correcta decidualización, ha sido realizar una tinción de los filamentos de F-actina mediante Faloidina.

Las células ndESC y dESC de cada diseño experimental se lavaron con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 3% durante 20 minutos. Después de la fijación, las células se lavaron dos veces con PBS 1X durante 10 minutos y luego fueron permeabilizadas incubándolas con 0.2% de Tritón X-100, por 5 minutos a temperatura ambiente. Después se ha procedido con dos lavados con PBS 1X y la incubación en oscuridad con 1,5 mg/ml de Rodamina faloidina (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a temperatura ambiente, para teñir los filamentos de F-actina. Con la siguiente tinción es posible visualizar la estructura del citoesqueleto de una célula no decidualizada (ndESC), con sus filamentos elongados, y decidualizadas (dESC), con una estructura totalmente redondeada/poligonal.

Todas las ESC, contrateñidas también con 4',6-Diamino-2-Fenilindol (DAPI, Life Technologies), fueron visualizadas y fotografiadas utilizando un microscopio Nikon invertido Eclipse TE200 (n=7 para cada grupo).

6. Inmunofluorescencia de PGRMC1, SERBP1 y PRAB y estudios de Colocalización

Las sublocalizaciones de PGRMC1, SERBP1 y PRAB (PR-A y PR-B) fueron evaluadas por inmunofluorescencia. Las ndESC y dESC de todos los experimentos de decidualización fueron fijadas durante 30 minutos con paraformaldehído (PFA) al 4%, lavadas dos veces en PBS-T (Tween 20 al 0,05%), permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,1% por 5 minutos, y lavadas en PBS-T nuevamente. Las células fueron bloqueadas con BSA al 1% (Sigma), lavadas en PBS-T e incubadas durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios de PGRMC1 (0.5 mg/mL; Sigma), SERBP1 (5 mg/ml; Abnova) o PRAB (reconoce ambas las isoformas, PR-A y PR-B) (1:1.000, Cell Signaling). A continuación, los cristales fueron lavados tres veces con PBS e incubados con anticuerpos secundarios AlexaFluor 488 anti-conejo de cabra (1: 1.000) y anti-ratón de cabra (1: 500) (Santa Cruz), en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con PBS, los núcleos celulares se contrateñieron con el medio de montaje ProLong Diamond Antifade con 4',6-

MATERIALES Y MÉTODOS

Diamino-2-Fenilindol (DAPI) (Molecular Probes, Life Technologies). Los controles negativos fueron preparados para cada muestra siguiendo el mismo procedimiento de tinción en ausencia de los anticuerpos primarios. Los cristales fueron analizados con un Microscopio confocal FV1000 Olympus. Los experimentos fueron repetidos cinco veces. Para la colocalización *in vivo* de PGRMC1 y SERBP1, la inmunofluorescencia fue llevada a cabo utilizando series de secciones de parafina de diferentes tejidos de cada fase del ciclo endometrial (n=15, tres diferentes biopsias por fase).

La recuperación de antígenos (Antigen retrieval) para exponer los sitios antigénicos ocultos, fue realizada por ebullición de los cortes durante 20 minutos en tampón de citrato 10 mM (pH 6,0). Después de la recuperación del antígeno, los cortes fueron permeabilizados con 0.3% de Triton X-100, bloqueados con 5% de BSA (Sigma)/5% suero normal de cabra (Sigma), e incubados con el anticuerpo primario de SERBP1 (3 mg/ml; Abnova) durante toda la noche a 4°C en una caja húmeda. Los portaobjetos fueron lavados tres veces con solución salina tamponada con tris (TBS) e incubadas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-ratón de cabra AlexaFluor 568 (1: 500) (Santa Cruz) durante 1 hora.

Después del lavado, los portaobjetos fueron incubados con el anticuerpo primario PGRMC1 (0.5 mg / mL; Sigma) a temperatura ambiente durante 1 hora, lavados con TBS, y finalmente incubados con el anticuerpo secundario anti-conejo de cabra AlexaFluor 488 (1: 1,000) (Santa Cruz) durante 1 hora. Las secciones fueron montadas con medio de montaje ProLong Gold Antifade con DAPI (Sondas moleculares, Life Technologies). Los controles negativos fueron preparados para cada muestra siguiendo el mismo procedimiento de tinción en ausencia de los anticuerpos primarios. Los portaobjetos fueron analizados usando un microscopio Nikon Eclipse 80i equipado con una cámara digital Nikon DS-L1.

7. Sobreexpresión de PGRMC1 en ESC

La sobreexpresión de PGRMC1 en ESC primarias fue realizada mediante transfección de un plásmido pCMV6-AC-GFP que contiene la secuencia ORF de PGRMC1 (Origene Inc.). Como control negativo se utilizó un vector vacío (Origene

MATERIALES Y MÉTODOS

Inc.) (Figura 11). Las células fueron cultivadas en condiciones estándar, con medios completos (DMEM/F12, 10% de suero bovino fetal, 0,1% de antibióticos), en una placa de 24 pocillos, dejándolas crecer hasta el 50% - 70% de confluencia, antes de la transfección. Las células, obtenidas a partir de 25 muestras de biopsias endometriales, fueron transfectadas con 1 mg de PGRMC1-pCMV6-AC-GFP (n=17) o plásmido vacío (n=8), usando el reactivo Lipofectamine 3000 (Life Technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

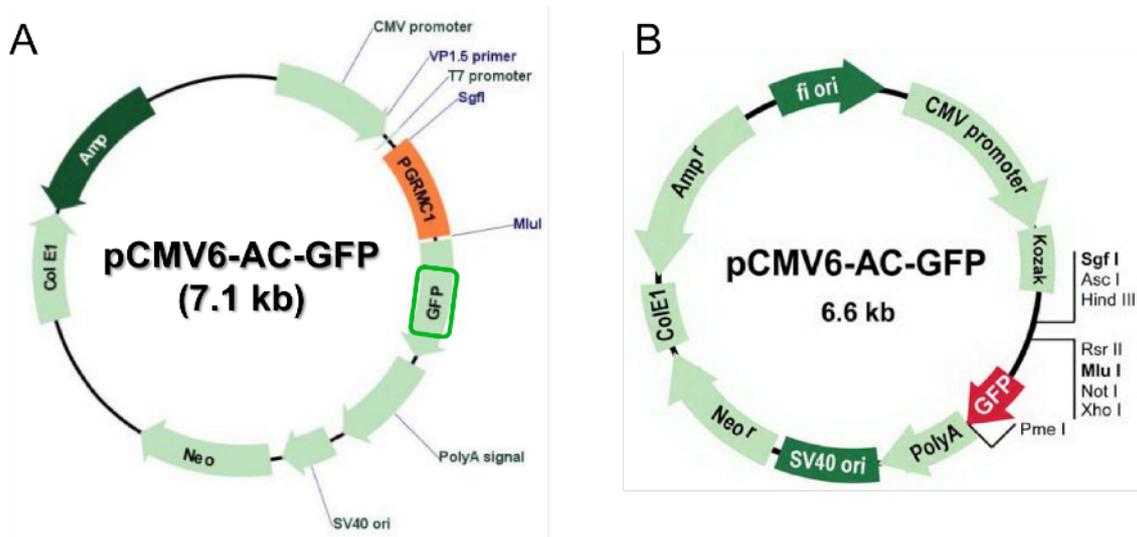


Figura 11. Plásmidos empleados para la transfección de las ESC. Plásmido pCMV6-AC-GFP que contiene la secuencia ORF de PGRMC1, utilizado para llevar a cabo la sobreexpresión de nuestra proteína de interés en las ESC (A). Plásmido pCMV6-AC vacío, utilizado como control negativo de la transfección (B).

Las ESC tratadas solamente con medios básicos sin aditivos fueron utilizadas como control. La transfección se dejó actuar durante 14 horas y después fue evaluada su eficiencia examinando en un microscopio de fluorescencia el porcentaje de células que expresaban GFP, y bioquímicamente mediante real time PCR cuantitativa y Western blot (proteína y ARNm de PGRMC1). Después, los medios de cultivo fueron reemplazados por los medios de decidualización que contienen MPA (1 mM) y 8-bromo-cAMP (0,5 mM). Después de 3 días, se recogieron los medios y las células para evaluar el proceso decidualización, tras tinción de F-actina y cuantificación de los niveles de los marcadores secretados (PRL).

8. Extracción del Proteoma Subcelular

Las fracciones proteicas citoplásmicas, de membrana/orgánulos y nucleares de ndESC y dESC fueron preparadas empleando un kit de extracción de proteoma subcelular (ProteoExtract Kit, Calbiochem, VWR International Ltd.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (n= 3 por fracción subcelular). La pureza de cada fracción fue analizada mediante inmunotransferencia, usando anticuerpos contra las proteínas marcadoras: anticuerpo monoclonal de conejo anti-Hsp70 humano (dilución 1:1.000; System Biosciences) para la fracción citosólica, anticuerpo policlonal de conejo anti-CD98 humano (dilución 1: 1000; Santa Cruz) para la fracción de membrana/orgánulos y anticuerpo policlonal de conejo anti-Histona4 N-Terminal humano (dilución 1: 1.000; Sigma) para la fracción nuclear. Hay que tener en cuenta que en este protocolo la fracción de membrana contiene membranas plasmáticas, así como las membranas de los orgánulos citoplasmáticos.

Finalmente, en todas las localizaciones subcelulares fueron analizados PGRMC1 y SERPBP1 por Western blot.

9. Western Blot

Las proteínas totales fueron extraídas de células ndESC y dESC transfectadas y no transfectadas. Las células fueron lisadas con tampón RIPA que contiene 0,5% de Triton X-100, 0,5% de Deoxicolato, 20mM de Tris-HCl a pH 7,5, 150mM de NaCl, 10mM de ácido etilendiamminotetraacético (EDTA), 1mM de 1,4-dithiothreitol (Cleland's reagent) (DTT), 1X de inhibidor de proteasa (Roche complete 7X) y 1X de inhibidor de fosfatasa (Sigma 100X). Después de 15 minutos de incubación en hielo, las células lisadas se centrifugaron a 13,000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Tras ello, las proteínas fueron desnaturalizadas a 95°C durante 5 minutos y fueron separadas (15ug) por electroforesis discontinua (stacking gel con 4% de poliacrilamida y resolving gel con 12% o 8% de poliacrilamida) durante 1 hora a 180V. Luego se procedió a la electrotransferencia de las proteínas por vía húmeda a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF), utilizando

MATERIALES Y MÉTODOS

tampón de transferencia Tris/glicina (BioRad). La transferencia fue llevada a cabo a 120V durante 2 horas. El bloqueo de la membrana de difluoruro de polivinilideno se efectuó con leche sin grasa (5%), a temperatura ambiente durante 1 hora.

A continuación, las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C: anticuerpo monoclonal de conejo anti-PGRMC1 humano (0.5µg/mL; Abcam); anticuerpo policlonal de cabra anti-PGRMC1 (0.2µg/ml); anticuerpo policlonal de conejo anti-SERBP1 humano (0.5mg/ml; Abcam); anticuerpo policlonal de conejo anti-BAP31 humano (0.4 µg/ml; Novus); anticuerpo policlonal de ratón anti-MAOB (Dilución 1:500; Abnova) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-b-actina humano (Dilución 1:2.500; Santa Cruz). Después, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios policlonal de cabra anti-ratón/conejo/cabra IgG-HRP (dilución 1: 2.000; Santa Cruz), a temperatura ambiente durante 1 hora. El revelado se llevó a cabo mediante el sistema de Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher). Finalmente, las membranas de difluoruro de polivinilideno han sido escaneadas utilizando el programa Fujifilm LAS-300.

10. Microarray de expresión de las muestras decidualizadas mediante protocolo largo en presencia de AG-205 y P4-BSA

El ARN total se extrajo de muestras no decidualizadas y decidualizadas mediante el Protocolo Largo (Long Protocol) en combinación con AG205 y P4BSA (n = 4), utilizando kit RNeasy Mini Kit (Qiagen), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La calidad del ARN se evaluó mediante la carga de 300 ng de ARN total en un RNA LabChip y se analizó en un Bioanalizador A2100 (Agilent Technologies). Para el análisis mediante microarray, se seleccionaron todas las muestras con un número de integridad de ARN (RIN) > 7. De las muestras utilizadas para la extracción, todas mostraron un RIN con un valor de 10. De tal manera, se pudieron incluir todas en el posterior análisis.

La preparación de las muestras y la hibridación se realizó según el manual técnico de Agilent. El ADN complementario de la primera cadena (cDNA) se transcribió a partir de 200ng de ARN total, utilizando primers promotores de T7-

MATERIALES Y MÉTODOS

Oligo (dT). Las muestras se transcribieron *in vitro* y se marcaron con Cy-3 mediante el kit de marcaje Quick-AMP (Agilent Technologies). Después de una ronda adicional de limpieza (QIAGEN), el ARN complementario se fragmentó en piezas que varían entre 35 y 200 bases, como se confirmó con la tecnología Agilent 2100 Bioanalyzer. Para la siguiente hibridación en los cristales de microarray, se utilizaron 1,65 µg de ARN complementario fragmentado. Las muestras se dejaron hibridando a 65 ° C durante 17 horas, con rotación constante. Luego se lavaron las micromatrices en dos pasos de 1 minuto, en cada uno de los dos tampones de lavado (Agilent Technologies). Los microarray hibridados se escanearon en un escáner Axon 4100A (Molecular Devices) y los datos se extrajeron con el software GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices). Solo se incluyeron las muestras que incorporaron el fluoróforo con una actividad > 9.

11. Extracción de ARN, transcripción inversa y PCR a tiempo real

El ARN celular total fue aislado de las muestras de biopsia endometrial total en diferentes fases del ciclo menstrual (n=3 por fase) y de las muestras decidualizadas con protocolo largo en presencia de AG205 y P4BSA, para validar los resultados obtenidos tras el análisis de microarray de expresión (cuatro muestras empleadas en el array y tres muestras de biopsias diferentes). La extracción se llevó a cabo usando un RNeasy Mini Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la transcripción inversa a cDNA se utilizó 1µg de ARN total de cada muestra, utilizando el PrimeScript RT Kit (Clontech Laboratories).

La PCR en tiempo real (RT-qPCR) se realizó con el SYBR Green I fluorescente (LightCycler, Roche). Cada mezcla de reacción contenía FastSTART DNA Master SYBR Green I, MgCl₂ (3 mM), 10 mM de primer Forward y 10 mM de primer Reverse (Invitrogen), y 200 ng de cada muestra, que fue amplificada por triplicado durante 30 ciclos utilizando un instrumento BioRad iCycler. Los niveles relativos de expresión fueron determinados mediante el método $\Delta\Delta C_t$ y normalizados frente a la expresión génica de la β -actina (Livak KJ, 2001). En la Tabla 2 se presentan los

MATERIALES Y MÉTODOS

primers específicos para cada gen analizado por RT-qPCR.

Gen	Secuencia Fw	Secuencia Rv	Producto PCR (bp)
<u>PGRMC1</u>	5'-ATTTTCACGTCGCCGCTCA-3'	5'-CCCTGGATGCATCTCTTCCA-3'	298
<u>THBD</u>	5'-ACATCCTGGACGACGGTTTC-3'	5'-AGATGCCTATGAGCAAGCCC-3'	273
<u>SFRP1</u>	5'-AGTGTGACAAGTTCCCCGAG-3'	5'-ATCCTCAGTGCAAACCTCGCT-3'	166
<u>MAOB</u>	5'-AGCAACAAATGCGACGTGGT-3'	5'-CATGGTGGATCAGACGCTCA-3'	271
<u>TAGLN</u>	5'-AACAGCCTGTACCCTGATGG-3'	5'-GCCCATCATTCTTGCTCACT-3'	232

Tabla 2. Primers utilizados para amplificar por RT-qPCR cada gen analizado.

12. Clonaje de PGRMC1 en el vector PGEX6P-1

La secuencia de PGRMC1 humana (598 pb) fue amplificada mediante el MyTaq™ Mix 2X (Bioline), usando los siguientes primers, con los extremos 5' del Forward y del Reverse flanqueados por los sitios de restricción BamHI y EcoRI respectivamente: Forward 5'-GGATCCatggctgccgaggatgtggtg-3'; Reverse 5'-GAATTCatcattttccgggact-3'. El producto de PCR fue clonado en el vector pCR™4-TOPO® TA (Invitrogen) (Figura 12) de acuerdo con el protocolo del fabricante y el vector clonado se utilizó para transformar células competentes DH5α. Algunas colonias positivas fueron seleccionadas y secuenciadas.

La proteína de fusión glutatión S-transferasa (GST) se produjo fusionando la secuencia PGRMC1 a la GST en el vector de expresión pGEX6P-1 (Addgene, Cambridge, MA). Para construir el plásmido pGEX:PGRMC1, se aisló el fragmento de PGRMC1 de 598 pb a partir del vector pCR™4-TOPO® TA: PGRMC1, después de digerirlo con BamHI y EcoRI, y se insertó en el vector de expresión pGEX6P-1, previamente digerido también con los mismos sitios de restricción. Primero se procedió con la digestión del enzima BamHI (6 µg o 5 µg de vector, para pCR™ 4-

MATERIALES Y MÉTODOS

TOPO® TA:PGRMC1 y pGEX6P-1, respectivamente) a 37°C durante 1 hora, confirmando mediante electroforesis en gel de agarosa.

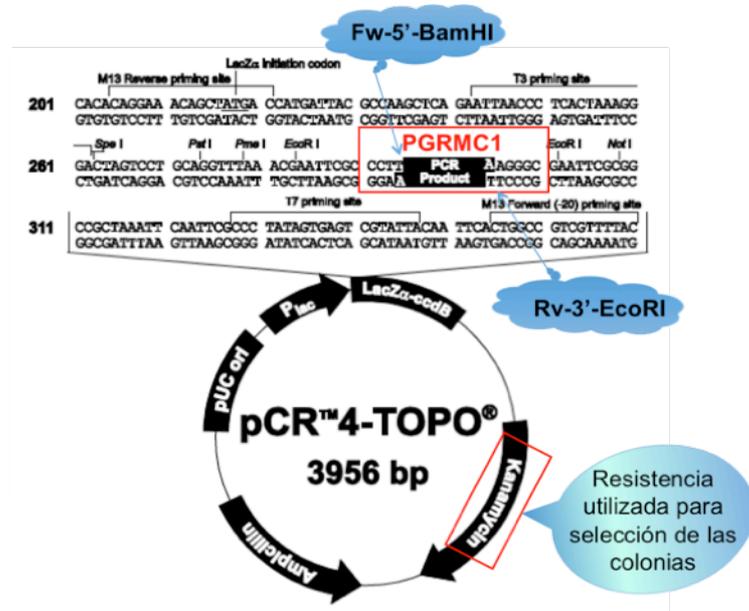


Figura 12. Estructura del Vector pCR™ 4-TOPO® TA utilizado para el clonaje de PGRMC1. El sitio de inserción del producto de PCR de PGRMC1 está señalado en rojo. En sus extremos 5' y 3' están representados los sitios de restricción contenidos en los primers utilizados para el diseño de los mismos, para la ampliación previa del producto. Entre las dos resistencias se eligió la

Para evitar la auto-circularización del vector, los grupos 5'-fosfato de los ADN plasmídicos fueron eliminados añadiendo fosfatasa alcalina (CIP, Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal, New England Biolabs) en la reacción de digestión con BamHI.

Los productos de la mezcla de digestión se purificaron con el QIAquick PCR purification Kit (Qiagen) y se utilizaron para la segunda digestión con EcoRI, a 37°C durante 1 hora. Los productos de digestión se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Después se procedió a cortar y purificar, mediante el mi-Gel Extraction kit (Metabion, Alemania) las bandas del inserto, aislado a partir del vector pCR™ 4-TOPO® TA:PGRMC1 digerido, y del vector pGEX6P-1 (Figura 13).

Tras ello, el inserto de PGRMC1 y el vector se unieron mediante reacción de ligación, con un ratio vector : inserto de 1:3 (50 ng de vector) a 22°C durante toda la noche.

MATERIALES Y MÉTODOS

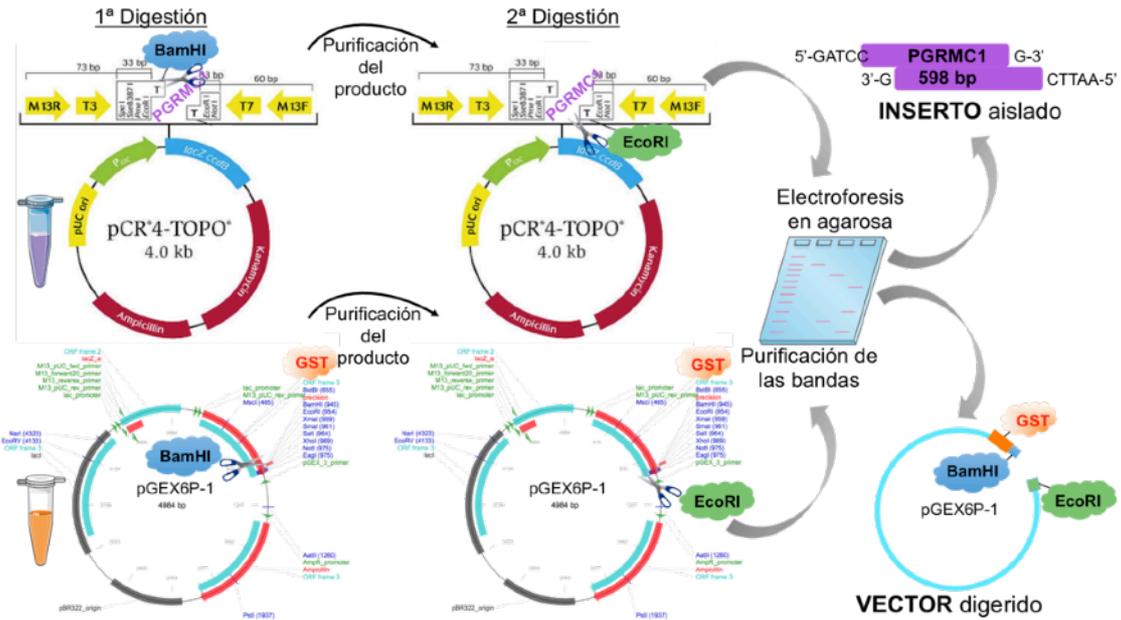


Figura 13. Digestión mediante enzimas de restricción de los vectores pCR[™]4-TOPO® TA: PGRMC1 (donante del inserto) y pGEX6P-1 (vector recipiente).

Con el producto de ligación, se transformaron células DH5 α competentes y luego se seleccionaron 20 colonias para ejecutar una PCR de screening. Mediante miniprep se aisló el ADN plasmídico de algunas colonias positivas y se confirmó la secuencia entera de PGRMC1 mediante secuenciación (Figura 14).

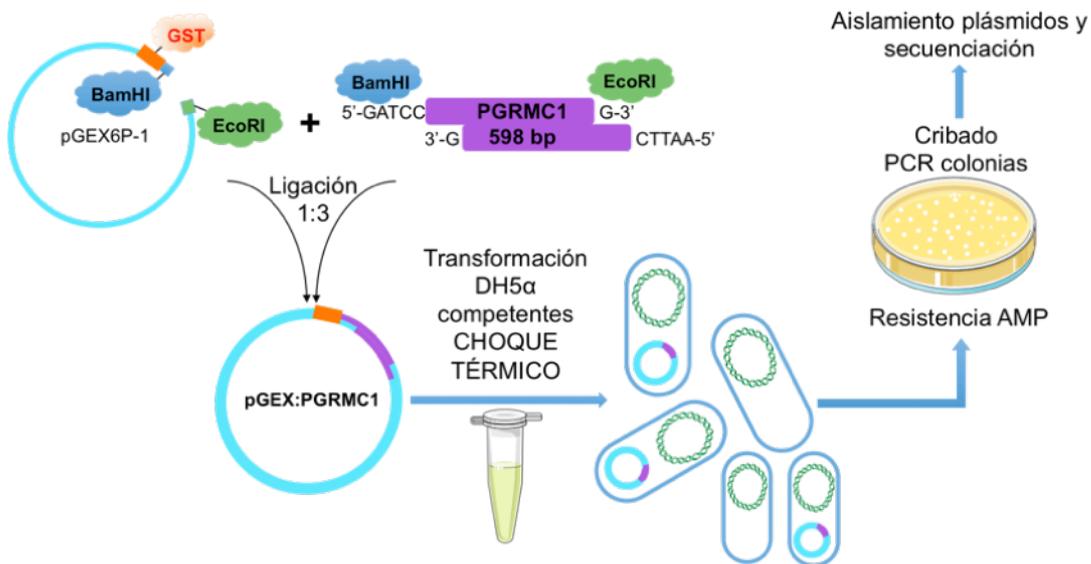


Figura 14. Esquema de ligación del vector pGEX6P-1 con el inserto PGRMC1 y transformación bacteriana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para comprobar la región relativa a la secuencia de la GST se utilizaron los siguientes cebadores (primers): Forward 5'- GCACTCCCGTTCTGGATAATG-3' y Forward 5'- GAGCGTGCAGAGATTTCAATG-3'. Mientras para comprobar la secuencia completa de PGRMC1 se utilizaron los siguientes primers: Forward 5'- GCAGGGCTGGCAAGCCACG-3' y Reverse 5'-GCTTGTCTGTAAGCGGATGC-3'.

13. Expresión y purificación de la proteína GST y proteína de fusión para ensayos de Pull-down

Para la expresión de las proteínas PGRMC1-GST (GST en el extremo N-terminal) etiquetada y GST, se transformaron células competentes BL21 de *E. coli* mediante los vectores de expresión, pGEX:PGRMC1 o pGEX (control negativo) para la GST, se cultivaron en medio LB complementado con ampicilina durante toda la noche a 37°C en agitación. Las proteínas GST se expresaron según la siguiente descripción. Las células BL21 fueron inducidas para expresar proteínas GST mediante 0.3 mM/l de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), durante 2 horas a 37°C. Después, las células se recogieron por centrifugación a 6.000 g durante 20 minutos a 4°C.

Para la inmovilización de las proteínas GST, se resuspendieron los pellets celulares BL21 en 20 ml de TBS 1X, suplementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa (Roche). Mediante un homogeneizador de alta presión (GEA Niro Soavi Panda PLUS 2000) se llevó a cabo la lisis bacteriana. Todos los pasos se ejecutaron manteniendo las muestras en frío. El material insoluble se eliminó por centrifugación a 18,000 g, durante 30 minutos a 4°C y los extractos proteicos solubles se recogieron e incubaron durante toda la noche a 4°C con resina de Sefarosa Glutación (GE Healthcare), preequilibrada con TBS1X. La resina se lavó cuatro veces con 50 ml de TBS1X y tres veces con 1 ml de TBS1X a 1000 rpm, durante 5 minutos a 4°C, para eliminar las proteínas no unidas a nuestra proteína de interés.

MATERIALES Y MÉTODOS

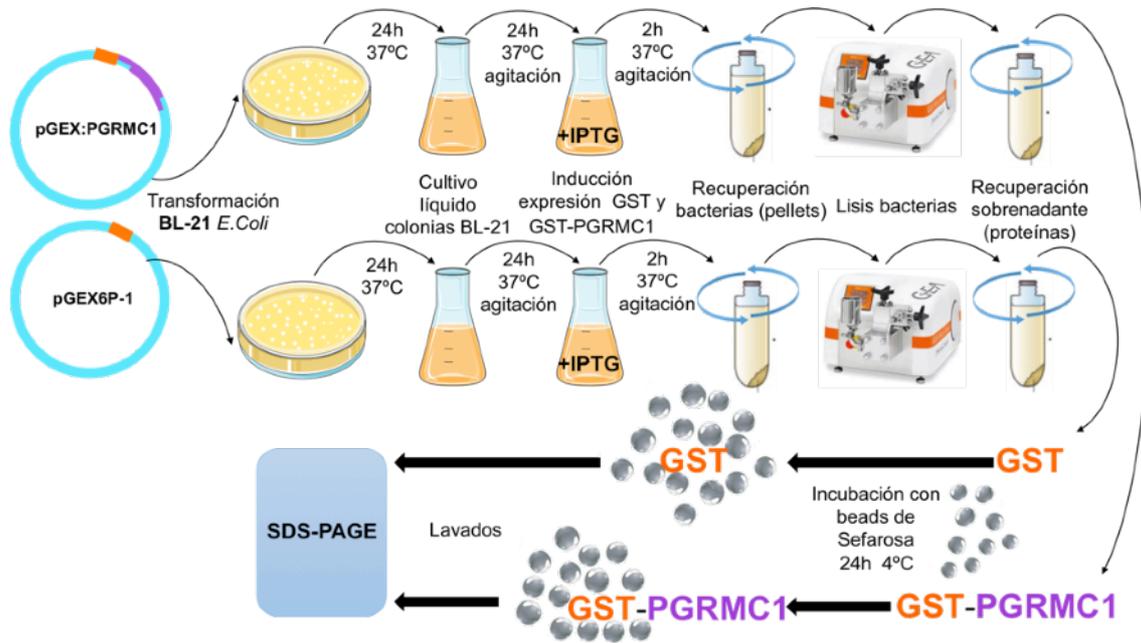


Figura 15. Esquema inducción de la expresión y purificación de la proteína GST y proteína de fusión.

La pureza y la cantidad de proteína se calculó comparando frente a patrones de BSA mediante separación por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida teñida con Coomassie (SDS-PAGE) (Figura 15). El gel y el western blot correspondientes se muestran en la Figura 16.

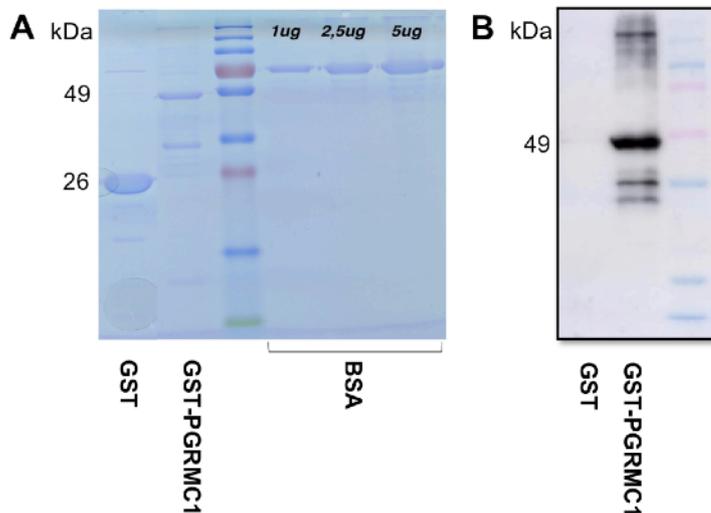


Figura 16. Chequeo de la expresión de las proteínas GST y GST-PGRMC1. Tinción de comassie enseñando tamaño y cantidad de las respectivas proteínas (GST, 26 kDa; GST-PGRMC1, 49 kDa) (A). Las muestras utilizadas para el siguiente pulldown fueron previamente analizadas también por western blot como indicado (B).

14. Preparación de los lisados ESC y ensayos de pulldown PGRMC1-GST

Con el fin de descubrir nuevas interacciones de PGRMC1 e identificar si hubiera alguna interacción proteína-proteína diferente durante el proceso de decidualización en las ESC, hemos realizado un ensayo de *Pull-down* en ndESC y dESC. Además, para ver si los diferentes protocolos de decidualización *in vitro* generan alguna diferencia en dichas interacciones, hemos utilizado muestras en las que se ha inducido decidualización *in vitro* con protocolo largo (P4/E2) y corto (cAMP/MPA) (Figura 17).

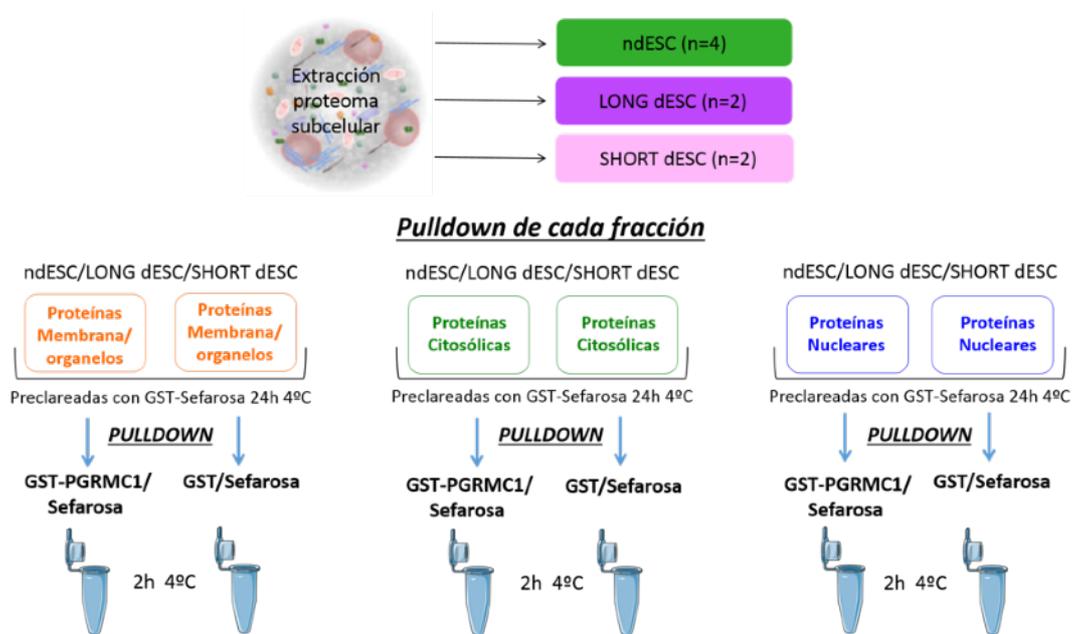


Figura 17. Esquema ensayo Pull-down.

Gracias al kit de extracción de proteoma subcelular ProteoExtract (Calbiochem, VWR International Ltd.) se extrajeron las fracciones proteicas del citosol, membrana/orgánulos y núcleo a partir de ndESC y dESC obtenidas tras los protocolos de decidualización largo (LONG) y corto (SHORT) (n = 2 por protocolo).

Los ensayos de GST-pulldown se realizaron como se describe a continuación. Primero, cada fracción proteica específica se incubó con la proteína GST sola, inmovilizada sobre resina de sefarosa a 4°C durante toda la noche, para realizar un pre-aclarado. A continuación, se recuperaron los lisados mediante

MATERIALES Y MÉTODOS

centrifugación e incubaron con la proteína GST-PGRMC1 o GST (control negativo) para continuar con el ensayo de Pull-down durante 2 horas a 4°C (Figura 17). Las resinas de GST-PGRMC1-Sefarosa o GST-Sefarosa se lavaron cuatro veces con TBS1X a 1000 rpm, durante 5 minutos a 4°C. Las muestras del último lavado se recuperaron para ser almacenadas a -20°C, hasta el análisis de espectrometría de masas.

15. Cuantificación de proteínas en los experimentos de Pull-down y digestión en gel concentrante

La cuantificación de proteínas de las muestras de *Pull-down* (1/10 de cada fracción) se realizó mediante electroforesis SDS-PAGE. La resina con las proteínas unidas se mezcló con tampón de carga SDS-PAGE (en un volumen de hasta 50 µl), se desnaturalizaron calentando a 100°C durante 5 minutos, y se cargaron en geles de poliacrilamida (10% gel separador/4% gel concentrador), con un grosor de 0,75 mm. Después de la electroforesis, el gel se tiñó con Coomassie coloidal (GelCode™ Blue Stain Reagent, ThermoFisher) para la visualización y cuantificación de las proteínas, tomando como referencia los estándares de peso molecular (Broad-Range SDS-PAGE Standards, BioRad).

Para el análisis del proteoma de interacción, los 9/10 restantes de las muestras de *Pull-down* se resuspendieron en un volumen de 100 µl de tampón de carga SDS-PAGE, se desnaturalizaron a 100°C durante 5 minutos y luego se cargaron en pocillos de 1,2 cm de ancho en un gel SDS-PAGE con la misma composición que el descrito anteriormente. Una vez que el frente de electroforesis entró en el gel separador 3mm se paró la electroforesis, de modo que todo el proteoma quedó concentrado en la interfaz del gel concentrador/separador.

Las bandas conteniendo el proteoma concentrado correspondientes a núcleo, citoplasma y membrana de las 3 condiciones experimentales (control, Long, Short), tanto para la construcción GST-PGRMC1 como para la GST, se visualizaron tras tinción con Coomassie, se recortaron en cubos de 2 x 2 mm (Figura 18) y se colocaron en tubos de microcentrífuga de 0,5 ml (Moreno, M.L., 2014) para ser digeridas por separado.

