



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Programa de doctorado de biotecnología

TESIS DOCTORAL

**“MECANISMOS EPIGENÉTICOS
EN LAS CÉLULAS ENDOMETRIALES ESTROMALES DURANTE EL PROCESO
DE DECIDUALIZACIÓN”**

Autora:

Isabel Herrero Mambrona

Licenciada en Bioquímica

Directores:

Prof. Carlos Antonio Simón Vallés

Dr. Carlos Estella Sagrado

Valencia 2012

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

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“MECANISMOS EPIGENÉTICOS EN LAS CÉLULAS ENDOMETRIALES ESTROMALES DURANTE EL PROCESO DE DECIDUALIZACIÓN”** ha sido realizado íntegramente por Dña. Isabel Herrer Mambrona 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 2012.

Fdo. Prof. Carlos Antonio Simón Valles

Dr. Carlos Estella Sagrado, Doctor en Biología e Investigador de la Fundación IVI.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“MECANISMOS EPIGENÉTICOS EN LAS CÉLULAS ENDOMETRIALES ESTROMALES DURANTE EL PROCESO DE DECIDUALIZACIÓN”** ha sido realizado íntegramente por Dña. Isabel Herrero Mambrona 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 2012.

Fdo. Dr. Carlos Estella Sagrado

AGRADECIMIENTOS

Y con estas palabras quiero agradecer a todas esas personas que con su esfuerzo, perseverancia, conocimiento, cariño o incluso su mera existencia, han contribuido a alcanzar mis logros.

A mi director el Doctor Carlos Simón Vallés por darme la oportunidad de realizar este trabajo y por todo el conocimiento aportado.

A mi director el Doctor Carlos Estella Sagrado, porque todo que pueda decir no sería suficiente. Gracias por su ejemplo, su dedicación, su profesionalidad, por compartir el trabajo diario, por contagiarme su motivación y sobre todo porque ha sido el maestro que me ha enseñado a andar en el camino de la ciencia.

A Antonio Pellicer y a José Remohí por permitirme desarrollar este trabajo en las instalaciones de la Fundación IVI y del Instituto Valenciano de infertilidad (IVI).

A todos mis compañeros de la Fundación IVI con quienes he compartido el espacio-tiempo durante estos años, a Juanma, Ali, Sebas, Amparo, Horten, Leslie, Carmen, Claudia, Aymara, Tamara, Ana, Sonia y Mercedes. Gracias por vuestro, apoyo, comprensión y por llenar el día a día de alegría.

A Ali por todo lo que he podido aprender a su lado y por su gran ayuda.

A Sebas y Amparo por cuidar tanto del laboratorio y de mi persona.

A Juanma por transmitir el entusiasmo por el mundo computacional y por compartir la gran misión de desvelar el misterio de los miRNAs.

A los grandes investigadores del equipo a Paco, Felipe, Irene, Jose Vicente y Raúl, gracias por sus consejos y por ayudar a encontrar soluciones.

También a Marcos, Jaime y al resto de compañeros de administración.

A todos aquellos que también formaron parte, al Doctor Oscar Berlanga, a Isabel por sus buenos días diarios, a Patri y su visión trascendental, al Doctor Jose Antonio Horcajas, Josón, gracias por creer en mí.

A nuestros vecinos de DGP, a Julio, al artista Pere, Anita, Mariaje, Mila y Vicente, gracias por todos esos pequeños grandes momentos compartidos durante este tiempo. Al nuevo incorporado Jose Antonio, por la complicidad que me ha aportado todo este tiempo, porque le conocí subido de un árbol recogiendo hojas de morera y eso determinó la dirección de las grandes situaciones vividas.

A los nuevos compañeros de iviomics, por todo lo que nos enseñan del mundo de la reproducción durante los seminarios. A María, por su simpatía y por saber contagiar su optimismo.

A mis compañeros de biología y de bioquímica, con quienes pude crecer durante esos “duros” años de formación universitaria, a Ana, Noelia, Andrea, Eva, Aida, Pablo, Tati, Joaquín y especialmente a la Doctora Marta Valero, la mejor compañera de clase del mundo, por ser mi mejor consejera y por toda la paciencia que tiene conmigo.

A todas esas personas que he conocido en Valencia, a Sarupi, Elena, Ruth, Andrea, Sergio, Silvia, Antonio, Vero, Miguelez, Isma, Caste, Marine, y a todo Kultrun batukada. Gracias a ellos he encontrado mi lugar en esta ciudad, una experiencia intensa, enriquecedora y simplemente maravillosa.

A los de siempre, a Eva y su ternura, a mi tatica Lauriki, a Ainhoa, Gallego, Jorge, Oscar, Bea, Lucia, Guiomar y Marta, gracias por ser, estar y permanecer. Nuestra amistad está llena de aprendizajes, de experiencias inolvidables y de mucha felicidad y al fin y al cabo sin alegría ni se hace una tesis ni se vive con plenitud. No se os puede querer más.

A mis abuelos porque ellos me enseñaron que no existen razones suficientes para rendirse ante las dificultades.

A mis hermanas porque forman parte de mí.

A mis padres por ser mis ojos cuando no puedo ver, por ser siempre su prioridad, por su amor incondicional.

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en los laboratorios de la Fundación IVI, gracias a la financiación de la Fundación IVI y a la ayuda del programa Prometeo para grupos de investigación de excelencia (PROMETEO/2008/163) financiado por la Consejería de Educación de la Generalitat Valenciana.

INDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	1
1. EI ENDOMETRIO	1
1.1. El ciclo menstrual.....	2
2. IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA	4
2.1 Receptividad endometrial	5
2.2 Decidualización.....	7
2.3. Fases de la implantación embrionaria.....	13
2.3.1. Fase preimplantatoria: Aposición.....	14
2.3.2. Fase implantatoria: Adhesión e invasión.....	14
3. Remodelación de la matriz extracelular en el proceso de implantación	17
3.1 Generalidades de la matriz extracelular.....	17
3.2 Las metaloproteasas matriciales: MMPs.....	19
3.3. Los inhibidores tisulares de las metaloproteasas: TIMPs.....	22
3.4 Sistema de las metaloproteasas en el endometrio y en la interfase materno-embionaria.....	23
3.4.1 Composición de la MEC endometrial a lo largo del ciclo menstrual	24
3.4.2. Sistema de la metaloproteasas en el endometrio.....	25
3.4.3. Sistema de las metaloproteasas en la interfase materno-embionaria.....	27
4. Las “omicas” del endometrio	29
5. EPIGENÉTICA	30
5.1. Metilación del ADN.....	32
5.2. Modificación post-traducciona de las histonas.....	35
5.2.1 Histonas: acetilación y deacetilación.....	37
5.2.2 Regulación de HATs y HDACs. Inhibidores.....	40

5.3. miRNAs	43
5.3.1 ARN no codificantes pequeños.....	43
5.3.2 Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNA.....	44
5.3.3 Caracterización funcional de los miRNAs	46
5.3.4 miRNAs como biomarcadores y terapia molecular ...	48
5.4. Mecanismos epigenéticos en el aparato reproductor femenino	49
5.4.1 Metilación del ADN en el endometrio.....	49
5.4.2 Acetilación de las histonas durante la implantación.....	50
5.4.3 miRNAs en el aparato reproductor femenino.....	51
5.4.4 miRNAs en el endometrio.....	52
II. HIPÓTESIS.....	57
II. OBJETIVOS.....	61
1.1 Objetivos generales.....	61
1.2 Objetivos específicos.....	62
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	65
1. Cultivo celular	65
1.1 Muestras de endometrio.	65
1.2 Separación y cultivo primario de células endometriales epiteliales y estromales.....	65
1.3 Líneas celulares.....	66
1.4 Condiciones de cultivo.....	67
1.5 Tratamiento con Trichostatina A (TSA).....	68
1.6 Inducción del proceso de decidualización de las ESC “in Vitro”.....	68
1.7 Embriones de ratón.....	69
1.8 Medios condicionados	69
1.9 Determinación de la viabilidad celular.....	70
2. Ensayos de movilidad celular.....	70
2.1 Ensayos de migración / wound-healing.....	70
2.2 Ensayos de invasión.....	71
3. Modelo de invasión embrionario <i>in vitro</i> basado en co-cultivo.....	72

4. Análisis de ácidos nucleicos.....	73
4.1 Extracción de ARN total.....	73
4.2 Retrotranscripción.....	73
4.3 Diseño de oligonucleótidos.....	75
4.4 PCR cuantitativa a tiempo real o qRT-PCR.....	76
4.5 miRNA PCRarray.....	78
4.6 Inmunoprecipitación de la cromatina.....	79
4.7 Silenciamiento de Dicer.....	82
4.8 Transfección con mimetizadores de miRNAs.....	83
5. Análisis de proteínas.....	84
5.1 Extracción de proteína.....	84
5.2 Western-blot	85
5.3 Análisis de proteasas: Zimografía.....	86
5.4 Inmunohistoquímica	88
5.5 Inmunofluorescencia.....	89
5.6 ELISA.....	89
6. Análisis bioinformático	90
7. Análisis Estadístico de los Datos.....	90
IV. RESULTADOS	90
1. Estudio de los cambios en la acetilación de las histonas y sus efectos durante la decidualización de las células estromales endometriales.....	95
1.1 Efecto de TSA sobre el fenotipo de hESC	95
1.1 Efecto del TSA sobre la movilidad celular	97
1.2 Implicación del TSA sobre la invasión embrionaria.....	100
1.2.1 Ensayo de invasión trofoblástica.....	100
1.2.2 Ensayos de invasión embrionaria en la monocapa de células hESC.....	101
1.3 Efecto del TSA en la expresión génica del sistema de las MMPs	103
1.4 Efecto del TSA en la actividad de las MMPs.....	108

1.5 Efecto del TSA los niveles proteicos de los TIMPs.....	110
1.6 Implicación del TSA sobre los niveles de acetilación de las histonas: análisis de los promotores génicos.....	111
1.7 Efecto de la decidualización en el balance de los moduladores de la MEC y su asociación con la acetilación de las histonas.....	113
2. Estudio de la expresión y función de los miRNAs durante el proceso de decidualización <i>in vitro</i>.....	119
2.1 Análisis del perfil de expresión de miRNA en las hESC decidualizadas <i>in vitro</i>	119
2.2 Análisis de los potenciales genes diana de los miRNAs diferencialmente expresados durante la decidualización.....	123
2.3 Análisis de las familias de miRNAs representadas durante la decidualización.....	127
2.4 Caracterización funcional del miR96 y miR135b.....	130
3. Caracterización funcional de Dicer durante la decidualización <i>in vitro</i> de las hESC.....	134
3.1 Expresión de Dicer durante la decidualización.....	134
3.1.1 Análisis de los niveles de Dicer durante el proceso de decidualización <i>in vivo</i>	134
3.1.2 Análisis de los niveles de Dicer durante el proceso de decidualización <i>in vitro</i>	137
3.2 Efecto del silenciamiento de Dicer sobre el proceso de decidualización <i>in vitro</i>	138
3.2.1 Efecto del silenciamiento de Dicer sobre los niveles de marcadores moleculares característicos del proceso de decidualización	139
3.2.2 Efecto del silenciamiento de Dicer sobre los niveles de señalizadores relevantes del proceso de diferenciación.....	144
3.2.3 Implicación de Dicer sobre la morfología de las hESC.....	147
V. DISCUSIÓN	151

VI. CONCLUSIONES	171
VII. BIBLIOGRAFÍA	175
VIII. ANEXOS	204

SIGLAS, ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario.
- AKT:** Proteína quinasa B
- AMPc:** Adenosin-monofosfato cíclico.
- ARN:** Ácido ribonucleico.
- ARNi:** ARN de interferencia.
- ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero.
- CEBP β :** *CCAAT/enhancer-binding protein beta*.
- CDK2:** Quinasa dependiente de ciclina 2.
- ChIP:** Chromatin immunoprecipitation.
- COX-2:** *Ciclooxigenasa -2*.
- E₂:** 17- β -Estradiol.
- EEC:** Células endometriales epiteliales.
- ESC:** Células endometriales estromales.
- ELISA:** *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*.
- FASL:** Ligando de Fas.
- FGF:** Factor de crecimiento fibroblástico.
- FIV:** Fecundación *in vitro*.
- GAPDH:** Gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa.
- HAT:** Histona acetilasa.
- HCG:** Gonadotropina coriónica humana.
- HDAC:** Histona deacetilasa.
- HDACi:** Inhibidores de histona deacetilasas.
- IGFBP-1:** Factor de crecimiento similar a insulina 1.
- LH:** Hormona luteinizante.
- MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógenos.
- MBD:** *methyl binding CpG domain*.
- MEC:** Matriz extracelular.
- miRNA:** microRNA.

SIGLAS, ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS

MMLV-RT: *Moloney Murine Leukemia Virus Retro-Transcriptase* (retrotranscriptasa del virus murino de la leucemia Moloney).

MMP: Metaloproteasas de la matriz.

MPIF-1: Myeloid progenitor inhibitory factor-1.

N: Número de muestras.

P₄: Progesterona.

PBS: *Phosphate buffered saline*.

PGE₂: Prostaglandina E.

PKA: Proteína quinasa A.

PKC: Proteína quinasa C.

PMSG: gonadotropina sérica de yegua preñada

PRL: Prolactina.

qRT-PCR: Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real).

SFB: Suero fetal bovino.

SDS: Dodecilsulfato sodico.

SEM: Error estándar de la media.

Sp/KLF: *specificity protein/Krüppel-like factor*.

STAT: Transductor de señal y activador de la transcripción.

TIMP: Tissue metalloprotease inhibitor.

TNF- α :

TSA: Trichostatina A.

uPA: Activador de plasminógeno tipo uroquinasa.

Vs: del latín *versus*.

I. INTRODUCCIÓN

I.- INTRODUCCIÓN

1.- EL ENDOMETRIO

El **endometrio** es la membrana mucosa que recubre la cavidad uterina. Es un tejido dinámico que sufre una serie de modificaciones cíclicas reguladas por las hormonas esteroideas circulantes liberadas por el folículo ovárico y el cuerpo lúteo. La función del endometrio en la reproducción es crucial ya que es responsable del microambiente necesario para el desarrollo y la implantación del embrión hasta que éste pueda nutrirse de la madre a través de la placenta

Morfológicamente, podemos dividir al endometrio en dos capas:

Funcional: Que constituye la zona más superficial y se descama y renueva cada mes durante el ciclo menstrual.

Basal: Capa que no se desprende y constituye la base para regenerar el endometrio (Figura 1):

Los principales componentes histológicos que forman este tejido son: el epitelio luminal, el epitelio glandular, el estroma, las arterias espirales y las células inmunitarias residentes.

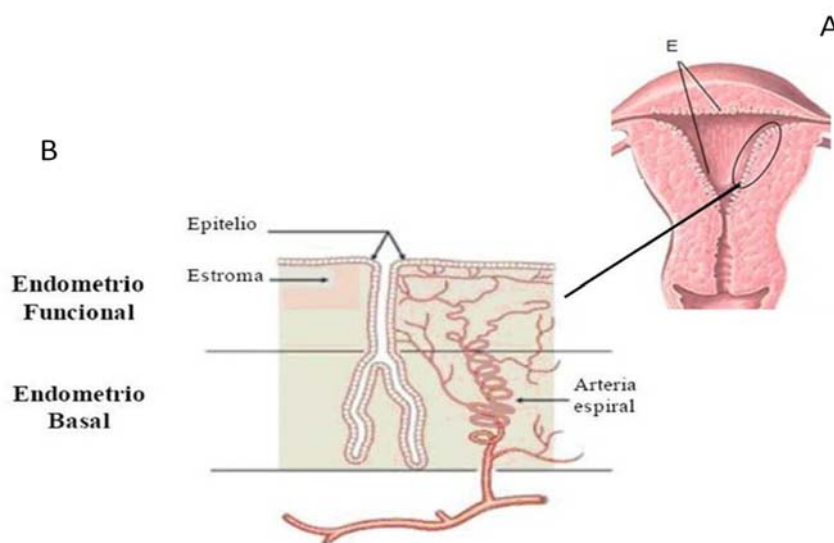


Figura 1. Endometrio humano. A) Localización del endometrio en el útero. B) Anatomía funcional del endometrio. Una monocapa de células epiteliales cuboidales recubre la superficie del estroma y penetra en el formando profundas invaginaciones que constituyen el epitelio glandular. El estroma está formado por células fibroblásticas estromales, arterias espirales y células inmunitarias residentes, todo ello embebido en una red reticular que constituye la matriz extracelular. E: endometrio.

1.1 El ciclo menstrual

El ciclo menstrual es un complejo proceso dinámico, durante el cual el endometrio pasa por periodos de crecimiento, diferenciación y regresión cuyo significado biológico es preparar al útero para el momento de la implantación. Estos cambios se repiten en la especie humana cíclicamente cada 28 días y están dirigidos por las hormonas esteroideas estrógenos y progesterona (E_2 y P_4 respectivamente). Los niveles de estas hormonas se regulan gracias a la acción del ovario y sincronizan al endometrio para la recepción del embrión, por ello el ciclo menstrual y el ciclo ovárico se encuentran acoplados (Figura 2).

El ciclo menstrual o endometrial se divide en tres fases principales: menstrual, proliferativa y secretora (Noyes y cols., 1975).

Fase menstrual: Comprende del día 1 al 4 del ciclo. Durante esta fase predominan niveles de E_2 y P_4 bajos desencadenando la hemorragia acompañada del desprendimiento de la capa funcional (menstruación). El primer día de la menstruación representa el inicio del ciclo menstrual. Después de esta fase, queda un endometrio delgado donde únicamente está presente la capa basal.

Fase Proliferativa: Situada temporalmente entre el final de la menstruación y la ovulación, es decir, entre el día 5 y 14 del ciclo. Durante la fase proliferativa se regenera la capa funcional del endometrio. Bajo la influencia de niveles crecientes de estrógenos, secretados por el folículo ovárico en desarrollo, se produce un aumento en la proliferación de las células epiteliales y estromales de la capa

funcional. El alargamiento del epitelio glandular que adopta formas rectilíneas y el aumento de la vascularización principalmente de las arterias espirales, son los eventos más relevantes. En esta etapa el espesor del endometrio aumenta de 4 a 7mm aproximadamente. Alrededor del día 14 del ciclo menstrual, como respuesta al pico de la hormona luteinizante (LH), tiene lugar la expulsión del ovocito maduro poniendo fin a esta etapa y dando paso a la siguiente.

Fase secretora: Es la fase comprendida entre los días 15 y 28 del ciclo menstrual. Tras la ovulación, el cuerpo lúteo secreta grandes cantidades de E_2 y P_4 . Los estrógenos provocan una ligera proliferación adicional, y la progesterona una notable diferenciación del endometrio. Durante la primera mitad de la fase secretora, las células del epitelio secretan material rico en glucógeno y mucopolisacáridos, las estructuras glandulares se ensanchan y los vasos sanguíneos adoptan estructuras tortuosas.

Entre los días 19 y 21 del ciclo, es cuando el epitelio endometrial se transforma en un epitelio receptivo (Aplin, 2000) y a continuación se inicia el proceso de decidualización del estroma (Figura 2). De este modo el endometrio queda preparado para el momento de la implantación embrionaria (Carson y cols., 2000). Estos procesos, al menos en humanos, ocurren independientemente de la fecundación.

Si el óvulo es fecundado la implantación comienza aproximadamente en el sexto día de la fase secretora. Si no ocurre la fecundación el cuerpo lúteo degenera y disminuyen los niveles de E_2 y P_4 . Es entonces cuando el endometrio secretor sufre una regresión progresiva, se transforma en un endometrio isquémico, se detiene la secreción glandular y se pierde líquido intersticial. El resultado final es la eliminación de la capa funcional, la menstruación y el comienzo de un nuevo ciclo (Brenner y West, 1975; Hawkins y Matzuk, 2008).

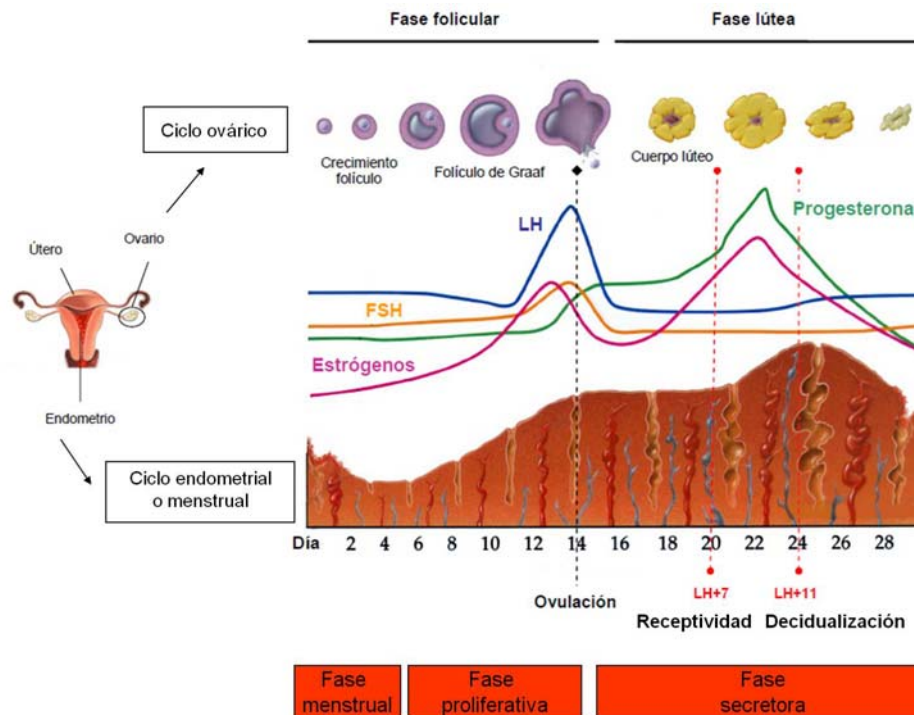


Figura 2. Fases del ciclo menstrual. El ciclo menstrual y el ciclo ovárico se encuentran acoplados gracias a la acción coordinada de las hormonas. En la segunda mitad de la fase secretora tienen lugar en el endometrio el proceso de receptividad endometrial y el proceso de decidualización.

2.- IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA

La implantación embrionaria consiste en la aposición, adhesión y posterior invasión del blastocisto en el endometrio materno en fase receptiva. Esta interacción entre dos sistemas tan diferentes, como son el blastocisto y el endometrio, requiere un correcto diálogo que permita el desarrollo sincronizado de ambos y una correcta implantación. Por ello mientras que el embrión alcanza el potencial de adhesión, el endometrio alcanza el estado receptivo.

2.1 Receptividad endometrial

El blastocisto solo es capaz de adherirse e implantarse en el útero materno en un periodo limitado de tiempo del ciclo menstrual conocido como ventana de implantación. Este periodo se da en mitad de la fase secretora (a partir del día 19 o 20 del ciclo aproximadamente) y delimita el momento funcionalmente conocido como receptividad endometrial (Psychoyos, 1986).

El epitelio luminal constituye el primer sitio de contacto y por lo tanto la primera barrera entre el embrión y el endometrio. El mecanismo por el cual el embrión se adhiere a la pared uterina en el inicio del proceso de implantación, requiere de una interacción entre las células epiteliales endometriales (EEC) y la membrana de las células del trofoblasto embrionario. Para favorecer esta interacción las células epiteliales lumbinales experimentan, durante la ventana de implantación, cambios morfológicos y bioquímicos conocidos como la “transformación de la membrana plasmática” (Murphy y Shaw, 1994) cuyo fin es la modificación de las propiedades de adhesión de las células epiteliales.

Estos cambios se caracterizan morfológicamente por la presencia de proyecciones ectoplasmáticas o pinópodos en la membrana plasmática, aumento de la superficie celular y pérdida de la polaridad epitelial mediada por la reorganización de las proteínas del citoesqueleto (Murphy, 2004).

A nivel bioquímico, las EEC sufren una reorganización de las proteínas de membrana que modifican las interacciones célula-célula, favoreciendo la adhesión entre el epitelio y el trofoblasto. Los principales cambios son: un aumento en la expresión de moléculas de adhesión (integrinas, selectinas, cadherinas), disminución de moléculas anti-adherentes (glicocalix) y cambios en la expresión de receptores de hormonas, citoquinas y factores de crecimiento (Makker y Singh, 2006). El estudio de este conjunto de moléculas ha permitido caracterizarlas como marcadores del proceso de receptividad.

Las **integrinas** son glicoproteínas de superficie que se unen específicamente a los componentes de la matriz extracelular activando señales intracelulares (Miyamoto y cols., 1995). Durante la ventana de implantación se ha observado un aumento de las integrinas $\alpha 1$, $\alpha 4$ y $\beta 3$, tanto en biopsias endometriales como en las EEC aisladas (Lessey y Castelbaum, 2002). Estas integrinas están presentes también en la superficie de las células trofoblásticas. Una disminución en la expresión de estas integrinas ha sido asociado a ciertas patologías ginecológicas como la endometriosis (Lessey y cols., 1994b) o la infertilidad primaria de origen desconocido (Lessey y cols., 1994a; Lessey, 1997).