MATERIALES Y MÉTODOS

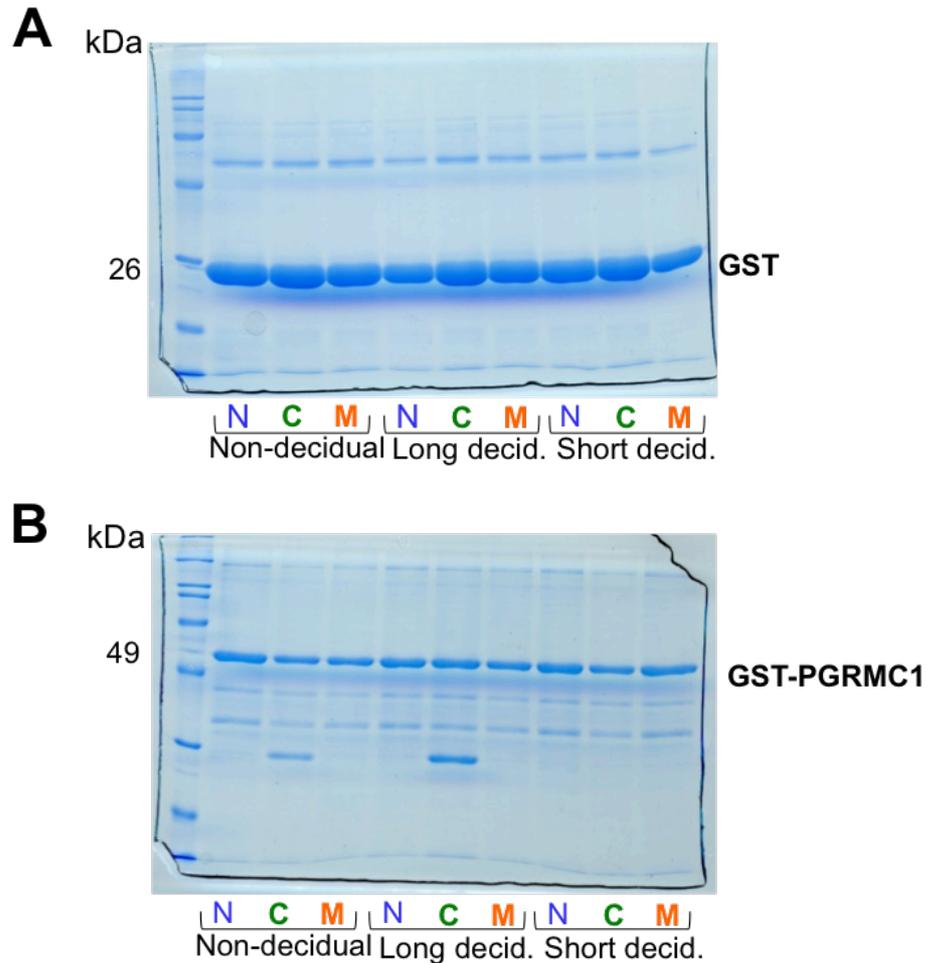


Figura 18. Tinción comassie de las muestras pulldown previas al análisis por espectrometría de masas.

Las piezas de gel fueron desteñidas en acetonitrilo:agua (ACN: H₂O, 1: 1), reducidas, alquiladas (los enlaces disulfuro de los residuos de cisteína fueron reducidos con DTT 10 mM durante 1 hora a 56°C, y luego los grupos tiol libres se alquilaron con yodoacetamida 50mM durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad) y digeridas in situ con tripsina grado de secuenciación (Promega, Madison, WI) como lo describen Shevchenko et al. (Shevchenko, A 1996) con algunas modificaciones menores. A continuación, las piezas de gel fueron deshidratadas usando acetonitrilo (ACN). El acetonitrilo se retiró y las piezas de gel se secaron totalmente en un *Speedvac*. Las piezas de gel secas se rehidrataron de nuevo en bicarbonato de amonio 50 mM, pH 8.8, conteniendo tripsina (60 ng/μl) a una ratio 5:1 proteína:tripsina (w/w). Los tubos se mantuvieron en hielo durante 2 horas y, posteriormente, se incubaron a 37°C, durante 12 horas. La digestión se

interrumpió mediante la adición de TFA (ácido trifluoroacético) al 1%. Los sobrenadantes se secaron y se desalaron mediante OMIX C18 (Agilent Technologies), para almacenarse a -80°C hasta su análisis mediante espectrometría de masas.

16. Análisis del los experimentos de Pull-down mediante cromatografía líquida en fase reversa acoplada a espectrometría de masas en tándem (RP-LC-MS/MS)

Los péptidos obtenidos tras las digestiones ya desalados se secaron, se resuspendieron en 10 µl de ácido fórmico al 0,1% y se analizaron mediante cromatografía líquida en fase reversa acoplada a espectrometría de masas (RP-LC-MS/MS), en un sistema Easy-nLC II acoplado a un espectrómetro de masas híbrido LTQ-Orbitrap-Velos-Pro (Thermo Scientific).

Con el fin de simplificar el número de muestras a analizar, se mezclaron los digeridos de las distintas fracciones (citosol, membrana/orgánulos y núcleo) para cada condición, no decidual y decidual, tanto para los *Pull-down* con GST cómo para los *Pull-down* con GST-PGRMC1. Se pincharon un total de 1,5µg (0,5 µg núcleo+0,5 µg citoplasma+0,5 µg membrana/orgánulos) de proteoma digerido realizando dos réplicas técnicas por muestra. Los péptidos se concentraron (en línea) mediante cromatografía de fase reversa usando una precolumna C18 RP de 0,1 mm x 20 mm (Thermo Scientific) para luego separarse usando una columna C18 RP de 0,075 mm x 250 mm (Thermo Scientific), con un flujo de 0,3 µl / min. Los péptidos se eluyeron empleando un gradiente en dos etapas de 100 minutos de duración: de 5 a 25% de disolvente B durante 68 minutos, seguido de un gradiente de 25 a 40% de disolvente B durante 90 minutos (Disolvente A: ácido fórmico al 0,1% en agua, disolvente B: Ácido fórmico al 0,1%, acetonitrilo al 80% en agua). La ESI (ionización mediante electrospray) se realizó utilizando una interfaz de acero inoxidable con un diámetro interno de 30 µm (Proxeon) (Ruth Alonso 2015).

Los péptidos se detectaron en espectros de barrido completo de 400 a 1600 uma (unidad de masa atómica) (1 µscan), seguidos por 15 espectros de fragmentación (MS/MS) dependientes de datos, empleando un ancho de

MATERIALES Y MÉTODOS

aislamiento de 2u (en unidades de ratio masa-carga), una energía de colisión normalizada del 35% y una exclusión dinámica aplicada durante periodos de 30 segundos. La identificación y cuantificación de los péptidos, a partir de los datos sin procesar, se llevó a cabo utilizando el software PEAKS Studio 8.5 (Bioinformatics Solutions Inc.) (Zhang J 2012, Han X 2011, Yonghua Han 2004). La búsqueda en la base de datos se realizó frente a uniprot-homo sapiens.fasta (*decoy-fusion database*).

Para las búsquedas, se aplicaron los siguientes parámetros: corte tríptico después de Arg y Lys, hasta dos sitios de corte omitidos, tolerancia de 20 ppm para iones precursores y 0,6 Da para fragmentos MS/MS. Las búsquedas se han realizado permitiendo la oxidación opcional de Met y la carbamidometilación de Cys.

La tasa de falsos positivos (False Discovery Rate, FDR), para los espectros de fragmentación de los péptidos (PSM), se limitó a 0,01. Sólo aquellas proteínas con al menos dos péptidos distintos identificados a partir de los análisis de LC-MS/MS se consideraron identificadas de forma fiable. En el análisis de cuantificación relativa, las proteínas con un valor de significancia ≥ 13 fueron seleccionadas y consideradas estadísticamente significativas.

17. Validación de interacciones por inmunofluorescencia y Co-inmunoprecipitación (Co-IP)

Los resultados obtenidos tras los experimentos de *Pull-down* seguidos por espectrometría de masas fueron validados mediante estudios de colocalización por inmunofluorescencia de PGRMC1 y de las proteínas seleccionadas mediante ensayos de Co-inmunoprecipitación (Co-IP). Para ambas estrategias, solo fueron validadas las interacciones en células decidualizadas mediante el protocolo corto.

La inmunoprecipitación se realizó utilizando el kit Pierce™Crosslink IP (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, 20µl de resina de agarosa A/G (Pierce Protein A/G Plus Agarose) se añadieron a una columna del kit (Pierce Spin column), se centrifugó a 1000 x g por 1 minuto y se lavó dos veces con un tampón de acoplamiento 1X (Coupling Buffer 20X del kit,

MATERIALES Y MÉTODOS

fosfato de sodio 0.01 M, NaCl 0.15 M, pH 7.2). Después, 10 µg de Anticuerpo (Ab) (MAOB, BAP31) se ajustaron a 100µl de tampón de acoplamiento 1X, fueron añadidos a la columna y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente, dejando la columna en rotación. La columna se lavó 3 veces con el tampón de acoplamiento 1X, antes de proceder con el entrecruzamiento (crosslinking) del anticuerpo. Para ello, el anticuerpo contenido en la columna se incubó en rotación con el reactivo de entrecruzamiento DSS (Disuccinimidil suberato) durante 60 minutos y se lavó con tampón de elución (pH 2,8, del kit).

Las proteínas de dESC decidualizadas con protocolo corto, fueron extraídas utilizando el tampón de lisis del kit (Tris 0.025 M, NaCl 0.15M, EDTA 0.001M, NP-40 1%, glicerol 5%; pH 7.4), en presencia de inhibidores de fosfatasas y proteasas. El lisado total fue preclareado con Resina de Agarosa Control del kit (80µl de resina para cada mg de lisado) incubándolo a 4°C en rotación en otra columna durante una hora. Después de centrifugar 1 minuto a 1000 x g, finalmente 1mg de lisado pre-clareado fue incubado en rotación con el anticuerpo inmovilizado a 4°C durante dos horas.

Las columnas se lavaron tres veces con tampón de lavado del kit (Tris 0.025 M, NaCl 0.15M, EDTA 0.001M, NP-40 1%, glicerol 5%; pH 7.4) y una vez con el tampón de acoplamiento 1X. Los antígenos unidos se eluyeron en 40µl de tampón de elución y se analizaron por western blot.

Para los estudios de co-localización de las proteínas seleccionadas, a fin de validar sus interacciones con PGRMC1, hemos seguido el mismo protocolo de inmunocitofluorescencia descrito previamente en el apartado 6. Las células fijadas (ndESC y dESC) fueron incubadas con el anticuerpo primario de BAP31 (2µg/ml; Novus) o MAOB (µg/ml; Abnova) durante toda la noche a 4°C en agitación. A continuación, fueron lavadas, incubadas con los anticuerpos secundarios AlexaFluor 568 anti-conejo de cabra (1:500) y anti-ratón de cabra (1:500) durante una hora a temperatura ambiente.

Después de lavar tres veces con PBS-T, las células fueron incubadas nuevamente con el anticuerpo primario de PGRMC1 (0.5µg) durante toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente se procedió con los lavados y la incubación con el anticuerpo secundario AlexaFluor 488 anti-cabra (1:1.000) durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con PBS-T, los núcleos celulares

MATERIALES Y MÉTODOS

se contratiñeron con el medio de montaje ProLong Diamond Antifade con 4',6-Diamino-2-Fenilindol (DAPI) (Molecular Probes, Life Technologies). Los controles negativos fueron preparados para cada muestra siguiendo el mismo procedimiento de tinción en ausencia de los anticuerpos primarios. Los cristales fueron analizados con un Microscopio a fluorescencia (ZEISS AX10 Vert.A1).

18. Análisis estadístico

Para calcular los valores P de dos colas y con el fin de analizar las diferencias intergrupales globales, se empleó un T-test Student. Se han considerado como estadísticamente significativos los valores P de 0.05 o menos. Los resultados promedios de experimentos múltiples, se presentan como la media aritmética +/- desviación estándar (SD). Para estudiar los cambios de ARNm a lo largo del ciclo menstrual hemos realizado un análisis de varianza de una vía (ANOVA).

El análisis de expresión génica diferencial de todas las comparaciones se llevó a cabo utilizando un T-test Student. Con el fin de minimizar la cantidad de falsos positivos, los valores P fueron corregidos utilizamos los procedimientos convencionales de corrección de múltiples pruebas propuestos por Benjamini Hochberg (FDR).

RESULTADOS

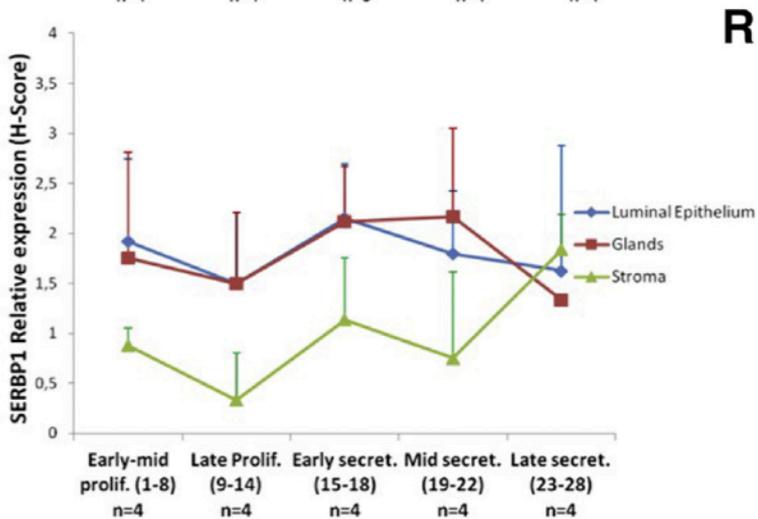
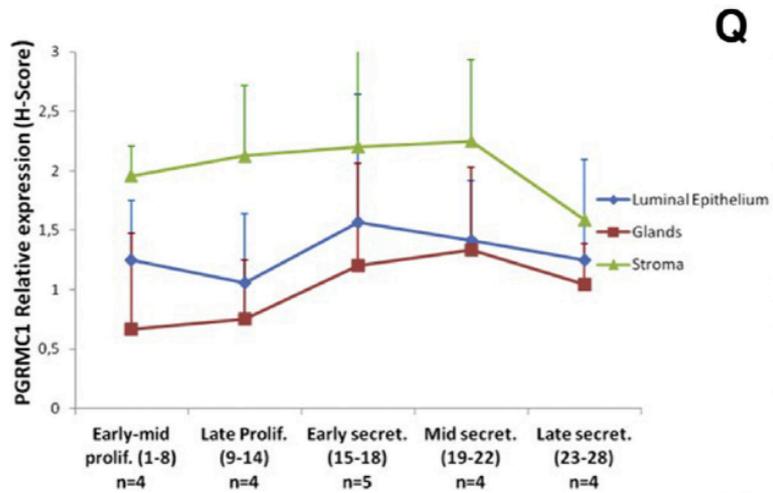
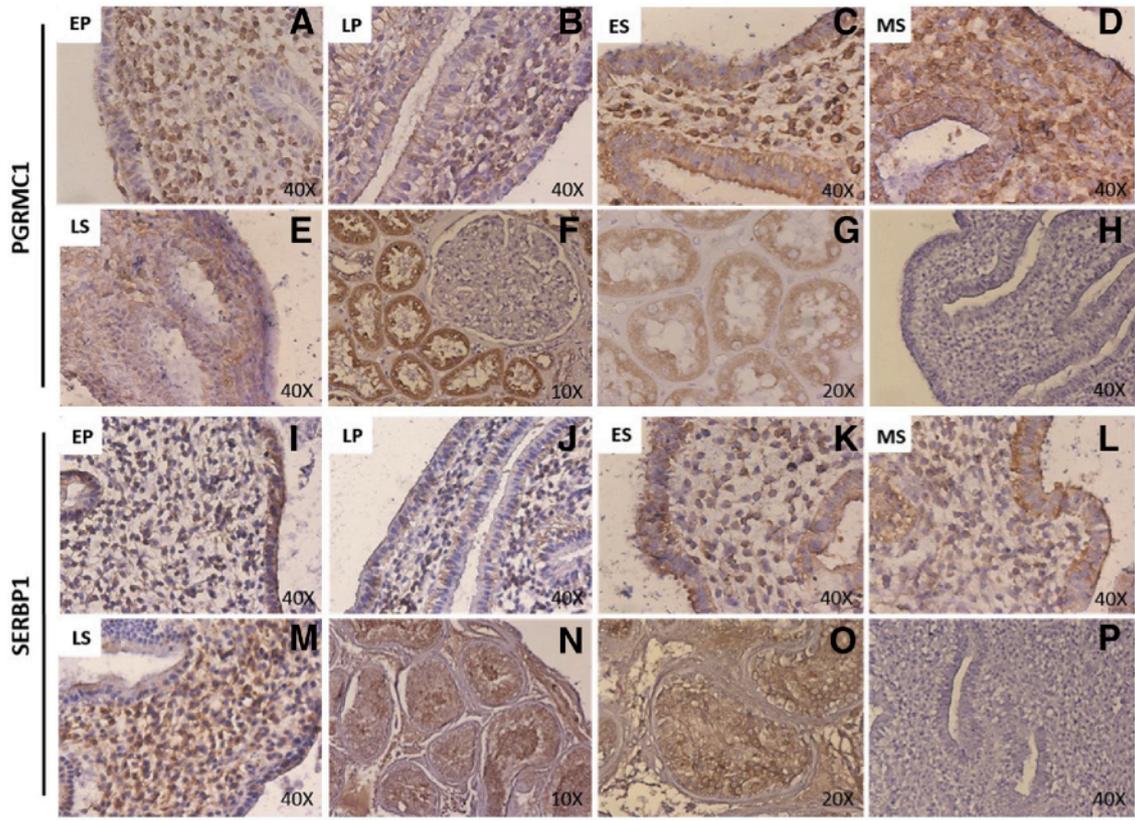
1. Inmunolocalización y expresión de ARNm de PGRMC1 y SERBP1 en el endometrio humano durante el ciclo menstrual

De acuerdo con nuestros resultados previos que mostraron una diferente expresión de la proteína durante el ciclo menstrual, procedimos a la localización de PGRMC1 y de su proteína putativa asociada, SERBP1, en muestras de endometrio humano de distintas fases del ciclo menstrual (Figura 19). En cada una de las fases analizadas, PGRMC1 mostró una mayor abundancia en el compartimento estromal endometrial en comparación con el compartimento glandular y epitelio luminal. Además, observamos una expresión moderada que pareció ser constante durante todo el ciclo menstrual en el compartimento del estroma (Figura 19A-1D y 19Q), excepto en la fase secretora tardía donde la señal se detectó disminuida (Figura 19E y 19Q). La proteína PGRMC1 mostró una señal creciente de forma gradual durante la fase proliferativa (proliferative phase) y desde la fase secretora temprana (early secretory phase) hasta la media (midsecretory phase) en las glándulas y en el epitelio luminal (Figura 19A-D y 19Q). Sin embargo, se observó una disminución en la fase secretora tardía en todos los compartimentos endometriales (Figura 19E y 19Q).

Por otro lado, SERBP1 mostró una menor expresión en el compartimento estromal en comparación con el compartimento glandular y epitelio luminal (Figura 19L y 19R). En contraste con la expresión de PGRMC1, la señal de la proteína SERBP1 se observó aumentada de forma gradual a lo largo de todo el ciclo menstrual y logró un máximo nivel de expresión en la fase secretora tardía en el estroma (Figura 19M y 19R). La tinción pareció ser equivalente en el epitelio glandular y luminal durante todo el ciclo, aunque resultó disminuir en la fase secretora tardía (late secretory phase) en el epitelio glandular (Figura 19M y 19R).

Las señales de tinción de inmunohistoquímica de las muestras de biopsias endometriales humanas embebidas en parafina (n = 4-5 por día de ciclo), fueron evaluadas según una puntuación H (H-score), por tres observadores independientes, clasificándolas como 0 (ausente), 1 (señal débil), 2 (señal fuerte) o 3 (señal muy fuerte). Los resultados se presentaron como la media aritmética (SD) en el gráfico de la Figura 19 (Figura 19Q y 19R).

RESULTADOS



RESULTADOS

Figura 19. Inmunolocalización *in vivo* de PGRMC1 y SERBP1 en el endometrio humano a lo largo del ciclo menstrual. Inmunotinción para PGRMC1 (A-E) y SERBP1 (I-M) en cortes de endometrios humanos en diferentes fases del ciclo menstrual. Tejidos de control positivo (riñón y testículo, para PGRMC1 y SERBP1 respectivamente; F-G; N-O) y controles negativos (H, P). Se detectaron en el caso de PGRMC1 tinciones fuertes en el riñón (control positivo) (F, G) y en el caso de SERBP1 en el testículo (N, O), con ausencia de señal en los respectivos controles negativos (H, P). Resultados de la puntuación H (H-score) representados como media aritmética de la expresión de PGRMC1 (Q) y SERBP1 (R) en las biopsias endometriales durante el ciclo menstrual. EP = fase proliferativa temprana; ES = fase secretora temprana; LP=fase proliferativa tardía; LS = fase secretora tardía; MS = fase secretora mediana

A continuación, cuantificamos por PCR en tiempo real (Real Time PCR) la expresión de ARNm de ambas proteínas, en otras biopsias endometriales igualmente recogidas en distintas fases del ciclo menstrual (Figura 20A y 20B). Se observó una disminución significativa de la expresión del ARNm de PGRMC1 (* $P < 0.05$) en la fase secretora tardía (late secretory phase) en comparación con la fase proliferativa temprana (early secretory phase) (Figura 20A). Por otro lado, la expresión del ARNm de SERBP1 alcanzó su punto máximo alrededor de la fase proliferativa temprana (early proliferative phase) y secretora temprana (early secretory phase) (Figura 20B). Además, su expresión en la fase proliferativa tardía (late proliferative phase) fue reducida de forma estadísticamente significativa (** $P < 0.01$) en comparación con la fase proliferativa temprana (early proliferative phase) (Figura 20B). Cada fase del ciclo en el histograma es el resultado de la media de la expresión de PGRMC1 y SERBP1 \pm DE de tres biopsias distintas en diferentes días de ciclo.

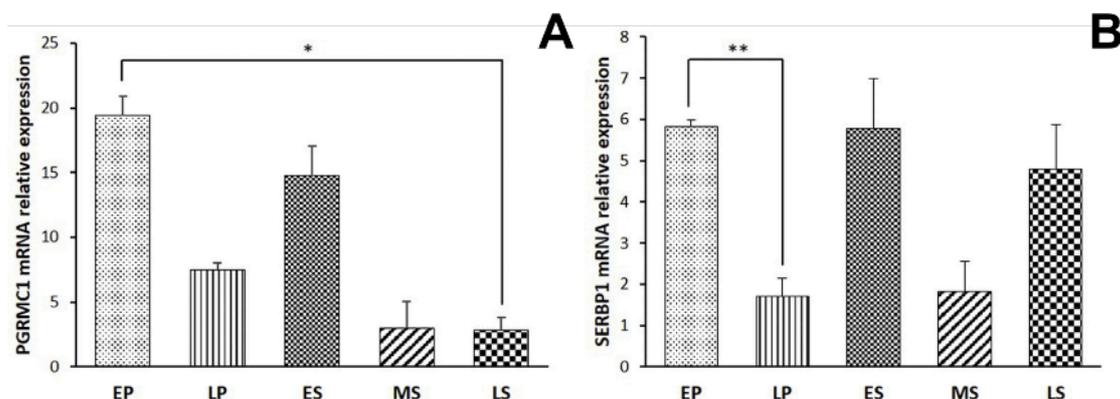


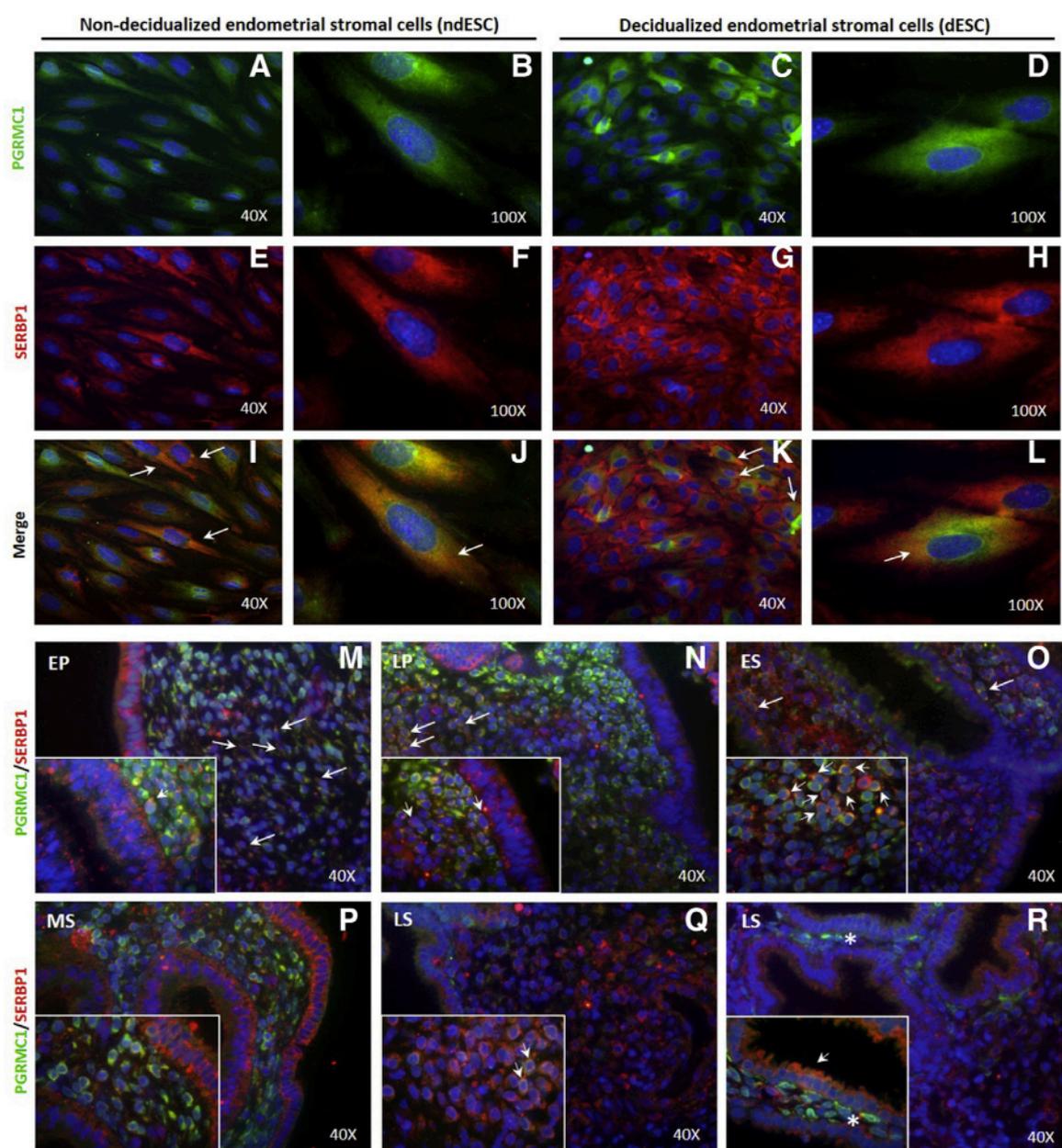
Figura 20. Cuantificación del ARN mensajero (ARNm) de PGRMC1 y SERBP1 en muestras de endometrio humano a lo largo del ciclo menstrual. Diferencias significativas han sido encontradas entre las fases proliferativa temprana (EP) y secretora tardía (LS) en los niveles de

RESULTADOS

ARNm de PGRMC1 (A), y entre la fase proliferativa temprana (EP) y tardía (LP) en los niveles de ARNm de SERBP1 (B) (* P <.05, ** P <.01).

2. Co-localización de PGRMC1 y SERBP1 en ESC y Tejido endometrial humano

Con el fin de corroborar la interacción putativa de PGRMC1 y SERBP1 en las células estromales endometriales (ESC), se realizó una doble detección de inmunofluorescencia para colocalizar ambas proteínas *in vitro* en estas células (Figura 21).



RESULTADOS

Figura 21. Colocalización de PGRMC1 y SERBP1 en células estromales endometriales no decidualizadas y decidualizadas (ndESC / dESC) (A-L) y en endometrio humano durante el ciclo menstrual (M-R). Las señales de PGRMC1 (verde) y SERBP1 (rojo) se colocalizaron *in vitro* en el citoplasma y en la región perinuclear de ndESC (I, J) y dESC (K, L), como se indica mediante las flechas (I, K) y se muestra a aumento 100X (J, L). (M-R) En el análisis de colocalización *in vivo* en tejido endometrial humano a lo largo del ciclo menstrual, la tinción no fue homogénea entre las ESC. Una fuerte señal de colocalización para PGRMC1 y SERBP1 se observó en las fases proliferativa temprana (M), proliferativa tardía (N) y secretora temprana (O), como se indica mediante flechas. Se observó una fuerte tinción para PGRMC1 en el estroma de la fase secretora media (P), aunque pocas células mostraron colocalización. Al contrario, la señal de PGRMC1 disminuyó fuertemente en la fase secretora tardía en el estroma (Q), aunque se detectó una señal elevada en las regiones periglandulares (R), como se indica por el asterisco. Se observó una superposición de las señales PGRMC1 y SERBP1 también en el epitelio glandular de la fase secretora tardía (R). Las imágenes de los recuadros pequeños en M-R se tomaron a un aumento 60X. (EP= proliferativa temprana; ES= secretora temprana; LP= proliferativa tardía; LS = secretor tardío; MS=secretora media).

PGRMC1 y SERBP1 mostraron una clara colocalización en el citoplasma de células estromales no decidualizadas (ndESC) (Fig. 21I y 21J) y decidualizadas (dESC) (Fig. 21K y 21L).

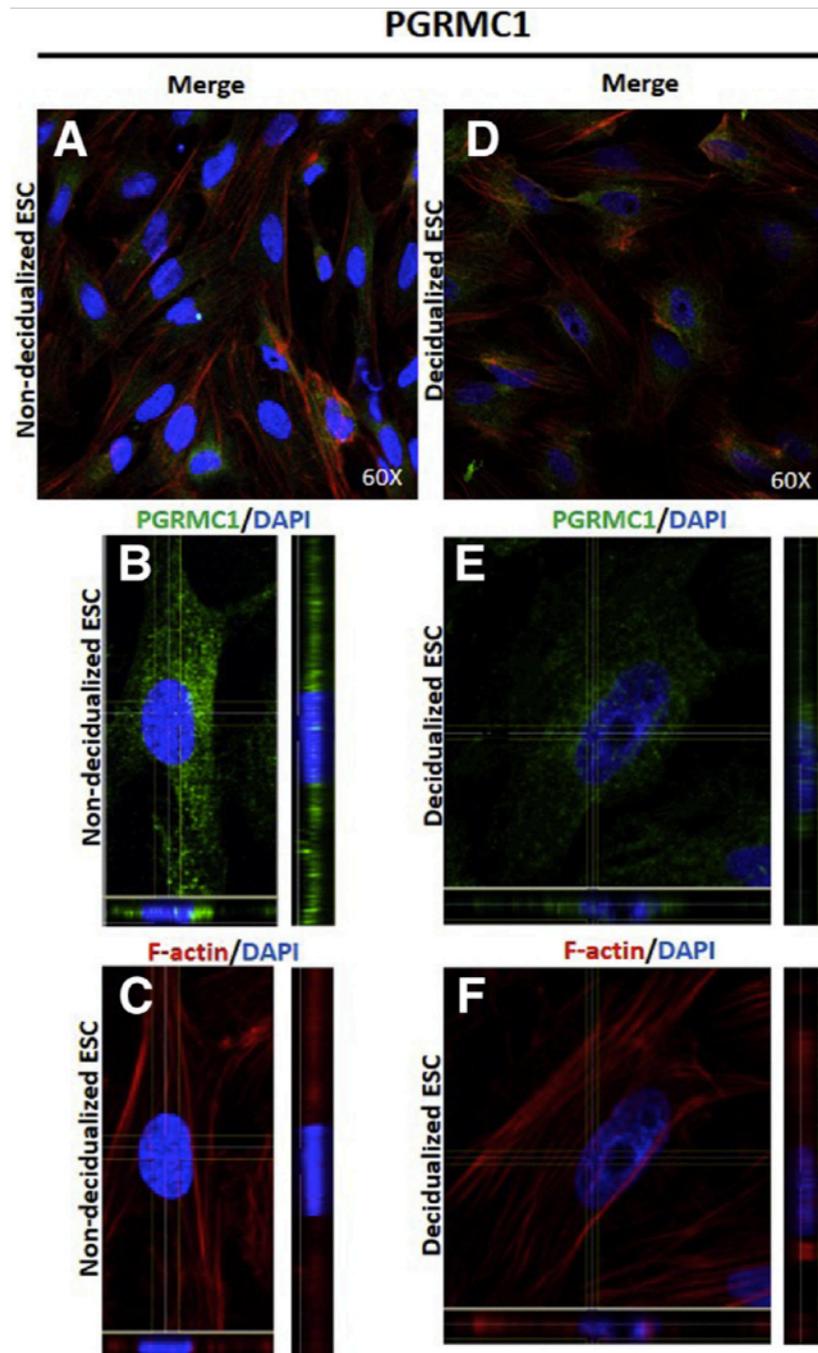
Además, dicha colocalización de ambas proteínas en el compartimiento estromal fue confirmado también *in vivo*, a lo largo del ciclo menstrual (Fig. 21M-Q). Curiosamente, no todas las células mostraron una colocalización de ambas proteínas. La colocalización de PGRMC1-SERBP1 se detectó principalmente en las fase proliferativa y secretora temprana (Fig. 21M-O). Una disminución de la señal de PGRMC1 se encontró nuevamente en el estroma de la fase secretora tardía (Figura 21Q), aunque una fuerte señal de PGRMC1 se detectó dentro de las regiones periglandulares (Figura 21R). Una superposición de las señales correspondientes a PGRMC1 y SERBP1 se observó, además, en el epitelio glandular durante la fase secretora tardía (Figura 21R).

3. La proteína PGRMC1 cambia su localización en ESC durante el proceso decidualización *in vitro*

Para evaluar si la localización de PGRMC1 cambia durante el proceso de decidualización, inducimos la decidualización *in vitro* de ESC primarias y realizamos una tinción mediante inmunofluorescencia para visualizar su localización. Como se muestra en la Figura 20, PGRMC1 se localizó en la membrana

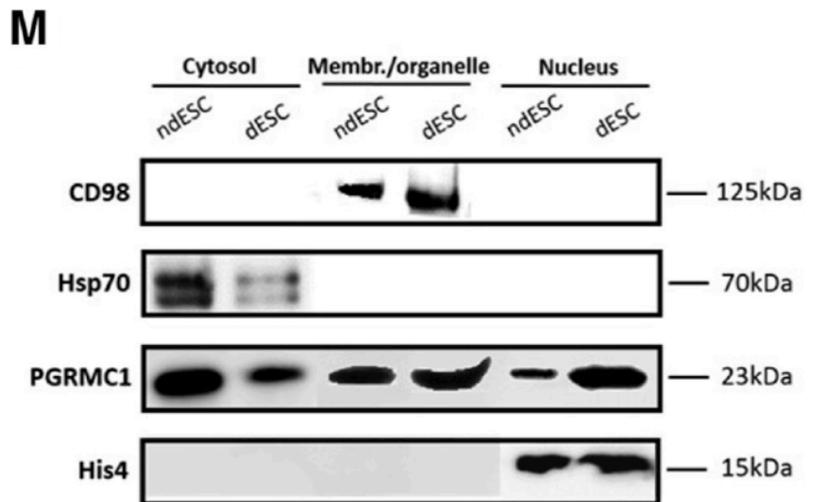
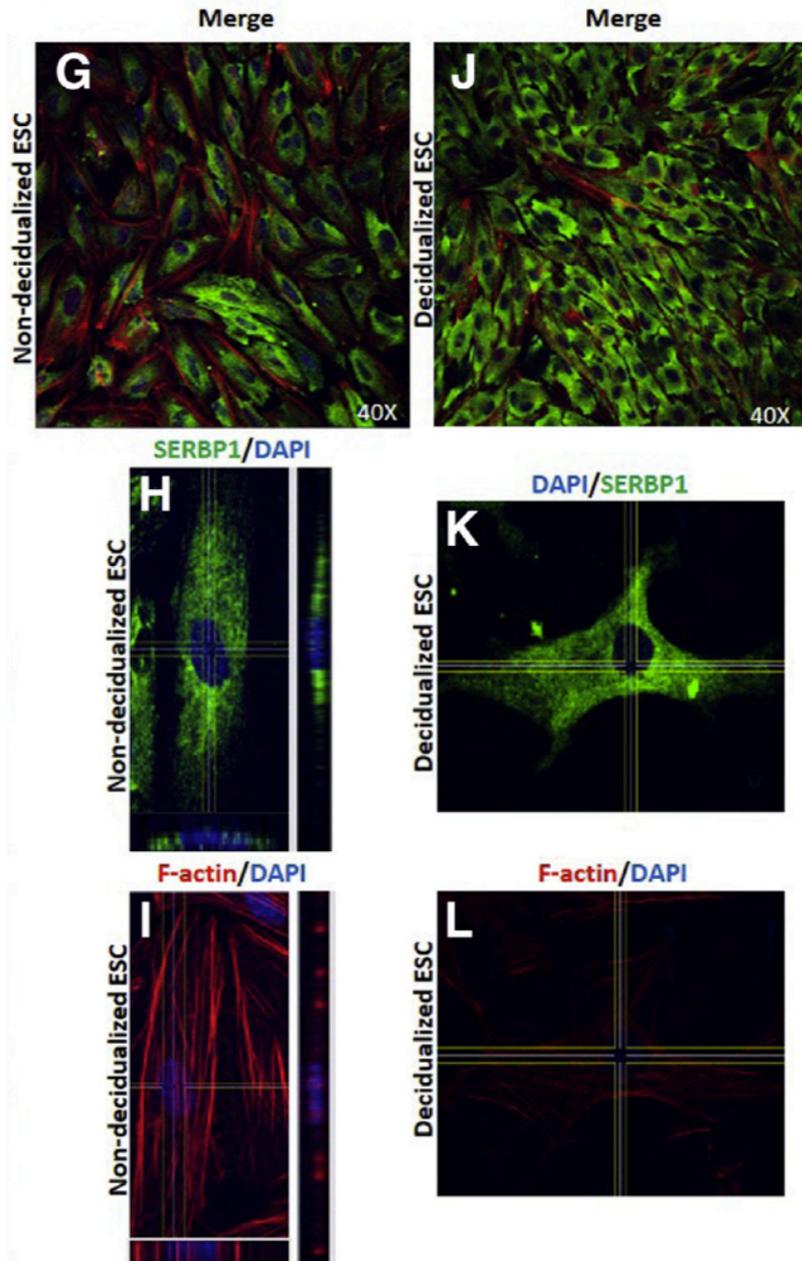
RESULTADOS

y en el citoplasma de las células estromales no decidualizadas (ndESC) (Figura 22A-C), mientras que en las células estromales decidualizadas (dESC), PGRMC1 pareció concentrarse cerca o en el núcleo, mostrando una expresión predominantemente a nivel nuclear y perinuclear (Figura 22D-F).