En cuanto a las proteínas del glicocalix, **MUC1** (Mucin 1, cell surface associated) ha sido definida como una proteína de antiadhesión, ya que al ser una molécula de gran tamaño podría estar actuando como barrera física para la adhesión embrionaria. MUC1 tiene una regulación hormonal mediada por la progesterona que induce un aumento en sus niveles en el endometrio mientras que el embrión se encarga de la rotura específica de MUC1 en la zona exclusiva del epitelio endometrial al que se adhiere (Meseguer y cols., 2001).

También se ha descrito el relevante papel de las citoquinas, entre las que se puede destacar el **factor inhibidor de la leucemia** (LIF; leukemia inhibitory factor), necesario para la adhesión embrionaria. En ratones mutantes carentes de LIF la adhesión embrionaria se encuentra completamente anulada y esos ratones no implantan a no ser que se administre LIF recombinante al animal (Stewart y cols., 1992). En humanos, se ha demostrado que la expresión de LIF aumenta durante la ventana de implantación y que pacientes con fallos de implantación presentan una disminución en los niveles de LIF en el fluido endometrial (Laird y cols., 1997). También se ha encontrado que mujeres infértiles presentan mutaciones en el gen de LIF (Giess y cols., 1999).

Otros factores importantes son: HB-EGF (Heparan binding EGF like growth factor) (Das y cols., 1994), osteopontina (Apparao y cols., 2001), glicodelina

(Mueller y cols., 2000), leptina (Gonzalez y cols., 2003)(Cervero y cols., 2005) (Cervero y cols., 2007) o COX-2 (Marions y Danielsson 1999). Estos factores se han caracterizado como moléculas implicadas en la receptividad endometrial.

2.2. Decidualización

La decidualización se define como el proceso por el cual el compartimento estromal se transforma en un tejido diferenciado, morfológica y funcionalmente diferente cuyo fin es regular el proceso de invasión y la formación de la placenta (Gellersen y Brosens, 2003). La decidua es el tejido materno que tapiza el útero gestante y que se encuentra en íntimo contacto con las células del trofoblasto constituyendo la denominada interfase materno-fetal y por lo tanto constituye un soporte para el establecimiento del embarazo y para el desarrollo del embrión.

El proceso de decidualización requiere la remodelación de la MEC, la diferenciación de las ESC y la infiltración local de células linfoides granulares gigantes (uNK) (Kelly y cols., 2001; Salamonsen y cols., 2003).

La decidualización tiene lugar a mitad de la fase secretora inducida por la presencia de E₂ y P₄. Mientras que en humanos ocurre independientemente de la implantación, en otros mamíferos como el ratón o la rata, es necesaria la presencia del blastocisto. El estado de decidualización permanece si se produce un embarazo que permita mantener altas las concentraciones de progesterona. Si esto no ocurre y los niveles de progesterona caen se produce la menstruación (Kelly y cols., 2001) (Condon y cols., 2003).

El proceso de decidualización puede inducirse *in vitro* no solo con E₂ y P₄ sino con una gran variedad de moléculas reguladoras como AMPc (Adenosin-monofosfato cíclico), PGE₂ (prostaglandina E₂) o relaxina (Gellersen y Brosens, 2003).

La decidualización supone un cambio morfológico y fenotípico de las ESC que se convierten en células deciduales estromales (Salamonsen y cols., 2003). Durante la decidualización, las ESC modifican su morfología fibroblástica fusiforme para hacerse gradualmente más redondeadas adoptando un aspecto epiteloide y caracterizadas por el aumento de gránulos de glucógeno en su citoplasma.

Las células deciduales son fenotípicamente diferentes, por lo que se han identificado gran variedad de marcadores bioquímicos de decidualización tales como la secreción de prolactina (PRL), la expresión de desmina, de relaxina, de IGFBP-1, ciertos componentes de la lámina basal y colágeno tipo IV (Glasser y Julian, 1986; Riddick y Kusmik, 1977; Salamonsen y cols., 2003, Tabanelli y cols., 1992). Estos marcadores confirman el estado diferenciado de la célula decidual (Dunn y cols., 2003) (Figura 3).

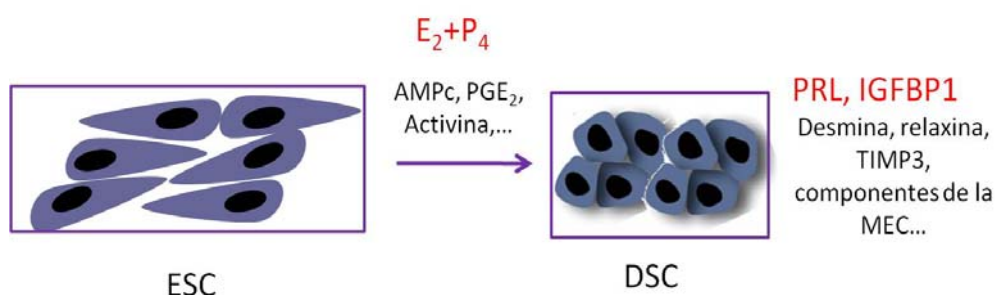


Figura 3. Caracterización de las células deciduales estromales. El fenotipo decidualizado se caracteriza por un aumento en los niveles de PRL e IGFBP-1 y por la transformación morfológica de las células deciduales previamente descrita. ESC: células estromales endometriales; DSC: Células estromales decidualizadas.

Estudios genómicos y proteómicos globales del proceso de decidualización de las ESC han podido confirmar la participación de familias génicas y proteicas implicadas en diversos procesos tales como la organización de la matriz extracelular, la adhesión celular, la organización del citoesqueleto, la transducción de señales, la diferenciación y la apoptosis (Borthwick y cols., 2003; Okada y cols., 2003, Popovici y cols., 2000, Garrido-Gomez y cols., 2011). Estos estudios, junto

con otros múltiples trabajos de investigación del proceso de decidualización, revelan el complejo mecanismo molecular que participa en la regulación de este proceso.

Aunque los niveles de progesterona están gobernando el proceso de diferenciación de las ESC, la regulación de genes necesarios en este proceso no solo está bajo el control transcripcional directo del receptor de progesterona. La respuesta al estímulo decidual inducido por la progesterona está regulada por un aumento en los niveles intracelulares del segundo mensajero AMPc (Gellersen y Brosens 2003).

Durante la fase secretora distintos factores locales liberados como la relaxina, la hormona liberadora de corticotropina (CRH) o la PGE₂, son capaces de aumentar los niveles de AMPc en las ESC y por lo tanto de iniciar el proceso de diferenciación (Huang y cols., 1987, Tang y cols., 2005).

El aumento en los niveles de AMPc intracelulares provoca la liberación de las subunidades reguladoras de la PKA (proteína quinasa A) permitiendo su activación. La ruta de la PKA activa a diversas vías secundarias que convergen en la activación de varios factores de transcripción. Estos factores de transcripción son los encargados de la regulación del conjunto de genes que participan en la diferenciación decidual.

Curiosamente, a pesar de la cantidad de transcritos diferencialmente expresados durante el proceso de diferenciación de las ESC muy pocos codifican factores de transcripción.

Entre los factores de transcripción con un papel relevante durante la decidualización está **FOXO1** (forkhead transcription factor). La familia de factores de transcripción FOXO está formada por cuatro proteínas, FOXO1, FOXO3a, FOXO4 y FOXO5. En el endometrio durante la señalización inducida por AMPc, FOXO1 se induce a nivel transcripcional y se activa por la fosforilación mediada por la quinasa AKT (Proteína quinasa B). FOXO1 es inducido tras el estímulo decidual en las ESC, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*, regulando la expresión de IGFBP-1 (Kim y cols., 2005). Además el silenciamiento de FOXO1 en las ESC mediante

transfección con ARN de interferencia (ARNi) disminuye la expresión de genes necesarios para la decidualización. Estos datos nos indican que las ESC requieren el estímulo de la progesterona para activar, a través de FOXO1, la expresión de genes necesarios para la diferenciación de las ESC.

STAT5 es un factor de transcripción con un importante papel durante la decidualización. STAT5 es un miembro de la familia de los factores de transcripción STAT (transductores de señales y activadores de la transcripción), que están implicados en la diferenciación de los tejidos. La decidualización *in vitro* de las ESC provoca la inducción transcripcional y la translocación nuclear de STAT5. Además en las ESC carentes de STAT5, la inducción de PRL en presencia de AMPc no se produce (Mak y cols., 2002). Estos estudios sugieren que STAT5 es fundamental para el correcto proceso de decidualización de las ESC.

C/EBP β es otro factor de transcripción que cumple un papel esencial en la fisiología del aparato reproductor femenino, donde participa en la ovulación y en el desarrollo de las glándulas mamarias. También se ha demostrado como ratonas mutantes para C/EBP β son infértiles y presentan fallos en el proceso de decidualización (Mantena y cols., 2006). Durante la decidualización los niveles de C/EBP β aumentan en las ESC tratadas con AMPc (Pohnke y cols., 1999). *In vivo* se han detectado altos niveles de C/EBP β en el núcleo de las ESC durante la fase secretora (Christian y cols., 2002). Además el promotor del gen de la PRL tiene secuencias de reconocimiento para C/EBP β . Por lo tanto se ha propuesto que este factor de transcripción actúa como un mediador de la ruta de señalización que participa en la respuesta decidual.

HOXA10 (homeobox 10) es un factor de transcripción con una expresión restringida espacialmente al útero dentro del tracto reproductor femenino de los ratones. En humanos se ha descrito un patrón de expresión similar siendo su expresión más evidente a mitad de fase secretora (Taylor y cols., 1998). Ratones deficientes para HOXA10 son estériles, indicando que este factor de transcripción

es esencial para la función reproductora (Satokata y cols., 1995) y su endometrio muestra deficiencias en el proceso de decidualización (Gendron y cols., 1997, Lim y cols., 1999). Además también se ha encontrado que las ESC humanas aumentan la expresión de HOXA10 en presencia de estrógenos y progesterona. Estos datos demuestran la importancia de HOXA10 en la regulación del proceso de decidualización.

La familia de factores de transcripción **Sp/KLF** (specificity protein/Krüppel-like factor) está formada por 9 miembros proteicos que se unen a dominios CG presentes en los promotores génicos. Dependiendo del contexto celular, Sp3 actúa como un inhibidor de Sp1 y especialmente durante la fase secretora se ha observado un aumento de Sp1 y una disminución de Sp3 en el endometrio (Krikun y Lockwood, 2002). Además la expresión de genes representativos del proceso de decidualización, como IGFBP-1, es regulada por la proporción Sp1/Sp3 (Krikun y cols., 2000). Estos datos sugieren que estos factores de transcripción cumplen un papel relevante durante la decidualización.

Se puede decir que la decidualización requiere una precisa regulación génica para llevar a cabo multitud de funciones celulares, tales como la proliferación, la apoptosis o la diferenciación. En los últimos años ha aumentado el conocimiento de las numerosas señales y factores de transcripción implicados en este proceso. A pesar de las complejas redes señalizadoras que participan en la regulación coordinada de los genes implicados durante la decidualización, se puede establecer un modelo simplificado que explica el mecanismo molecular que interviene en este proceso.

La diferenciación de las ESC está inducida por factores locales capaces de elevar los niveles celulares de AMPc que activan la vía de señalización del PKA. Esto conlleva a la expresión de multitud de factores que participan en vías de señalización secundarias que convergen junto con la cascada mediada por la progesterona en la activación de los factores de transcripción que hemos descrito

previamente. Estos factores de transcripción serán los encargados del control de genes necesarios para el proceso de decidualización (Figura 4).