RESULTADOS

SERBP1



RESULTADOS

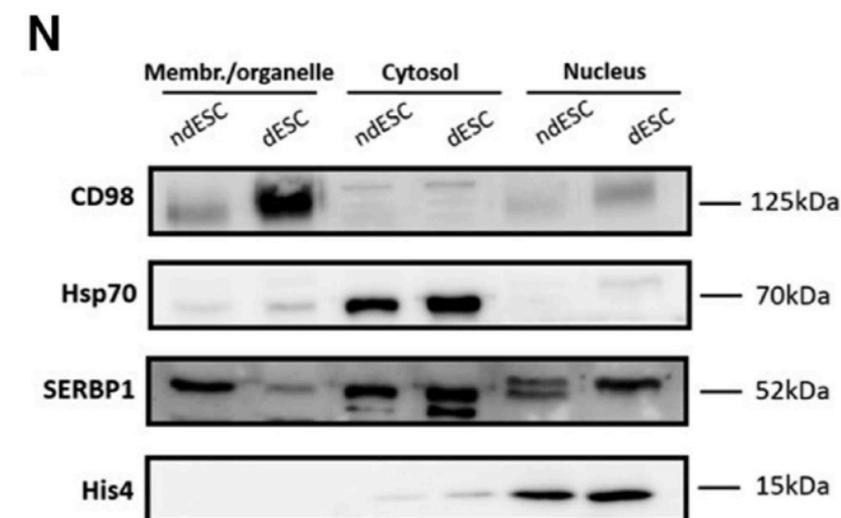


Figura 22. Localización de PGRMC1 y SERBP1 en células estromales endometriales (ESC) no decidualizadas (ndESC) y células estromales endometriales decidualizadas (dESC). (A-L) Doble tinción por inmunofluorescencia para PGRMC1 (verde; A, B, D, E) o SERBP1 (verde; G, H, J, K) y F-actina (rojo; C, F, I, L) en ndESC y dESC. Los núcleos se tiñeron con 6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (azul). Las células fijas se analizaron mediante microscopía confocal (40X y 60X). C, I (ndESC) y F, L (dESC) representan el citoesqueleto celular usando una tinción de rodaminafaloidina. F y L mostraron la clásica forma poligonal/redonda de las dESC. Las barras laterales a las figuras B, C, E, F, H e I representan la reconstrucción del eje Z de seis secciones. (M, N) Western blot de PGRMC1 y SERBP1 a partir de fracciones subcelulares en ndESC y dESC. Las fracciones enriquecidas para membrana/orgánulo (n=3), citosol (n=4) y núcleos (n=4) también fueron analizadas para los marcadores específicos de cada compartimento: CD98 (Membrana), HSP70 (Citosol) e His4 (Núcleo). De tal manera se aseguró la pureza de cada fracción analizada.

Al mismo tiempo, evaluamos también la localización de la proteína SERBP1 (Figura 22G-L), siempre mediante inmunofluorescencia. Sin embargo, en este caso no observamos ningún cambio en la localización de dicha proteína. La proteína SERBP1 fue localizada en el citoplasma y el núcleo en ambas condiciones, no decidual y decidual (Figura 22G-L). Para verificar estos resultados, decidimos aislar las distintas subfracciones celulares de células ndESC y dESC: citoplasma, membrana/orgánulos, y núcleo.

El análisis por Western Blot confirmó la presencia de PGRMC1 y SERBP1 en todas las subfracciones analizadas (Figura 22M y 22N). Las bandas correspondientes a PGRMC1 revelaron un aumento en la fracción de las dESC en comparación con la fracción nuclear de las ndESC (Figura 22M).

Igualmente, también la proteína SERBP1 se detectó en todas las fracciones subcelulares analizadas (Figura 22N). El Western blot reveló, además, una disminución en la fracción de membrana/orgánulos en las dESC en comparación con las ndESC (Figura 22N).

RESULTADOS

4. La sobreexpresión de PGRMC1 inhibe la Decidualización in vitro de las ESC

Para evaluar el efecto funcional de la sobreexpresión de PGRMC1 en ESC primarias, inducimos el aumento de la expresión de la proteína PGRMC1 en estas células mediante un plásmido de fusión GFP.

De tal manera las ESC se incubaron con 1 μ g de PGRMC1-pCMV6-AC-GFP (PGRMC1 transfección, n = 17), o 1 μ g de plásmido vacío, utilizado como control negativo (Vector vacío, n=8). Las ESC de control solo fueron incubadas con medio base (No transfección, n=25) (Figura 23A).

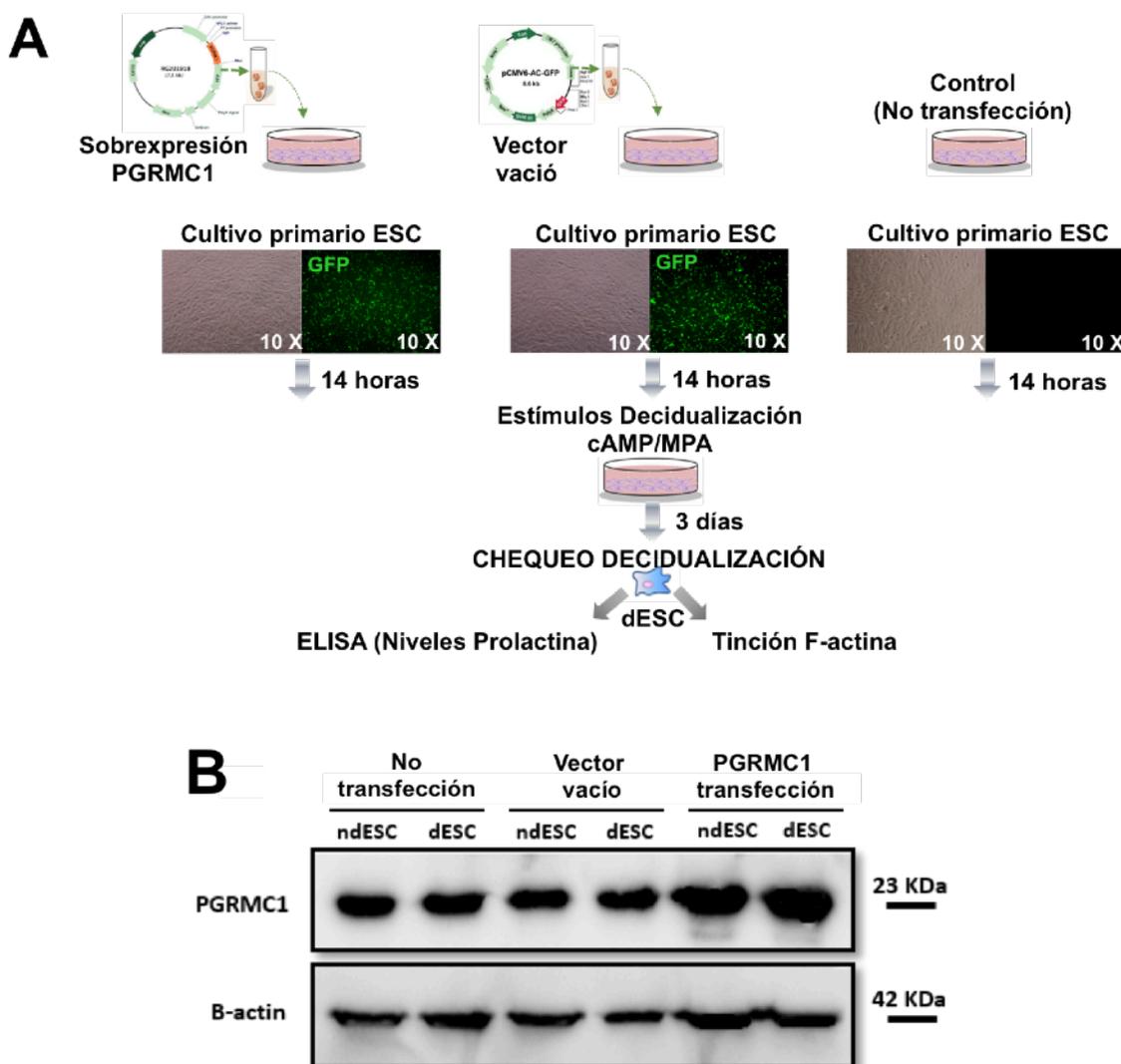


Figura 23. Diseño experimental para la sobreexpresión de PGRMC1 y análisis de la expresión proteica en las células estromales endometriales primarias (ESC). (A) Cultivos de ESC se

RESULTADOS

transfectaron con un vector de fusión pCMV6-AC-GFP que contenía la secuencia PGRMC1 ORF (n=17), para poder sobreexpresar PGRMC1. Como controles de transfección transfectamos las mismas células ESC con un vector vacío (n=8). Como controles negativos se usaron ESC adicionales no transfectadas. Las imágenes mostraron una morfología intacta y una buena fluorescencia de las ESC transfectadas con los vectores de fusión y vacío (pCMV6-AC-GFP). Después de 14 horas de transfección, el medio fue reemplazado con medio de decidualización (cAMP y MPA). La decidualización se verificó midiendo los niveles de PRL mediante ELISA y la tinción con F-actina con Rodamina-Faloidina. (B) Análisis por Western Blot de la sobreexpresión de PGRMC1 en ESC no transfectadas, y transfectadas con vector vacío y de fusión. Cada grupo fue analizado en la condición no decidual (ndESC) y decidual (dESC).

La sobreexpresión de PGRMC1 fue comprobada adicionalmente mediante Western blot, que mostró un correcto aumento de la proteína PGRMC1 en las células transfectadas (Figura 23B).

A continuación, para comprobar funcionalmente el proceso de decidualización, en todos los sobrenadantes de las ESC del diseño experimental anterior, medimos las concentraciones del marcador de decidualización, prolactina (PRL). Tal como representamos en la Figura 24A, después de 3 días de estímulo de decidualización, las ESC controles (Non-transfected ESC) mostraron un aumento significativo de los niveles de PRL, en comparación con las células transfectadas con el vector de fusión (PGRMC1 transfected ESC) en condiciones deciduales. Dicha diferencia significativa también se observó entre los valores de PRL de las células transfectadas con el vector vacío (Empty transfected ESC) y las células transfectadas con el vector de fusión (PGRMC1 transfected ESC) (Figura 24A), lo que indica un fallo de decidualización en las ESC que presentan una sobreexpresión de PGRMC1.

Para corroborar aún más el efecto perjudicial de la sobreexpresión de la proteína PGRMC1 sobre el proceso de decidualización, se evaluaron los cambios morfológicos de las ESC mediante tinción de los filamentos de F-actina (Figura 24B-G). Las ESC controles no transfectadas, después de los estímulos de decidualización *in vitro*, mostraron una morfología celular redondeada, típica de una célula decidualizada (Figura 24C). Sin embargo, las ESC transfectadas con el vector de fusión (PGRMC1 transfected ESC), después de 3 días de estímulos con MPA y 8-bromo-cAMP, no mostraron las características morfológicas clásicas, confirmando así una decidualización comprometida (Figura 24E).

RESULTADOS

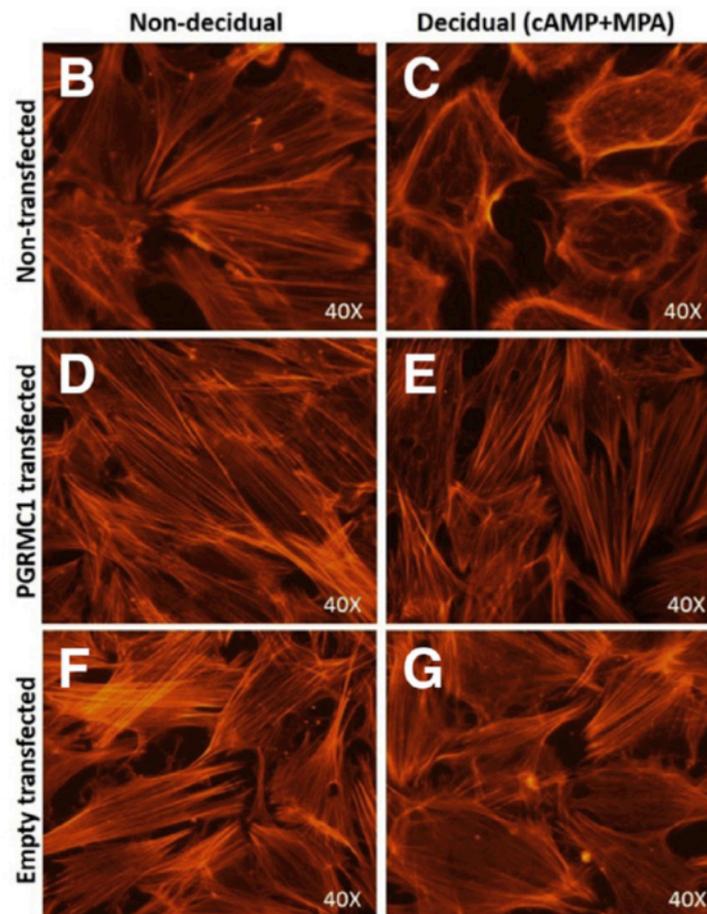
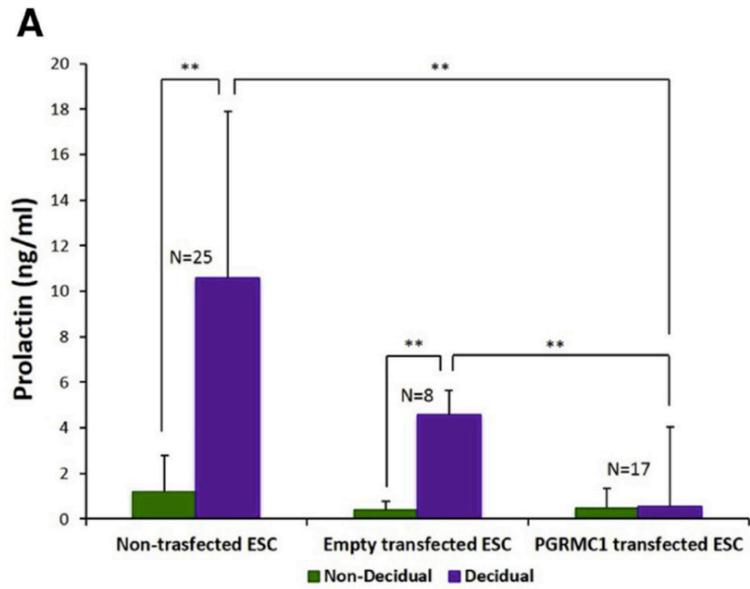


Figura 24. Efecto de la sobreexpresión de PGRMC1 sobre la decidualización en células estromales endometriales humanas (ESC). (A) Los niveles de PRL se midieron mediante ELISA en los medios condicionados de ESC no transfectadas (Non-transfected ESC), transfectadas con el vector

RESULTADOS

vacío (Empty transfected ESC) y transfectadas con el vector de fusión (PGRMC1 transfected ESC). Los resultados mostraron una reducción significativa en las células deciduales donde sobreexpresamos PGRMC1 (PGRMC1 transfected ESC) en comparación con las ESC no transfectadas y transfectadas con el vector vacío. (B-G) Análisis de la estructura del citoesqueleto. La tinción de F-actina en las células ESC no transfectadas mostró los cambios morfológicos típicos del proceso de decidualización en las dESC no decidualizadas (ndESC) (B, C). No se observaron diferencias en la distribución de los filamentos de F-actina entre las condiciones no deciduales (D) y deciduales (E) en las ESC que sobreexpresaron PGRMC1. (F, G) Las ESC transfectadas con el vector vacío mostraron la misma morfología de las células no transfectadas. Cada columna representa la media±desviación estándar (SD). Cada muestra se analizó por triplicado. (* P <.05, ** P <.01.)

De hecho, en este grupo de células (PGRMC1 transfected ESC) no se observaron diferencias en la distribución de los filamentos de F-actina entre la condición no decidual y decidual (Figura 24D y 24E). El grupo de las ESC transfectadas con el vector vacío (Empty transfected ESC) también mostró la misma forma redonda que las ESC control no transfectadas bajo condiciones deciduales (Figura 24G), excluyendo que los efectos observados en el grupo de las ESC que sobreexpresan PGRMC1, se deban propiamente al proceso de transfección. En conjunto, estos resultados indican que son necesarios bajos niveles de PGRMC1 para que se produzca el mecanismo de decidualización, sugiriendo que la proteína PGRMC1 puede ser un componente importante en este proceso.

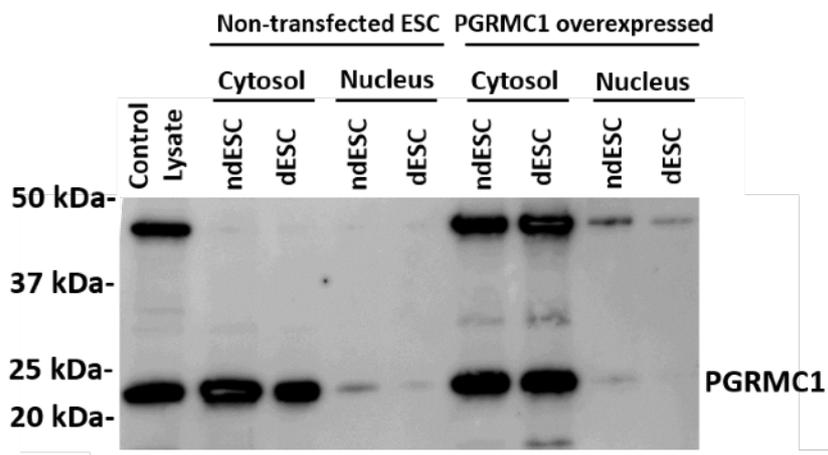


Figura 25. Expresión de PGRMC1 en fracciones citoplasmáticas y nucleares de ESC transfectadas con vector de expresión de PGRMC1. La sobreexpresión de PGRMC1 probablemente induce un aumento de la dimerización del receptor (banda 46kDa) en citosol y núcleo, comparado con ESC no transfectadas. La presencia de la misma banda, en el lisado control, probablemente se debe a la presencia del dímero en la fracción de membranas y orgánulos, que quedaron excluidas en el fraccionamiento.

RESULTADOS

Después realizamos un western blot de las fracciones citoplasmáticas y nucleares de las ESC transfectadas y se observó la presencia de una banda de aproximadamente 46kDa, tanto en las fracciones citoplasmáticas como nucleares de ndESC y dESC donde sobrepresamos PGRMC1. Dicha banda podría corresponder a un dímero de PGRMC1 ya que probablemente la sobrepresión estaría induciendo la dimerización del receptor (Figura 25).

5. La inhibición de la actividad de PGRMC1 mediante AG205 puede inducir la decidualización en las ESC, en ausencia de la entrada de Progesterona

Para comprender mejor la posible implicación de los receptores no clásicos de P4 en la decidualización, en particular de PGRMC1, hemos empleado una P4 impermeable a la membrana (P4-BSA), que evita la entrada de P4 en la célula, activando de tal manera solamente los receptores de membrana. Además, hemos introducido también un antagonista de PGRMC1, AG-205, que bloquea específicamente su activación.

Debido a la posibilidad de decidualizar las ESC tanto con un protocolo clásico largo (8 días) mediante P4 combinada a E2 como también con un protocolo más rápido (4 días) mediante cAMP y MPA, hemos introducido la P4BSA y AG205 en ambos, estableciendo así diferentes condiciones de decidualización (descritos en la sección 3.1 de “Materiales y métodos”). De esa manera, hemos podido también analizar si se generaban efectos diferentes entre los dos tipos de protocolos.

La P4 y el MPA, del protocolo largo y corto respectivamente, han sido sustituidos por P4-BSA (1uM) en combinación o no con AG-205 (50uM).

Después de 8 días de cada estímulo de decidualización, según las distintas condiciones establecidas para el Protocolo largo (P4/E2, P4-BSA/E2, P4/E2+AG205 y P4BSA/E2+AG205), la secreción de prolactina (PRL) disminuyó significativamente en presencia de P4-BSA/E2 en comparación con el grupo dESC decidualizado con P4/E2 ($p < 0,01$) (Figura 26A). Por contra, los niveles de PRL se revertían aumentando significativamente en presencia del inhibidor AG205 y P4-

RESULTADOS

BSA/E2 en comparación con ndESC y el grupo dESC decidualizado solamente con P4-BSA/E2 ($p < 0,05$) ($n=7$).

Sin embargo, en el Protocolo corto de 4 días, todos los grupos fueron capaces de secretar altos niveles de PRL e IGFBP1, incluso en presencia de P4-BSA/cAMP o P4-BSA/cAMP y AG205 ($n=7$) (Figura 26B).

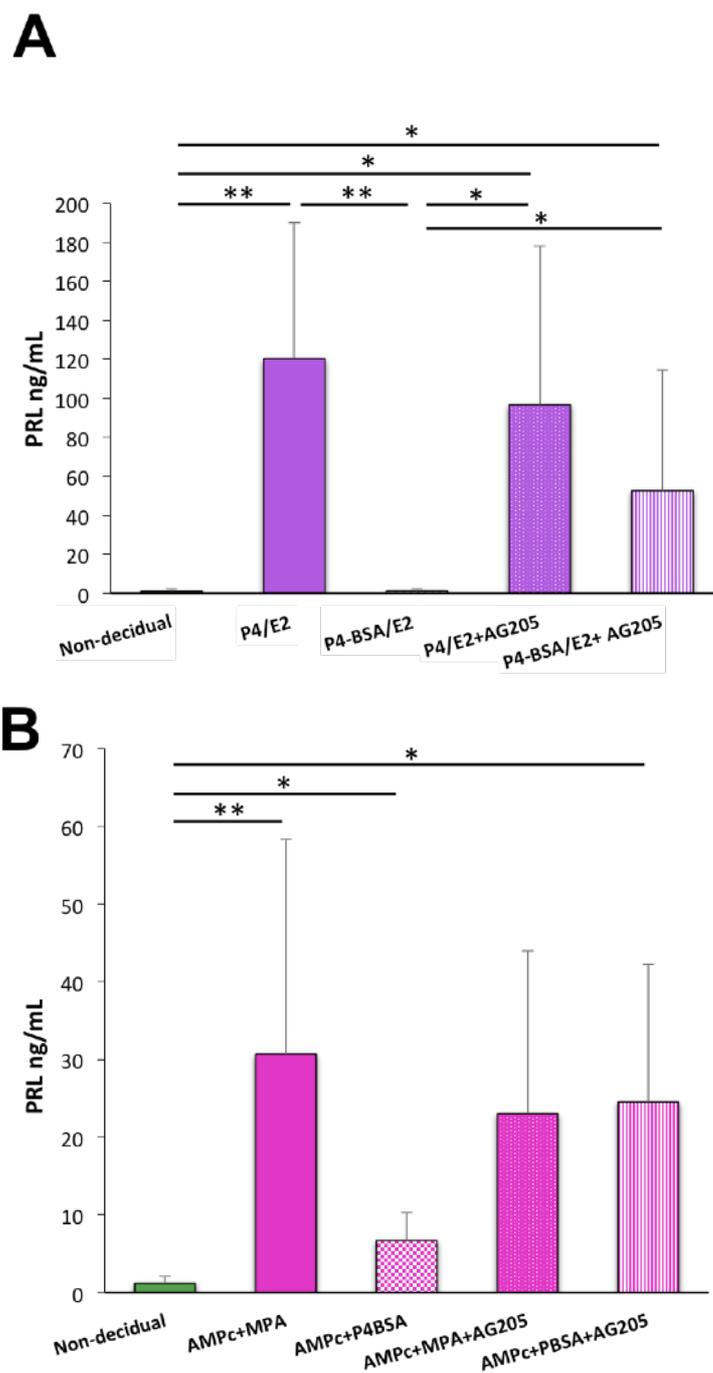


Figura 26. Niveles de secreción de PRL en células estromales endometriales humanas (ESC) en presencia de los estímulos de decidualización del protocolo Largo (A) y Corto (B).

RESULTADOS

Analizando nuestro segundo chequeo de decidualización mediante la tinción de los filamentos de F-actina, para el Protocolo Largo se mostró una falta de remodelación del citoesqueleto en el grupo decidualizado con P4-BSA en comparación con la forma poligonal típica observada en los controles. La disposición correcta de los filamentos de F-actina de las dESC se restauró en el grupo P4-BSA en presencia de AG205 (Figura 27 y 28).

En el caso del Protocolo Corto de decidualización, las dESC de todos los grupos mostraron una estructura correcta decidualizada de los filamentos de F-actina, también en presencia de P4-BSA/cAMP o P4-BSA/cAMP y AG205.

6. La ausencia de la entrada de progesterona y AG205 inducen cambios de localización de los receptores de progesterona durante la decidualización en las ESC

El receptor clásico de P4 (PR-A y PR-B) sufre un cambio de localización durante el proceso de decidualización. Con la entrada y el aumento de la P4 en las ESC, el receptor PR se activa y transloca al núcleo, donde actúa como factor de transcripción, mientras que PGRMC1, conforme la ESC se va decidualizando, se acumula mayormente a nivel perinuclear. Para evaluar los efectos de los diferentes estímulos de decidualización inducidos sobre las ESC, combinados con P4BSA y AG205, también analizamos la localización de dichos receptores de progesterona.

Los experimentos de inmunolocalización por inmunocitofluorescencia revelaron, con respecto a las condiciones del Protocolo largo, una clara localización perinuclear y nuclear de PGRMC1 en los grupos dESC decidualizados con P4/E2 y P4/E2 + AG205, aunque ligeramente disminuida en este último (Figura 27). Sin embargo, PGRMC1 pareció persistir en la membrana y en el citosol en los grupos dESC decidualizadas con P4-BSA/E2 y P4-BSA/E2 + AG205 dESC (Figura 27).

En cuanto al receptor PR utilizamos un anticuerpo capaz de reconocer ambas las isoformas A y B (PRAB). En las ESC no decidualizadas (Control ndESC) el receptor PRAB muestra una tinción casi indetectable en el citosol, debida a su poca expresión. Como se ha descrito, después del estímulo de progesterona, aumenta su expresión y se transloca al núcleo de las ESC (Figura 28, P4+E2 dESC).

RESULTADOS

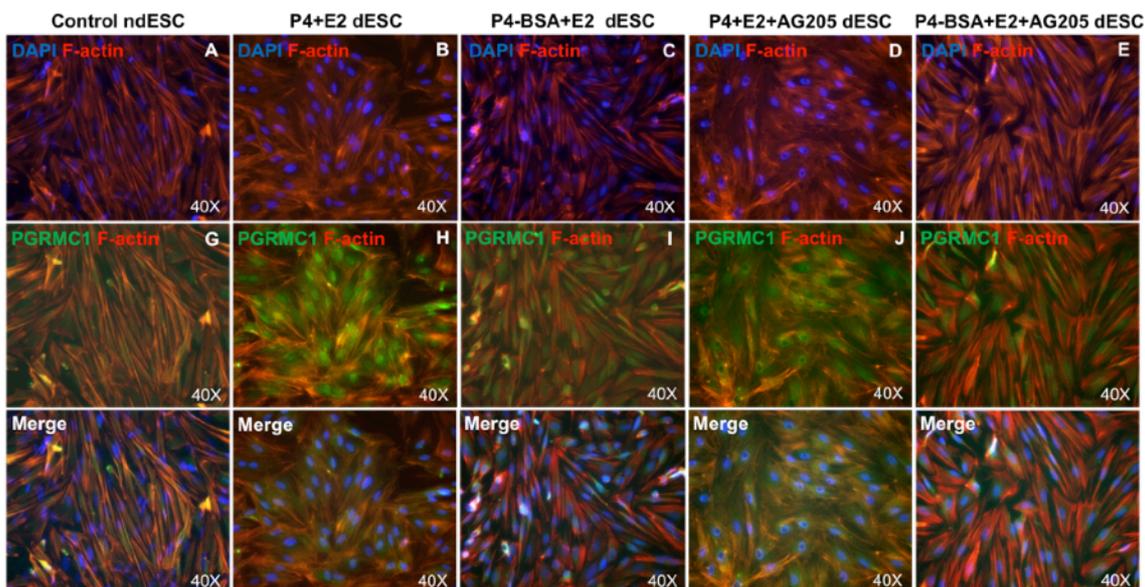


Figura 27. Inmunolocalización de PGRMC1 en los diferentes estímulos de decidualización del protocolo largo (PGRMC1, verde; DAPI, azul; F-actina, rojo).

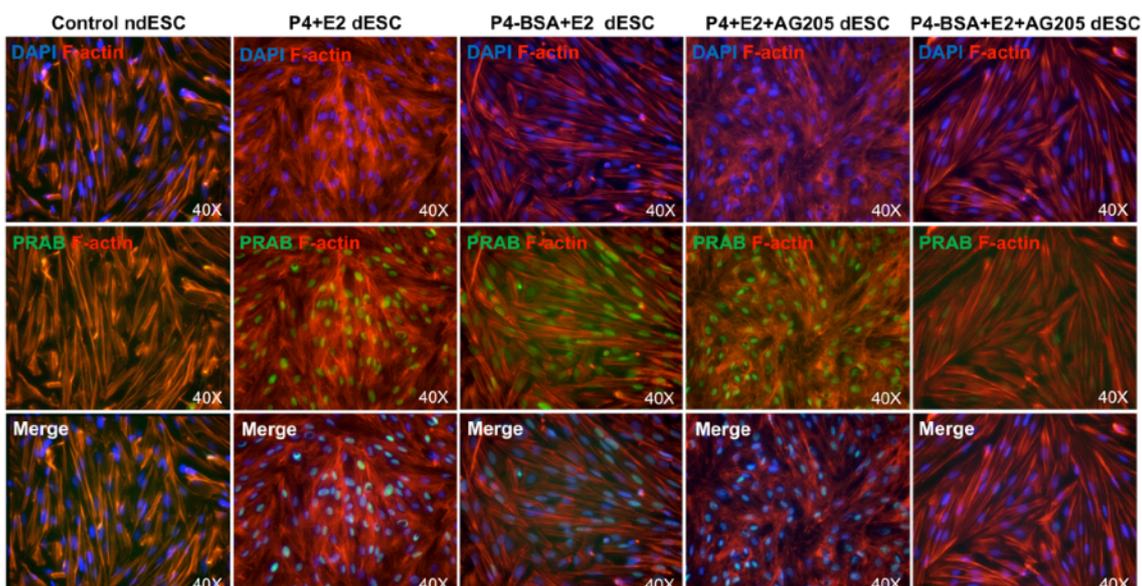


Figura 28. Inmunolocalización de PRAB en los diferentes estímulos de decidualización del protocolo largo mediante P4 y E2 (PRAB, verde; DAPI, azul; F-actina, rojo).

Sorprendentemente, en el grupo dESC P4-BSA / E2, sigue translocándose al núcleo como ocurre con el estímulo de decidualización (P4 / E2) y en presencia de AG205 (P4+E2+AG205). Sin embargo, la señal de PRAB disminuyó fuertemente en el grupo dESC decidualizadas con P4-BSA+E2 + AG205 (Figura 28, P4-BSA/E2+AG205).

RESULTADOS

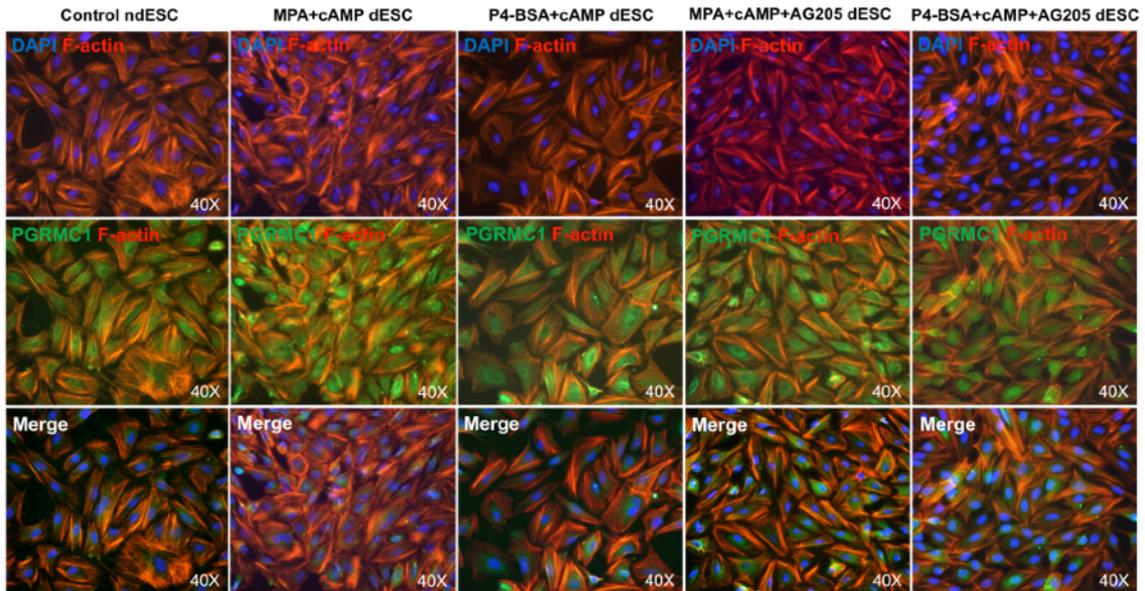


Figura 29. Inmunolocalización de PGRMC1 en los diferentes estímulos de decidualización del protocolo corto mediante cAMP y MPA (PGRMC1, verde; DAPI, azul; F-actina, rojo).

Por otro lado, el ensayo de inmunocitofluorescencia en el protocolo corto de decidualización no mostró diferencias de localización de PGRMC1 en los diferentes grupos, aunque en el grupo P4BSA+cAMP+AG205 disminuyó su localización a nivel perinuclear (Figura 29).

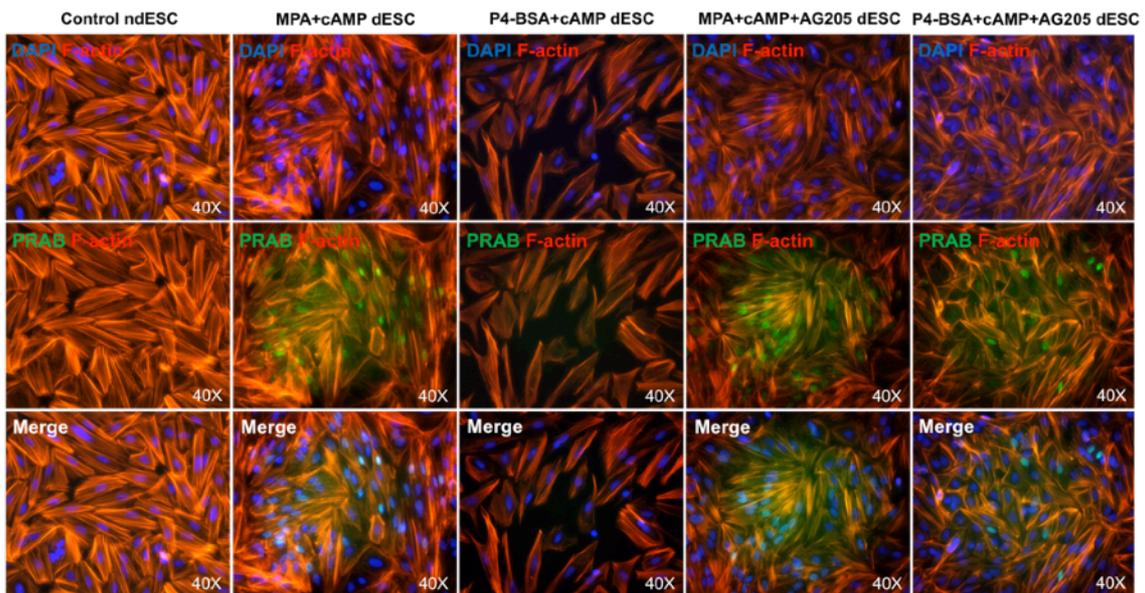


Figura 30. Inmunolocalización de PRAB en los diferentes estímulos de decidualización del protocolo corto mediante cAMP y MPA (PRAB, verde; DAPI, azul; F-actina, rojo).

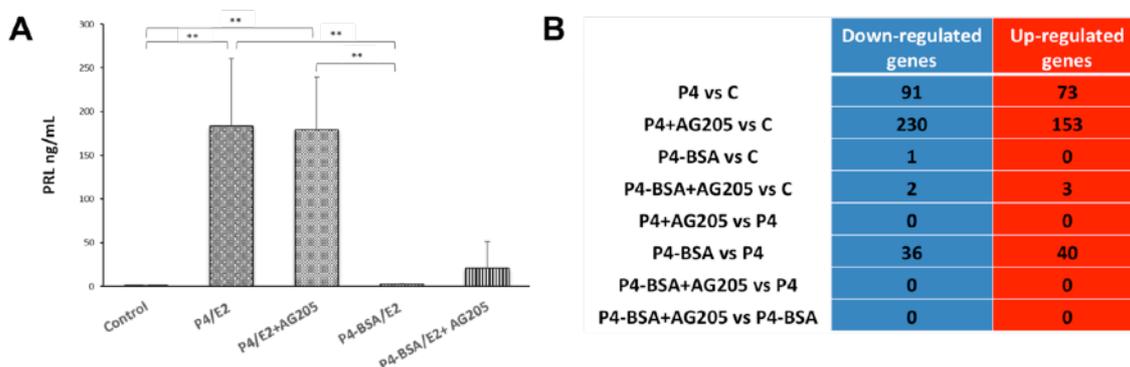
RESULTADOS

Mientras que con respecto a PRAB, se observó su translocación en el núcleo en todas las condiciones de decidualización inducidas, frente a su leve expresión citoplasmática, casi indetectable, en las células ndESC. En presencia de P4-BSA+cAMP, PRAB no mostró tampoco su translocación nuclear, como en el caso del control (ndESC) (Figura 30).

7. Alteraciones en los Perfiles Transcriptómicos Globales en las ESC decidualizadas con diferentes tratamientos

A continuación, utilizamos la estrategia de microarray para identificar los cambios moleculares subyacentes a las diferencias funcionales de decidualización encontradas en las ESC decidualizadas con el antagonista de PGRMC1, AG205 y P4-BSA. Ya que los mayores cambios, tanto a niveles de secreción del marcador de decidualización (PRL), como de localización subcelular de los receptores de P4, se han producido prevalentemente en las condiciones del protocolo largo y debido a que este último es lo más semejante a la condición fisiológica, decidimos llevar a cabo el análisis transcriptómico solo de las siguientes condiciones: Control (ndESC), P4/E2, P4/E2 + AG205, P4-BSA/E2 y P4-BSA/E2 + AG205.

Los niveles de PRL secretados por cada grupo no decidualizado y decidualizado se muestran en la Figura 31A. Una visión resumida de los resultados está representada en la tabla de la Figura 31B.



RESULTADOS

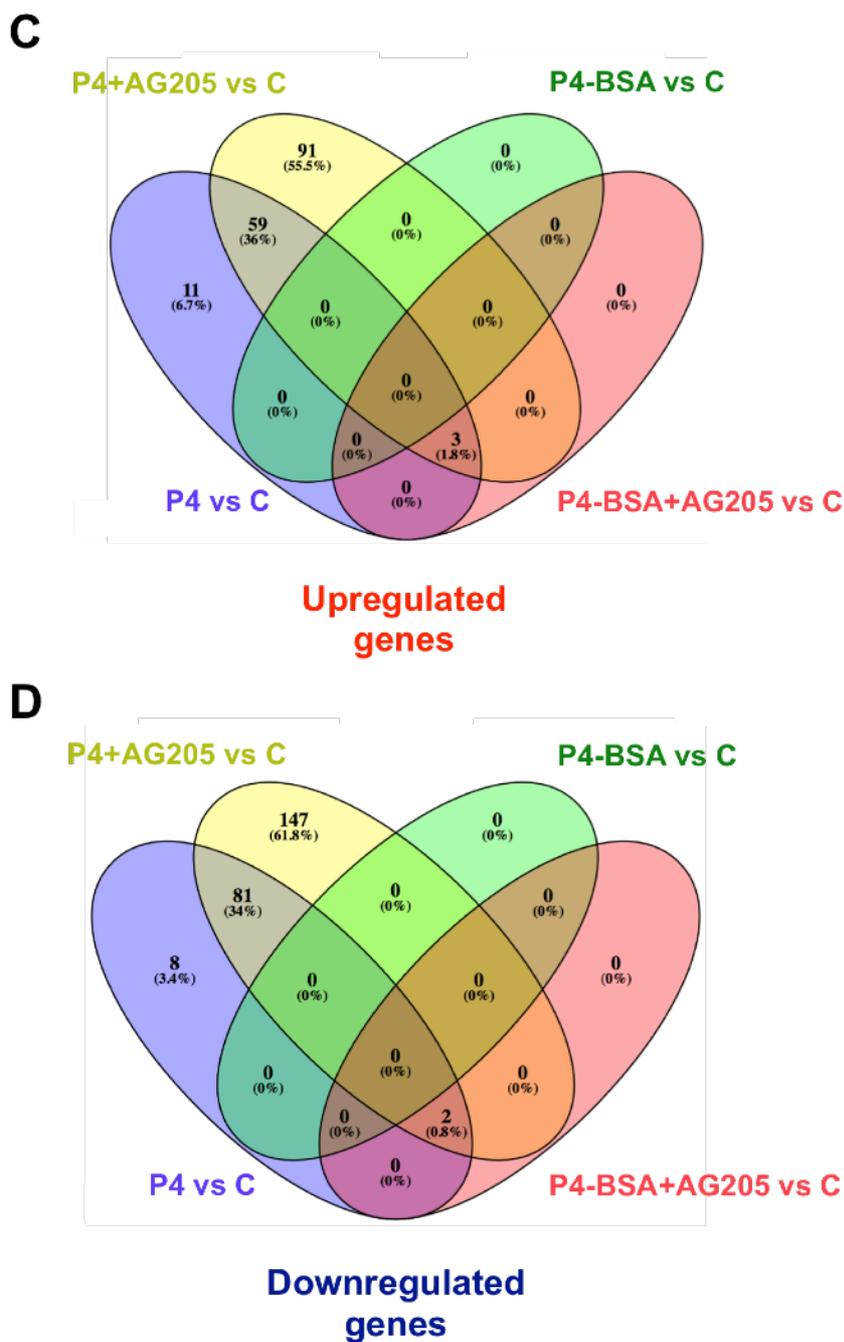


Figura 31. Análisis transcriptómico de los diferentes estímulos de decidualización mediante protocolo largo. Confirmación, mediante ELISA, de los niveles de Prolactina secretados en los medios condicionados de cada grupo de decidualización y en el Control (A). Tabla con número de genes diferencialmente expresados, comparando cada grupo de decidualización con el Control y P4 (n=4) (B). Diagramas de Venn entre los genes diferencialmente expresados, aumentados (Upregulated genes) (C) y disminuidos (Downregulated genes) (D), de los diferentes grupos de decidualización comparando con el Control.

En el estado decidual fisiológico (P4 vs Control), 91 genes disminuyeron de manera estadísticamente significativa y 73 genes aumentaron, en base a una tasa

RESULTADOS

de descubrimientos falsos (FDR) <0.05 y al menos dos veces diferencialmente expresados.

En presencia del antagonista de PGRMC1, AG205 (P4/E2+ AG205 vs Control), se encontró un aumento considerable en el número de transcritos génicos diferencialmente expresados (230 genes disminuidos y 153 genes aumentados) (Figura 31B). Éstos incluyen muchos genes en común con la comparación de P4 frente al Control, conocidos por estar implicados en la decidualización endometrial. Algunos genes se encontraron aumentados, como por ejemplo PRL, IGFBP1, THBD (Thrombomodulin), THSD7A (Thrombospondin type-1 domain-containing protein 7A), IRS2 (Insulin Receptor Substrate 2), GREB1 (Growth Regulation By Estrogen In Breast Cancer 1), DPP4 (Dipeptidyl Peptidase 4) y otros disminuidos, cómo por ejemplo IGFBP5 (Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5) y SRFP1 (Secreted Frizzled Related Protein 1) (Figura 32A). Más de la mitad de los genes diferencialmente expresados fueron inducidos por la presencia del antagonista de PGRMC1 (exclusivos del grupo P4+AG205) tal como se desprende del diagrama de Venn de la Figura 31C y 31D (91 genes aumentados y 147 disminuidos). Entre estos genes encontramos algunos aumentados, como MAOB (Monoamine Oxidase B), MAOA (Monoamine Oxidase A), GPX3 (Glutathione Peroxidase 3), SLC7A11 (Solute Carrier Family 7 Member 11), SLC7A8 (Solute Carrier Family 7 Member 8), SLC7A7 (Solute Carrier Family 7 Member 7), ATP8A2 (ATPase Phospholipid Transporting 8A2), y otros disminuidos como RAB15 (RAB15, Member RAS Oncogene Family), SOD3 (Superoxide Dismutase 3), RAB3B (RAB3B, Member RAS Oncogene Family) y TAGLN (Transgelin) (Figura 32B-C).

A	P4 vs C		P4+AG205 vs C	
	fold	padj	fold	padj
PRL	8.757	0.002	8.868	0.001
IGFBP1	8.562	0.017	8.51	0.009
THBD	7.129	0.001	6.456	0
THSD7A	5.067	0.001	6.336	0
IRS2	3.898	0.008	4.879	0.001
GREB1	2.444	0.001	2.509	0
DPP4	2.322	0.001	3.208	0
IGFBP5	-3.916	0.004	-3.891	0.002
SFRP1	-4.972	0.001	-5.248	0

B	P4+AG205 vs C	
	fold	padj
MAOB	4.78	0.015
MAOA	3.816	0.034
GPX3	3.606	0.027
SLC7A11	3.366	0.037
SLC7A8	2.972	0.001
SLC7A7	2.434	0.001
ATP8A2	2.179	0.003
RAB15	-2.155	0.014
SOD3	-2.63	0.007
RAB3B	-2.691	0.029
TAGLN	-4.734	0.01

RESULTADOS

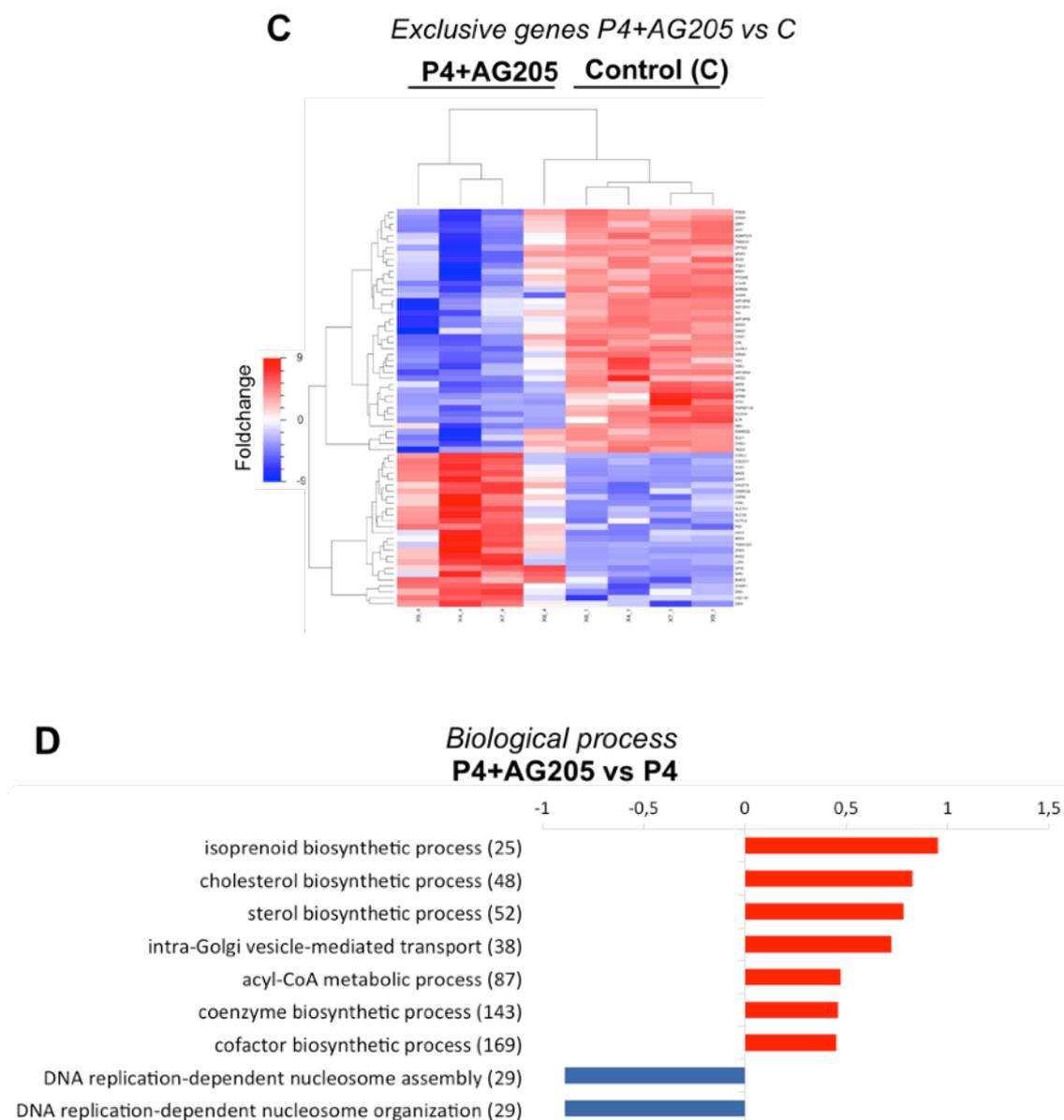
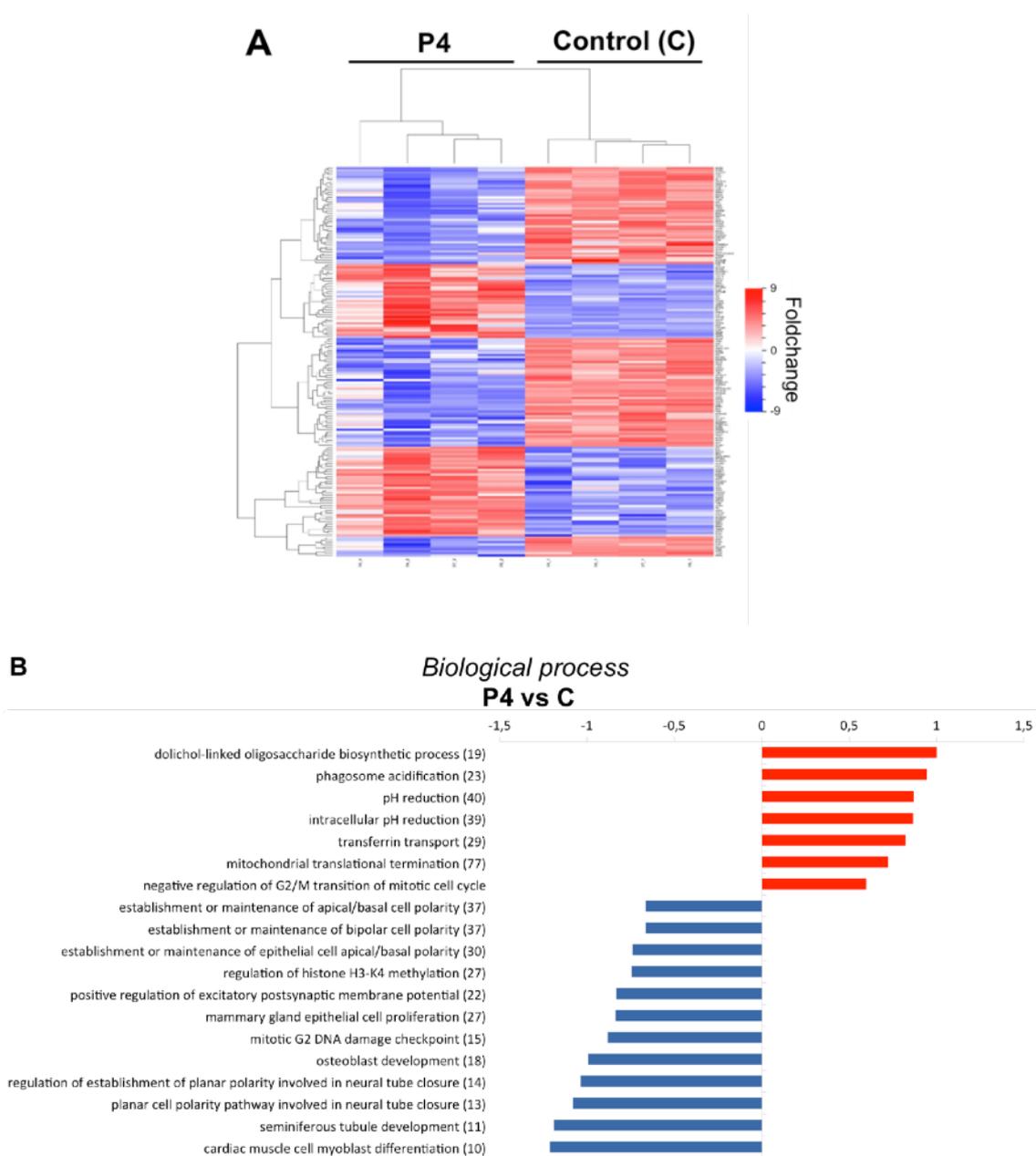


Figura 32. Análisis de los cambios transcriptómicos inducidos por el antagonista de PGRMC1 en el estímulo fisiológico de deciduación. Genes comunes, aumentados y disminuidos, entre P4vsC y P4+AG205vsC, bien conocidos por jugar un importante rol durante el proceso de deciduación (A). Algunos de los genes exclusivos de P4+AG205, como genes que codifican para antioxidantes celulares (GPX3 y SOD3), monoaminooxidasas (MAOA y MAOB), ATPasa flippasa de clase 4 (ATP8A2), transportadores aminoacídicos (SLC7A11, SLC7A8 y SLC7A7), miembros de la familia oncogénica RAS (RAB3B y RAB15) y una proteína de unión a la actina cual la trangelina (TAGLN) (B). Heat map de los genes exclusivos del grupo P4+AG205 comparado con el Control. En la escala del color rojo están representados los foldchange de los genes aumentados y en azul los foldchange de los genes disminuidos, con un FDR <0.05 (C). Procesos biológicos diferencialmente regulados (barras rojas, aumentados; barras azules, disminuidos; $p \leq 0.05$), durante el proceso de deciduación en presencia de AG205, comparando P4+AG205 vs P4 (D).

A nivel de procesos biológicos, AG205 determinó un aumento significativo de los procesos relacionados con la biosíntesis del colesterol, esteroles y acetil CoA y

RESULTADOS

transporte intra-Golgi mediado por vesículas. Procesos relacionados con el ensamblaje y la organización del nucleosoma aparecieron estar disminuidos (Figura 32D). Durante el estímulo de decidualización tras P4-BSA (P4-BSA vs Control) no se encontraron diferencias significativas, contrariamente a los 76 genes diferencialmente expresados y estadísticamente significativos (FDR <0.05) identificados al comparar P4-BSA con el grupo P4 (36 genes disminuidos y 40 aumentados) (Figura 31B).



RESULTADOS

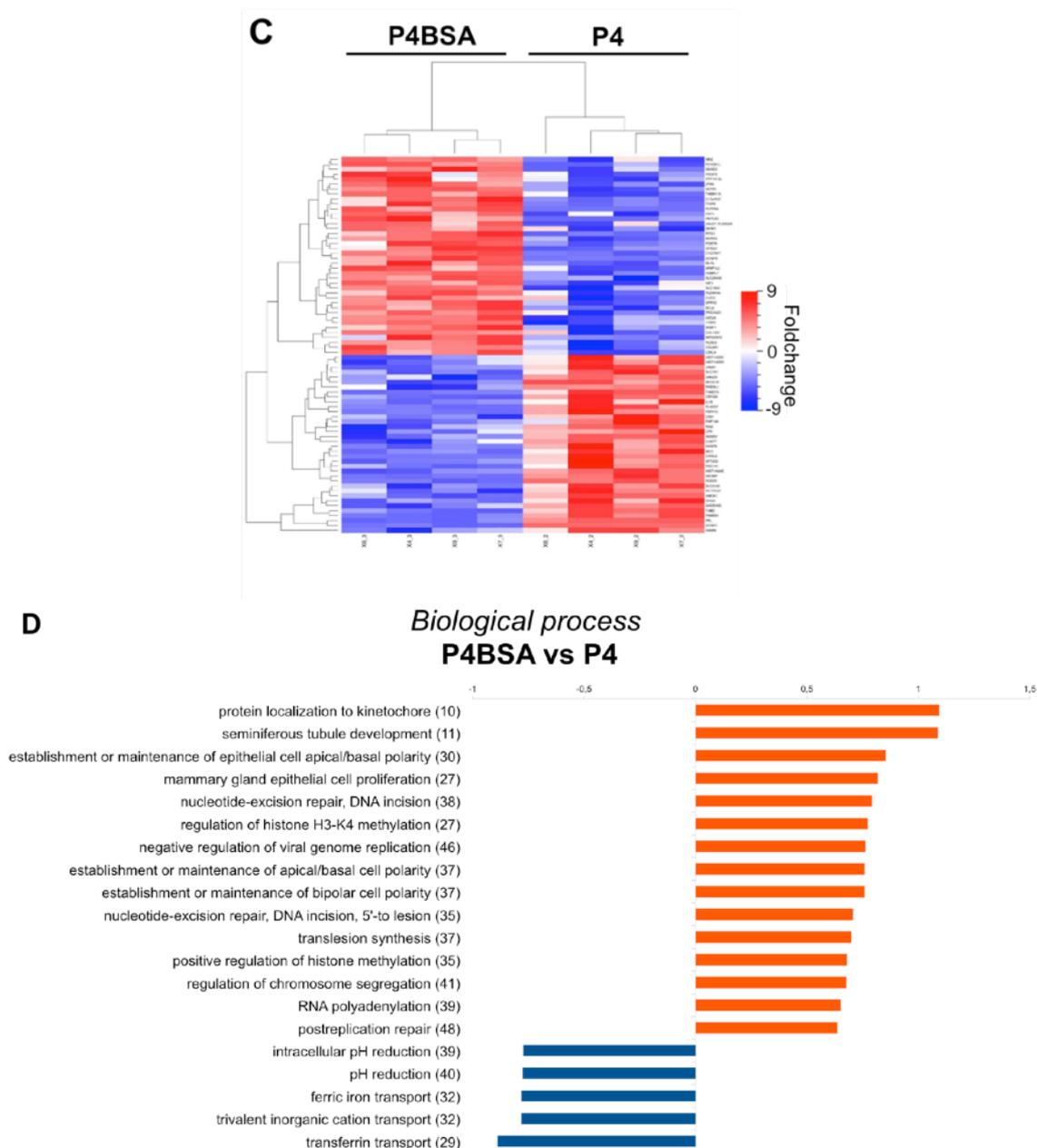


Figura 33. Análisis transcriptómico y de los procesos biológicos desregulados en el grupo de decidualización P4BSA comparado con el estímulo fisiológico de decidualización (P4). Heat maps del grupo P4 comparado con el Control (A) y P4BSA comparado con P4 (C). En la escala del color rojo están representados los foldchange de los genes aumentados y en azul los foldchange de los genes disminuidos, con un FDR <0.05 (A y C). Procesos biológicos diferencialmente regulados (barras rojas, aumentados; barras azules, disminuidos; $p \leq 0.05$), comparado el estímulo de decidualización fisiológico versus el control (B) y el estímulo con P4BSA versus P4 (D). Es evidente el patrón exactamente inverso de las dos comparativas, confirmando que el grupo de decidualización P4/BSA se comporta como un Control.

Observando el heat map (Figura 33C) y el enriquecimiento funcional (Figura 33D) (P4BSA vs P4), podemos ver cómo la distribución de la expresión diferencial y los procesos biológicos significativos de P4BSA vs P4 reflejan exactamente la situación contraria a la condición fisiológica, cual P4 vs C (Figura

RESULTADOS

33A-B). Por lo tanto, todo confirma que el grupo decidualizado con P4-BSA mostró un comportamiento muy similar al grupo control.

A continuación, en presencia de AG205, el grupo P4BSA + AG205 mostró solamente cinco genes diferencialmente expresados de manera estadísticamente significativa, comparado con el Control (2 genes disminuidos y 3 disminuidos) (Figura 31B).

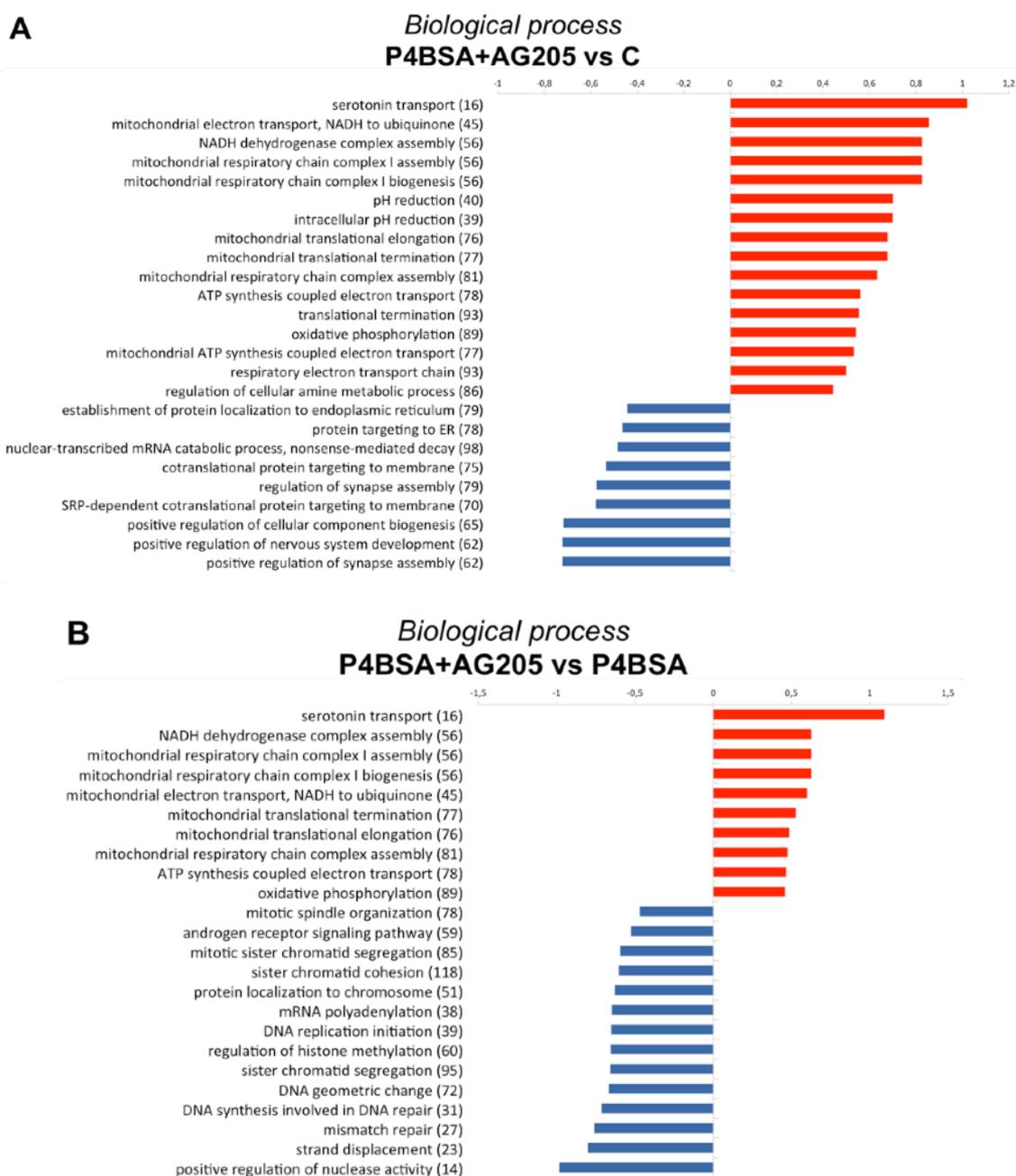


Figura 34. Análisis de los procesos biológicos desregulados en el grupo de decidualización P4BSA+AG205 comparado con el Control (A) y con P4BSA (B).

RESULTADOS

Aunque se hayan identificado pocas diferencias significativas y ninguna en el caso de las comparativa P4BSA+AG205 vs P4BSA, el enriquecimiento funcional ha identificado aspectos interesantes. El antagonista de PGRMC1, AG205, determinó un aumento significativo de todos los procesos biológicos asociados a actividad mitocondrial (Figura 34A-B) y una disminución de actividad de transporte intracelular, como por ejemplo localización de proteínas en el retículo endoplasmático y membrana (Figura 34A), localización de proteínas en los cromosomas, organización del spindle mitótico, segregación de las cromátidas, reparación y replicación del ADN y regulación positiva de la actividad nucleasa (Figura 34B).

Para las validaciones de los resultados de microarray obtenidos, se seleccionaron dos genes exclusivos del grupo P4+AG205, uno aumentado (MAOB) y otro disminuido (TAGLN), comparado con el Control (Figura 35A-B).

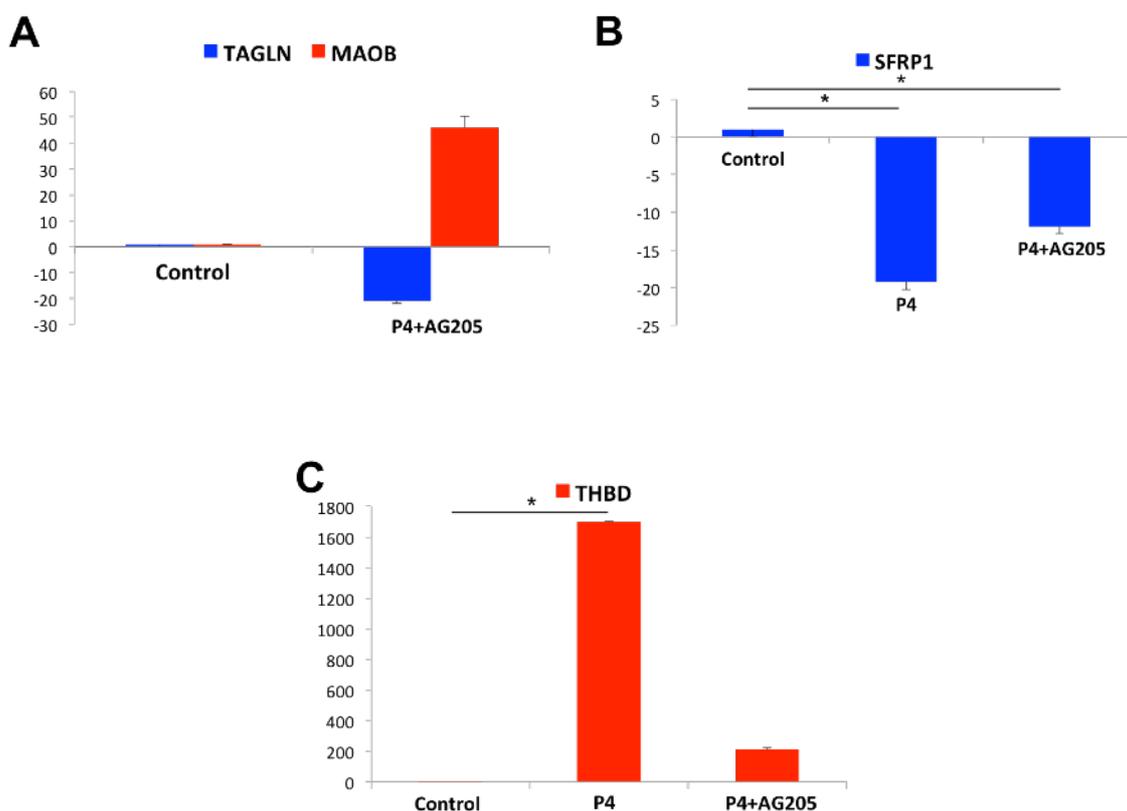


Figura 35. Validación de los resultados de microarray. Entre los genes diferencialmente expresados y estadísticamente significativos, han sido validado por RT-qPCR genes exclusivos del grupo P4+AG205 (TAGLN y MAOB) (A) y genes comunes entre los grupos P4 y P4+AG205 (THBD y SFRP1) (B, C), comparado con el Control.

RESULTADOS

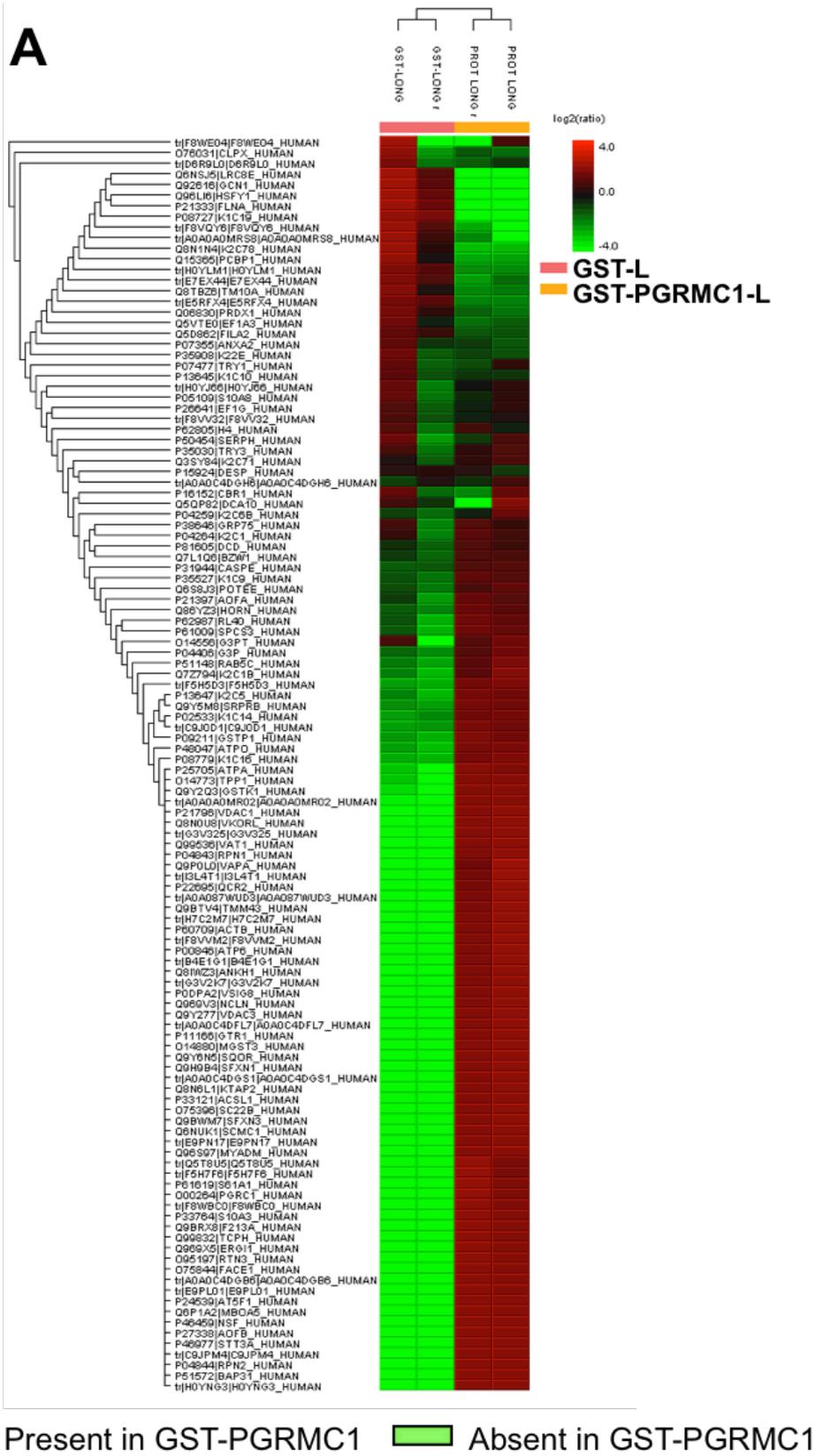
Además, se seleccionaron también dos genes comunes a los grupos P4+AG205 y P4, con un aumento (THBD) y una disminución (SFRP1) estadísticamente significativa frente al Control (Figura 35C-D). Dichos genes fueron validados en tres de las cuatro muestras utilizadas en el experimento de array y tres más diferentes (n=6).