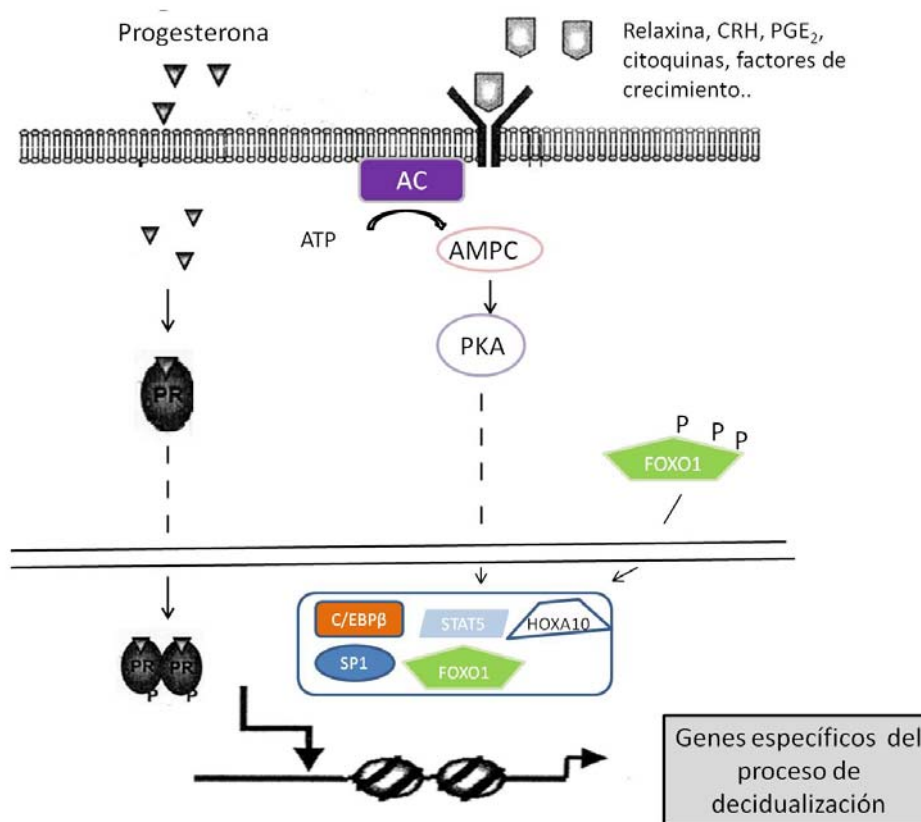


Figura 4. Vía de señalización del proceso de decidualización de las ESC. Diferentes factores autocrinos/paracrinos inducen un aumento en los niveles de AMPc que inducen el aumento de factores de transcripción que junto con la señalización del receptor de PR, inducen la activación de genes necesarios para el proceso de decidualización.

Defectos en el proceso de implantación y sobretodo de la placentación han sido atribuidos a alteraciones en la diferenciación estromal e invasión trofoblástica (Gellersen y cols., 2007). Por otro lado existen cada vez más pruebas de que un

endometrio hostil, inducido por defectos en el proceso de decidualización es la principal causa de las complicaciones ginecológicas (Teklenburg,G y cols.,2010).

2.3 Fases de la implantación embrionaria

El proceso de implantación no se trata de un hecho puntual, sino que es un proceso que consta de tres fases consecutivas que tienen lugar durante dos períodos (Figura 5):

- Período Preimplantatorio: Corresponde a la primera fase o fase de **aposición** u orientación del blastocisto hacia una zona luminal determinada del endometrio.
- Período de Implantación: Que consta de la fase de **adhesión**, donde la cubierta externa del blastocisto formada por las células trofoblásticas contacta directamente con el epitelio endometrial y una tercera fase o fase de **invasión** donde el trofoblasto embrionario penetra en la decidua materna.

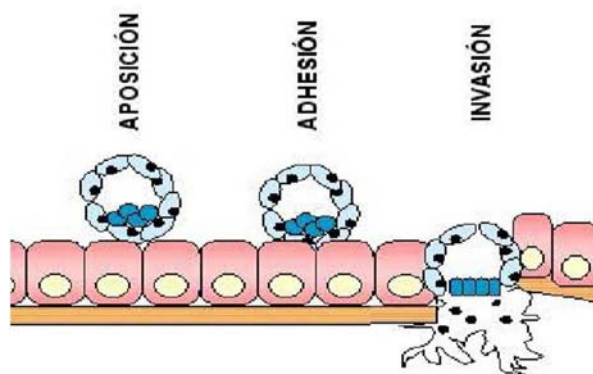


Figura 5. Esquema de las distintas fases del proceso de implantación embrionaria.

2.3.1 Periodo preimplantatorio. Fase de aposición

La fase de aposición tiene lugar entre los 5-6 días después de la ovulación. El blastocisto se posiciona en una zona determinada del útero que depende de la especie, siendo en humanos el tercio superior de la cara posterior del útero. Esta localización es importante ya que va a determinar la situación de la placenta.

2.3.2 Periodo implantatorio

Fase de adhesión

Durante la fase de adhesión, las superficies del trofoblasto y del endometrio experimentan cambios moleculares que favorecen las interacciones célula-célula entre los dos sistemas celulares. Estos cambios se regulan por las hormonas esteroideas (Aplin, 1997) y/o por el embrión (Simon y cols., 1998a; Simon y cols., 1998b) que inducen la expresión de moléculas de adhesión en la superficie celular del epitelio luminal durante la ventana de implantación.

Las integrinas y las cadherinas son moléculas de membrana con capacidad de interactuar con receptores celulares o con proteínas de la matriz extracelular (MEC) y por lo tanto intervienen mediando procesos de adhesión y migración. Entre estas moléculas podemos destacar el papel de L-selectina, que se presenta en la superficie del blastocisto y se une a ligandos de la superficie de las EEC receptoras. Otras proteínas presentes en el trofoblasto como ICAM-1, N-CAM y V-CAM-I o E-cadherina también han sido asociadas al proceso de adhesión (Juliano y cols., 2006, Zygmunt y cols., 1998, Coutifaris y cols., 1991).

En esta fase también se ha descrito la importancia de una serie de moléculas de acción local (autocrino-paracrino) como las citoquinas, LIF, CSF- α y en especial el sistema de la IL-1 (Simon y cols., 1996).

El blastocisto controla su adhesión a través de interacciones receptor-ligando con la superficie de las EEC y mediante la eliminación de potenciales barreras que impidan la adhesión al endometrio. Se ha comprobado como el blastocisto es capaz de inducir el corte de MUC1 en el sitio de implantación (Meseguer y cols., 2001). Otro mecanismo implicado en la adhesión embrionaria, es la inducción de un proceso de apoptosis de las EEC mediado por el ligando de Fas (FasL) presente en la superficie del trofoectodermo. La unión del FasL trofoblástico al Fas presente en las EEC, activa la vía apoptótica (Galan y cols., 2000). Este proceso es activado por el TGF β (Transforming growth Factor β) secretado por el embrión (Kamijo y cols., 1998). De esta manera el blastocisto se abre camino a través del endometrio dando paso a la fase de invasión.

Fase de invasión

Tras afianzar la unión del blastocisto al epitelio luminal, el trofoblasto comienza un proceso invasivo que alcanzará gradualmente el estroma uterino. Hacia el décimo día después de la fecundación, el blastocisto se encuentra embebido totalmente en el tejido estromal del útero, el epitelio ha crecido hasta cubrir todo el sitio de implantación y el trofoblasto continúa su expansión. El proceso más tardío, es el establecimiento de la circulación uteroplacentar que pone en contacto directo al trofoblasto con la circulación materna.

El control de este proceso invasivo está mediado por moléculas de adhesión como las integrinas y selectinas y por diversas proteasas de la MEC, entre ellas las serín-proteasas, metaloproteasas y colagenasas (Alexander y cols., 1996). Una vez en contacto con el estroma, el trofoblasto secreta proteasas que incluyen colagenasas, estromelisin y el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uAP) y de tejido (tAP). Estas enzimas permiten al trofoblasto degradar la MEC y penetrar en la red estromal (Strickly y cols., 1976). Las propiedades migratorias del trofoblasto han sido relacionadas con la actividad proteolítica del plasminógeno

activo (PA) que se activa por la acción de uAP. Además este sistema enzimático representa un mecanismo que facilita la remodelación de la vasculatura uterina y el desarrollo de la placenta (Zini y cols., 1992). El inhibidor del activador del plasminógeno (IPA-1) está presente en las células estromales deciduales limitando la actividad de la plasmina activa (Schatz y cols., 1995).

La familia de las metaloproteasas de la matriz (MMPs) es otro conjunto de proteasas implicadas en la degradación de la MEC. Se sabe que el trofoblasto secreta principalmente las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 (Cohen y cols., 2006) cuya acción está regulada por la acción de los inhibidores tisulares de tejido o TIMPs secretados por las células endometriales estromales (ESC) (Irwin y cols., 2001; Dimitriadis y cols., 2005).

En cuanto al papel de las integrinas, se sabe que el trofoblasto despolariza la integrina $\alpha 6 \beta 4$ (receptor de laminina) facilitando su capacidad de migración (Bischof y cols., 1997; Bischof y Campana, 1997). Por otro lado la invasión es facilitada por la expresión de las integrinas $\alpha 5$ y $\beta 1$ en el blastocisto que producen la activación de las MMPs.

Como hemos visto, múltiples moléculas contribuyen en la regulación del proceso de invasión embrionaria. Existe una regulación de las integrinas mediada por progesterona (Palomino y cols., 2005) que determina el importante papel de la regulación hormonal en el proceso de invasión embrionaria

Otro tipo de moléculas moduladoras del proceso de invasión son las citoquinas o factores de crecimiento que se encuentran regulando la expresión de integrinas y proteasas que participan, como hemos visto previamente, en la invasión trofoblástica. La migración del trofoblasto se encuentra estimulada por el factor de crecimiento de insulina tipo 2 (IGF-II) y por la proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGFBP-I), mientras que puede ser inhibida por TGF β (Irving y Lala, 1995). El TGF β -1 es el principal responsable de la regulación de la invasividad del trofoblasto. Se expresa en la decidua humana y es capaz de estimular la expresión de TIMP-1 en los fibroblastos. Además se ha demostrado su capacidad para inhibir a la proteasa estromalisina (Lash y cols., 2005; Lash GE,

2005). Por otro lado, TGF β -1 se activa en presencia de plasmina activa (PA) cuyos niveles aumentan en presencia de la uPA trofoblástica (Graham, 1997). Esto indica que la acción moduladora del endometrio se regula por la acción invasiva del trofoblasto.

La invasión embrionaria ha sido comparada con el proceso de invasión de las células tumorales, aunque a diferencia de estas últimas la invasión está estrictamente controlada espacial y temporalmente. Hasta hoy se han propuesto dos posibles mecanismos.

El primer mecanismo se basa en el hecho de que la gonadotropina coriónica humana (HCG) secretada por el embrión disminuye la actividad proteasa *in vitro* de uPA, reduciendo la invasividad del trofoblasto (Chou y cols., 2003).

Un segundo mecanismo lo constituye la barrera estromal endometrial. El mecanismo que adopta el endometrio para controlar la invasión del trofoblasto es la diferenciación de las ESC y la conversión de la MEC en una densa matriz celular. A este tejido modificado se le conoce como **DECIDUA** (Lala y cols., 1983), que constituye una especie de barrera física capaz de crear un ambiente local de citoquinas y factores de crecimiento que promueve más el anclaje del trofoblasto que la invasión por parte de éste (Graham y Lala, 1992; Tabibzadeh, 1998).

3. Remodelación de la matriz extracelular en el proceso de implantación

3.1 Generalidades de la matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) es una compleja estructura glicoproteica que sirve de soporte celular y que agrupa todos los elementos intercelulares presentes en los organismos pluricelulares. La composición de la MEC y de las células responsables de su síntesis son únicas para cada tipo de tejido, lo que determina una

ultraestructura tridimensional de la MEC específica a cada uno de estos (Tsang y cols., 2010).

Los componentes de la MEC pueden clasificarse en dos tipos:

- Fluidos que incluyen los glicosaminoglicanos (polisacárido) y proteoglicanos (glicoproteína).
- Fibrosos que se dividen en proteínas estructurales (colágenos) y glicoproteínas multifuncionales o adhesivas (fibronectina, laminina, trombospondina y otras).

Cada molécula desempeña funciones de manera integrada con las demás, esto hace que la matriz sea calificada como un verdadero complejo funcional.

Además de su función estructural, los componentes de la MEC hacen posible la interacción de proteínas que intervienen en la señalización celular y que modulan procesos tan diferentes como el crecimiento, diferenciación, angiogénesis, proliferación y migración celular (Hynes, 2009). Es por ello que la MEC cumple un importante papel en funciones fisiológicas tales como el desarrollo embrionario, las respuestas inflamatorias e inmunológicas y los procesos de reparación tisular (Bissell y cols., 1982, Ingber 1991). El control de todos estos procesos está mediado a través de las interacciones MEC-MEC y célula-MEC (Hynes, 2009). Además el descubrimiento de citoquinas, factores de crecimiento y de potentes proteínas funcionales que se localizan en el seno de la MEC nos hace comprender la relevancia de la misma en el proceso de comunicación intercelular (Bonewald 1999).

La composición de la matriz no es estática si no que existe un proceso de cambio y regeneración continuo. El equilibrio de la MEC se mantiene por la regulación de la síntesis, formación, degradación y remodelación de la misma. Factores clave de la remodelación de la MEC son las MMPs y sus inhibidores.

3.2 Las metaloproteasas matriciales: MMPs

Las metaloproteasas de la matriz o MMPs son endopeptidasas dependientes del zinc capaces de degradar colectivamente la mayoría de las proteínas de la MEC (Nagase y Woessner, 1999)(Murphy y cols., 1999). Las MMPs forman una familia de más de 23 endopeptidasas que se clasifican en función de su localización celular y del sustrato al que degradan. Distinguimos cuatro grupos principales: las gelatinasas A y B, las estromelisininas, las colagenasas y las metaloproteasas de membrana como la MT1-MMP (Figura 6)

Cada MMP posee una secuencia señalizadora N-terminal o *dominio señal*, un propéptido o *predominio* que mantiene a la enzima latente hasta que se elimina por proteólisis, y un *dominio catalítico* que contiene la región conservada de unión al Zn^{2+} .

Sobre esta estructura básica aparecen diversas variantes: un dominio tipo hemopexina que media la especificidad del sustrato y las interacciones con inhibidores endógenos, o un dominio transmembrana en el caso de las MMPs asociadas a la membrana plasmática.

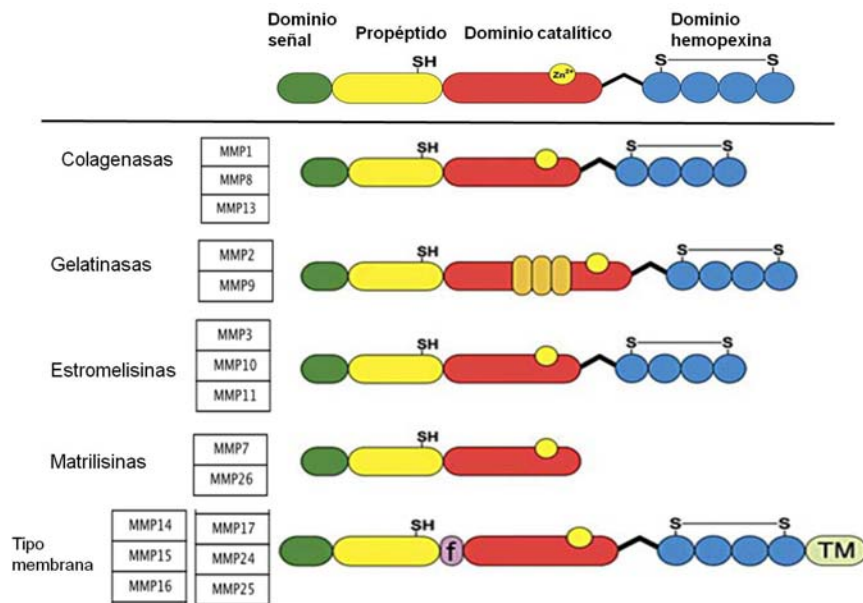


Figura 6. Estructura y clasificación de las metaloproteasas humanas. Las metaloproteasas matriciales humanas (MMPs) contienen un péptido señal (verde), un dominio propeptídico (amarillo) que debe clivarse para su activación, un dominio catalítico (rojo) que contiene el sitio de unión al zinc, y un dominio hemopexina (azul). Las MMPs de tipo membrana (MT-MMPs) contienen un dominio transmembrana (TM) adicional.

La actividad proteolítica de las MMPs se regula a tres niveles principales: transcripción, activación del proenzima e inhibición post-transcripcional. Otros posibles mecanismos también implicados incluyen la estabilidad del ARNm, la secreción enzimática o el reclutamiento en la membrana celular. Estos mecanismos operan coordinadamente para asegurar que la expresión y actividad de las MMPs se circunscriba a aquellos sitios y condiciones en los que es necesaria su actividad.

Las MMPs son secretadas por las células en forma inactiva (prometaloproteasa), activándose en el espacio extracelular por escisión del propéptido aminoterminal. Esta escisión está mediada por la acción de una cascada

proteolítica en la que intervienen citoquinas, serin-proteasas o incluso otras metaloproteasas como la MMP3 (Figura 7).

Entre estos moduladores, uPA y tPA son importantes activadores indirectos de las MMPs. Estas serin-proteasas son capaces de convertir plasminógeno en plasmina activa, la cual es capaz de degradar los componentes de la MEC directamente y de forma indirecta mediante la activación de las MMPs. También posee una acción proteolítica sobre los inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMPs) contribuyendo a la activación de las MMPs desde distintos niveles de regulación (Vassalli y cols., 1991).

Se ha descrito que la unión de uPA a su receptor (uPAR), no sólo activa al plasminógeno, sino que también desencadena una cascada de señales celulares que regulan procesos de migración celular en condiciones fisiológicas y patológicas. Por ello se ha asociado una importante función de uPA en procesos como la angiogénesis, la implantación embrionaria, la reacción inflamatoria, la cicatrización cutánea o la metástasis tumoral (Carmeliet y cols., 1994., Andreasen y cols., 1997; Mazar, 2001).

En cuanto a la inhibición de la acción de las MMPs, se sabe que tiene lugar a nivel extracelular y es mediada por inhibidores específicos, entre los que cabe destacar a la α 2-macroglobulina y a los TIMPs (Birkedal-Hansen y cols., 1993, Curry y Osteen, 2001)(Figura 7).

Las MMPs se encuentran implicadas, principalmente en regular la integridad de la MEC, mediante el procesamiento o degradación de numerosos componentes del espacio extracelular como colágenos, laminina o fibronectina (Lopez-Otin y Matrisian, 2007). Pero también participan en el procesado de una gran variedad de moléculas como proteínas de adhesión, factores de crecimiento, la escisión de receptores celulares y en la in/activación de citoquinas pro-inflamatorias (Figura 7).

La función de las MMPs se asocia a procesos fisiológicos como desarrollo, organogénesis, ovulación, implantación embrionaria así como en procesos patológicos como metástasis, fibrosis, úlceras y artritis reumatoide.

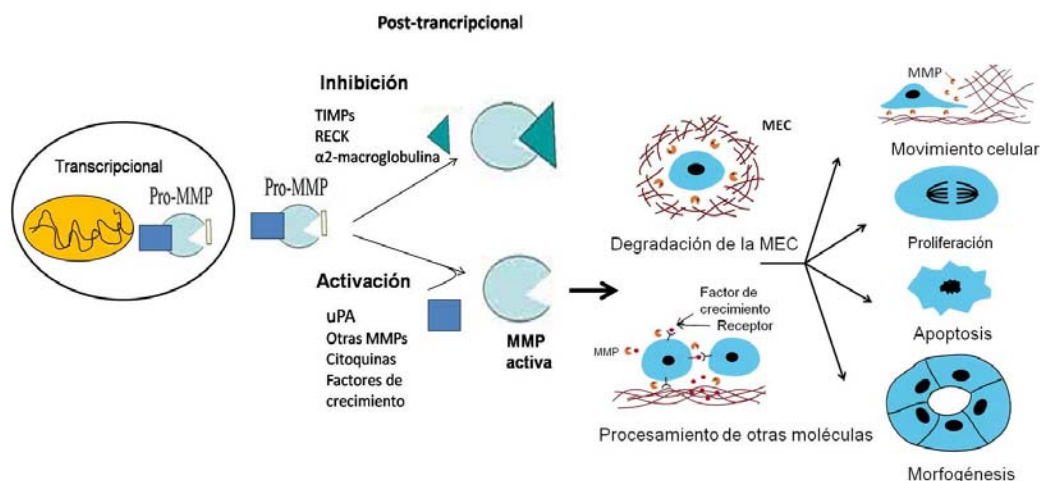


Figura 7. Regulación y mecanismo de acción de las MMPs.

3.3 Inhibidores tisulares de las metaloproteasas: TIMPs

La actividad de las MMPs en el espacio extracelular está controlada rigurosamente por un sistema de inhibidores que se divide, según su origen, en inhibidores serológicos e inhibidores tisulares (TIMPs) (Gomez y cols., 1997, Brew y cols., 2000). Los inhibidores serológicos actúan sobre un amplio espectro de proteasas e incluyen macroglobulinas, como la α 2-macroglobulina, los inhibidores del activador del plasminógeno (PAIs) y el α 1-inhibidor. El segundo grupo de inhibidores constituye el grupo formado por los TIMPs, los cuales se producen localmente e inhiben específicamente a las MMPs a nivel tisular.

La familia de los TIMPs incluye 4 proteínas, TIMP 1- 4, que comparten una secuencia peptídica idéntica. Los TIMPs actúan mediante interacción con su sitio activo o el dominio carboxiterminal, formando complejos 1:1 con las MMPs (Douglas y cols., 1997).

Aunque los TIMPs no parecen diferenciar las MMPs sobre las que actúan, se ha observado un cierto grado de especificidad. Por ejemplo, TIMP-1 se fija preferentemente a las colagenasas y a la MMP -3 y -9, mientras que TIMP-2 tiene una alta afinidad por MMP-2. Sabemos que los TIMPs -1 y -2 difunden en el medio extracelular, mientras que el TIMP-3 está ligado a los constituyentes de la MEC, por lo que actuaría impidiendo la fijación de las MMPs a su sustrato (Pavloff N y col, 1992; Leco KJ y col, 1994). Por último TIMP-4 posee una especificidad de sustrato similar a la del TIMP-2 (Gomez y cols., 1997, Leco y cols., 1997, Brew y cols., 2000).

Existen varias proteínas, también inhibitoras de las MMPs, que pueden presentar dominios homólogos a los dominios inhibidores de los TIMPs. Este es el caso de RECK, que es un inhibidor de las MMPs de la superficie celular y un regulador clave de la integridad de la MEC y de la angiogénesis (Oh y cols., 2001).

Los TIMPs son proteínas multifuncionales cuya acción no se limita exclusivamente a la inhibición de las MMPs ya que también intervienen en la regulación de numerosos factores de crecimiento como TNF- α (factor de necrosis tumoral) o FGF (Factor de crecimiento fibroblástico), que determinan el desarrollo tisular (Gomez y cols., 1997). Además, los TIMPs promueven el desarrollo embrionario (Sato y cols., 1994), actúan como factores antiangiogénicos (Murphy y cols., 1999), estimulan el crecimiento celular (Hayakawa y cols., 1992) y modulan la apoptosis (Talhok y cols., 1992).

3.4 Sistema de las metaloproteasas en el endometrio y en la interfase materno-embrionaria

Se sabe que la remodelación de la MEC es necesaria durante los procesos fisiológicos del endometrio, tales como la implantación, la decidualización o la menstruación, así como en procesos patológicos como la endometriosis (Sillem y cols., 1998).

La remodelación de la MEC a lo largo del ciclo menstrual, ocurre a nivel de composición y de distribución de sus componentes. Esto requiere la participación de proteasas implicadas en la degradación de la matriz, de sus inhibidores y de cambios en la síntesis celular de los diferentes componentes de la MEC.

3.4.1 Composición de la MEC endometrial a lo largo del ciclo

Durante la decidualización se remodela la composición de la MEC, coincidiendo con un periodo crítico para el proceso de implantación como es la invasión del trofoblasto en el endometrio. En concreto, el tejido decidual aparece más hidratado debido a un aumento en ácido hialurónico (Salamonsen y cols., 2001) además la producción de colágeno tipo I, II y III y de fibronectina es menor en mitad de fase secretora. El colágeno tipo I y III cambian de un patrón de distribución difuso a uno fibrilar apareciendo más compactados durante la decidualización (Aplin, 2000).

Las células estromales decidualizadas secretan laminina, colágeno tipo IV y heparan sulfato, acumulándose en la membrana basal sobre las que se asienta el epitelio luminal y en la matriz intersticial que rodea a las células estromales. Esta red de componentes matriciales constituyen las principales barreras físicas al trofoblasto invasivo (Iwahashi y cols., 1996). Además estos componentes interactúan con integrinas y cadherinas de la superficie celular presentes tanto en las ESC como en el trofoblasto. Estos datos nos indican que la composición de la MEC podría estar modulando señales celulares implicadas en la diferenciación y la migración, tanto de las ESC como del trofoblasto.

3.4.2 Sistema de las metaloproteasas en el endometrio

Durante el ciclo menstrual el endometrio pasa por periodos de proliferación, diferenciación, neoangiogénesis, apoptosis y rotura del tejido, procesos en los que se ha asociado un importante papel a las MMPs y sus inhibidores.