8. El análisis mediante espectrometría de masas de los experimentos de Pull-down revela diferentes interacciones proteicas de PGRMC1 en las ESC

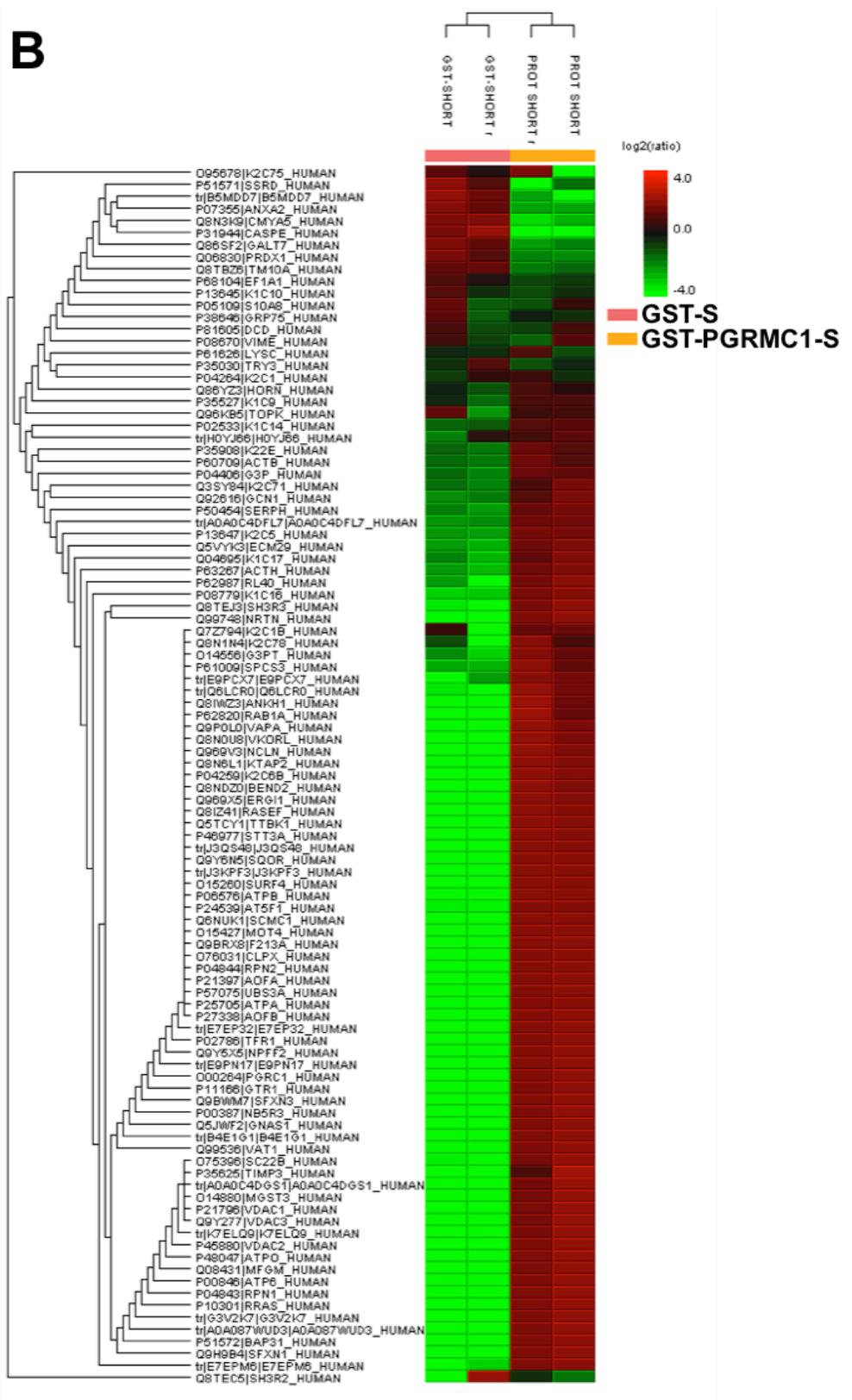
Para lograr una visión general de todas las posibles proteínas que interactúan con PGRMC1 durante la decidualización, se extrajo el proteoma subcelular de células estromales no decidualizadas (ndESC) y decidualizadas (dESC). Además, para verificar si la utilización de diferentes protocolos de decidualización *in vitro* podría generar alguna diferencia en estas interacciones proteicas, se emplearon ESC decidualizadas mediante protocolo largo (Long) y corto (Short). Las células se lisaron y los extractos proteicos se mezclaron con GST-PGRMC1 para poder captar las proteínas que interactúan con nuestra proteína de interés. Para reforzar y enriquecer la proteína de la población interactuante, los *Pull-down* de GST se llevaron a cabo de manera independiente para cada fracción de proteína subcelular (membrana / orgánulo, citosol y núcleo) de cada condición. Luego, todas las subfracciones de ndESC o dESC (con protocolo largo o corto) fueron mezcladas para analizar las proteínas asociadas por RP-LC-MS / MS.

Para determinar la cantidad de cada proteína que interactúa con la proteína de fusión GST-PGRMC1, se realizó un análisis cuantitativo relativo basado en la selección de tres péptidos únicos más intensos para cada proteína (según el software PEAKS Studio 8.5). Para identificar las interacciones específicas de PGRMC1, se excluyeron las proteínas que fueron purificadas por afinidad por la proteína GST (GST-Control, GST-Long y GST-Short). Por otro lado, las proteínas con proporciones similares en los *Pull-down* realizados con GST-PGRMC1 y GST se consideraron inespecíficas y fueron excluidas (Figura 36 A-C). De las proteínas específicas solo se consideraron significativas las que presentaban un valor de significancia superior a 13 (p value ≤ 0.01).

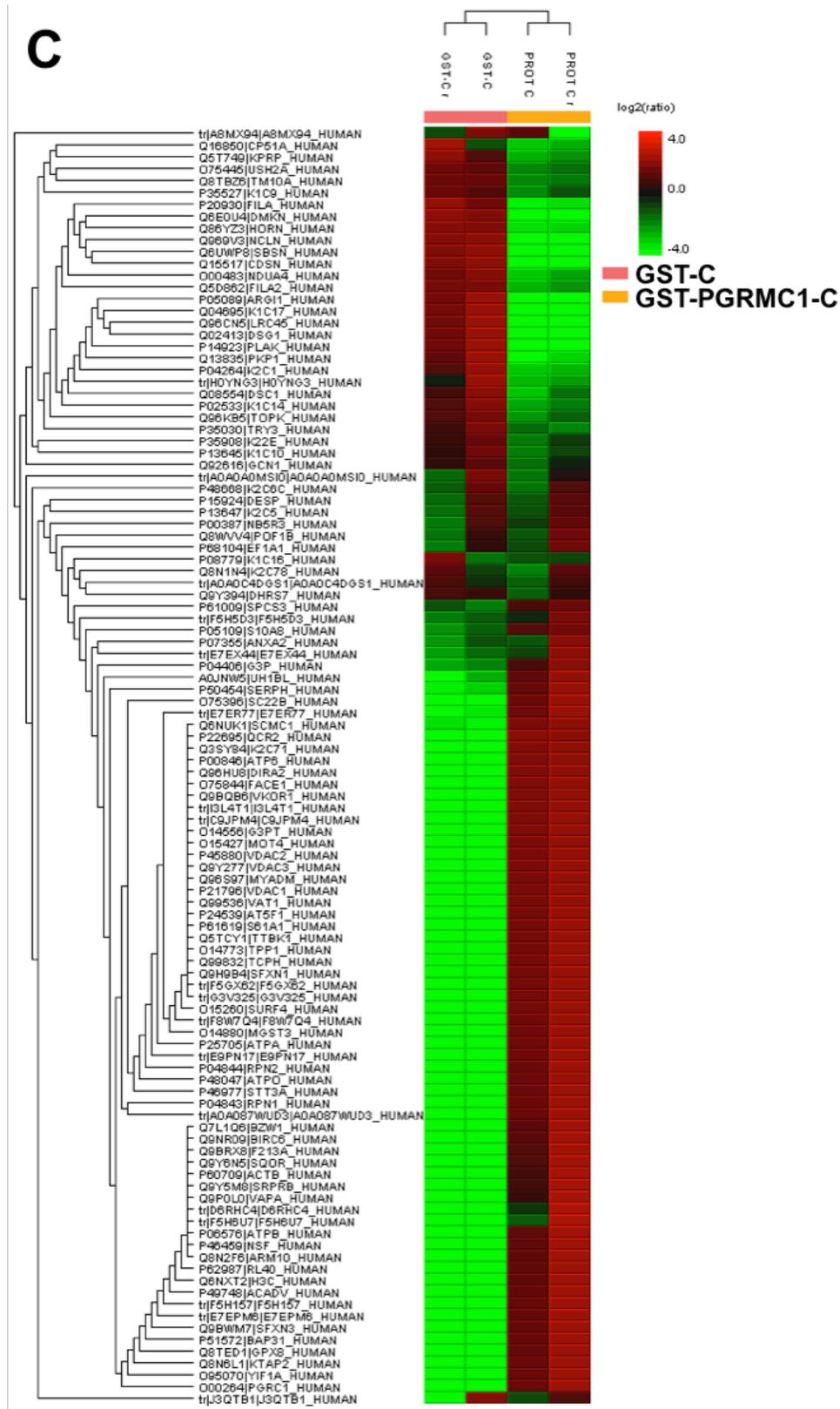
RESULTADOS



RESULTADOS



RESULTADOS



RESULTADOS

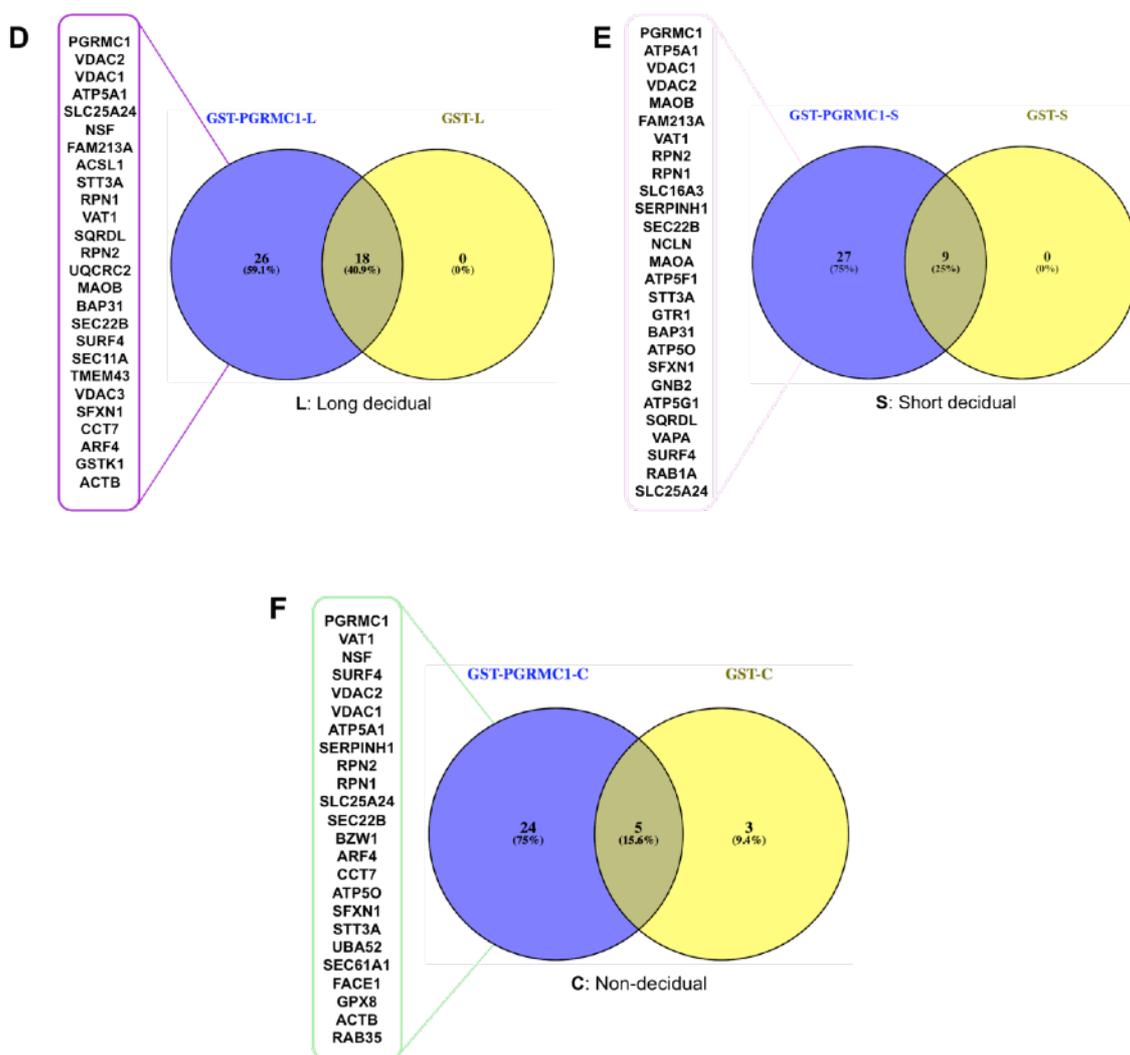


Figura 36. Screening de las proteínas específicas de interacción con la proteína de fusión GST-PGRMC1. Heat maps de las proteínas identificadas por espectrometría de masas en los pulldown con GST y GST-PGRMC1 (A-C). Las proteínas comunes, identificadas por espectrometría de masas en los ensayos de pulldown con GST y GST-PGRMC1 en muestras del protocolo Largo (A), Corto (B) y Control (C), se consideraron inespecíficas y se excluyeron. Se encontraron 26 y 27 proteínas específicas de GST-PGRMC1 en los pulldown realizados con extractos de proteínas de ESC decidualizadas con protocolo Largo (D) y Corto (E) respectivamente, y 24 proteínas específicas con extracto proteico de ESC no decidualizadas (F). Las proteínas con un valor de significación $> = 13$ (FDR $\leq 5\%$) se consideraron estadísticamente significativas (B). L = Long; S = Short; C = Control.

Gracias a los experimentos de *Pull-down* acoplados a análisis mediante espectrometría de masas, identificamos 26 proteínas específicas, que interaccionan con PGRMC1, en las ESC decidualizadas mediante el protocolo largo (Long), 27 proteínas en las ESC del protocolo de decidualización Short y 24 proteínas en las ESC no decidualizadas (Figura 36 D-F).

RESULTADOS

Protein	Significance	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Avg. Mass	Description
PGRMC1_HUMAN	200.00	66	41	40	21671	Membrane-associated progesterone receptor component 1
VDAC2_HUMAN	76.17	24	6	6	30348	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (Fragment)
VDAC1_HUMAN	52.29	32	7	7	30773	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1
ATP5A1_HUMAN	42.37	20	10	10	59751	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial
SLC25A24_HUMAN	40.25	10	5	5	53354	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1
NSF_HUMAN	39.23	9	6	6	82594	Vesicle-fusing ATPase
FAM213A_HUMAN	37.48	16	3	3	25764	Redox-regulatory protein FAM213A
ACSL1_HUMAN	34.67	7	5	5	77943	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1
STT3A_HUMAN	34.30	5	3	3	80530	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A
RPN1_HUMAN	32.22	11	6	6	68569	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1
VAT1_HUMAN	30.03	24	8	8	41920	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog
SQORDL_HUMAN	29.32	9	3	3	49961	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial
RPN2_HUMAN	28.97	5	3	3	69284	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2
UQCR2_HUMAN	27.57	11	4	4	48443	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial
MAOB_HUMAN	26.64	15	7	6	58763	Amine oxidase [flavin-containing] B
BAP31_HUMAN	26.17	12	3	3	27992	B-cell receptor-associated protein 31
SEC22B_HUMAN	25.68	21	4	4	24593	Vesicle-trafficking protein SEC22b
SURF4_HUMAN	24.05	17	3	3	21128	Surfeit 4
SEC11A_HUMAN	19.23	10	2	2	18651	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11
TMEM43_HUMAN	18.95	5	2	2	44876	Transmembrane protein 43
VDAC3_HUMAN	18.29	8	2	2	30659	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3
SFXN1_HUMAN	17.74	7	2	2	35619	Sideroflexin-1
CCT7_HUMAN	17.68	3	2	2	59367	T-complex protein 1 subunit eta
ARF4_HUMAN	16.44	24	3	2	14553	ADP-ribosylation factor 4 (Fragment)
GSTK1_HUMAN	16.27	13	2	2	25497	Glutathione S-transferase kappa 1
ACTB_HUMAN	10.20	47	15	1	41737	Actin, cytoplasmic 1

Tabla 3. Listado de proteínas que interactúan específicamente con PGRMC1 en ESC deciduizadas con protocolo largo (Long).

Protein	Significance	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Avg. Mass	Description
PGRMC1_HUMAN	200.00	81	50	50	21671	Membrane-associated progesterone receptor component 1
ATP5A1_HUMAN	200.00	19	9	9	59751	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial
VDAC1_HUMAN	200.00	36	8	8	30773	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1
VDAC2_HUMAN	200.00	20	6	6	31567	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2
MAOB_HUMAN	137.84	17	7	6	58763	Amine oxidase [flavin-containing] B
FAM213A_HUMAN	130.55	16	3	3	25764	Redox-regulatory protein FAM213A
VAT1_HUMAN	98.39	15	4	4	41920	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog
RPN2_HUMAN	90.75	6	3	3	69284	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2
RPN1_HUMAN	78.54	9	5	5	68569	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1
SLC16A3_HUMAN	77.09	9	4	4	49469	Monocarboxylate transporter 4
SERPINH1_HUMAN	70.59	18	6	6	46441	Serpin H1
SEC22B_HUMAN	69.55	17	3	3	24593	Vesicle-trafficking protein SEC22b
NCLN_HUMAN	69.21	6	3	3	62974	Nicalin
MAOA_HUMAN	65.45	8	4	3	59682	Amine oxidase [flavin-containing] A
ATP5F1_HUMAN	53.55	11	3	3	28909	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial
STT3A_HUMAN	34.58	3	2	2	80530	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A
GTR1_HUMAN	32.61	4	2	2	54084	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1
BAP31_HUMAN	32.49	7	2	2	27992	B-cell receptor-associated protein 31
ATP5O_HUMAN	31.85	11	2	2	23277	ATP synthase subunit O, mitochondrial
SFXN1_HUMAN	31.37	7	2	2	35619	Sideroflexin-1
GNB2_HUMAN	30.47	7	2	2	32408	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2
ATP5G1_HUMAN	28.99	29	2	2	8452	ATP synthase membrane subunit g
SQORDL_HUMAN	26.11	5	2	2	49961	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial
VAPA_HUMAN	24.55	10	2	2	27893	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A
SURF4_HUMAN	20.36	18	5	5	30394	Surfeit locus protein 4
RAB1A_HUMAN	8.90	13	2	1	22678	Ras-related protein Rab-1A
SLC25A24_HUMAN	7.23	7	3	3	53354	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1

Tabla 4. Listado de proteínas que interactúan específicamente con PGRMC1 en ESC deciduizadas con protocolo corto (Short).

RESULTADOS

Protein	Significance	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Avg. Mass	Description
PGRMC1_HUMAN	200.00	84	43	41	21671	Membrane-associated progesterone receptor component 1
VAT1_HUMAN	113.08	28	8	8	41920	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog
NSF_HUMAN	112.33	12	8	8	82594	Vesicle-fusing ATPase
SURF4_HUMAN	107.71	14	4	4	30394	Surfeit locus protein 4
VDAC2_HUMAN	105.63	14	4	4	31567	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2
VDAC1_HUMAN	102.21	36	8	8	30773	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1
ATP5A1_HUMAN	93.09	16	8	8	59751	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial
SERPINH1_HUMAN	76.89	15	5	5	46441	Serpin H1
RPN2_HUMAN	75.49	8	4	4	69284	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2
RPN1_HUMAN	71.38	13	7	7	68569	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1
SLC25A24_HUMAN	62.89	12	6	6	53354	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1
SEC22B_HUMAN	62.23	20	3	3	24593	Vesicle-trafficking protein SEC22b
BZW1_HUMAN	60.20	10	5	5	48043	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1
ARF4_HUMAN	59.57	17	2	2	14553	ADP-ribosylation factor 4 (Fragment)
CT7_HUMAN	30.93	3	2	2	59367	T-complex protein 1 subunit eta
ATP5O_HUMAN	30.92	11	2	2	23277	ATP synthase subunit O, mitochondrial
SFXN1_HUMAN	29.62	7	2	2	35619	Sideroflexin-1
STT3A_HUMAN	28.16	3	2	2	80530	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A
UBA52_HUMAN	27.87	20	2	2	14728	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40
SEC61A1_HUMAN	27.40	4	2	2	52265	Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1
FACE1_HUMAN	26.05	3	2	2	54813	CAAX prenyl protease 1 homolog
GPX8_HUMAN	24.94	10	2	2	23881	Probable glutathione peroxidase 8
ACTB_HUMAN	9.08	42	13	1	41737	Actin, cytoplasmic 1
RAB35_HUMAN	8.88	12	2	1	21214	Ras-related protein Rab-35 (Fragment)

Tabla 5. Listado de proteínas que interactúan específicamente con PGRMC1 en ESC no decidualizadas.

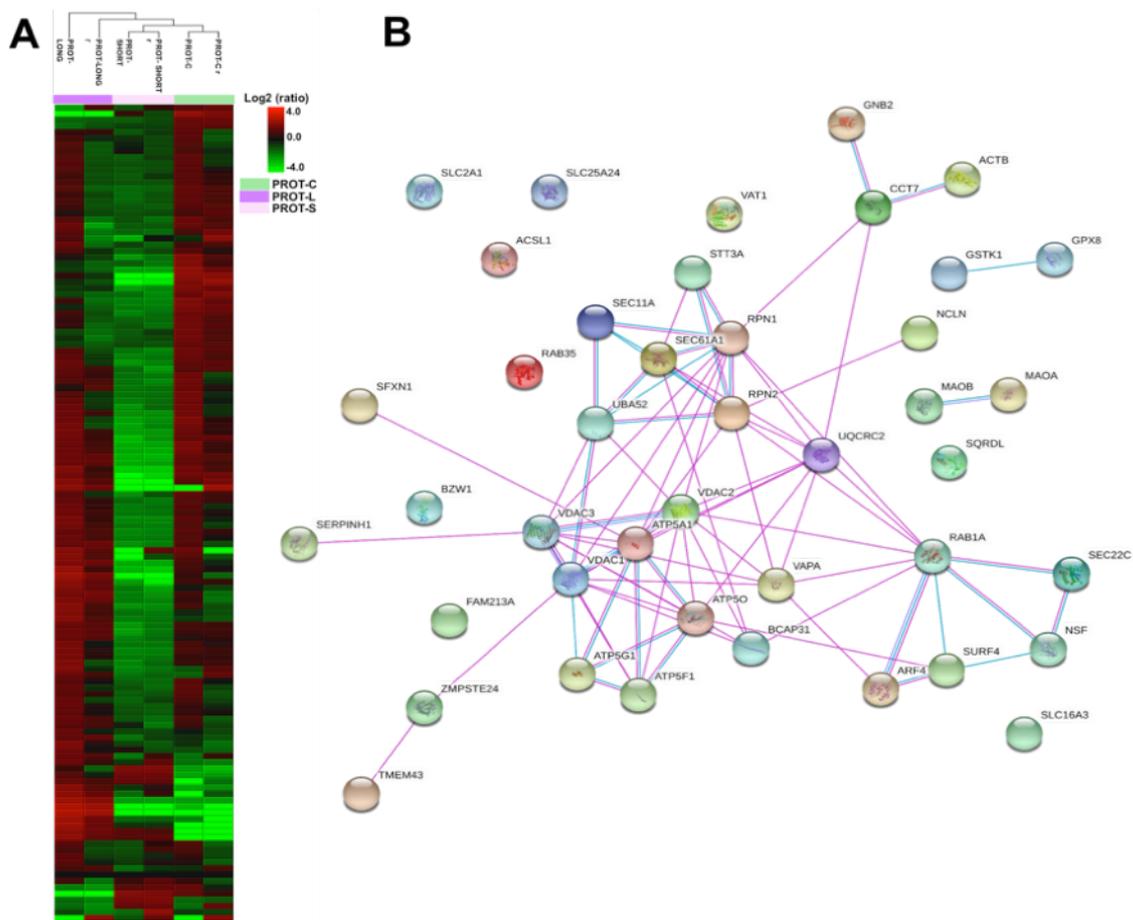
Con el fin de entender si las proteínas encontradas tuvieran alguna relación biológica entre todas ellas, hemos empleado las bases de datos String (Versión 10.0), Gene Ontology (Gene Ontology Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) y la herramienta Funrich (Version 3.1.3). String representa una base de datos de interacciones entre proteínas conocidas y predichas, incluyendo interacciones directas o físicas e indirectas o funcionales (Von Mering et al. 2003). Las interacciones entre proteínas provienen de bases de datos primarias como BioGRID, DIP, IntAct, MINTy de datos predichos. El Sistema de Clasificación PANTHER (Análisis de Proteína Mediante Relaciones Evolutivas) está diseñado para clasificar las proteínas (y sus genes) en base a los componentes celulares, los procesos biológicos, las funciones moleculares y los pathway, a fin de facilitar el análisis. La herramienta Funrich representa un software independiente utilizado principalmente para el enriquecimiento funcional y el análisis de redes de interacción de genes y proteínas.

El análisis de STRING reveló que la mayoría de las proteínas identificadas por espectrometría de masas, interactúan entre ellas de manera directa (física) e indirecta (funcionalmente) (Figura 38B). Dichas predicciones de interacción se

RESULTADOS

basan en bases de datos (Figura 38B, líneas azules) y determinaciones experimentales (Figura 38B, líneas rosas).

Según los análisis mediante Go Panther y Funrich, identificamos que los componentes celulares más significativos en los cuales residen la mayoría de las proteínas que interactúan con PGRMC1 son lisosomas y mitocondrias (Figura 38D), mientras que las funciones moleculares más representadas están relacionadas con actividad de transporte celular y actividad catalítica (Figura 38C, E). Las mismas funciones moleculares y los mismos procesos biológicos significativos se observaron tras el análisis por separado de cada grupo (Control, protocolo largo y corto), evidenciando también los mismos componentes celulares (mitocondrias y lisosomas). Aunque, en el caso del protocolo corto, también se identificaron procesos relacionados a procesos biológicos de óxido-reducción debido a una mayor representación de proteínas del complejo del ATP sintasa (ATP5A1, ATP5F1, ATP5G1 y ATP5O).



RESULTADOS

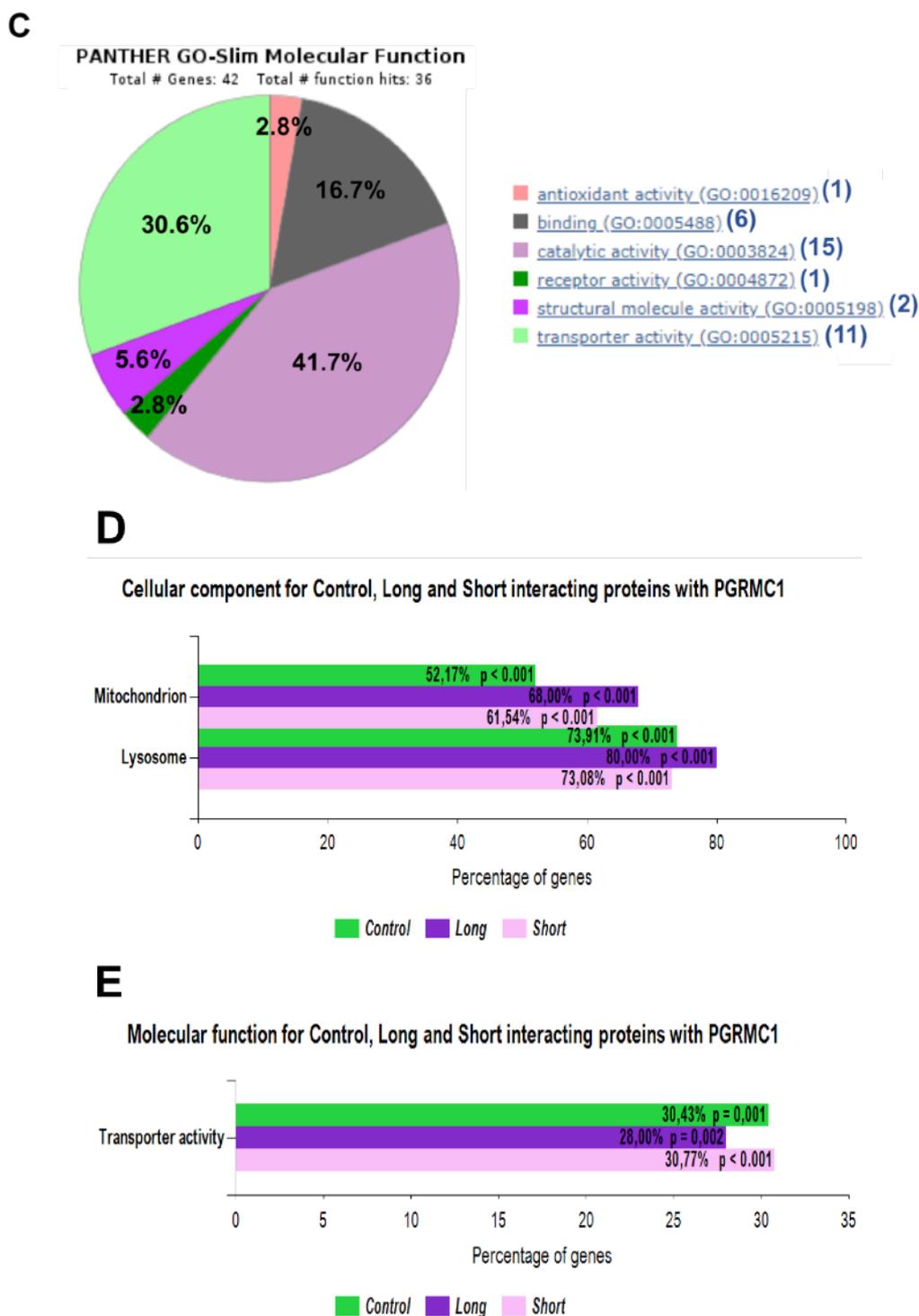
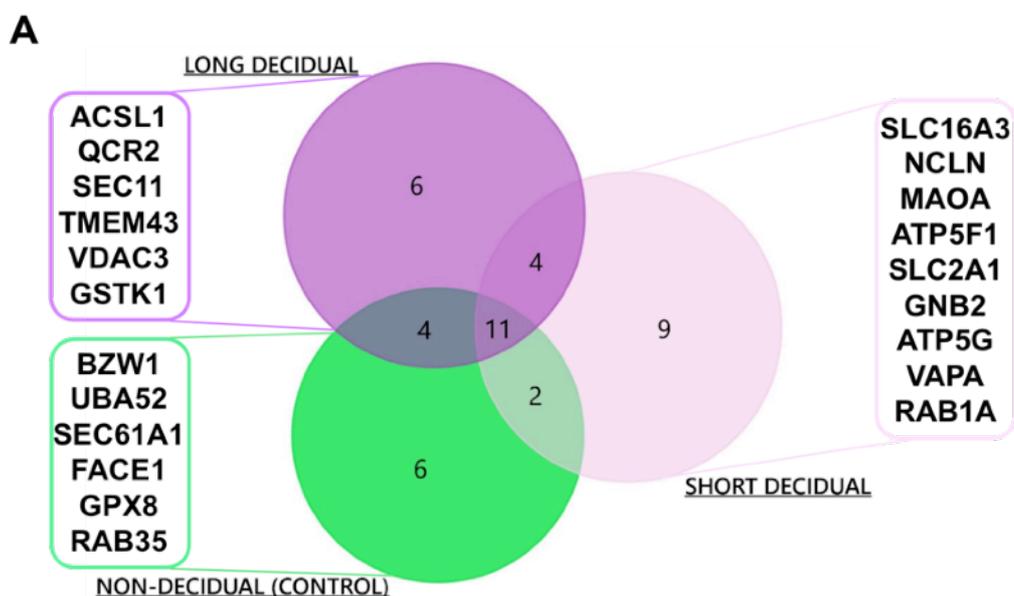


Figura 38. Heat map de todas las proteínas identificadas por espectrometría de masas en los pulldown de PGRMC1-GST llevados a cabo con extractos de proteínas de ESC Controles y decidualizadas con protocolo Largo y protocolo corto. En rojo están representadas las proteínas presentes y en verde las proteínas ausentes (A). La red de interacciones proteína-proteína para las proteínas específicas que interactúan con PGRMC1, identificadas en ndESC (CONTROL) ha sido mapeada buscando en la base de datos STRING (versión 10.0) con una puntuación de confianza mínima de 0,4. Las diferentes líneas de color indican interacciones conocidas basadas en las bases de datos (línea azul) y en la determinación experimental (línea rosa) (B). Las funciones moleculares y los procesos biológicos más significativos relacionados con las proteínas identificadas han sido analizados por Go Panther (C) (entre paréntesis está indicado el número de genes asociado a cada

RESULTADOS

función molecular) y la herramienta Funrich (Versión 3.1.3) (D-E) (Control, verde; ESC decidualizadas con protocolo Largo, morado; ESC decidualizadas con protocolo corto, rosa. Todos los análisis evidencian que PGRMC1 interacciona con proteínas que localizan en mitocondrias y lisosomas, con una función prevalentemente de transporte celular y actividad catalítica.

Después observamos que los tres grupos analizados comparten 11 proteínas (overlapped), mostrando cada uno un set de proteínas exclusivas (8 proteínas exclusivas del Control, 9 del protocolo corto (Short Decidual) y 6 del protocolo largo (Long Decidual) (Figura 39).



B Long and Short Common Proteins

- SURF4
- VAT1
- SLC25A24
- STT3A
- RPN1
- RPN2
- ATP5A1
- VDAC1
- VDAC2
- SEC22B
- FAM213A
- SQRDL
- MAOB
- BCAP31
- SFXN1

Figura 39. Diagrama de Venn que muestra las proteínas que interaccionan con PGRMC1 compartidas entre los varios grupos (Control, verde; protocolo largo (Long), morado; protocolo

RESULTADOS

corto (Short), rosa). En los recuadros se muestran las proteínas exclusivas de cada condición (A). Proteínas que interactúan con PGRMC1 en los protocolos de decidualización largo y corto. En negrita están remarcadas las proteínas elegidas para las validaciones (B).

Para las validaciones de los resultados obtenidos tras los experimentos de pulldown y de espectrometría de masas, hemos elegido dos proteínas que parecen interactuar con PGRMC1, solamente durante el proceso de decidualización (en ambos protocolos, largo y corto): MAOB y BCAP31.

MAOB es una mono-amino oxidasa, localizada en la membrana externa mitocondrial, que cataliza la desaminación oxidativa de monoaminas (como dopamina, serotonina y adrenalina) biogénicas y xenobióticas por liberación de peróxido. Está bien descrito que el gen MAOB es uno de los genes cuya expresión aumenta significativamente durante la decidualización (Aghajanova et al. 2011) (Garrido-Gomez et al. 2011b).

BCAP31 es una de las proteínas más abundantes del retículo endoplasmático (ER). Es una proteína chaperona que participa en la exportación de proteínas secretadas en el ER, el reconocimiento de proteína plegada anormalmente, en la degradación asociada con el retículo endoplásmico (ERAD) y en la apoptosis mediada por caspasa 8.

De tal manera la interacción entre PGRMC1 y las dos proteínas, MAOB y BCAP31, ha sido validada en ESC decidualizadas solo mediante el protocolo corto. Para ello hemos llevado a cabo dos estrategias distintas, empleando por un lado una inmunocitofluorescencia y por otro una Co-inmunoprecipitación (Co-IP).

Gracias a los experimentos de inmunocitofluorescencia, se ha revelado total ausencia de señal de MAOB y BCAP31 en las ESC no decidualizadas (ndESC, Control) (Figura 40A-B). En cambio, en las ESC decidualizadas (dESC), hemos evidenciado una clara co-localización (señal naranja) de las señales de BCAP1 y MAOB (rojo) en el citoplasma y a nivel perinuclear con la señal de PGRMC1 (verde) (Figura 40C-D).

Asimismo, las Co-IP llevadas a cabo inmunoprecipitando MAOB y BCAP31 a partir de extractos proteicos de células ESC decidualizadas, han confirmado que PGRMC1 podría estar interactuando con dichas proteínas durante el proceso de decidualización. El western blot (Figura 40E) nos reveló una leve banda del peso molecular correspondiente al monómero de PGRMC1 (23kDa), tanto en la

RESULTADOS

inmunoprecipitación anti-MAOB (IP α -MAOB) como en la inmunoprecipitación anti-BAP31 (IP α -BAP31). Sorprendentemente, también se identificó otra banda en la IP- α -MAOB, del mismo peso molecular que el dímero de PGRMC1, y una banda de menor peso molecular en la IP α -BAP31. Esto nos indica que la proteína MAOB podría interactuar con PGRMC1 dimerizado, mientras que alguna forma modificada postraduccionalmente de PGRMC1 podría estar interactuando con BAP31.