Las MMPs se expresan constitutivamente por todos los tipos celulares, aunque se sabe que su expresión puede ser inducida por la acción de citoquinas (TNF- α), interleuquinas (IL-1), hormonas (GnRH) y factores de crecimiento (EGF, VEGF, PDGF), mientras que las hormonas esteroideas como progesterona y miembros de la familia de TGF β son reguladores negativos (Chakraborti y cols., 2003, Osteen y cols., 2003). Como se ha detallado anteriormente, los niveles de estos reguladores se ven modificados a lo largo del ciclo menstrual por lo que inducen cambios en la expresión de las proteasas.

Estudios de inmunohistoquímica así como análisis de expresión de los ARNm, han establecido un patrón de expresión diferencial de las MMPs y sus inhibidores en fases específicas de ciclo menstrual (Goffin y cols., 2003) (Figura 8). En general los niveles de las MMPs son bajos en fase secretora tardía coincidiendo con la presencia de altos niveles de progesterona. Algunas MMPs, como MMP- 2, -7, -11 y MT1-MMP, se expresan en fase proliferativa o secretora, sin cambios significativos.(Goldman y Shalev, 2003, Rodgers y cols., 1994). En cambio, los niveles de ARNm de MMP-1 y -9 son mínimos en mitad de fase secretora temprana y se ven aumentados al final de este periodo debido a la caída en los niveles de estrógenos y progesterona (Salamonsen, 1994).

También se ha establecido un aumento en los niveles de ARNm de TIMP-1 durante la fase secretora. Por otro lado la expresión de TIMP-2 en el compartimento estromal se mantiene estable durante todo el ciclo menstrual. En cuanto a TIMP-3, se ha determinado un aumento significativo de los niveles de expresión en fase secretora tardía. Este periodo coincide con el momento de la diferenciación

decidual y por ello TIMP-3 está considerado un marcador de decidualización cuya función es limitar la invasión trofoblástica (Gao y cols., 2001, Higuchi y cols., 1995).

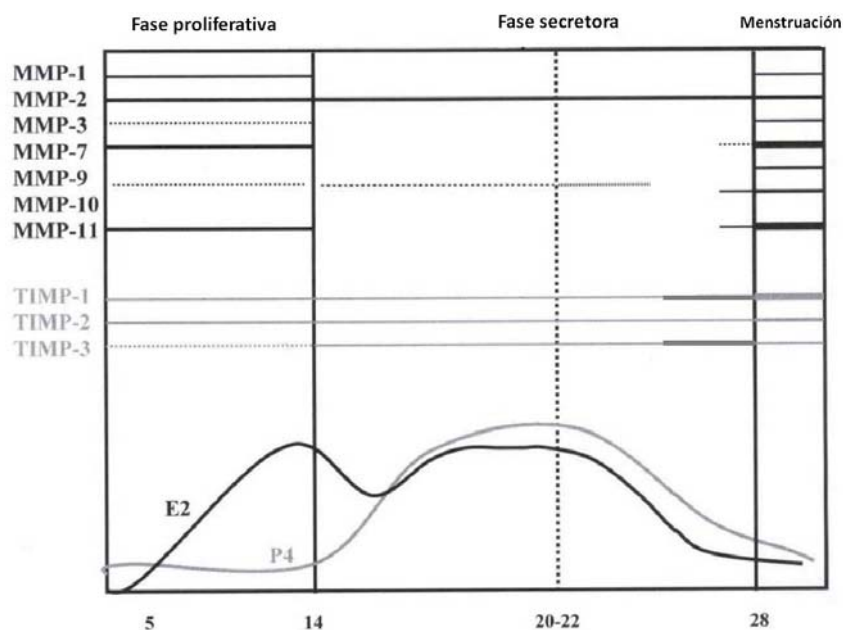


Figura 8. Representación esquemática del patrón de expresión de MMPs y TIMPs durante las distintas fases del ciclo menstrual. Los niveles de expresión quedan indicados por el espesor de las líneas. En la parte inferior de la gráfica se indican los niveles relativos de estradiol (E_2) y progesterona (P_4) (Adaptada de Osteen y cols., 2003).

Una expresión aberrante de las MMPs y/o de sus inhibidores se ha asociado a patologías o disfunciones endometriales tales como la endometriosis, la preeclampsia o el cáncer endometrial (Lockwood y cols., 2008; Sillem y cols., 1998, Di Nezza y cols., 2002). El endometrio de mujeres con endometriosis, presenta un aumento en la expresión y secreción de MMP-9 y en menor medida de MMP-2 así como una disminución en la secreción de TIMP-1 durante la fase secretora (Pitsos y Kanakas, 2009). También se ha encontrado un aumento en los niveles de MMP-9 en tejido de placenta de mujeres con preeclampsia (Lockwood y cols., 2008).

3.4.3 Sistema de la metaloproteasas en la interfase materno-embionaria

Por razones éticas y legales, el estudio *in vivo* de los procesos que acontecen durante la fase temprana de la invasión embionaria en los humanos se encuentra limitado. Es por ello que la mayor parte de la información acerca del papel de las MMPs y sus inhibidores en la interfase materno-embionaria procede de modelos animales o de cultivos celulares humanos.

En ratones, la expresión de las proteasas e inhibidores asociados a la degradación de la MEC, presenta un patrón de expresión temporal y específico de tipo celular durante la implantación. En particular, se han detectado altos niveles de expresión de MMP-9 en las células trofoblásticas en día 4.4 de gestación aumentando de forma considerable en las células trofoblásticas diferenciadas entre los días 6.5-8.8 (Alexander y cols., 1996). El aumento en la expresión de MMP-9 coincide temporalmente con el aumento en la expresión de TIMP-3 en las células estromales decidualizadas (Leco y cols., 1996).

Estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de las células trofoblásticas de degradar e invadir la MEC gracias a la acción de proteasas, principalmente de MMP-2 y MMP-9 así como de uPA (Bischof y cols., 2000). Por otro lado, las ESC secretan importantes cantidades del inhibidor de plasmina PAI contrarrestando el efecto de uPA secretado por las células trofoblásticas. Por lo tanto el estroma decidualizado actúa disminuyendo la actividad proteasa a través del aumento en la expresión de inhibidores post-transcripcionales.

Estos resultados ponen de manifiesto que el trofoblasto durante su diferenciación alcanza un potencial invasivo a través de la síntesis de proteasas capaces de degradar la MEC, que será limitado por las células estromales decidualizadas mediante la secreción de TIMPs.

Además estos datos determinan que las principales proteasas implicadas en el control del proceso de implantación, son las serin-proteasas del sistema plasmina/plasminógeno y las metaloproteasas de la matriz.

Las MMPs no solo participan en la degradación de los componentes de la MEC, sino que también pueden activar mediante proteólisis importantes moléculas reguladoras del proceso de implantación. Un buen ejemplo es la rotura y activación de las IGFBPs por las MMPs o la inhibición de IGF por TIMP-1 y TIMP-3, regulando la vía de señalización mediada por el IGFBR. Esta vía de señalización participa en el proceso de decidualización y regula el potencial invasivo del trofoblasto (Ganef y cols., 2009). Otro caso es la activación del TGF β por MMP-2 o MMP-9 favoreciendo el proceso invasivo (Irwin y cols., 2001, Yu y Stamenkovic, 2000). Otro importante mediador es la IL-1 β que también se procesa y activa por MMP-2,-3 o -9 y participa en la receptividad endometrial regulando la expresión de integrinas (Simon y cols., 1998a).

Para poder determinar la importancia de las MMPs y de sus inhibidores durante el proceso de implantación, se han realizado diversos estudios de manipulación génica. Los resultados obtenidos revelan que los efectos del sistema proteolítico en el proceso de implantación son variables y mínimos (Salamonsen y Nie, 2002). Concretamente, ratones mutantes para MMP-2 son fértiles y no se ve afectado el proceso de implantación (Rudolph-Owen y cols., 1997). En cambio, en ratones mutantes para MMP-9, en ratones con sobreexpresión de TIMP-1 o ratones tratados con inhibidores de las MMPs no tienen bloqueado el proceso de implantación ya que el tamaño de la camada no se ve alterado, aunque se observa una disminución en la extensión del proceso de decidualización (Rinkenberger y cols., 1997). Estos datos nos indican que las MMPs están participando en el proceso de diferenciación estromal.

Por otro lado ratonas mutantes carentes de TIMP-1 presentan una morfología uterina anormal y fertilidad reducida (Nothnick, 2000).

El hecho de que el proceso de implantación no se encuentre afectado significativamente, puede ser debido a que en estos estudios la diana molecular es una sola proteína de la red de moduladores de la MEC. La disminución en la actividad de una sola molécula es compensada por otras. Sería necesario

desarrollar otras alternativas, que nos permitan la inhibición simultánea de más dianas y se pueda conocer el efecto del conjunto de proteasas y sus inhibidores en la MEC.

En resumen, el sistema implicado en la remodelación de la MEC parece contribuir al desarrollo del proceso de diferenciación decidual y en el control del proceso de invasión trofoblástica.

4. Las “ómicas” en el endometrio

En los últimos años, tras el desarrollo de las nuevas tecnologías, multitud de estudios se han centrado en caracterizar la firma transcriptómica de un fenotipo celular determinado.

Estudios genómicos globales realizados con la tecnología de los microarrays de muestras de endometrio o de células endometriales aisladas, han podido establecer un perfil transcriptómico específico de las distintas fases del ciclo menstrual o de determinadas patologías endometriales. Concretamente, se han identificado los genes diferencialmente expresados durante la fase receptiva, tanto en muestras de endometrio como en las EEC aisladas (Borthwick y cols., 2003, Carson y cols., 2002, Riesewik y cols., 2003, Schmidt y cols., 2005, Mirkin y cols., 2005, Otsuka y cols., 2007). La misma tecnología ha sido aplicada para el estudio de los genes implicados en el proceso de decidualización.

En nuestro laboratorio los microarrays han sido utilizados para la identificación de aquellos genes implicados en la adquisición del estado receptivo endometrial (Horcajadas y cols., 2007). Posteriormente esta tecnología ha sido de utilidad para el desarrollo de una herramienta de diagnóstico del perfil transcriptómico de receptividad endometrial, usado ya en pacientes con fallos repetitivos de implantación (Díaz-Gimeno y cols., 2011).

Otra de las vías para el estudio global de moléculas relevantes en los procesos biológicos, es el campo de la proteómica. Se ha determinado el perfil proteico en el endometrio durante las distintas fases del ciclo menstrual (Parmar y cols., 2009). En nuestro laboratorio se ha estudiado el proteoma de la receptividad endometrial, comparando muestras de endometrio en fase pre-receptiva vs receptiva. También se ha establecido el proteoma del proceso de decidualización *in vitro* (Dominguez y cols., 2009, Garrido-Gomez y cols., 2011).

Los perfiles transcriptómicos o proteómicos pueden ser muy útiles para identificar los mecanismos involucrados en un proceso celular fisiológico y son de ayuda a la hora de detectar aquellas alteraciones asociadas a la aparición de una enfermedad. Además pueden ser una potente herramienta diagnóstica, ya que permite caracterizar fenotipos celulares específicos. Sin embargo, estos estudios no aportan información de los mecanismos responsables de la regulación de las moléculas implicadas en estos procesos.

La epigenética incluye aquellos cambios en el patrón de expresión génica que no conllevan cambios en la secuencia de nucleótidos. Los diferentes mecanismos epigenéticos son procesos esenciales en la regulación de la expresión génica, y por lo tanto son responsables del establecimiento de los patrones transcriptómicos y proteómicos de un fenotipo celular concreto. Además establecer el patrón epigenético no sólo es necesario para un mayor conocimiento de los procesos moleculares endometriales o para el desarrollo de herramientas diagnósticas, sino porque puede aportar nuevas vías de intervención para la terapia de determinados desordenes ginecológicos.

5. EPIGENÉTICA

La epigenética se define como el estudio de los cambios en la función genética que se transmiten de una generación a otra por herencia meiótica o mitótica y que no implican cambios en la secuencia de ADN (Berger y cols., 2009). De modo que

esta disciplina se centra en el estudio de la información génica que se superpone al genoma y que contribuye al mantenimiento del estado transcripcional y de la identidad celular.

Durante el desarrollo de los organismos multicelulares, un único cigoto da origen a miles de subtipos celulares, que se diferencian en los distintos tejidos que lo conforman. Como todas las células del organismo tienen la misma información genética, existe un patrón de lectura discriminativo, que dictado por la epigenética va a determinar el linaje de cada célula. El programa de expresión genética debe mantenerse, asimismo, a lo largo de las generaciones celulares subsiguientes a través de la división celular. Por lo tanto los mecanismos epigenéticos trabajan en conjunto, regulando los patrones de expresión génica claves durante el desarrollo y la diferenciación celular (Figura 9).

La diferencia más importante entre el mecanismo genético y el epigenético es que estos últimos pueden ser reversibles, ya que se modulan por el entorno. Esto convierte a la epigenética en un importante mediador de la interacción del genoma con el ambiente. Se conocen una gran cantidad de factores ambientales, como la nutrición o compuestos xenobióticos, que intervienen en el establecimiento o mantenimiento del patrón epigenético (Herceg y Vaissiere, 2011).

La vía principal de modulación epigenética, es a través de modificaciones en la estructura de la cromatina. El tamaño de los genomas eucariotas hace necesario un sistema de almacenamiento efectivo, que se basa en el ensamblaje del mismo en una estructura denominada cromatina. La cromatina puede adoptar varias conformaciones con diferentes propiedades químicas y físicas. Distintas regiones genómicas pueden mostrar variaciones en el nivel de compactación de la cromatina y por lo tanto en la accesibilidad a la maquinaria de transcripción. Es por ello que la forma en que la cromatina se encuentra organizada, compactada y estabilizada ejerce una gran influencia sobre los procesos génicos llevados a cabo en el núcleo.

Los principales mecanismos de modificación de la estructura de la cromatina implican la metilación del ADN y la modificación de las histonas, que junto con los

ARN no codificantes pequeños (ARN nc) constituyen las principales vías de regulación epigenética que intervienen en el control de la expresión génica (Dolinoy 2007, Jirtle y Skinner 2007).

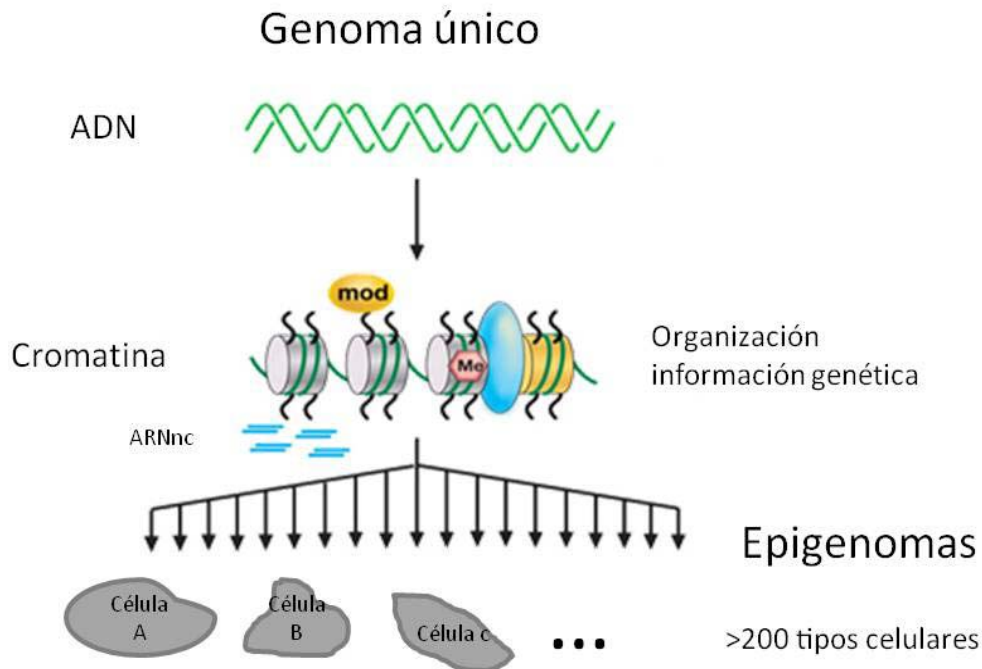


Figura 9. Epigenética. El genoma constituye una secuencia de nucleótidos invariable dentro de un mismo individuo. El epigenoma, determina el modo en que la cromatina es organizada y junto con los ARN nc regulan la activación o represión génica. Este epigenoma es variable dependiendo del tipo celular y del ambiente al que las células son expuestas. (Adaptada de Allis, 2006).

5.1 Metilación del ADN

La metilación del ADN es una modificación covalente del ADN que tiene lugar en residuos de citosina localizados en secuencias dinucleótidas CpG que se agrupan constituyendo las denominadas islas CpG (Bird, 1992). Gran número de

estas islas CpG se concentran cerca del extremo 5' de los promotores génicos (Gardiner-Garden y Frommer, 1987). Las enzimas encargadas de establecer y mantener el patrón de metilación del ADN, son las ADN metil-transferasas y se han identificado 5 enzimas principales:

- DNMT1 tiene la función de asegurar que se copie de forma adecuada el patrón de metilación durante el proceso de replicación (Okano y cols., 1999). De esta manera se mantiene una memoria epigenética que se transmite de manera idéntica a las células hijas.
- DNMT2, es otra metiltransferasa que a pesar del nombre que posee, actualmente se conoce que transfiere grupos metilo a las citosinas presentes en el ARN (Goll y cols., 2006).
- DNMT3A y 3B son las encargadas de la adición de “novo” grupos metilo.
- DNMT3L se encuentra normalmente inactiva, excepto durante la gametogénesis, donde cumple una importante función participando en el establecimiento del proceso de impronta materno (Bourc'his y cols., 2001).

La metilación de las islas CpG en las regiones promotoras está asociada a la represión transcripcional (Bird, 1992) y para tal fin se han propuesto varios mecanismos. Por un lado la presencia del grupo metilo impide la unión de factores de transcripción o proteínas reguladoras como es el caso de AP-2, E2F o ATF/CREB (Tate y Bird, 1993). La secuencia CpG metilada también puede ser reconocida por proteínas represoras de la transcripción que bloquean indirectamente la unión de los factores de transcripción, limitando así el acceso a los elementos reguladores (Figura 10). También se pueden unir proteínas, que en asociación con otras enzimas, regulan la condensación de la cromatina, este es el caso de la familia de las proteínas MBD (methyl binding CpG domain) (Wade, 2001). Estas proteínas establecen una conexión entre los mecanismos de metilación del ADN y las modificaciones de las histonas ya que, entre otras funciones, son capaces de reclutar histona deacetilasas (HDAC) (Suzuki y cols., 2003).

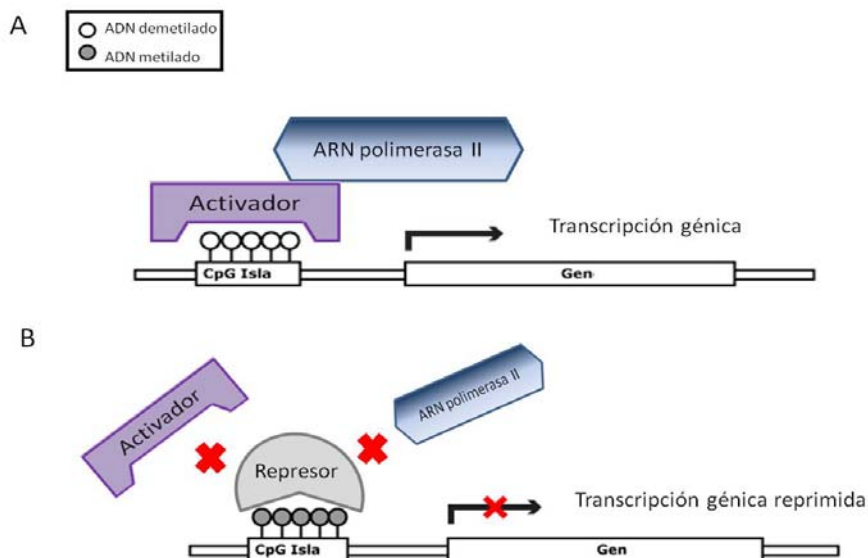


Figura 10: Mecanismo de acción de la metilación del ADN. A. Las Islas CpG demetiladas son reconocidas por la maquinaria de transcripción activando la expresión génica. B. Los residuos de las islas CpG metilados impiden la unión de la maquinaria transcripcional, de forma directa o indirecta por la unión de represores transcripcionales que impiden el acceso a los promotores. La transcripción es reprimida.

Aproximadamente el 10-20% de los genes presentan patrones de metilación específicos y por lo tanto están asociados a la función celular dentro de un tejido o al estado fisiológico en el que se encuentra.

La represión génica mediada por la metilación del ADN es, además, responsable de la inactivación del cromosoma X, la impronta genómica o la represión de secuencias génicas repetitivas como los retrotrasposones (Li y cols., 1993, Panning y Jaenisch, 1998)(Walsh y cols., 1998). Además se sabe que la metilación del ADN está implicada en la regulación de los procesos de reparación del ADN y de estabilidad genómica (Chuang y cols., 1997, Lengauer y cols., 1997).

La presencia de patrones de metilación alterados se ha asociado con la aparición de ciertas enfermedades. De hecho en células tumorales se suele

encontrar un estado global de hipometilación, aunque es frecuente hallar un estado de hipermetilación en genes supresores de tumores así como los un estado de hipometilación en los promotores de protoncogenes (Esteller, 2008).

5.2 Modificación post-traducciona de las histonas

La unidad básica repetitiva de la cromatina es el nucleosoma. El nucleosoma está constituido por un núcleo central que consta de 147pb de superhélice de ADN enrollado alrededor de un complejo formado por un octámero de histonas. Dicho octámero está compuesto por un heterotetrámero central de histonas H3 y H4 flanqueadas por dos heterodímeros de H2A y H2B en la forma ([H2A-H2B][{H3-H4}2][H2A-H2B]) (Figura 11) (Kornberg, 1974, Luger y cols., 1997).

Las histonas son pequeñas proteínas básicas ricas en los aminoácidos lisina y arginina. Las cuatro histonas poseen un extremo C-terminal situado en un dominio con estructura globular localizado dentro del nucleosoma y un extremo N-terminal o “cola” extendido fuera del mismo. Una característica singular es la variedad de modificaciones a las que puede ser expuesta la “cola” de las histonas. Las principales modificaciones que se han encontrado incluyen: la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, y sumoilación entre otras (Figura 11) (Kouzarides, 2007; Lindner, 2008). Dichas modificaciones son covalentes y poseen la propiedad común de regular el estado de compactación de la cromatina.

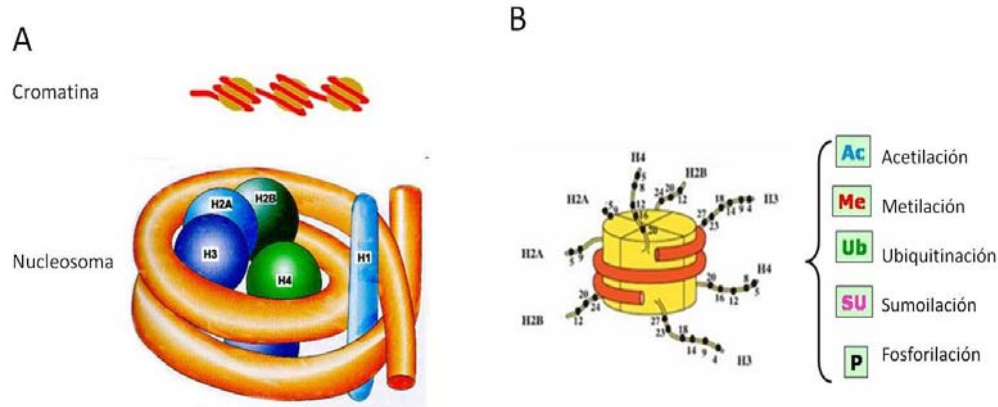


Figura 11. Histonas. A) Representación esquemática de la organización nucleosómica en la formación de la cromatina. Estructura del nucleosoma, donde se muestra la organización de las histonas, que se encuentran formado un octámero, alrededor del cual se enrollan casi dos vueltas de DNA. B) Principales modificaciones post-traduccionales de las colas de las histonas.

Las enzimas implicadas en estos procesos son: histona acetilasas (HATs - acetilación), metilasas de histonas (HMTs - metilación), quinasas de histonas (HKs - fosforilación), etc (Sterner y Berger 2000, Zhang y Reinberg 2001, Nowak y Corces 2004). Aunque estas enzimas son muy variadas, todos estos procesos están muy relacionados entre sí. De hecho algunas enzimas necesitan, por ejemplo, que el sustrato esté metilado para reconocerlo y acetilarlo.