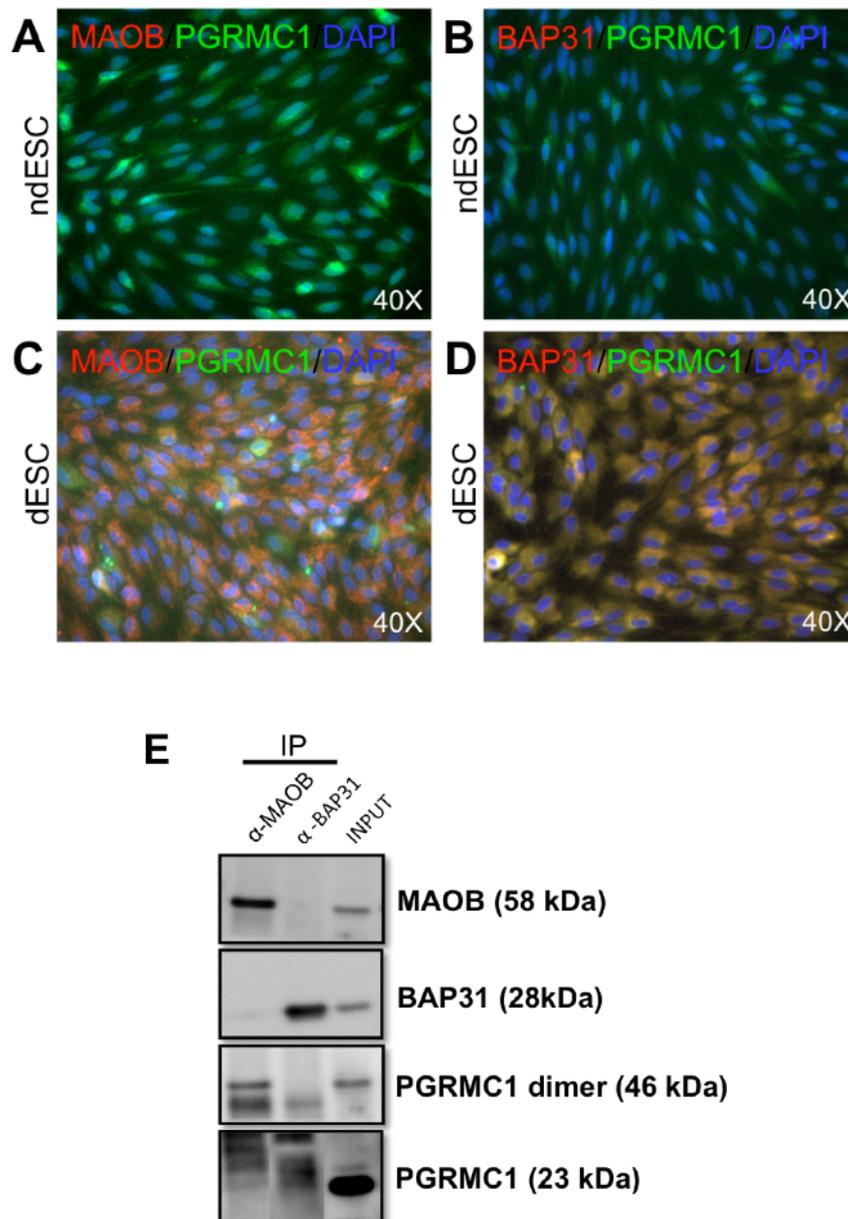


Figura 40. Validación de la interacción de PGRMC1 con MAOB y BAP31. (A-D) Las proteínas MAOB, BAP31 y PGRMC1 han sido localizadas por inmunocitofluorescencia en ndESC (A, B) y dESC (C, D). En las ndESC no se detectó ninguna señal ni de MAOB (A) ni de BAP31 (B). En cambio, la

RESULTADOS

expresión de ambas proteínas, MAOB y BAP31, aumenta en las dESC, y sus señales colocalizan con la señal de PGRMC1 (C y D respectivamente) (colocalización señales, naranja; PGRMC1, verde; MAOB y BAP31, rojo; DAPI, azul). (E) Co-IP realizadas inmunoprecipitando MAOB y BAP31 en extractos proteicos de dESC. El western blot revela que tanto la proteína MAOB como BAP31 inmunoprecipita con la proteína PGRMC1, como evidencia la leve banda del peso molecular correspondiente al monómero de PGRMC1 (23kDa). También se identificó otra banda en la IP- α -MAOB, del mismo peso molecular que el dímero de PGRMC1, y una banda de menor peso molecular en la IP α -BAP31.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Está bien establecido que los receptores de progesterona nucleares clásicos (nPR) contribuyen en la mayoría de los procesos de reproducción masculinos y femeninos (Luetjens et al. 2006), pero ha sido claramente demostrado que la progesterona también puede desempeñar sus acciones hormonales en células completamente desprovistas de sus receptores nucleares clásicos (Ehring et al. 1998) (J. Peluso et al. 2002). Se conoce muy bien cierta implicación de las acciones no clásicas de la progesterona en diferentes procesos biológicos y fisiológicos, como la regulación del comportamiento durante la actividad sexual (Frye et al. 2006), maduración meiótica (Finidori-Lepicard et al. 1981), la reacción acrosómica en los espermatozoides (Foresta, Rossato, and Di Virgilio 1993), así como el flujo de iones en las células epiteliales (G. Head et al. 1999), neuronas (Viéro et al. 2006) y músculo liso vascular (Barbagallo et al. 2001). En particular, el receptor no clásico de la progesterona PGRMC1, se ha visto que está implicado en diversos eventos fisiológicos, como la inhibición de la apoptosis y de la proliferación de células de la granulosa/células luteales, regulación del desarrollo del folículo antral, inhibición de la actividad neuronal de la GnRH (John J. Peluso 2013) (Viéro et al. 2006) (Bashour and Wray 2012) o el aumento de la síntesis de colesterol (J J Peluso et al. 2004b). Además, se han identificado ciertas mutaciones sin sentido de PGRMC1 en humano, que resultan estar asociadas con fallo ovárico prematuro (FOP) (Mansouri et al. 2008). También se han identificado niveles diferentes de expresión de la proteína en el tejido ovárico humano de mujeres con síndrome de ovario poliquístico (SOP), apoyando la hipótesis de la implicación de PGRMC1 en el proceso de la esteroidogénesis.

Aunque el mecanismo de acción de PGRMC1 ha comenzado a estudiarse en los últimos años en células de la granulosa, poco se sabe de su función en el endometrio humano. Nuestro estudio se ha centrado en la caracterización de PGRMC1 en el endometrio humano demostrando su importancia en el proceso de decidualización.

La proteína SERBP1 también se ha visto tener cierta participación en las acciones apoptóticas de la progesterona, interactuando con PGRMC1. Esta interacción parece ser importante ya que la transfección de la secuencia de PGRMC1 que se une a SERBP1 en líneas de células de la granulosa inmortalizadas espontáneamente, no solamente interrumpe la interacción entre PGRMC1

DISCUSIÓN

endógeno y SERBP1, sino que también induce las células a entrar rápidamente en apoptosis, incluso en presencia de progesterona (John J. Peluso 2013).

En nuestro estudio, la evaluación inmunohistoquímica ha confirmado una expresión variable endometrial *in vivo* de PGRMC1 durante todo el ciclo menstrual, con una disminución de la señal en la fase secretora tardía en las células estromales, de acuerdo con los hallazgos previos donde analizamos una cohorte diferente de pacientes (Garrido-Gómez et al. 2014).

Debido a la alta expresión de PGRMC1 en ESCs en comparación con células epiteliales y su regulación crítica durante la fase secretora mediana endometrial, es probable que PGRMC1 juegue un papel clave en la decidualización.

La localización celular de PGRMC1 puede cambiar bajo diferentes condiciones fisiológicas en las células de la granulosa. Aunque se detecte expresión en la membrana plasmática de estas células, PGRMC1 aumenta en las células lúteas y localiza de manera difusa a lo largo del citoplasma y en el núcleo después de la inducción de la ovulación tras hCG en folículos de rata (J J Peluso et al. 2006). Además, PGRMC1 cambia su localización dinámicamente durante la maduración de los ovocitos. Específicamente, PGRMC1 comienza a asociarse con los cromosomas en proceso de condensación después de la ruptura de la membrana nuclear y se localiza en la región centromérica de los cromosomas en las fases de metafase I y II, mientras que en anafase/telofase se concentra en los cromosomas que se están separando, localizando en la zona media y en el cuerpo medio (Lodde and Peluso 2011) (Alberto M Luciano et al. 2010). De acuerdo con un análisis de secuencia de aminoácidos capaz de predecir los sitios de escisión, es posible que una escisión enzimática de los dominios extracelulares y transmembrana de PGRMC1 sea necesaria para poder translocarse al núcleo (John J Peluso, DeCerbo, and Lodde 2012).

PGRMC1 presenta un bajo peso molecular (monómero) de aproximadamente 25 kDa, pero también puede aparecer como formas de mayor peso molecular (≥ 50 kDa) (Falkenstein et al. 2001b) (J J Peluso et al. 2010) (Engmann et al. 2006a)(R. Lösel et al. 2005). Estas formas de mayor peso molecular representan dímeros/oligómeros (J J Peluso et al. 2010) (Kabe, Nakane, et al. 2016) (Kabe, Yamamoto, et al. 2016), con algunos incluso sometidos a sumoilación (John J Peluso, Lodde, and Liu 2012).

DISCUSIÓN

La exposición a estresores ambientales tales como la dioxina pueden aumentar los niveles de PGRMC1 (I. S. Ahmed, Rohe, Twist, Mattingly, et al. 2010). Esto puede ser una respuesta celular común al estrés. Del mismo modo, las células de la granulosa aisladas de mujeres que viven en ambientes altamente contaminados presentan niveles más altos de PGRMC1 (Cavallini et al. 2016). Además, las células cancerosas de ovario expresan altos niveles de PGRMC1, que esta predominantemente localizado en el núcleo (John J Peluso, Gawkowska, et al. 2009) (John J. Peluso et al. 2008). Se ha visto además que AG205, un antagonista de PGRMC1, altera la distribución celular de PGRMC1 aparentemente reduciendo su presencia dentro del núcleo. Dado que las formas de mayor peso molecular de PGRMC1 tienden a estar ubicadas en el núcleo (J J Peluso et al. 2010), el efecto de AG205 podría aumentar la presencia de las formas de bajo peso molecular y disminuir las de mayor peso molecular (Will, Liu, and Peluso 2017).

En este trabajo hemos analizado la localización subcelular de PGRMC1 y SERBP1 durante el proceso de decidualización. En el caso de SERBP1 se ha visto una expresión claramente difusa en el citoplasma de células endometriales estromales humanas, antes, durante, y después de la diferenciación a células deciduales, mientras que PGRMC1 primero ha sido localizada de manera dispersa por la célula y tras la decidualización se ha observado una acumulación a nivel perinuclear. Sin embargo, después de 4 días de decidualización *in vitro*, la tinción no fue homogénea, por lo tanto, no todas las células mostraron este cambio de localización de la proteína. Dicho patrón de expresión está de acuerdo con Zhang y cols. (Zhang et al. 2008)(Cahill 2007b), que encontró un patrón similar de PGRMC1 en ratones. Este comportamiento podría explicarse con el estado de diferenciación discrepante entre las células, ya que en la población decidual suele haber mucha heterogeneidad con diferentes estados de diferenciación de las células.

PGRMC1 ha sido anteriormente detectada en una variedad de compartimentos celulares, retículo endoplásmico, núcleo, citoplasma, membrana celular y mitocondrias (Cahill 2007). Su localización perinuclear sugiere una implicación en el metabolismo de los esteroides, activando el citocromo P450 en la membrana del retículo endoplásmico (Crudden, Loesel, and Craven 2005) (Oda et al. 2011) (Szczesna-Skorupa and Kemper 2011). Cuando hemos analizado la cantidad de proteína subcelular por Western blot en células endometriales

DISCUSIÓN

estromales, hemos encontrado una mayor cantidad de PGRMC1 y SERBP1 en las fracciones citoplásmicas tanto de las ndESC como de las dESC. A pesar de que PGRMC1 apenas se ha detectado en el núcleo, hemos encontrado mayor cantidad en la fracción nuclear de las dESC en comparación con las ndESC. Esta interesante localización nuclear de PGRMC1 en las dESC también ha sido encontrada en el macaco (Keator, Mah, and Slayden 2012) y durante la gestación temprana en el ratón (McCallum et al. 2016)(50), apoyando nuestros resultados y sugiriendo una posible función para PGRMC1 regulando directamente la expresión de un conjunto específico de genes distinto de los genes diana del receptor clásico nuclear de Progesterona durante la decidualización. Curiosamente, Nousiainen y cols. (Nousiainen et al. 2006) identificaron la presencia de PGRMC1 en husos mitóticos de ovocitos y Luciano y cols. (Alberto M Luciano et al. 2010) la co-localizaron con la aurora quinasa B fosforilada activa en cromosomas y en los centrómeros durante la maduración de los ovocitos.

Por lo tanto, la presencia de PGRMC1 en el núcleo de dESC podría estar relacionada con la regulación de la progresión del ciclo celular. Además, gracias a los experimentos de microarray y del enriquecimiento funcional de este trabajo, hemos revelado que la antagonización de PGRMC1 mediante AG205 durante la decidualización (P4BSA+AG205), genera una disminución significativa de los procesos biológicos relacionados con la localización de proteínas en los cromosomas, organización del huso mitótico y segregación de las cromátidas. Después de la estimulación con progesterona, las células del estroma sufren una diferenciación terminal que las convierte en células deciduales, que conlleva detención de la división celular. Por tanto, PGRMC1 podría mediar las acciones antimitóticas de la progesterona en este contexto, fomentando la parada celular durante el proceso de diferenciación.

Basado en nuestros estudios funcionales *in vitro* parece que sean necesarios bajos niveles de PGRMC1 en ESC humanas para que pueda haber una correcta decidualización, ya que la sobreexpresión de PGRMC1 inhibió significativamente todo el proceso, aunque el mecanismo a través del cual esto ocurre sigue estando pendiente de determinar. La inducción, por la sobreexpresión, de formas de PGRMC1 de mayores pesos moleculares, tanto en citoplasma como en núcleo, reconducibles a eventuales dímeros, podría ser una explicación. Puede que el

DISCUSIÓN

aumento de dimerización esté impidiendo a PGRMC1 interactuar con otras proteínas importantes, interfiriendo con las señalizaciones necesarias para que se genere una decidualización correcta. Un estudio más profundo a este respecto podría ayudar a delinear mejor este mecanismo de acción.

Las actividades de PGRMC1 y de SERBP1 podrían estar vinculadas en las ESC. Una interacción física de las dos proteínas se ha demostrado en células de la granulosa y luteales en rata (John J. Peluso et al. 2005). Debido a que SERBP1 no posee un dominio transmembrana, se ha propuesto que SERBP1 se una a una proteína transmembrana para formar un complejo de membrana receptor de progesterona (J J Peluso et al. 2004). Nuestros análisis de inmunofluorescencia sugieren que esta interacción entre PGRMC1 y SERBP1 puede ocurrir en el citosol de ndESC y dESC.

En este estudio, los resultados de los pulldown acoplados a espectrometría masas han identificado, además, novedosas proteínas con las cuales interaccionaría PGRMC1 en células estromales endometriales humanas, antes y después del proceso de decidualización. La mayoría de estas proteínas son proteínas de membrana que residen en mitocondrias (VDAC1, VDAC2, VDAC3, VAT1, VAT2, MAOA, MAOB, SLC25A24, SFXN1, ATP5O, ATP5A1, ATP5G1, ATP5F1, SQRDL, UQCR2, GSTK1), retículo endoplasmático (SEC22B, SERPINH1, RPN1, RPN2, SURF4, SEC61A1, SEC11A, STT3A, GPX8, NCLN, BAP31, GSTK1) y vesículas intracelulares (NSF, ARF4, GTR1/SLC2A1, VAPA).

Además, en las ESC no decidualizadas (ndESC) PGRMC1 interacciona con UBA52, un componente de la subunidad ribosomal 60s, implicada en la degradación asociada con el retículo endoplasmático (ERAD) de proteínas plegadas anormalmente. En este mismo proceso estaría implicada también la proteína BAP31, con la cual PGRMC1 interacciona solo durante el proceso de decidualización. Asimismo nuestros resultados revelan que PGRMC1 se asocia a determinadas chaperonas que actúan tanto en el correcto plegado (folding) de las proteínas (CCT7, participa en el plegado de varias proteínas como actina y tubulina) como en la degradación de proteínas plegadas de forma anormal (UBA52 y BAP31).

El endometrio ha sido tradicionalmente considerado como un objetivo de la acción de la hormona esteroidea pero no involucrada en la biosíntesis y

DISCUSIÓN

metabolismo de esteroides. Análisis transcriptómicos (Talbi et al. 2006) (Kao et al. 2003) han demostrado, sin embargo, que el tejido endometrial expresa actividades de varios miembros de la vía esteroidogénica, como STAR (Tsai et al. 2001), CYP11A1 (Tsai et al. 2001) (Rhee et al. 2003), HSD3B (Kao et al. 2003) (Vani et al. 2007), CYP17A1 (Berstein et al. 2002), HSD17B1 (Peltoketo, Nokelainen, et al. 1999) (Peltoketo, Luu-The, et al. 1999), HSD17B2 (Zeitoun et al. 1998) y CYP19A1 (Tseng et al. 1982). Por lo tanto, parece que el endometrio es un tejido que se une a los tradicionales órganos "esteroidogénicos", junto con los tejidos cardiacos y nerviosos y otros con capacidad esteroidogénica recientemente demostrada (Mellon and Griffin 2002) (Simpton, Cunliffe, and Hodgins 1983) (Kayes-Wandover and White 2000).

En nuestros experimentos de decidualización tras la utilización del antagonista AG205, la inhibición de PGRMC1 determinó un aumento significativo de los procesos biológicos relacionados a biosíntesis de acíl-CoA, esterol y colesterol. Dichos resultados podrían tener una conexión con otras proteínas identificadas por espectrometría de masas, que estarían relacionadas de manera directa o indirecta con PGRMC1. En las dESC (protocolo de estimulación largo) identificamos, por ejemplo, la proteína ACSL1, que es una isoenzima responsable entre el 50% y el 90% de la actividad total de las acíl-Coenzima A (acíl-CoA) sintetasas. Por lo tanto, esto reforzaría una de las funciones descritas para PGRMC1, relacionada con la esteroidogénesis, ya que la acíl-CoA se utiliza para la biosíntesis del colesterol.

En los resultados de microarray de expresión, encontramos que la decidualización en presencia del antagonista de PGRMC1 (AG205) disminuyó significativamente procesos biológicos relacionados al ensamblaje y la organización del nucleosoma. Paralelamente, hemos identificado en las dESC (protocolo de estimulación largo), una proteína llamada TMEM43, que se localiza en la envoltura nuclear. TMEM43 se requiere para que otra proteína, la emerina, pueda estar retenida en la membrana nuclear, mediando así el anclaje al citoesqueleto (Liang et al. 2011). Por otro lado, en las ndESC encontramos la proteína FACE1, localizada en la membrana nuclear y en el retículo endoplásmico (ER), que es una proteasa responsable del procesamiento de la Lamina A/C, desempeñando un rol en la organización de la envoltura nuclear. Como bien se sabe,

DISCUSIÓN

durante la decidualización, el núcleo de las células estromales sufre una profunda remodelación. De hecho, los cambios en el tamaño y en la forma nuclear también se asocian con la diferenciación celular y el desarrollo (Cohen, Hernandez, and Stewart 2008) (Margalit et al. 2005). Curiosamente, se ha visto que las proteínas de la lámina nuclear (A,B y C) tienen un papel importante en la modulación de la morfología nuclear (Walters, Bommakanti, and Cohen-Fix 2012)(Jevtić et al. 2015), aumentando la rigidez de la envoltura nuclear (Pajerowski et al. 2007), pudiendo afectar el transporte nuclear (Pajerowski et al. 2007) (Perez-Terzic et al. 2007) y la posible expresión genética (Pajerowski et al. 2007) (Constantinescu et al. 2006) (Constantinescu et al. 2006). Se cree entonces, que la expresión de la lámina nuclear y las proteínas estructurales asociadas facilitan los cambios estructurales, que pueden afectar la organización de la cromatina y la expresión génica (Melcer et al. 2012). Nuestros datos de transcriptómica y proteómica, podrían asociar PGRMC1 también a otra función, implicada en los cambios nucleares que las células ESC sufren durante el proceso de diferenciación durante la decidualización, aunque serían necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis.

PGRMC1 exhibe también un papel en el tráfico regulado de vesículas en múltiples tipos de células. Por ejemplo, PGRMC1 puede estar involucrado en la fusión regulada de vesículas que contienen receptores de netrina durante la guía embriológica del axón; neurotransmisores en uniones sinápticas; insulina en células beta pancreáticas; vesículas que contienen glucosa transportadora en el músculo y en células adiposas en respuesta a la insulina, etc. (Cahill, Jazayeri, Catalano, et al. 2016).

Runko y Kaprielian (Runko and Kaprielian 2004) identificaron la presencia de varios motivos consensos YXX (ϕ) (donde ϕ representa un aminoácido alifático) conservados en PGRMC1 y proteínas relacionadas de varios organismos, también conocidos en la literatura como motivos de activación de inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM). Se cree que estos motivos basados en tirosina están implicados en: 1) dirigir las proteínas de membrana integrales a los compartimentos de membrana; 2) internalización endocítica de receptores de membrana citoplásmica, después de la unión al ligando (Marks et al. 1997); 3) transporte de vesículas, interactuando con los complejos proteicos de éstas (Cahill 2007a). Además ha sido demostrado que PGRMC1 se requiere para la correcta localización en la membrana

DISCUSIÓN

del receptor EGFR (I. S. A. Ahmed, Chamberlain, and Craven 2012)(I. S. Ahmed, Rohe, Twist, and Craven 2010).

Según nuestros resultados, PGRMC1 interaccionaría en las ESC con proteínas que presentan prevalentemente una actividad de transporte. Es más, también hemos identificado proteínas que localizan en vesículas intracelulares (NSF, ARF4, GTR1/SLC2A1, VAPA). A la vez, la inhibición de PGRMC1 causa una disminución de los procesos biológicos relacionados con el establecimiento (targeting) de proteínas al retículo endoplasmático (ER).

Como bien descrito, la decidualización endometrial implica muchos cambios morfológicos e ultraestructurales de las células estromales: redondeo del núcleo, aumento del número de nucléolos, dilatación del retículo endoplasmático rugoso y del aparato del Golgi, acumulación de glucógeno y de gotas de lípidos en el citoplasma en extensión (Kajihara et al. 2014) y aumento en el número de fagosomas y lisosomas (Cornillie, Lauweryns, and Brosens 1985). Teniendo en consideración dichos aspectos de la decidualización endometrial, todos estos datos, juntos con las evidencias ya publicadas, hipotetizamos que PGRMC1 podría, efectivamente jugar un rol muy importante en el endometrio en procesos endocíticos que generan tráfico vesicular y de membranas, en particular durante la decidualización, aunque esto no se haya demostrado.

Con respecto a SERBP1, proteína de fijación al ARNm de SERPINA 1, analizada en este estudio y muy bien conocida como proteína que interacciona con PGRMC1, tras los experimentos de pulldown no ha sido detectada en ninguna condición. Pero, sorprendentemente los análisis por espectrometría identificaron la proteína SERPINAH1. Probablemente PGRMC1 estaría implicada en la regulación post-transcripcional de la SERPINA1, interaccionando con su proteína de fijación correspondiente SERBP1, y luego después de la traducción, en su transporte y localización en el retículo endoplasmático.

Muy importante es destacar la desventaja de la producción de nuestra proteína de fusión, PGRMC1-GST, en un sistema procariota. *E. Coli* es seguramente el modelo ideal para la producción de proteínas de fusión, gracias al cual se pueden alcanzar los niveles más altos de productividad de nuestra proteína de interés. Sin embargo, también conlleva limitaciones. Muchas proteínas requieren para su función la inclusión de modificaciones postraduccionales (como glicosilación,

DISCUSIÓN

fosforilación, sumoilación), que no pueden llevarse a cabo en organismos procariotas. Está bien descrito, por ejemplo, que PGRMC1 presenta sitios de fosforilación y sumoilación (Cahill, Jazayeri, Kovacevic, et al. 2016) (Kabe, Nakane, et al. 2016), que regulan cambios conformacionales de la proteína. Por lo tanto, la falta de dichas modificaciones en nuestras proteínas de fusión, empleada para llevar a cabo los experimentos de pulldown para la identificación de nuevas interacciones, podría haber causado pérdida de proteínas que interaccionarían con PGRMC1, sobretudo proteínas nucleares que suelen estar reguladas por fosforilación. Para solventar esta falta, se podrían aplicar otros sistemas más sofisticados de interacción proteína-proteína *in vivo*, como la técnica de identificación de biotina dependiente de la proximidad, BioID (proximity-dependent biotin identification) (Roux et al. 2012), combinada con espectrometría de masas. De tal manera se tendría una representación de interacciones más aproximada a lo que ocurriría *in vivo*.

Estudios recientes revelan que el dominio de unión al citocromo b5/hemo es requerido para la formación de las formas de alto peso molecular de PGRMC1 (es decir, dímeros/oligómeros) (Kabe, Nakane, et al. 2016) (Kabe, Yamamoto, et al. 2016). Dichos dímeros/oligómeros son el resultado de una molécula de hemo que se une a un monómero de PGRMC1 (en el dominio de unión del citocromo b5). A su vez este monómero interacciona con un complejo PGRMC1-hemo adyacente. (Kabe, Nakane, et al. 2016) (Kabe, Yamamoto, et al. 2016).

AG205 compete con hemo interactuando con el dominio de unión a citocromo b5/hemo de PGRMC1 (I. S. Ahmed, Rohe, Twist, Mattingly, et al. 2010) lo que podría interrumpir los dímeros/oligómeros de PGRMC1 inducida por el antagonista.

En nuestros experimentos hemos identificado que PGRMC1 interacciona durante el proceso de decidualización con la subunidad 2 del ubiquinol-citocromo b-c1 reductasa (QRC2), enzima que cataliza la transferencia de electrones desde el ubiquinol al citocromo c, durante la respiración mitocondrial, jugando un papel crítico en la generación de ATP. Este último, una vez producido, podrá difundir a través de la membrana externa mitocondrial al citoplasma, gracias al canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC). PGRMC1, resulta interaccionar también con dichas proteínas VDAC (VDAC1, VDAC2) en las dESC.

DISCUSIÓN

La interfaz feto-materna se define como la interacción entre el endometrio decidualizado y las células del trofoblasto invasivo y extraveloso. Dicha interfaz está expuesta a grandes cambios en la tensión de oxígeno durante el embarazo e induce una gran cantidad de especies reactivas del oxígeno (ROS) intracelulares, como el superóxido y peróxido de hidrógeno (Almada et al. 2017). El aumento de su producción o un metabolismo reducido, generan estrés oxidativo. Las ROS están involucradas en el metabolismo celular, cómo por ejemplo en la cadena respiratoria mitocondrial, donde son generadas continuamente por las células del endometrio (Ruder et al. 2008). Dichas señales de estrés oxidativo se generan en respuesta a la remodelación intensa del tejido endometrial, generando la afluencia de células inflamatorias y cambios dinámicos en perfusión y tensión de oxígeno.

La generación de ROS es contrarrestada por la acción de las enzimas antioxidantes, como superóxido dismutasas (SOD), que las convierten en peróxido de hidrógeno. Mediante Inmunotinción intensiva para cobre, zinc y manganeso-SOD se ha encontrado en ESC decidualizadas durante el embarazo temprano (Sugino 2007) una alta presencia de estas enzimas antioxidantes en dichas células.

Las ESC decidualizadas rodean y envuelven el embrión y, su resistencia notable al daño oxidativo celular asegura que el embarazo está protegido contra estos estresores ambientales (Birgit Gellersen and Brosens 2014). En realidad, las ESC decidualizadas son notablemente resistentes a la muerte celular oxidativa, comparado con ESC indiferenciadas (Kajihara et al. 2006). Estos hallazgos sugieren que en el endometrio la decidualización regula no solo la invasión embrionaria y la homeostasis tisular, si no que presenta también una elevada resistencia al estrés oxidativo (Okada, Tsuzuki, and Murata 2018).

Nuestros resultados indican que PGRMC1 podría estar implicada en la protección de las ESC al estrés oxidativo generado durante la profunda remodelación que sufre el endometrio. De hecho, este estudio ha revelado que PGRMC1 interacciona en ndESC con la glutatión peroxidasa 8 (GPX8) y en dESC con la glutatión transferasa Kappa 1 (GSTK1), las monoaminooxidasas A y B (MAOA y MAOB), y FAM213 (Miembro de la familia con secuencia similar 213), un importante antioxidante. El ciclo red-ox del glutatión es la mayor fuente de protección contra bajos niveles de estrés oxidativo. La glutatión peroxidasa es una enzima que cataliza la reducción de diferentes hidroperóxidos (ROOH y H₂O₂)

DISCUSIÓN

usando glutatión reducido (GSH), contribuyendo así a la protección de las células contra el daño oxidativo. Por otro lado, las monoaminooxidasas (MAOA, MAOB) son enzimas que catalizan la oxidación de monoaminas por liberación de peróxido de hidrogeno, cuya expresión resulta aumentada durante la decidualización.

Además hemos visto que antagonizando PGRMC1 durante la decidualización mediante AG205, disminuye de manera estadísticamente significativa la expresión de la superóxido dismutasa 3 (SOD3) y aumenta la expresión de MAOA y MAOB, aumentando también los procesos biológicos de actividad mitocondrial celular. La enzima SOD en las células del estroma endometrial humano aumenta con la decidualización y se cree que es un componente importante de la implantación embrionaria (Sugino et al. 1996) (Sugino et al. 2000).

Muy interesante también es la identificación de la proteína SLC25A24 en los pulldown de todas las condiciones, ndESC y dESC (protocolos largo y corto). Esta proteína media el intercambio electroneutral reversible de Mg-ATP o Mg-ADP contra iones de fosfato, catalizando la captación neta o flujo de nucleótidos de adenina a través de la membrana interna mitocondrial. El transporte de nucleótidos está inactivo cuando los niveles de calcio citosólico son bajos y se activa por un aumento en los niveles de calcio citosólico. SLC25A24 podría desempeñar un papel en la protección de las células contra la muerte celular inducida por el estrés oxidativo, probablemente promoviendo la formación de precipitados de fosfato de calcio en la matriz mitocondrial y, de ese modo, amortiguando los niveles de calcio en la matriz mitocondrial.

Durante la transición de ndESC a dESC, las células endometriales sufren un cambio drástico en el metabolismo de la glucosa. La absorción de esta última está determinada por los transportadores de glucosa, GLUT, y muchos de éstos han sido identificados en el estroma endometrial (Antonina I. Frolova and Kelle H. Moley, 2011). El transporte de glucosa desde la circulación materna al lumen uterino es esencial para el embarazo. Se ha visto que entre los varios transportadores GLUT, el SLCA1 es el más abundante en las ESC, aumentando significativamente en las dESC (Antonina I. Frolova and Kelle H. Moley, 2011) (Schneider et al., 1981). De hecho, SLCA1 es indispensable para la decidualización y parece estar regulado por la P4 (Haijun Gao, 2009). En nuestros experimentos de pulldown hemos identificado

DISCUSIÓN

dicha proteína, SLCA1, en las células dESC. Esto nos indica que PGRMC1 podría también estar implicado en la regulación de este transportador de glucosa.

Con todos estos datos, hemos desarrollado una hipótesis de funcionamiento de PGRMC1 en las células estromales del endometrio humano (Figura 41). Antes de decidualizarse, una célula estromal (ndESC) presentaría el receptor PGRMC1, probablemente en forma dimérica, localizado prevalentemente en citoplasma y membrana plasmática, donde estaría implicado en procesos de transporte vesicular y mitocondriales. Con el aumento de la concentración de la progesterona, en una célula endometrial decidualizada (dESC), PGRMC1 aumentaría su localización perinuclear en el retículo endoplasmático. La sobreexpresión de este receptor inhibe la decidualización de las ESC, aumentando también su forma dimérica. Por otro lado, la utilización de su antagonista AG205, conocido para inhibir su dimerización, en presencia de los estímulos de decidualización, no altera la diferenciación de las ESC. Es probable que, para que una célula pueda llevar a cabo su diferenciación a célula decidual, necesite que PGRMC1 esté en forma monomérica y pueda interactuar con determinadas y diferentes proteínas. En las ESC, en procesos de diferenciación o ya diferenciadas (dESC), PGRMC1 podría estar implicada en síntesis de acil-CoA; acción antioxidante que hace dichas células más resistentes al aumento de especies reactivas del oxígeno y aumento del tráfico vesicular, contribuyendo a la profunda remodelación de la célula que esta decidualizándose. Las múltiples funciones que podría estar desempeñando nuestra proteína se deben probablemente a los diferentes ligandos que PGRMC1 une. Queda por definir cuáles de ellos, entre todos estos procesos en el que estaría implicado este receptor, depende de una activación directa por parte de la Progesterona.

En conclusión, este estudio descriptivo y funcional revela un patrón dinámico de expresión de PGRMC1 en el endometrio humano durante todo el ciclo menstrual, delineando diferentes funciones para dicha proteína, destacando una nueva implicación de PGRMC1 en el proceso de decidualización humana. Aún no queda clara su relación con la progesterona y si su unión es imprescindible para su activación y función. Claramente, se necesita más investigación en este receptor para describir su mecanismo molecular de acción, para finalmente entender su complejo papel durante el proceso de decidualización humana.

DISCUSIÓN

El deterioro del proceso de decidualización se asocia con infertilidad, abortos involuntarios recurrentes y trastornos útero-placentarios. Por lo tanto, se espera que el conocimiento más detallado y profundo con respecto a la decidualización a lo que contribuye este receptor no clásico de la progesterona, un proceso tan complejo, ayude a mejorar las tasas de éxito en las técnicas de reproducción asistida (ART) y a establecer una base para el desarrollo de nuevos tratamientos en la práctica clínica.

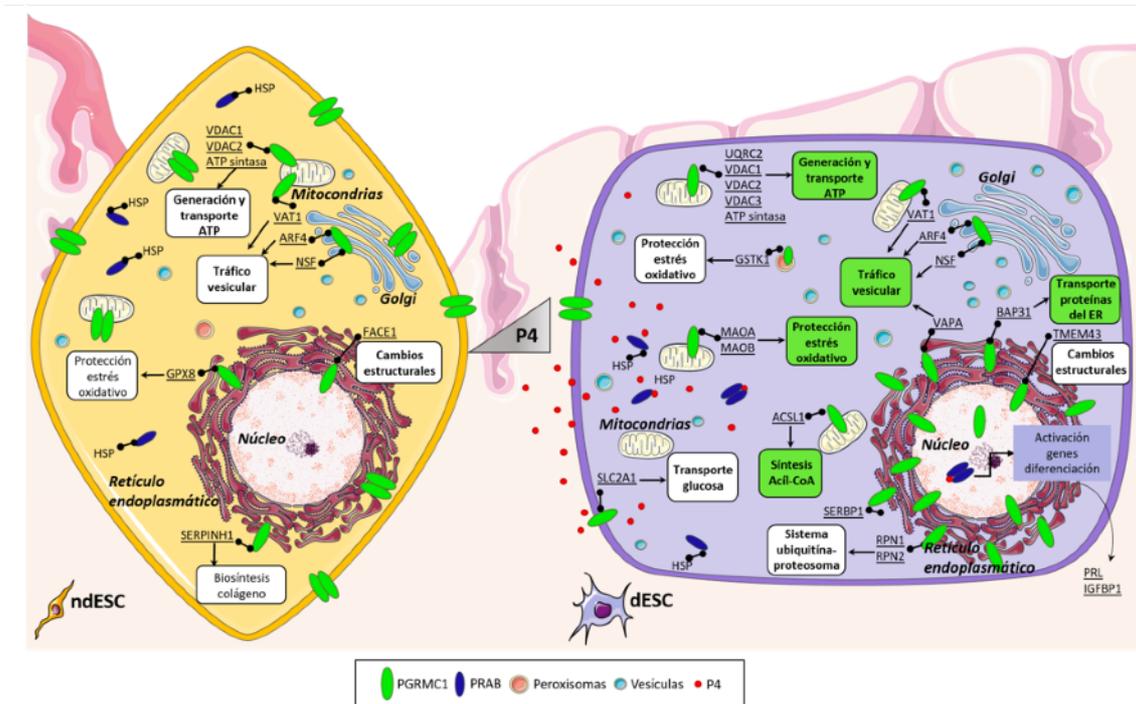


Figura 41. Resumen hipotético de los procesos en los que podría estar implicado PGRMC1 en el estroma endometrial durante la decidualización. En una célula estromal no decidualizada (ndESC), el receptor PGRMC1 está localizado prevalentemente en citoplasma y membrana plasmática, probablemente en forma dimérica. PGRMC1 interacciona en estas células con diferentes proteínas implicadas en: generación y transporte de ATP (VDAC1, VDAC2 y ATP sintasa), tráfico vesicular (VAT1, ARF4 y NSF); protección contra el estrés oxidativo (GPX8); biosíntesis de colágeno (SERPINH1); cambios estructurales de la envoltura nuclear (FACE1). Por otro lado, el receptor clásico de P4 (PRAB), en ausencia de su ligando, se encuentra unido en el citoplasma a la proteína HSP. Con el aumento de la concentración de la progesterona, en una célula endometrial decidualizada (dESC), PGRMC1 aumenta su localización perinuclear en el retículo endoplasmático. En estas células, en procesos de diferenciación o ya diferenciadas, PGRMC1 interacciona con más proteínas implicadas: en generación y transporte de ATP (UQRC2, VDAC1-3 y ATP sintasa); tráfico vesicular (VAT1, ARF4, NSF y VAPA); transporte de proteínas del retículo endoplasmático (BAP31); protección contra el estrés oxidativo (MAOA, MAOB, GSTK1); síntesis de acil-CoA (ACSL1); activación de genes de diferenciación (RPN1, RPN2); activación de genes de diferenciación (RPN1, RPN2). El receptor clásico de P4 (PRAB) se encuentra unido a la proteína HSP en el citoplasma.

DISCUSIÓN

transporte de glucosa (SLCA1); sistema ubiquitina-proteosoma (RPN1 y RPN2); cambios estructurales de la envoltura nuclear (TMEM43). La P4 entra en la célula en proceso de decidualización, se une a su receptor clásico PRAB, y esto hace que el receptor dimerize, entre en el núcleo y active la transcripción de los genes específicos de diferenciación. Como resultado, la ESC empieza a secretar prolactina (PRL) y IGFBP1, reestructurándose completamente y convirtiéndose en una dESC.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- I. PGRMC1, junto a su proteína asociada SERBP1 tienen una expresión variable en el endometrio humano durante el ciclo menstrual, co-localizándose ambas en el estroma. PGRMC1 cambia su localización durante el proceso de decidualización, encontrándose principalmente en una localización perinuclear y nuclear. Esto sugiere que su forma nuclear, modificada postranscripcionalmente tras el estímulo de la progesterona, podría estar implicada en la remodelación de la célula estromal durante su diferenciación decidual.
- II. La sobreexpresión de PGRMC1 en las ESC inhibe el proceso de decidualización *in vitro*, induciendo un aumento de la dimerización de dicho receptor. Por otro lado, en ausencia de entrada de P4 en las ESC, la activación de los receptores no clásicos de membrana de la P4 y el antagonista de PGRMC1, que impide la dimerización del receptor, fueron capaces de inducir los cambios celulares típicos de decidualización. Esto indica que PGRMC1 estaría directamente implicada en el proceso de decidualización probablemente en forma monomérica.
- III. La presencia del antagonista de PGRMC1 durante los estímulos de decidualización mediante un protocolo largo, genera abundantes cambios transcriptómicos, reforzando el papel de esta proteína en el proceso de decidualización.
- IV. PGRMC1 interacciona con 24 proteínas específicas en ndESC, 26 proteínas en ESC decidualizadas con el protocolo largo y 27 proteínas en ESC decidualizadas con el protocolo corto. Los dos protocolos de decidualización, además, determinan diferentes interacciones proteicas específicas de PGRMC1, lo que sugiere distintos roles de dicha proteína a lo largo del proceso de decidualización.
- V. Las proteínas identificadas que interactúan con PGRMC1 en las ESC fueron principalmente proteínas de lisosomas y mitocondrias, relacionadas con

CONCLUSIONES

actividad de transporte celular y actividad catalítica. De hecho, hemos identificado que el antagonista de PGRMC1 induce un aumento significativo de los procesos relacionados con biosíntesis del colesterol, acetyl-CoA y transporte intra-Golgi mediados por vesículas durante el proceso de decidualización.

VI. En ausencia de la entrada de P4 en las ESC, la inhibición de la actividad de PGRMC1 y la activación de los receptores no clásicos de membrana de la P4, determinaron además un aumento significativo de todos los procesos asociados a actividad mitocondrial y disminución de actividad de transporte intracelular. Todo eso indica que PGRMC1 podría desempeñar, en las ESC, un papel de transporte y obtención de energía, procesos biológicos importantes durante la profunda remodelación que sufren las células estromales durante la decidualización.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Hafiz Hany A, and Kathryn B Horwitz. 2012. "Control of Progesterone Receptor Transcriptional Synergy by SUMOylation and DeSUMOylation." *BMC molecular biology* 13(1): 10.
- Abdel-Hafiz Hany A, and Kathryn B Horwitz . 2014. "Post-Translational Modifications of the Progesterone Receptors." *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 140: 80–89.
- Adams, T E, R L Norman, and H G Spies. 1981. "Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Binding and Pituitary Responsiveness in Estradiol-Primed Monkeys." *Science (New York, N.Y.)* 213(4514): 1388–90.
- Aghajanova, L et al. 2011. "Unique Transcriptome, Pathways, and Networks in the Human Endometrial Fibroblast Response to Progesterone in Endometriosis." *Biology of reproduction* 84(4): 801–15.
- Ahmed, Ikhlas S, Hannah J Rohe, Katherine E Twist, Marlene N Mattingly, et al. 2010. "Progesterone Receptor Membrane Component 1 (Pgrmc1): A Heme-1 Domain Protein That Promotes Tumorigenesis and Is Inhibited by a Small Molecule." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 333(2): 564–73.
- Ahmed, Ikhlas S A, Cora Chamberlain, and Rolf J Craven. 2012. "S2R(Pgrmc1): The Cytochrome-Related Sigma-2 Receptor That Regulates Lipid and Drug Metabolism and Hormone Signaling." *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 8(3): 361–70.
- Ahmed, Ikhlas S, Hannah J Rohe, Katherine E Twist, and Rolf J Craven. 2010. "Pgrmc1 (Progesterone Receptor Membrane Component 1) Associates with Epidermal Growth Factor Receptor and Regulates Erlotinib Sensitivity." *The Journal of biological chemistry* 285(32): 24775–82.
- Aiyer, M S, G Fink, and F Greig. 1974. "Changes in the Sensitivity of the Pituitary Gland to Luteinizing Hormone Releasing Factor during the Oestrous Cycle of the Rat." *The Journal of endocrinology* 60(1): 47–64.
- Almada, M. et al. 2017. "Anandamide Oxidative Metabolism-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis." *Apoptosis* 22(6): 816–26.
- Alonso, G et al. 1988. "Axons Containing a Prolactin-like Peptide Project into the Perivascular Layer of the Median Eminence: An Immunocytochemical Light and Electron Microscope Study in Adult and Infant Rats." *Neuroendocrinology* 48(1): 39–44.
- Andersen, J R. 1990. "Decidual Prolactin. Studies of Decidual and Amniotic Prolactin in Normal and Pathological Pregnancy." *Danish medical bulletin* 37(2): 154–65.
- Aplin, John D. 2000. "The Cell Biological Basis of Human Implantation." *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 14(5): 757–64.
- Balash, J, F Fábregues, M Creus, and J A Vanrell. 1992. "The Usefulness of Endometrial Biopsy for Luteal Phase Evaluation in Infertility." *Human reproduction (Oxford, England)* 7(7): 973–77.
- Barbagallo, Mario et al. 2001. "Vascular Effects of Progesterone : Role of Cellular Calcium Regulation." *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 37(1): 142–47.
- Bashour, Nicholas Michael, and Susan Wray. 2012. "Progesterone Directly and Rapidly Inhibits GnRH Neuronal Activity via Progesterone Receptor Membrane Component

BIBLIOGRAFIA

- 1." *Endocrinology* 153(9): 4457-69.
- Behera, Millie A. et al. 2009. "Progesterone Stimulates Mitochondrial Activity with Subsequent Inhibition of Apoptosis in MCF-10A Benign Breast Epithelial Cells." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 297(5): E1089-96.
- Bell, S C, S R Patel, J A Jackson, and G T Waites. 1988. "Major Secretory Protein of Human Decidualized Endometrium in Pregnancy Is an Insulin-like Growth Factor-Binding Protein." *The Journal of endocrinology* 118(2): 317-28.
- Ben-Jonathan, N, J L Mershon, D L Allen, and R W Steinmetz. 1996. "Extrapituitary Prolactin: Distribution, Regulation, Functions, and Clinical Aspects." *Endocrine reviews* 17(6): 639-69.
- Ben-Jonathan, Nira, Christopher R LaPensee, and Elizabeth W LaPensee. 2008. "What Can We Learn from Rodents about Prolactin in Humans?" *Endocrine reviews* 29(1): 1-41.
- Berstein, Lev M et al. 2002. "CYP17 Genetic Polymorphism in Endometrial Cancer: Are Only Steroids Involved?" *Cancer letters* 180(1): 47-53.
- Bishop, C V et al. 2012. "Microarray Analysis of the Primate Luteal Transcriptome during Chorionic Gonadotrophin Administration Simulating Early Pregnancy." *Molecular human reproduction* 18(4): 216-27.
- Bohn, H, and W Kraus. 1980. "Isolation and Characterization of a New Placenta Specific Protein (PP12) (Author's Transl)." *Archives of gynecology* 229(4): 279-91.
- Brar, A K et al. 1997. "Progesterone-Dependent Decidualization of the Human Endometrium Is Mediated by CAMP." *Endocrine* 6(3): 301-7.
- Brar, A K, S Handwerger, C A Kessler, and B J Aronow. 2001. "Gene Induction and Categorical Reprogramming during in Vitro Human Endometrial Fibroblast Decidualization." *Physiological genomics* 7(2): 135-48.
- Brenner, Robert M, and Ov D Slayden. 2004. "Steroid Receptors in Blood Vessels of the Rhesus Macaque Endometrium: A Review." *Archives of histology and cytology* 67(5): 411-16.
- Briskin, Cathrin. 2013. "Progesterone Signalling in Breast Cancer: A Neglected Hormone Coming into the Limelight." *Nature reviews. Cancer* 13(6): 385-96.
- Brosens, J J, N Hayashi, and J O White. 1999. "Progesterone Receptor Regulates Decidual Prolactin Expression in Differentiating Human Endometrial Stromal Cells." *Endocrinology* 140(10): 4809-20.
- Brosens, Jan J., Robert Pijnenborg, and Ivo a. Brosens. 2002. "The Myometrial Junctional Zone Spiral Arteries in Normal and Abnormal Pregnancies." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 187(5): 1416-23.
- Bulmer, J N, M Longfellow, and A Ritson. 1991. "Leukocytes and Resident Blood Cells in Endometrium." *Annals of the New York Academy of Sciences* 622: 57-68.
- Bunch, Kristen et al. 2014. "Expression Patterns of Progesterone Receptor Membrane Components 1 and 2 in Endometria from Women with and without Endometriosis." *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 21(2): 190-97.
- Cahill, Michael A. 2007. "Progesterone Receptor Membrane Component 1: An Integrative Review." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 105(1-5): 16-36.

BIBLIOGRAFIA

- Cahill, Michael A., Jalal A. Jazayeri, Susan M. Catalano, et al. 2016. "The Emerging Role of Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1) in Cancer Biology." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1866(2): 339–49.
- Cahill, Michael A., Jalal A. Jazayeri, Zaklina Kovacevic, and Des R. Richardson. 2016. "PGRMC1 Regulation by Phosphorylation: Potential New Insights in Controlling Biological Activity." *Oncotarget* 7(32): 50822–27.
- Cai, Zailong, and Carlos Stocco. 2005. "Expression and Regulation of Progestin Membrane Receptors in the Rat Corpus Luteum." *Endocrinology* 146(12): 5522–32.
- Carter, A M et al. 2004. "The Insulin-like Growth Factor System in Mammalian Pregnancy--a Workshop Report." *Placenta* 25 Suppl A: S53-6.
- Cavallini, Aldo et al. 2016. "The Effects of Chronic Lifelong Activation of the AHR Pathway by Industrial Chemical Pollutants on Female Human Reproduction." ed. Juha Tuukkanen. *PloS one* 11(3): e0152181.
- Cha J, Vilella F, Dey S, Simón C. 2013. "Molecular Interplay in Successful Implantation. In Ten Critical Topics in Reproductive Medicine." *Science/AAAS*.
- Chen, Jenny I C et al. 2009. "Proteomic Characterization of Midproliferative and Midsecretory Human Endometrium." *Journal of proteome research* 8(4): 2032–44.
- Chhieng, D, and P Hui. 2011. "Normal Histology of Female Genital Organs." In *Current Clinical Pathology*, , 1–13.
- Christian, Mark, Xiaohui Zhang, et al. 2002. "Cyclic AMP-Induced Forkhead Transcription Factor, FKHR, Cooperates with CCAAT/Enhancer-Binding Protein Beta in Differentiating Human Endometrial Stromal Cells." *The Journal of biological chemistry* 277(23): 20825–32.
- Christian, Mark, Yvonne Pohnke, et al. 2002. "Functional Association of PR and CCAAT/Enhancer-Binding Protein Beta Isoforms: Promoter-Dependent Cooperation between PR-B and Liver-Enriched Inhibitory Protein, or Liver-Enriched Activatory Protein and PR-A in Human Endometrial Stromal Cells." *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 16(1): 141–54.
- Church, H J et al. 1996. "Laminins 2 and 4 Are Expressed by Human Decidual Cells." *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 74(1): 21–32.
- Clarke, Christine L, and J Dinny Graham. 2012. "Non-Overlapping Progesterone Receptor Cistromes Contribute to Cell-Specific Transcriptional Outcomes." ed. John P. Lydon. *PloS one* 7(4): e35859.
- Clarke, I J, J T Cummins, M E Crowder, and T M Nett. 1988. "Pituitary Receptors for Gonadotropin-Releasing Hormone in Relation to Changes in Pituitary and Plasma Gonadotropins in Ovariectomized Hypothalamo/Pituitary-Disconnected Ewes. II. A Marked Rise in Receptor Number during the Acute Feedback Effects of Estradiol." *Biology of reproduction* 39(2): 349–54.
- Clarke, I J, G B Thomas, B Yao, and J T Cummins. 1987. "GnRH Secretion throughout the Ovine Estrous Cycle." *Neuroendocrinology* 46(1): 82–88.
- Clements, J. et al. 1983. "Expression of the prolactin gene in human decidua-chorion." *Endocrinology* 112(3): 1133–34.
- Cloke, Brianna et al. 2008. "The Androgen and Progesterone Receptors Regulate Distinct

BIBLIOGRAFIA

- Gene Networks and Cellular Functions in Decidualizing Endometrium." *Endocrinology* 149(9): 4462-74.
- Cobrinik, David. 2005. "Pocket Proteins and Cell Cycle Control." *Oncogene* 24(17): 2796-2809.
- Cohen, Tatiana V., Lidia Hernandez, and Colin L. Stewart. 2008. "Functions of the Nuclear Envelope and Lamina in Development and Disease: Figure 1." *Biochemical Society Transactions* 36(6): 1329-34.
- Constantinescu, Dan et al. 2006. "Lamin A/C Expression Is a Marker of Mouse and Human Embryonic Stem Cell Differentiation." *Stem Cells* 24(1): 177-85.
- Contrò, Valentina, John R. Basile, and Patrizia Proia. 2015. "Sex Steroid Hormone Receptors, Their Ligands, and Nuclear and Non-Nuclear Pathways." *AIMS Molecular Science* 2(3): 294-310.
- Corbacho, A M, G Martínez De La Escalera, and C Clapp. 2002. "Roles of Prolactin and Related Members of the Prolactin/Growth Hormone/Placental Lactogen Family in Angiogenesis." *The Journal of endocrinology* 173(2): 219-38.
- Cornillie, F J, J M Lauweryns, and I A Brosens. 1985. "Normal Human Endometrium. An Ultrastructural Survey." *Gynecologic and obstetric investigation* 20(3): 113-29.
- Coutifaris, Christos et al. 2004. "Histological Dating of Timed Endometrial Biopsy Tissue Is Not Related to Fertility Status." *Fertility and sterility* 82(5): 1264-72.
- Crandall, Carolyn J, and Elizabeth Barrett-Connor. 2013. "Endogenous Sex Steroid Levels and Cardiovascular Disease in Relation to the Menopause: A Systematic Review." *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 42(2): 227-53.
- Creus, Montserrat et al. 2002. "Alphavbeta3 Integrin Expression and Pinopod Formation in Normal and Out-of-Phase Endometria of Fertile and Infertile Women." *Human reproduction (Oxford, England)* 17(9): 2279-86.
- Crowder, M E, and T M Nett. 1984. "Pituitary Content of Gonadotropins and Receptors for Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) and Hypothalamic Content of GnRH during the Perioovulatory Period of the Ewe." *Endocrinology* 114(1): 234-39.
- Croy, B Anne, Marianne J van den Heuvel, Angela M Borzychowski, and Chandrakant Tayade. 2006. "Uterine Natural Killer Cells: A Specialized Differentiation Regulated by Ovarian Hormones." *Immunological reviews* 214(1): 161-85.
- Crudden, Gerard, Ralf Loesel, and Rolf J Craven. 2005. "Overexpression of the Cytochrome P450 Activator Hpr6 (Heme-1 Domain Protein/Human Progesterone Receptor) in Tumors." *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 26(3): 142-46.
- Dalkin, A C et al. 1989. "The Frequency of Gonadotropin-Releasing-Hormone Stimulation Differentially Regulates Gonadotropin Subunit Messenger Ribonucleic Acid Expression." *Endocrinology* 125(2): 917-24.
- Daly, Douglas C., Ila a. Maslar, and Daniel H. Riddick. 1983. "Prolactin Production during in Vitro Decidualization of Proliferative Endometrium." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 145(6): 672-78.
- Denker, H.-W. 1993. "Implantation: A Cell Biological Paradox." *Journal of Experimental Zoology* 266(6): 541-58.

BIBLIOGRAFIA

- Derynck, and Wagner. 1995. "Cell Differentiation." *Current opinion in cell biology* 7(6): 843-44.
- DeSouza, Leroi et al. 2005. "Proteomic Analysis of the Proliferative and Secretory Phases of the Human Endometrium: Protein Identification and Differential Protein Expression." *PROTEOMICS* 5(1): 270-81.
- Díaz-Gimeno, Patricia et al. 2011. "A Genomic Diagnostic Tool for Human Endometrial Receptivity Based on the Transcriptomic Signature." *Fertility and sterility* 95(1): 50-60, 60.e1-15.
- Díaz-Gimeno, Patricia et al. 2013. "The Accuracy and Reproducibility of the Endometrial Receptivity Array Is Superior to Histology as a Diagnostic Method for Endometrial Receptivity." *Fertility and Sterility* 99(2): 508-17.
- Díaz-Gimeno, Patricia, Maria Ruíz-Alonso, David Blesa, and Carlos Simón. 2014. "Transcriptomics of the Human Endometrium." *The International journal of developmental biology* 58(2-4): 127-37.
- Domínguez, F. et al. 2009. "Proteomic Analysis of the Human Receptive versus Non-Receptive Endometrium Using Differential in-Gel Electrophoresis and MALDI-MS Unveils Stathmin 1 and Annexin A2 as Differentially Regulated." *Human Reproduction* 24(10): 2607-17.
- Dressing, Gwen E et al. 2011. "Membrane Progesterone Receptor Expression in Mammalian Tissues: A Review of Regulation and Physiological Implications." *Steroids* 76(1-2): 11-17.
- Dunn, Carolyn L, Rodney W Kelly, and Hilary O D Critchley. 2003. "Decidualization of the Human Endometrial Stromal Cell: An Enigmatic Transformation." *Reproductive biomedicine online* 7(2): 151-61.
- Ehring, G R et al. 1998. "A Nongenomic Mechanism for Progesterone-Mediated Immunosuppression: Inhibition of K⁺ Channels, Ca²⁺ Signaling, and Gene Expression in T Lymphocytes." *The Journal of experimental medicine* 188(9): 1593-1602.
- Elassar, Alyaa et al. 2012. "The Relationship between Follicle Development and Progesterone Receptor Membrane Component-1 Expression in Women Undergoing in Vitro Fertilization." *Fertility and sterility* 97(3): 572-78.
- Enders, A.C., and S. J. Schlafke. 1967. "Cytological Aspects of Trophoblast-Uterine Interaction in Early Implantation." *Am. J. Anat* 125: 1-30.
- Engmann, Lawrence, Ralf Losel, Martin Wehling, and John J Peluso. 2006a. "Progesterone Regulation of Human Granulosa/Luteal Cell Viability by an RU486-Independent Mechanism." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91(12): 4962-68.
- Falkenstein, E et al. 1996. "Full-Length cDNA Sequence of a Progesterone Membrane-Binding Protein from Porcine Vascular Smooth Muscle Cells." *Biochemical and biophysical research communications* 229(1): 86-89.
- Falkenstein, E. et al. 2001. "Chemical Modification and Structural Analysis of the Progesterone Membrane Binding Protein from Porcine Liver Membranes." *Molecular and cellular biochemistry* 218(1-2): 71-79.
- Fazleabas, Asgerally T, and Zuzana Strakova. 2002. "Endometrial Function: Cell Specific Changes in the Uterine Environment." *Molecular and cellular endocrinology* 186(2): 143-47.

BIBLIOGRAFIA

- Feng, L et al. 2014. "Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1) Expression in Fetal Membranes among Women with Preterm Premature Rupture of the Membranes (PPROM)." *Placenta* 35(5): 331–33.
- Ferenczy, A. 1980. "Ultrastructure and Historadioautography of Endometrial Cancer and Its Precursors [Proceedings]." *Acta Cytol.* 24(6): 490–92.
- Ferenczy, A, and C Bergeron. 1991. "Histology of the Human Endometrium: From Birth to Senescence." *Annals of the New York Academy of Sciences* 622: 6–27.
- Ferenczy, A, and M Guralnick. 1983. "Endometrial Microstructure: Structure-Function Relationships throughout the Menstrual Cycle." *Semin. Reprod. Endocrinol.* 1: 205–19.
- Finidori-Lepicard, J, S Schorderet-Slatkine, J Hanoune, and E E Baulieu. 1981. "Progesterone Inhibits Membrane-Bound Adenylate Cyclase in *Xenopus Laevis* Oocytes." *Nature* 292(5820): 255–57.
- Foresta, C, M Rossato, and F Di Virgilio. 1993. "Ion Fluxes through the Progesterone-Activated Channel of the Sperm Plasma Membrane." *The Biochemical journal* 294 (Pt 1(1 993): 279–83.
- Frolova, Antonina I, and Kelle H Moley. 2011. "Quantitative Analysis of Glucose Transporter MRNAs in Endometrial Stromal Cells Reveals Critical Role of GLUT1 in Uterine Receptivity." *Endocrinology* 152(5): 2123–28.
- Frost, R A, J Mazella, and L Tseng. 1993. "Insulin-like Growth Factor Binding Protein-1 Inhibits the Mitogenic Effect of Insulin-like Growth Factors and Progestins in Human Endometrial Stromal Cells." *Biology of reproduction* 49(1): 104–11.
- Frye, C A et al. 2006. "Mid-Aged and Aged Wild-Type and Progesterin Receptor Knockout (PRKO) Mice Demonstrate Rapid Progesterone and 3alpha,5alpha-THP-Facilitated Lordosis." *Psychopharmacology* 185(4): 423–32.
- Gala, R R, and E M Shevach. 1994. "Evidence for the Release of a Prolactin-like Substance by Mouse Lymphocytes and Macrophages." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 205(1): 12–19.
- Gao, Haijun et al. 2009. "Select Nutrients in the Ovine Uterine Lumen. III. Cationic Amino Acid Transporters in the Ovine Uterus and Peri-Implantation Conceptuses1." *Biology of Reproduction* 80(3): 602–9.
- Gargett, Caroline E., Rachel W.S. Chan, and Kijana E. Schwab. 2008. "Hormone and Growth Factor Signaling in Endometrial Renewal: Role of Stem/Progenitor Cells." *Molecular and Cellular Endocrinology* 288(1–2): 22–29.
- Gargett, Caroline E, and Hirotaka Masuda. 2010. "Adult Stem Cells in the Endometrium." *Molecular human reproduction* 16(11): 818–34.
- Garrido-Gomez, Tamara et al. 2011a. "Modeling Human Endometrial Decidualization from the Interaction between Proteome and Secretome." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96(3): 706–16.
- Garrido-Gómez, Tamara et al. 2014. "Deciphering the Proteomic Signature of Human Endometrial Receptivity." *Human reproduction (Oxford, England)* 29(9): 1957–67.
- Gellersen, B, and J Brosens. 2003. "Cyclic AMP and Progesterone Receptor Cross-Talk in Human Endometrium: A Decidualizing Affair." *The Journal of endocrinology* 178(3):

BIBLIOGRAFIA

357–72.

- Gellersen, B, R Kempf, R Telgmann, and G E DiMattia. 1994. "Nonpituitary Human Prolactin Gene Transcription Is Independent of Pit-1 and Differentially Controlled in Lymphocytes and in Endometrial Stroma." *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 8(3): 356–73.
- Gellersen, Birgit et al. 2007. "Expression of the Metastasis Suppressor KAI1 in Decidual Cells at the Human Maternal-Fetal Interface: Regulation and Functional Implications." *The American journal of pathology* 170(1): 126–39.
- Gellersen, Birgit, and Jan J Brosens. 2014. "Cyclic Decidualization of the Human Endometrium in Reproductive Health and Failure." *Endocrine reviews* 35(6): 851–905.
- Gerdes, D Wehling, M Leube, B Falkenstein, E. 1998. "Cloning and Tissue Expression of Two Putative Steroid Membrane Receptors." *Biological chemistry* 379(7): 907–11.
- Giudice, L C et al. 1991. "Insulin-like Growth Factor Binding Proteins in Human Endometrium: Steroid-Dependent Messenger Ribonucleic Acid Expression and Protein Synthesis." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 72(4): 779–87.
- Giudice, L C et al. 1993. "Differential Expression of Messenger Ribonucleic Acids Encoding Insulin-like Growth Factors and Their Receptors in Human Uterine Endometrium and Decidua." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 76(5): 1115–22.
- Giudice, L C et al. 1994. "The Insulin-like Growth Factor System in Human Peritoneal Fluid: Its Effects on Endometrial Stromal Cells and Its Potential Relevance to Endometriosis." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 79(5): 1284–93.
- Giudice, L C et al. 1997. "Multifaceted Roles for IGFBP-1 in Human Endometrium during Implantation and Pregnancy." *Annals of the New York Academy of Sciences* 828: 146–56.
- Giudice, L C, B A Dsupin, and J C Irwin. 1992. "Steroid and Peptide Regulation of Insulin-like Growth Factor-Binding Proteins Secreted by Human Endometrial Stromal Cells Is Dependent on Stromal Differentiation." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 75(5): 1235–41.
- Gleeson, L M, C Chakraborty, T McKinnon, and P K Lala. 2001. "Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 1 Stimulates Human Trophoblast Migration by Signaling through Alpha 5 Beta 1 Integrin via Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86(6): 2484–93.
- Golander, A et al. 1978. "Prolactin Synthesis by Human Chorion-Decidual Tissue: A Possible Source of Prolactin in the Amniotic Fluid." *Science (New York, N.Y.)* 202(4365): 311–13.
- Goyeneche, Alicia A, Ricardo P Deis, Geula Gibori, and Carlos M Telleria. 2003. "Progesterone Promotes Survival of the Rat Corpus Luteum in the Absence of Cognate Receptors." *Biology of reproduction* 68(1): 151–58.
- Graham, J. Dinny, and Christine L. Clarke. 1997. "Physiological Action of Progesterone in Target Tissues." *Endocrine Reviews* 18(4): 502–19.
- Graham, J D et al. 1995. "Characterization of Progesterone Receptor A and B Expression in Human Breast Cancer." *Cancer research* 55(21): 5063–68.

BIBLIOGRAFIA

- Grimaldi, Giulia, Mark Christian, Siobhan Quenby, and Jan J Brosens. 2012. "Expression of Epigenetic Effectors in Decidualizing Human Endometrial Stromal Cells." *Molecular human reproduction* 18(9): 451–58.
- Grimm, Sandra L, Sean M Hartig, and Dean P Edwards. 2016. "Progesterone Receptor Signaling Mechanisms." *Journal of molecular biology* 428(19): 3831–49.
- Handwerker, S. 1991. "Clinical Counterpoint: The Physiology of Placental Lactogen in Human Pregnancy." *Endocrine reviews* 12(4): 329–36.
- Hannan, Natalie J. et al. 2010. "2D-DiGE Analysis of the Human Endometrial Secretome Reveals Differences between Receptive and Nonreceptive States in Fertile and Infertile Women." *Journal of Proteome Research* 9(12): 6256–64.
- Hapangama, D.K. et al. 2008. "Endometriosis Is Associated with Aberrant Endometrial Expression of Telomerase and Increased Telomere Length." *Human Reproduction* 23(7): 1511–19.
- Harlan, R E et al. 1989. "Distribution and Partial Characterization of Immunoreactive Prolactin in the Rat Brain." *Neuroendocrinology* 49(1): 7–22.
- Head, G M et al. 1999. "Rapid Progesterone Actions on Thymulin-Secreting Epithelial Cells Cultured from Rat Thymus." *Neuroimmunomodulation* 6(1–2): 31–38.
- Henriet, Patrick, Héloïse P. Gaide Chevronnay, and Etienne Marbaix. 2012. "The Endocrine and Paracrine Control of Menstruation." *Molecular and Cellular Endocrinology* 358(2): 197–207.
- Hill, Krista K, Sarah C Roemer, Mair E A Churchill, and Dean P Edwards. 2012. "Structural and Functional Analysis of Domains of the Progesterone Receptor." *Molecular and cellular endocrinology* 348(2): 418–29.
- Hirshfield, A N. 1991. "Development of Follicles in the Mammalian Ovary." *International review of cytology* 124: 43–101.
- Huang, Cheng-Chiu, Grant D. Orvis, Kin Ming Kwan, and Richard R. Behringer. 2014. "Lhx1 Is Required in Müllerian Duct Epithelium for Uterine Development." *Developmental Biology* 389(2): 124–36.
- Hughes, Adam L et al. 2007. "Dap1/PGRMC1 Binds and Regulates Cytochrome P450 Enzymes." *Cell metabolism* 5(2): 143–49.
- Ihnatovych, Ivanna et al. 2007. "Increased Phosphorylation of Myosin Light Chain Prevents in Vitro Decidualization." *Endocrinology* 148(7): 3176–84.
- Intlekofer, K.A., and S.L. Petersen. 2011. "17 β -Estradiol and Progesterone Regulate Multiple Progestin Signaling Molecules in the Anteroventral Periventricular Nucleus, Ventromedial Nucleus and Sexually Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area in Female Rats." *Neuroscience* 176: 86–92.
- Irwin, J C, L de las Fuentes, B A Dsupin, and L C Giudice. 1993. "Insulin-like Growth Factor Regulation of Human Endometrial Stromal Cell Function: Coordinate Effects on Insulin-like Growth Factor Binding Protein-1, Cell Proliferation and Prolactin Secretion." *Regulatory peptides* 48(1–2): 165–77.
- Iwahashi, M et al. 1996. "Alterations in Distribution and Composition of the Extracellular Matrix during Decidualization of the Human Endometrium." *Journal of reproduction and fertility* 108(1): 147–55.

BIBLIOGRAFIA

- Jabbour, Henry N., Rodney W. Kelly, Hamish M. Fraser, and Hilary O. D. Critchley. 2006. "Endocrine Regulation of Menstruation." *Endocrine Reviews* 27(1): 17–46.
- Jabbour, HN, and HO Critchley. 2001. "Potential Roles of Decidual Prolactin in Early Pregnancy." *Reproduction (Cambridge, England)* 121(2): 197–205.
- Jacobsen, Britta M, and Kathryn B Horwitz. 2012. "Progesterone Receptors, Their Isoforms and Progesterone Regulated Transcription." *Molecular and cellular endocrinology* 357(1–2): 18–29.
- Jevtić, Predrag et al. 2015. "Concentration-Dependent Effects of Nuclear Lamins on Nuclear Size in *Xenopus* and Mammalian Cells." *Journal of Biological Chemistry* 290(46): 27557–71.
- Johnson, Greg A et al. 2003. "Osteopontin Expression in Uterine Stroma Indicates a Decidualization-like Differentiation during Ovine Pregnancy." *Biology of reproduction* 68(6): 1951–58.
- Jones, Marius C et al. 2006. "Regulation of the SUMO Pathway Sensitizes Differentiating Human Endometrial Stromal Cells to Progesterone." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(44): 16272–77.
- Kabe, Yasuaki, Takehiro Yamamoto, et al. 2016. "Cystathionine β -Synthase and PGRMC1 as CO Sensors." *Free radical biology & medicine* 99: 333–44.
- Kabe, Yasuaki, Takanori Nakane, et al. 2016. "Haem-Dependent Dimerization of PGRMC1/ Sigma-2 Receptor Facilitates Cancer Proliferation and Chemoresistance." *Nature communications* 7: 11030.
- Kajihara, Takeshi et al. 2006. "Differential Expression of FOXO1 and FOXO3a Confers Resistance to Oxidative Cell Death upon Endometrial Decidualization." *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 20(10): 2444–55.
- Kajihara, Takeshi et al. 2014. "Androgens Modulate the Morphological Characteristics of Human Endometrial Stromal Cells Decidualized in Vitro." *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 21(3): 372–80.
- Kao, L C et al. 2002. "Global Gene Profiling in Human Endometrium during the Window of Implantation." *Endocrinology* 143(6): 2119–38.
- Kao, L C et al. 2003. "Expression Profiling of Endometrium from Women with Endometriosis Reveals Candidate Genes for Disease-Based Implantation Failure and Infertility." *Endocrinology* 144(7): 2870–81.
- Karteris, Emmanouil et al. 2006. "Progesterone Signaling in Human Myometrium through Two Novel Membrane G Protein-Coupled Receptors: Potential Role in Functional Progesterone Withdrawal at Term." *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 20(7): 1519–34.
- Kayes-Wandover, K M, and P C White. 2000. "Steroidogenic Enzyme Gene Expression in the Human Heart." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85(7): 2519–25.
- Keator, Christopher S, Kuni Mah, and Ov D Slayden. 2012. "Alterations in Progesterone Receptor Membrane Component 2 (PGRMC2) in the Endometrium of Macaques Afflicted with Advanced Endometriosis." *Molecular human reproduction* 18(6): 308–19.
- Kletzky, O A et al. 1985. "Dynamics of Human Chorionic Gonadotropin, Prolactin, and

BIBLIOGRAFIA

- Growth Hormone in Serum and Amniotic Fluid throughout Normal Human Pregnancy." *American journal of obstetrics and gynecology* 151(7): 878–84.
- Knobil, E. 1980. "The Neuroendocrine Control of the Menstrual Cycle." *Recent progress in hormone research* 36: 53–88.
- Kosano, H et al. 1998. "The Assembly of Progesterone Receptor-Hsp90 Complexes Using Purified Proteins." *The Journal of biological chemistry* 273(49): 32973–79.
- Koshiyama, M et al. 1995. "Immunohistochemical Localization of Heat Shock Proteins HSP70 and HSP90 in the Human Endometrium: Correlation with Sex Steroid Receptors and Ki-67 Antigen Expression." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 80(4): 1106–12.
- Kowalik, Magdalena K, and Jan Kotwica. 2008. "Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1) Gene Expression in Corpus Luteum during the Estrous Cycle in Cows." *Reproductive biology* 8(3): 291–97.
- Krietsch, Tom et al. 2006. "Human Homologs of the Putative G Protein-Coupled Membrane Progesterone Receptors (MPR α , β , and γ) Localize to the Endoplasmic Reticulum and Are Not Activated by Progesterone." *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 20(12): 3146–64.
- Kuranaga, E et al. 2000. "Progesterone Is a Cell Death Suppressor That Downregulates Fas Expression in Rat Corpus Luteum." *FEBS letters* 466(2–3): 279–82.
- Lange, Carol A. 2004. "Making Sense of Cross-Talk between Steroid Hormone Receptors and Intracellular Signaling Pathways: Who Will Have the Last Word?" *Molecular Endocrinology* 18(2): 269–78.
- Lawn, A M, E W Wilson, and C A Finn. 1971. "The Ultrastructure of Human Decidual and Predecidual Cells." *Journal of reproduction and fertility* 26(1): 85–90.
- Lee, Karen L. et al. 2010. "Modulation of ATP-Induced Calcium Signaling by Progesterone in T47D-Y Breast Cancer Cells." *Molecular and Cellular Endocrinology* 319(1–2): 109–15.
- Lemos, Taíla A, and Jörg Kobarg. 2006. "CGI-55 Interacts with Nuclear Proteins and Co-Localizes to P80-Coilin Positive-Coiled Bodies in the Nucleus." *Cell biochemistry and biophysics* 44(3): 463–74.
- Lessey, B A et al. 1988. "Immunohistochemical Analysis of Human Uterine Estrogen and Progesterone Receptors throughout the Menstrual Cycle." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 67(2): 334–40.
- Lessey, B A et al. 1992. "Integrin Adhesion Molecules in the Human Endometrium. Correlation with the Normal and Abnormal Menstrual Cycle." *Journal of Clinical Investigation* 90(1): 188–95.
- Lessey, B A, P S Alexander, and K B Horwitz. 1983. "The Subunit Structure of Human Breast Cancer Progesterone Receptors: Characterization by Chromatography and Photoaffinity Labeling." *Endocrinology* 112(4): 1267–74.
- Liang, Wen-Chen et al. 2011. "TMEM43 Mutations in Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy-Related Myopathy." *Annals of neurology* 69(6): 1005–13. <http://doi.wiley.com/10.1002/ana.22338> (July 30, 2018).
- Lodde, Valentina, and John J Peluso. 2011. "A Novel Role for Progesterone and

BIBLIOGRAFIA

- Progesterone Receptor Membrane Component 1 in Regulating Spindle Microtubule Stability during Rat and Human Ovarian Cell Mitosis." *Biology of reproduction* 84(4): 715–22.
- Loercher, Amy E, Elizabeth M H Tank, Rachel B Delston, and J William Harbour. 2005. "MITF Links Differentiation with Cell Cycle Arrest in Melanocytes by Transcriptional Activation of INK4A." *The Journal of cell biology* 168(1): 35–40.
- Logan, Philip C, Michael Steiner, Anna P Ponnampalam, and Murray D Mitchell. 2012. "Cell Cycle Regulation of Human Endometrial Stromal Cells during Decidualization." *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 19(8): 883–94.
- Lösel, R. et al. 2005. "Classic and Non-Classic Progesterone Receptors Are Both Expressed in Human Spermatozoa." *Hormone and Metabolic Research* 37(1): 10–14.
- Lösel, Ralf M, Daniela Besong, John J Peluso, and Martin Wehling. 2008. "Progesterone Receptor Membrane Component 1--Many Tasks for a Versatile Protein." *Steroids* 73(9–10): 929–34.
- Lucas, Emma S. et al. 2016. "Loss of Endometrial Plasticity in Recurrent Pregnancy Loss." *STEM CELLS* 34(2): 346–56.
- Luciano, A M et al. 2011. "Expression of Progesterone Receptor Membrane Component-1 in Bovine Reproductive System during Estrous Cycle." *European journal of histochemistry : EJH* 55(3): e27.
- Luciano, Alberto M et al. 2010. "Progesterone Receptor Membrane Component 1 Expression and Putative Function in Bovine Oocyte Maturation, Fertilization, and Early Embryonic Development." *Reproduction (Cambridge, England)* 140(5): 663–72.
- Luetjens, C. Marc et al. 2006. "Tissue Expression of the Nuclear Progesterone Receptor in Male Non-Human Primates and Men." *Journal of Endocrinology* 189(3): 529–39.
- Lydon, J P, F J DeMayo, O M Conneely, and B W O'Malley. 1996. "Reproductive Phenotypes of the Progesterone Receptor Null Mutant Mouse." *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 56(1–6 Spec No): 67–77.
- Mak, I Y H et al. 2002. "Regulated Expression of Signal Transducer and Activator of Transcription, Stat5, and Its Enhancement of PRL Expression in Human Endometrial Stromal Cells in Vitro." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87(6): 2581–88.
- Mani, S K, P G Mermelstein, M J Tetel, and G Anesetti. 2012. "Convergence of Multiple Mechanisms of Steroid Hormone Action." *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 44(8): 569–76.
- Mansouri, Mahmoud Reza et al. 2008. "Alterations in the Expression, Structure and Function of Progesterone Receptor Membrane Component-1 (PGRMC1) in Premature Ovarian Failure." *Human molecular genetics* 17(23): 3776–83.
- Marano, Robert J., and Nira Ben-Jonathan. 2014. "Minireview: Extrapituitary Prolactin: An Update on the Distribution, Regulation, and Functions." *Molecular Endocrinology* 28(5): 622–33.
- Margalit, Ayelet et al. 2005. "A Lamin-Dependent Pathway That Regulates Nuclear Organization, Cell Cycle Progression and Germ Cell Development." *Novartis Foundation symposium* 264: 231-40; discussion 240-5.

BIBLIOGRAFIA

- Marks, M S, H Ohno, T Kirchnausen, and J S Bonracino. 1997. "Protein Sorting by Tyrosine-Based Signals: Adapting to the Ys and Wherefores." *Trends in cell biology* 7(3): 124–28.
- Marshall, J C, and M L Griffin. 1993. "The Role of Changing Pulse Frequency in the Regulation of Ovulation." *Human reproduction (Oxford, England)* 8 Suppl 2: 57–61.
- Martín, J C et al. 2000. "Increased Adhesiveness in Cultured Endometrial-Derived Cells Is Related to the Absence of Moesin Expression." *Biology of reproduction* 63(5): 1370–76.
- Maslar, I A, and D H Riddick. 1979. "Prolactin Production by Human Endometrium during the Normal Menstrual Cycle." *American journal of obstetrics and gynecology* 135(6): 751–54.
- Matsuoka, Aki et al. 2010. "Progesterone Increases Manganese Superoxide Dismutase Expression via a CAMP-Dependent Signaling Mediated by Noncanonical Wnt5a Pathway in Human Endometrial Stromal Cells." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95(11): E291-9.
- McCallum, Melissa L et al. 2016. "Conditional Ablation of Progesterone Receptor Membrane Component 1 Results in Subfertility in the Female and Development of Endometrial Cysts." *Endocrinology* 157(9): 3309–19.
- Melcer, Shai et al. 2012. "Histone Modifications and Lamin A Regulate Chromatin Protein Dynamics in Early Embryonic Stem Cell Differentiation." *Nature Communications* 3(1): 910.
- Mellon, Synthia H, and Lisa D Griffin. 2002. "Neurosteroids: Biochemistry and Clinical Significance." *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 13(1): 35–43.
- Von Mering, Christian et al. 2003. "STRING: A Database of Predicted Functional Associations between Proteins." *Nucleic acids research* 31(1): 258–61.
- Meyer, C et al. 1998. "Characterization of High Affinity Progesterone-Binding Membrane Proteins by Anti-Peptide Antiserum." *Steroids* 63(2): 111–16.
- Meyer, C, R Schmid, P C Scriba, and M Wehling. 1996. "Purification and Partial Sequencing of High-Affinity Progesterone-Binding Site(s) from Porcine Liver Membranes." *European journal of biochemistry* 239(3): 726–31.
- Mifsud, William, and Alex Bateman. 2002. "Membrane-Bound Progesterone Receptors Contain a Cytochrome B5-like Ligand-Binding Domain." *Genome biology* 3(12): RESEARCH0068.
- Migliaccio, A et al. 1998. "Activation of the Src/P21ras/Erk Pathway by Progesterone Receptor via Cross-Talk with Estrogen Receptor." *The EMBO journal* 17(7): 2008–18.
- Moenter, S M, A Caraty, and F J Karsch. 1990. "The Estradiol-Induced Surge of Gonadotropin-Releasing Hormone in the Ewe." *Endocrinology* 127(3): 1375–84.
- Moenter, S M, A Caraty, A Locatelli, and F J Karsch. 1991. "Pattern of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Secretion Leading up to Ovulation in the Ewe: Existence of a Preovulatory GnRH Surge." *Endocrinology* 129(3): 1175–82.
- Morel, Yves et al. 2016. "Evolution of Steroids during Pregnancy: Maternal, Placental and Fetal Synthesis." *Annales d'endocrinologie* 77(2): 82–89.

BIBLIOGRAFIA

- Mote, P A et al. 2001. "Detection of Progesterone Receptor Forms A and B by Immunohistochemical Analysis." *Journal of clinical pathology* 54(8): 624–30.
- Mueck, A O et al. 2014. "Genomic and Non-Genomic Actions of Progestogens in the Breast." *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 142: 62–67.
- Mulac-Jericevic, Biserka, and Orla M Conneely. 2004. "Reproductive Tissue Selective Actions of Progesterone Receptors." *Reproduction (Cambridge, England)* 128(2): 139–46.
- Murray, Michael J et al. 2004. "A Critical Analysis of the Accuracy, Reproducibility, and Clinical Utility of Histologic Endometrial Dating in Fertile Women." *Fertility and sterility* 81(5): 1333–43.
- Natraj, U, and J S Richards. 1993. "Hormonal Regulation, Localization, and Functional Activity of the Progesterone Receptor in Granulosa Cells of Rat Preovulatory Follicles." *Endocrinology* 133(2): 761–69.
- Neubauer, Hans et al. 2008. "Breast Cancer Proteomics Reveals Correlation between Estrogen Receptor Status and Differential Phosphorylation of PGRMC1." *Breast Cancer Research* 10(5): R85.
- Nolin, J M, and R J Witorsch. 1976. "Detection of Endogenous Immunoreactive Prolactin in Rat Mammary Epithelial Cells during Lactation." *Endocrinology* 99(4): 949–58.
- Nölte, I, D Jeckel, F T Wieland, and K Sohn. 2000. "Localization and Topology of Ratp28, a Member of a Novel Family of Putative Steroid-Binding Proteins." *Biochimica et biophysica acta* 1543(1): 123–30.
- Nousiainen, Marjaana et al. 2006. "Phosphoproteome Analysis of the Human Mitotic Spindle." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(14): 5391–96.
- Noyes, R W, A T Hertig, and J Rock. 1975. "Dating the Endometrial Biopsy." *American journal of obstetrics and gynecology* 122(2): 262–63.
- Oda, Shingo et al. 2011. "Progesterone Receptor Membrane Component 1 Modulates Human Cytochrome P450 Activities in an Isoform-Dependent Manner." *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 39(11): 2057–65.
- Okada, Hidetaka, Tomoko Tsuzuki, and Hiromi Murata. 2018. "Decidualization of the Human Endometrium." *Reproductive Medicine and Biology* 17(3): 220–27.
- Ordi, Jaume et al. 2003. "Within-Subject between-Cycle Variability of Histological Dating, Alpha v Beta 3 Integrin Expression, and Pinopod Formation in the Human Endometrium." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88(5): 2119–25.
- Ostman, Arne, Carina Hellberg, and Frank D Böhmer. 2006. "Protein-Tyrosine Phosphatases and Cancer." *Nature reviews. Cancer* 6(4): 307–20.
- Owen, G I et al. 1998. "Progesterone Regulates Transcription of the P21(WAF1) Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Gene through Sp1 and CBP/P300." *The Journal of biological chemistry* 273(17): 10696–701.
- Padykula, H A et al. 1989. "The Basalis of the Primate Endometrium: A Bifunctional Germinal Compartment." *Biology of reproduction* 40(3): 681–90.
- Pajerowski, J. D. et al. 2007. "Physical Plasticity of the Nucleus in Stem Cell Differentiation."

BIBLIOGRAFIA

- Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(40): 15619–24.
- Park-Sarge, O K, T G Parmer, Y Gu, and G Gibori. 1995. "Does the Rat Corpus Luteum Express the Progesterone Receptor Gene?" *Endocrinology* 136(4): 1537–43.
- Park, O K, and K E Mayo. 1991. "Transient Expression of Progesterone Receptor Messenger RNA in Ovarian Granulosa Cells after the Preovulatory Luteinizing Hormone Surge." *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 5(7): 967–78.
- Parmar, Tanu et al. 2009. "Protein Profiling of Human Endometrial Tissues in the Midsecretory and Proliferative Phases of the Menstrual Cycle." *Fertility and Sterility* 92(3): 1091–1103.
- Pedersen, T. 1970. "Follicle Growth in the Mouse Ovary." In *Oogenesis*, eds. JD Bigger and AW Schertz. , 361–376.
- Peltoketo, H, P Nokelainen, et al. 1999. "Two 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenases (17HSDs) of Estradiol Biosynthesis: 17HSD Type 1 and Type 7." *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 69(1–6): 431–39.
- Peltoketo, H, V Luu-The, J Simard, and J Adamski. 1999. "17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase (HSD)/17-Ketosteroid Reductase (KSR) Family; Nomenclature and Main Characteristics of the 17HSD/KSR Enzymes." *Journal of molecular endocrinology* 23(1): 1–11.
- Peluso, J J. 2003. "Progesterone as a Regulator of Granulosa Cell Viability." *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 85(2–5): 167–73.
- Peluso, J J, Liu X, Gawkowska A, Lodde V, and Wu CA. 2010. "Progesterone Inhibits Apoptosis in Part by PGRMC1-Regulated Gene Expression." *Molecular and cellular endocrinology* 320(1–2): 153–61.
- Peluso, J J, and A Pappalardo. 1994. "Progesterone and Cell-Cell Adhesion Interact to Regulate Rat Granulosa Cell Apoptosis." *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 72(11–12): 547–51.
- Peluso, J J, and A Pappalardo. 1998. "Progesterone Mediates Its Anti-Mitogenic and Anti-Apoptotic Actions in Rat Granulosa Cells through a Progesterone-Binding Protein with Gamma Aminobutyric AcidA Receptor-like Features." *Biology of reproduction* 58(5): 1131–37.
- Peluso, J J, A Pappalardo, G Fernandez, and C A Wu. 2004a. "Involvement of an Unnamed Protein, RDA288, in the Mechanism through Which Progesterone Mediates Its Antiapoptotic Action in Spontaneously Immortalized Granulosa Cells." *Endocrinology* 145(6): 3014–22.
- Peluso, J J, A Pappalardo, Ralf Losel, and Martin Wehling. 2006. "Progesterone Membrane Receptor Component 1 Expression in the Immature Rat Ovary and Its Role in Mediating Progesterone's Antiapoptotic Action." *Endocrinology* 147(6): 3133–40.
- Peluso, J J, G Fernandez, A Pappalardo, and BA White. 2002. "Membrane-Initiated Events Account for Progesterone's Ability to Regulate Intracellular Free Calcium Levels and Inhibit Rat Granulosa Cell Mitosis." *Biology of reproduction* 67(2): 379–85.
- Peluso, J J. et al. 2008. "Regulation of Ovarian Cancer Cell Viability and Sensitivity to Cisplatin by Progesterone Receptor Membrane Component-1." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93(5): 1592–99.
- Peluso, J J. et al. 2013. "Progesterone Receptor Membrane Component 1 and Its Role in

BIBLIOGRAFIA

- Ovarian Follicle Growth." *Frontiers in Neuroscience* 7: 99.
- Peluso J J, Pappalardo A, Losel R, and Wehling M. 2005. "Expression and Function of PAIRBP1 Within Gonadotropin-Primed Immature Rat Ovaries: PAIRBP1 Regulation of Granulosa and Luteal Cell Viability1." *Biology of Reproduction* 73(2): 261–70.
- Peluso, J J. 2007. "Non-Genomic Actions of Progesterone in the Normal and Neoplastic Mammalian Ovary." *Seminars in reproductive medicine* 25(3): 198–207.
- Peluso, J J, Gawkowska A, et al. 2009. "Progesterone Receptor Membrane Component-1 Regulates the Development and Cisplatin Sensitivity of Human Ovarian Tumors in Athymic Nude Mice." *Endocrinology* 150(11): 4846–54.
- Peluso, J J, DeCerbo J, and Lodde V. 2012. "Evidence for a Genomic Mechanism of Action for Progesterone Receptor Membrane Component-1." *Steroids* 77(10): 1007–12.
- Peluso, J J, Liu X, Gawkowska A, and Johnston-MacAnanny E. 2009a. "Progesterone Activates a Progesterone Receptor Membrane Component 1-Dependent Mechanism That Promotes Human Granulosa/Luteal Cell Survival but Not Progesterone Secretion." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94(7): 2644–49.
- Peluso, J J, Lodde V, and Liu X. 2012. "Progesterone Regulation of Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1) Sumoylation and Transcriptional Activity in Spontaneously Immortalized Granulosa Cells." *Endocrinology* 153(8): 3929–39.
- Peluso, J J, Romak J, and Liu X. 2008. "Progesterone Receptor Membrane Component-1 (PGRMC1) Is the Mediator of Progesterone's Antiapoptotic Action in Spontaneously Immortalized Granulosa Cells as Revealed by PGRMC1 Small Interfering Ribonucleic Acid Treatment and Functional Analysis of PGRMC1 Mutations." *Endocrinology* 149(2): 534–43.
- Peluso, J J, Yuan A, Liu X, and Lodde V. 2013. "Plasminogen Activator Inhibitor 1 RNA-Binding Protein Interacts with Progesterone Receptor Membrane Component 1 to Regulate Progesterone's Ability to Maintain the Viability of Spontaneously Immortalized Granulosa Cells and Rat Granulosa Cells." *Biology of reproduction* 88(1): 20.
- Perez-Terzic, Carmen et al. 2007. "Stem Cells Transform into a Cardiac Phenotype with Remodeling of the Nuclear Transport Machinery." *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 4(S1): S68–76.
- Pohnke, Yvonne et al. 2004. "Wild-Type P53 Protein Is up-Regulated upon Cyclic Adenosine Monophosphate-Induced Differentiation of Human Endometrial Stromal Cells." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89(10): 5233–44.
- Ponnampalam, Anna P et al. 2004. "Molecular Classification of Human Endometrial Cycle Stages by Transcriptional Profiling." *Molecular human reproduction* 10(12): 879–93.
- Popovici, R M, L C Kao, and L C Giudice. 2000. "Discovery of New Inducible Genes in in Vitro Decidualized Human Endometrial Stromal Cells Using Microarray Technology." *Endocrinology* 141(9): 3510–13.
- Prianishnikov, V A. 1978. "A Functional Model of the Structure of the Epithelium of Normal, Hyperplastic and Malignant Human Endometrium: A Review." *Gynecologic oncology* 6(5): 420–28.
- Price, Thomas M., Elizabeth L. Hansen, and Timothy N. Oliver. 2005. "Immunofluorescent Localization of a Novel Progesterone Receptor(s) in a T47D-Y Breast Cancer Cell Line Lacking Genomic Progesterone Receptor Expression." *Journal of the Society for*

BIBLIOGRAFIA

- Gynecologic Investigation* 12(8): 610–16.
- Psychoyos, A. 1973. "Hormonal Control of Ovoimplantation." *Vitamins and hormones* 31: 201–56.
- Qian, Kun et al. 2005. "Differentiation of Endometrial Stromal Cells in Vitro: Down-Regulation of Suppression of the Cell Cycle Inhibitor P57 by HOXA10?" *Molecular human reproduction* 11(4): 245–51.
- Quirk, Susan M, Robert G Cowan, and Rebecca M Harman. 2004. "Progesterone Receptor and the Cell Cycle Modulate Apoptosis in Granulosa Cells." *Endocrinology* 145(11): 5033–43.
- Rhee, Hee Sub et al. 2003. "Expression of 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase and P450 Side Chain Cleavage Enzyme in the Human Uterine Endometrium." *Experimental & Molecular Medicine* 35(3): 160–66.
- Riddick, D H, A A Luciano, W F Kusmik, and I A Maslar. 1978. "De Novo Synthesis of Prolactin by Human Decidua." *Life sciences* 23(19): 1913–21.
- Rider, V, T Potapova, G Dai, and M J Soares. 2005. "Stimulation of a Rat Uterine Stromal Cell Line in Culture Reveals a Molecular Switch for Endocrine-Dependent Differentiation." *The Journal of endocrinology* 184(1): 119–27.
- Rohe, Hannah J, Ikhlas S Ahmed, Katherine E Twist, and Rolf J Craven. 2009. "PGRMC1 (Progesterone Receptor Membrane Component 1): A Targetable Protein with Multiple Functions in Steroid Signaling, P450 Activation and Drug Binding." *Pharmacology & therapeutics* 121(1): 14–19.
- Rossetti, M F, M J Cambiasso, M A Holschbach, and R Cabrera. 2016. "Oestrogens and Progestagens: Synthesis and Action in the Brain." *Journal of neuroendocrinology* 28(7).
- Roux, Kyle J., Dae In Kim, Manfred Raida, and Brian Burke. 2012. "A Promiscuous Biotin Ligase Fusion Protein Identifies Proximal and Interacting Proteins in Mammalian Cells." *The Journal of Cell Biology* 196(6): 801–10.
- Roy, S K, and G S Greenwald. 1987. "In Vitro Steroidogenesis by Primary to Antral Follicles in the Hamster during the Perioovulatory Period: Effects of Follicle-Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone, and Prolactin." *Biology of reproduction* 37(1): 39–46.
- Ruder, E. H., T. J. Hartman, J. Blumberg, and M. B. Goldman. 2008. "Oxidative Stress and Antioxidants: Exposure and Impact on Female Fertility." *Human Reproduction Update* 14(4): 345–57.
- Ruiz-Alonso, Maria et al. 2013. "The Endometrial Receptivity Array for Diagnosis and Personalized Embryo Transfer as a Treatment for Patients with Repeated Implantation Failure." *Fertility and sterility* 100(3): 818–24.
- Runko, E., and Zaven Kaprielian. 2004. "Caenorhabditis Elegans VEM-1, a Novel Membrane Protein, Regulates the Guidance of Ventral Nerve Cord-Associated Axons." *Journal of Neuroscience* 24(41): 9015–26.
- Rutanen, E M et al. 1985. "Synthesis of Placental Protein 12 by Human Decidua." *Endocrinology* 116(4): 1304–9.
- Salker, Madhuri et al. 2010. "Natural Selection of Human Embryos: Impaired Decidualization of Endometrium Disables Embryo-Maternal Interactions and Causes

BIBLIOGRAFIA

- Recurrent Pregnancy Loss” ed. Virginia J. Vitzthum. *PLoS ONE* 5(4): e10287.
- Saner, Karla J et al. 2003. “Cloning and Expression of a Novel, Truncated, Progesterone Receptor.” *Molecular and cellular endocrinology* 200(1–2): 155–63.
- Schatz, Frederick et al. 1999. “Implications of Decidualization-Associated Protease Expression in Implantation and Menstruation.” *Seminars in Reproductive Medicine* 17(01): 3–12.
- Schena, M, D Shalon, R W Davis, and P O Brown. 1995. “Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray.” *Science (New York, N.Y.)* 270(5235): 467–70.
- Schmidt, Marc et al. 2002. “Cell Cycle Inhibition by FoxO Forkhead Transcription Factors Involves Downregulation of Cyclin D.” *Molecular and cellular biology* 22(22): 7842–52.
- Schneider, N O, R O Calderón, and S P de Fabro. 1981. “Isolation and Characterization of Cell Membranes from Human Placenta.” *Acta physiologica latino americana* 31(4): 283–89.
- Schuster, Jens et al. 2010. “Down-Regulation of Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1) in Peripheral Nucleated Blood Cells Associated with Premature Ovarian Failure (POF) and Polycystic Ovary Syndrome (PCOS).” *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 8(1): 58.
- Schwenke, Maren et al. 2013. “Control of Human Endometrial Stromal Cell Motility by PDGF-BB, HB-EGF and Trophoblast-Secreted Factors.” ed. Meijing Wang. *PloS one* 8(1): e54336.
- Shoupe, D et al. 1989. “Correlation of Endometrial Maturation with Four Methods of Estimating Day of Ovulation.” *Obstetrics and gynecology* 73(1): 88–92.
- Simón, C, J C Martín, and A Pellicer. 2000. “Paracrine Regulators of Implantation.” *Baillière’s best practice & research. Clinical obstetrics & Gynaecology* 14(5): 815–26.
- Simpton, N B, W J Cunliffe, and M B Hodgins. 1983. “The Relationship between the Vitro Activity of 3 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Delta 4-5-Isomerase in Human Sebaceous Glands and Their Secretory Activity in Vivo.” *The Journal of investigative dermatology* 81(2): 139–44.
- Slayden, Ov D, and Robert M Brenner. 2004. “Hormonal Regulation and Localization of Estrogen, Progesterone and Androgen Receptors in the Endometrium of Nonhuman Primates: Effects of Progesterone Receptor Antagonists.” *Archives of histology and cytology* 67(5): 393–409.
- Slayden, Ov Daniel, and Christopher S Keator. 2007. “Role of Progesterone in Nonhuman Primate Implantation.” *Seminars in reproductive medicine* 25(6): 418–30.
- Slonina, Dominika, Magdalena K Kowalik, and Jan Kotwica. 2012. “Expression of Progesterone Receptor Membrane Component 1, Serpine mRNA Binding Protein 1 and Nuclear Progesterone Receptor Isoforms A and B in the Bovine Myometrium during the Estrous Cycle and Early Pregnancy.” *The Journal of reproduction and development* 58(3): 288–94.
- Snijders, M P et al. 1992. “Immunocytochemical Analysis of Oestrogen Receptors and Progesterone Receptors in the Human Uterus throughout the Menstrual Cycle and after the Menopause.” *Journal of reproduction and fertility* 94(2): 363–71.

BIBLIOGRAFIA

- Spencer, Nakia D., Jeffrey M. Gimble, and Mandi J. Lopez. 2011. "Mesenchymal Stromal Cells: Past, Present, and Future." *Veterinary Surgery* 40(2): 129–39.
- Stefanoska, I et al. 2013. "Prolactin Stimulates Cell Migration and Invasion by Human Trophoblast in Vitro." *Placenta* 34(9): 775–83.
- Stoecklin, E et al. 1999. "Interactions in the Transcriptional Regulation Exerted by Stat5 and by Members of the Steroid Hormone Receptor Family." *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 69(1–6): 195–204.
- Suchanek, Monika, Anna Radzikowska, and Christoph Thiele. 2005. "Photo-Leucine and Photo-Methionine Allow Identification of Protein-Protein Interactions in Living Cells." *Nature methods* 2(4): 261–67.
- Sueldo, Carolina, Xiufang Liu, and John J Peluso. 2015. "Progesterone and AdipoQ Receptor 7, Progesterone Membrane Receptor Component 1 (PGRMC1), and PGRMC2 and Their Role in Regulating Progesterone's Ability to Suppress Human Granulosa/Luteal Cells from Entering into the Cell Cycle." *Biology of reproduction* 93(3): 63.
- Sugino, N. 2007. "The Role of Oxygen Radical-Mediated Signaling Pathways in Endometrial Function." *Placenta* 28: S133–36.
- Sugino, N et al. 1996. "Changes in Activity of Superoxide Dismutase in the Human Endometrium throughout the Menstrual Cycle and in Early Pregnancy." *Human reproduction (Oxford, England)* 11(5): 1073–78.
- Sugino, N et al. 2000. "Induction of Superoxide Dismutase by Decidualization in Human Endometrial Stromal Cells." *Molecular human reproduction* 6(2): 178–84.
- Svensson, E C, E Markström, M Andersson, and H Billig. 2000. "Progesterone Receptor-Mediated Inhibition of Apoptosis in Granulosa Cells Isolated from Rats Treated with Human Chorionic Gonadotropin." *Biology of reproduction* 63(5): 1457–64.
- Szczesna-Skorupa, Elzbieta, and Byron Kemper. 2011. "Progesterone Receptor Membrane Component 1 Inhibits the Activity of Drug-Metabolizing Cytochromes P450 and Binds to Cytochrome P450 Reductase." *Molecular pharmacology* 79(3): 340–50.
- Takano, Masashi et al. 2007. "Transcriptional Cross Talk between the Forkhead Transcription Factor Forkhead Box O1A and the Progesterone Receptor Coordinates Cell Cycle Regulation and Differentiation in Human Endometrial Stromal Cells." *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 21(10): 2334–49.
- Talbi, S. et al. 2006. "Molecular Phenotyping of Human Endometrium Distinguishes Menstrual Cycle Phases and Underlying Biological Processes in Normo-Ovulatory Women." *Endocrinology* 147(3): 1097–1121.).
- Tang, Li et al. 2009. "Involvement of Cyclin B1 in Progesterone-Mediated Cell Growth Inhibition, G2/M Cell Cycle Arrest, and Apoptosis in Human Endometrial Cell." *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 7(1): 144.
- Tang, Y Tom et al. 2005. "PAQR Proteins: A Novel Membrane Receptor Family Defined by an Ancient 7-Transmembrane Pass Motif." *Journal of molecular evolution* 61(3): 372–80.
- Telgmann, R, E Maronde, K Taskén, and B Gellersen. 1997. "Activated Protein Kinase A Is Required for Differentiation-Dependent Transcription of the Decidual Prolactin Gene in Human Endometrial Stromal Cells." *Endocrinology* 138(3): 929–37.
- Telleria, C M et al. 2001. "Apoptosis Induced by Antigestagen RU486 in Rat Corpus Luteum

BIBLIOGRAFIA

- of Pregnancy." *Endocrine* 15(2): 147–55.
- Thie, Michael, and Hans-Werner Denker. 2002. "In Vitro Studies on Endometrial Adhesiveness for Trophoblast: Cellular Dynamics in Uterine Epithelial Cells." *Cells Tissues Organs* 172(3): 237–52.
- Thomas, Peter. 2008. "Characteristics of Membrane Progesterin Receptor Alpha (MPR α) and Progesterone Membrane Receptor Component 1 (PGMRC1) and Their Roles in Mediating Rapid Progesterin Actions." *Frontiers in neuroendocrinology* 29(2): 292–312.
- Thomas, Peter, and Yefei Pang. 2012. "Membrane Progesterone Receptors: Evidence for Neuroprotective, Neurosteroid Signaling and Neuroendocrine Functions in Neuronal Cells." *Neuroendocrinology* 96(2): 162–71.
- Thomas, Peter, Yefei Pang, and Jing Dong. 2014. "Enhancement of Cell Surface Expression and Receptor Functions of Membrane Progesterin Receptor α (MPR α) by Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1): Evidence for a Role of PGRMC1 as an Adaptor Protein for Steroid Receptors." *Endocrinology* 155(3): 1107–19.
- Tierney, Emily P, Suzana Tulac, Se-Te Joseph Huang, and Linda C Giudice. 2003. "Activation of the Protein Kinase A Pathway in Human Endometrial Stromal Cells Reveals Sequential Categorical Gene Regulation." *Physiological genomics* 16(1): 47–66.
- Tsai, Shaw-Jenq et al. 2001. "Regulation of Steroidogenic Acute Regulatory Protein Expression and Progesterone Production in Endometriotic Stromal Cells." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86(12): 5765–73.
- Tseng, Linda, James Mazella, William J. Mann, and John Chumas. 1982. "Estrogen Synthesis in Normal and Malignant Human Endometrium." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 55(5): 1029–31.
- Tyson, J E, G S Mowat, and J A McCoshen. 1984. "Simulation of a Probable Biologic Action of Decidual Prolactin on Fetal Membranes." *American journal of obstetrics and gynecology* 148(3): 296–300.
- Ünlü, Mustafa, Mary E. Morgan, and Jonathan S. Minden. 1997. "Difference Gel Electrophoresis. A Single Gel Method for Detecting Changes in Protein Extracts." *Electrophoresis* 18(11): 2071–77.
- Vani, Susheel et al. 2007. "Mid-Luteal Endometrial Intracrinology Following Controlled Ovarian Hyperstimulation Involving Use of a Gonadotrophin Releasing Hormone Antagonist." *Human reproduction (Oxford, England)* 22(11): 2981–91.
- Vani, Susheel, Hilary O D Critchley, Ian S Fraser, and Martha Hickey. 2008. "Endometrial Expression of Steroid Receptors in Postmenopausal Hormone Replacement Therapy Users: Relationship to Bleeding Patterns." *The journal of family planning and reproductive health care* 34(1): 27–34.
- Vicent, Guillermo Pablo et al. 2013. "Unliganded Progesterone Receptor-Mediated Targeting of an RNA-Containing Repressive Complex Silences a Subset of Hormone-Inducible Genes." *Genes & development* 27(10): 1179–97.
- Viéro, Cédric et al. 2006. "Rapid Inhibition of Ca²⁺ Influx by Neurosteroids in Murine Embryonic Sensory Neurones." *Cell Calcium* 40(4): 383–91.
- Walters, Alison D., Ananth Bommakanti, and Orna Cohen-Fix. 2012. "Shaping the Nucleus: Factors and Forces." *Journal of Cellular Biochemistry* 113(9): 2813–21.

BIBLIOGRAFIA

- Wang, H et al. 1998. "Progesterone Receptor Subtype B Is Differentially Regulated in Human Endometrial Stroma." *Molecular human reproduction* 4(4): 407–12.
- Wang, J D, J B Zhu, W L Shi, and P D Zhu. 1994. "Immunocytochemical Colocalization of Progesterone Receptor and Prolactin in Individual Stromal Cells of Human Decidua." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 79(1): 293–97.
- Wathen, N C et al. 1993. "Dynamics of Prolactin in Amniotic Fluid and Extraembryonic Coelomic Fluid in Early Human Pregnancy." *Early human development* 35(3): 167–72.
- Wewer, U M, M Faber, L A Liotta, and R Albrechtsen. 1985. "Immunochemical and Ultrastructural Assessment of the Nature of the Pericellular Basement Membrane of Human Decidual Cells." *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 53(6): 624–33.
- Wildt, L et al. 1981. "Frequency and Amplitude of Gonadotropin-Releasing Hormone Stimulation and Gonadotropin Secretion in the Rhesus Monkey." *Endocrinology* 109(2): 376–85.
- Will, Erica Anspach, Xiufang Liu, and John J. Peluso. 2017. "AG 205, a Progesterone Receptor Membrane Component 1 Antagonist, Ablates Progesterone's Ability to Block Oxidative Stress-Induced Apoptosis of Human Granulosa/Luteal Cells†." *Biology of Reproduction* 96(4): 843–54.
- Wu, W X, J Brooks, A F Glasier, and A S McNeilly. 1995. "The Relationship between Decidualization and Prolactin mRNA and Production at Different Stages of Human Pregnancy." *Journal of molecular endocrinology* 14(2): 255–61.
- Wu, Wen et al. 2011. "Changes in PGRMC1, a Potential Progesterone Receptor, in Human Myometrium during Pregnancy and Labour at Term and Preterm." *Molecular human reproduction* 17(4): 233–42.
- Wynn, RM. 1989. "The Human Endometrium." In *Biology of the Uterus*, eds. Ralph M. Wynn and William P. Jollie. Springer, Boston, MA, 289–331.
- Xiu, Fangming et al. 2016. "High Physiological Concentrations of Progesterone Reverse Estradiol-Mediated Changes in Differentiation and Functions of Bone Marrow Derived Dendritic Cells." ed. Susan Kovats. *PloS one* 11(4): e0153304.
- Yang, Tong et al. 2002. "Crucial Step in Cholesterol Homeostasis: Sterols Promote Binding of SCAP to INSIG-1, a Membrane Protein That Facilitates Retention of SREBPs in ER." *Cell* 110(4): 489–500.
- Yoshino, Osamu et al. 2003. "Akt as a Possible Intracellular Mediator for Decidualization in Human Endometrial Stromal Cells." *Molecular human reproduction* 9(5): 265–69.
- Younglai, Edward V. et al. 2006. "Binding of Progesterone to Cell Surfaces of Human Granulosa-Lutein Cells." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 101(1): 61–67.
- Zeitoun, Khaled et al. 1998. "Deficient 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Expression in Endometriosis: Failure to Metabolize 17 β -Estradiol." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83(12): 4474–80.
- Zhang, Ling et al. 2008. "Expression of Progesterone Receptor Membrane Component 1 and Its Partner Serpine 1 mRNA Binding Protein in Uterine and Placental Tissues of the Mouse and Human." *Molecular and cellular endocrinology* 287(1–2): 81–89.

BIBLIOGRAFIA

Zhao, Guangfeng et al. 2014. "Hyaluronic Acid Promotes the Expression of Progesterone Receptor Membrane Component 1 via Epigenetic Silencing of MiR-139-5p in Human and Rat Granulosa Cells." *Biology of reproduction* 91(5): 116.

Zhao, Guangfeng et al. 2015. "Hyaluronic Acid Prevents Immunosuppressive Drug-Induced Ovarian Damage via up-Regulating PGRMC1 Expression." *Scientific reports* 5(1): 7647.

Zhu, Yong, Jason Bond, and Peter Thomas. 2003. "Identification, Classification, and Partial Characterization of Genes in Humans and Other Vertebrates Homologous to a Fish Membrane Progestin Receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(5): 2237-42.

APÉNDICE

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DOCTORANDO

1. Publicaciones científicas internacionales

- **Stefania Salsano**, Alicia Quiñonero, Silvia Pérez, Tamara Garrido Gómez, Carlos Simón and Francisco Dominguez. "Dynamic expression of PGRMC1 and SERBP1 in human endometrium: an implication in the human decidualization process." *Fertility and Sterility* 108, no. 5: 832–842 (July 2017). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.07.1163>

2. Trabajos presentados en congresos nacionales o internacionales científicas internacionales

2.1. Comunicaciones orales

- "Non classical Non-classical progesterone receptor (PGRMC1) and SERPINE1 mRNA binding protein (SERBP1) interaction influences the human decidualization process.

Nombre Congreso: SRI (Society for Reproductive Investigation) 64th Annual Meeting . Ciudad del evento: Orlando, Florida (USA). Fecha del evento: 15/03/2017. Fin del evento: 18/03/2017. **Stefania Salsano**, Alicia Quiñonero, Silvia Pérez, Tamara Garrido Gómez, Carlos Simón, Francisco Dominguez.

- "Phytoestrogens (Soy-Derived Metabolites) May Act Like Endometrial Disruptors Altering Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells". SRI (Society for Reproductive Investigation) 65th Annual Meeting . Ciudad del evento: San Diego, California (USA). Fecha del evento: 06/03/2018. Fin del evento: 10/03/2018. Silvia Pérez, **Stefania Salsano**, Alicia Quiñonero, Francisco Dominguez.

2.2. Posters

- "Progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) localization in human endometrial stromal cells (hESC) and its impact on decidualization". Congreso: SRI (Society for Reproductive Investigation) 62th Annual Meeting . Ciudad del evento: San Francisco, California (USA). Fecha del evento: 25/03/2015. Fin del evento: 28/03/2015. **Stefania Salsano**, Alicia Quiñonero, Tamara Garrido Gómez, Carlos Simón, Francisco Domínguez.

- "iTRAQ proteomic comparative analysis of endometrium from fertile donors, IUD carriers and patients with recurrent implantation failure (RIF) reveals no differential proteomic profile in RIF versus fertile donors." Congreso: SRI (Society for Reproductive Investigation) 63th Annual Meeting . Ciudad del evento: Montreal, Canada (USA). Fecha del evento:

APÉNDICE

16/03/2016. Fin del evento: 19/03/2016. Silvia Pérez, Jose Bellver, Pilar Alama, **Stefania Salsano**, Alicia Quiñonero, Patricia Díaz-Gimeno, Carlos Simón, Francisco Domínguez.

- “Phytoestrogens (Soy-Derived Metabolites) May Act Like Endometrial Disruptors Altering Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells”. Congreso: Congreso II Nacional Biomedicina Jóvenes Investigadores. Ciudad del evento: Valencia, Comunidad Valenciana (España). Fecha del evento: 28/11/2016. Fin del evento: 29/11/2016. **Stefania Salsano**, Silvia Pérez, Alicia Quiñonero, Francisco Dominguez.

- “Non-classical progesterone signaling may be sufficient to induce decidualization in Human Endometrial Stromal Cells (ESC)”. Congreso: ESHRE 34th Annual Meeting. Ciudad del evento: Barcelona (España). Fecha del evento: 01/07/2018. Fin del evento: 04/07/2018. **Stefania Salsano**, Alicia Quiñonero, Silvia Pérez, Roberto González Martín, Francisco Dominguez.