Las modificaciones post-traduccionales de las histonas, en conjunto, están directamente relacionadas con la regulación de la transcripción génica. Estas modificaciones establecen una nueva hipótesis denominada “código de las histonas”, según la cual el conjunto de modificaciones llevadas a cabo sobre una o más histonas, a través de cambios en las interacciones entre el ADN-histona o entre histonas, regulan el estado de empaquetamiento de la cromatina y por lo tanto el acceso de las proteínas (como por ejemplo factores de transcripción) a la cromatina. Esto altera el patrón de expresión génica llevando a una activación o represión de la transcripción, que repercute en el fenotipo celular sin cambiar el

genotipo. Además las modificaciones post-traduccionales de las histonas determinan la formación de la eucromatina y heterocromatina (Jenuwein y Allis 2001).

5.2.1 Histonas: acetilación y deacetilación

El proceso de modificación post-traduccionales de las histonas más y mejor estudiado es la acetilación/deacetilación. La acetilación consiste en la adición de un grupo acetilo a residuos conservados de lisina de la cola de las histonas. La acetilación también se puede dar en determinados factores de transcripción y otras proteínas nucleares y se asocia con una activación de la transcripción génica. Por el contrario la deacetilación de las histonas consiste en la eliminación de los grupos acetilos y se relaciona con silenciamiento génico (Fuks, 2005).

La acetilación y deacetilación de las histonas juega un papel importante en diversos procesos relacionados con la estructura de la cromatina y por lo tanto en el control de la transcripción (Kouzarides, 2007). Se han relacionado regiones de cromatina expandida (eucromatina) y activa transcripcionalmente con elevados niveles de acetilación, mientras que la cromatina compacta (heterocromatina), no accesible a la maquinaria de transcripción, posee niveles de acetilación más bajos. La acetilación tiene la capacidad de relajar la estructura de la cromatina ya que neutraliza las cargas básicas de los residuos de lisina y desestabiliza la unión a las cargas negativas de los grupos fosfato del ADN (Figura 12) (Peterson y Laniel, 2004).

Otro de los mecanismos de acción regulado por la acetilación (y otras modificaciones post-traduccionales) es el reclutamiento de proteínas no-histonas, a través de dominios de unión específicos, que son capaces de modificar la estructura de la cromatina. Un ejemplo son las proteínas cuya estructura posee un bromodominio a través del cual interaccionan con los residuos de acetil-lisina (Zeng y Zhou 2002).

Por lo tanto el proceso de acetilación/deacetilación es capaz de establecer un ambiente cromatínico adecuado para la expresión de un patrón genómico determinado a través de la regulación coordinada de procesos como son el ensamblaje del nucleosoma y la regulación del proceso de transcripción, entre otros (Iizuka y Smith, 2003, Couture y Trievel, 2006; Kouzarides, 2007, Shahbazian y Grunstein, 2007).

El patrón de acetilación de las histonas se mantiene gracias a la participación de dos grupos de enzimas con funciones opuestas: las histona acetiltransferasas (HATs) y las histona deacetilasas (HDACs). Ambos procesos están interrelacionados y cooperan en la regulación de la expresión génica.

Las HATs son las enzimas encargadas de la transferencia de grupos acetilo a residuos de lisina. Las HATs se dividen en dos grupos dependiendo del mecanismo de acción y de la localización celular: HAT A y HAT B. A su vez la clase A puede dividirse en tres subclases principales, GNAT, MYST y CBP/P300 dependiendo de su homología a las proteínas encontradas en levadura.

La familia de las HDACs está compuesta por al menos 12 miembros que se agrupan en cuatro clases, establecidas en función de la homología a las proteínas de la levadura y que se diferencian en la secuencia de ADN que reconocen y la organización de sus dominios.

Tanto las HATs como las HDACs actúan como parte de complejos multiproteicos constituidos por factores de transcripción específicos para ciertas secuencias y sus respectivos cofactores (Figura 12).

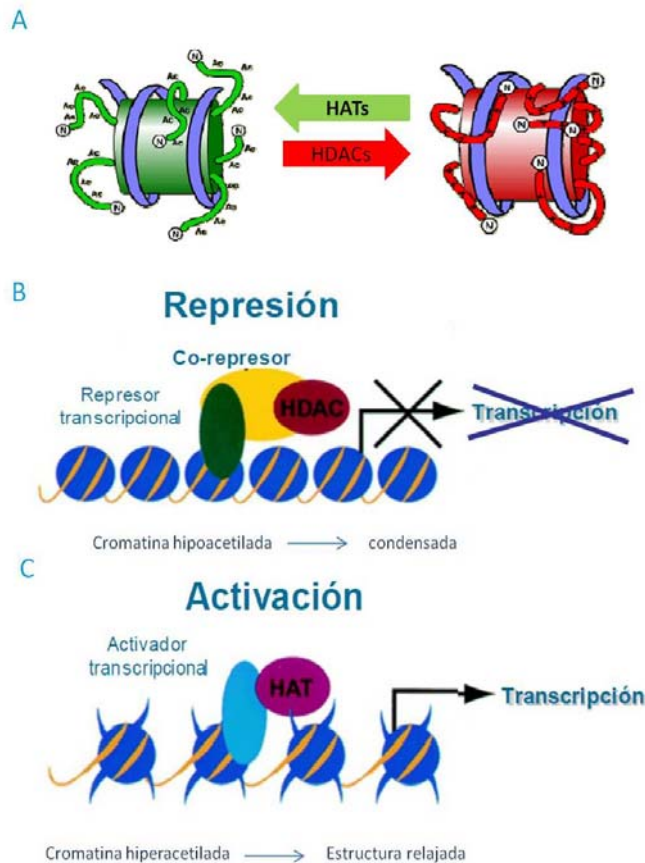


Figura 12. Esquema del mecanismo de acción de las HATs y HDACs. A. Las HDACs catalizan la reacción de eliminación del grupo acetilo incorporado por las HATs. B) y C) Representación esquemática de la acción de las HDACs y las HATs sobre la transcripción. La unión de los complejos represores formados por las HDACs conlleva hipoacetilación de la cromatina y por tanto condensación. Como resultado la transcripción es reprimida. Cuando se produce la acetilación de la cromatina ésta se vuelve accesible a los activadores y la transcripción es posible.

La influencia de la acetilación en el proceso de transcripción no solo se debe a un mecanismo dependiente de modificación de las histonas (Sternier y Berger, 2000, Glozak y cols., 2005). La acetilación también modula la actividad de factores

de transcripción (como TFII β , TFIIIF, c-MYC, p53, ER α) de proteínas nucleares (como GATA-1 o MyoD) o incluso de chaperonas (HSP90) sugiriendo una importante función de las HATs y las HDACs como coreguladores de la transcripción (Kuo y Allis, 1998).

En la última década, el conocimiento de las enzimas implicadas en el patrón de acetilación ha despertado un interés creciente, de modo que a día de hoy existe una gran información acerca de sus mecanismos de acción, dianas celulares y su implicación en la fisiología celular así como su asociación en patologías.

5.2.2 Regulación de las HATs y HDACs: Inhibidores

Debido a la gran importancia del papel de las HATs y las HDACs en la homeostasis celular, estas enzimas van a estar estrictamente reguladas. Se ha descrito un mecanismo de regulación complejo que se establece a múltiples niveles, como a nivel de transcripción, modificación post-transcripcional o localización subcelular entre otros.

Se conocen distintas rutas de señalización implicadas en la regulación de la actividad de estas enzimas. Diversos estudios han demostrado que las HATs están reguladas por fosforilación. Esta fosforilación puede ser llevada a cabo por varias quinasas como son Cdk2, proteína quinasa A (PKA), PKC, quinasa dependiente de Calcio/Calmodulina (CaMK) y algunas de las MAPK (Ait-Si-Ali y cols., 1998, Zanger y cols., 2001, Saha y Pahan, 2006).

La acetiltransferasa CBP se activa a través de una ruta dependiente de AMPc, en la vía que involucra al PKA (Chrivia y cols., 1993). Esta ruta, como ya hemos descrito previamente, participa en la diferenciación de las ESC durante la deciduización.

Además de estos mecanismos de regulación, existen moléculas capaces de competir de forma específica con el sustrato enzimático de las diferentes HATs y HDACs y por lo tanto funcionan inhibiendo la actividad enzimática.

Se han identificado varias moléculas capaces de inhibir específicamente a las HATs como son:

- Ácido anacárdico y garcinol: Inhibe la HAT p300 y PCAF
- Lisina-CoA: Inhibe p300
- H3-CoA-20: Inhibe PCAF
- MB-3: Inhibe Gcn5 en humanos

En general estas moléculas son compuestos de baja permeabilidad y baja estabilidad metabólica.

También se han descrito moléculas que actúan como inhibidores de la actividad HDAC. El más importante es un producto natural, la Trichostatina A o TSA. Fue aislado de *Streptomyces hygroscopicus* y fue catalogado como antibiótico fungistático. Es un inhibidor de las HDACs de clase I y II pero no afecta a la clase III (Yoshida y cols., 1990). Se ha demostrado que TSA es capaz de modificar los niveles de expresión de aproximadamente, el 2% de los genes de los mamíferos. Por ello se ha determinado que sólo un conjunto determinado de los genes es sensible a los niveles de acetilación de las histonas (Van Lint y cols., 1996).

Los inhibidores de las HDACs (HDACi) han sido ampliamente estudiados. Se sabe que los HDACi, a través de cambios en el patrón de expresión génica provocan restricción del crecimiento celular, inducción de apoptosis e inhibición de la angiogénesis (Figura 13) (Marks y cols., 2000, Vigushin y Coombes, 2002).

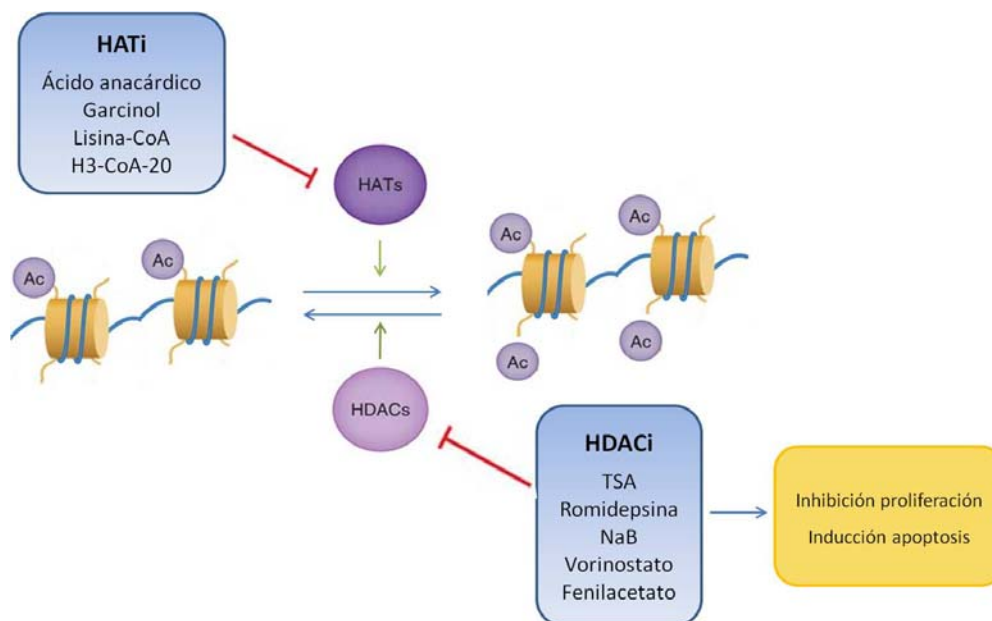


Figura 13. Inhibidores de las HATs/HDACs. Los HDACi impiden la eliminación de los grupos acetilos asociados a las histonas, provocando la activación transcripcional. Por el contrario los HATi impiden la adición de nuevos grupos acetilos a las histonas. Como se indica en la figura, se conocen una gran variedad de compuestos con capacidad de inhibir la acción de las HATs y HDACs.

A pesar de que el mecanismo de acción de los HDACi no se conoce con detalle a nivel molecular en todos los casos, hoy en día son agentes terapéuticos emergentes (Kim y Bae, 2011). De hecho el vorinostato estructuralmente parecido al TSA y el depsipeptido han sido recientemente aceptados por la FDA en 2006 y 2009 respectivamente. Estos HDACi han sido clínicamente probados en pacientes con linfoma cutáneo de células T (CTCL), donde se administra junto con la quimioterapia obteniendo resultados muy positivos (Luu y cols., 2008, Piekarz y cols., 2001). Además existen muchos estudios que ponen de manifiesto la eficacia del uso de estos compuestos como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, inflamación crónica o infección por VIH (Hockly y cols., 2003, Nasu y cols., 2008).

5.3 miRNAs

5.3.1 ARN no codificantes de pequeño tamaño

Los ARN no codificantes de pequeño tamaño son capaces de modificar la expresión génica a través del silenciamiento de sus ARNm diana, añadiendo un nuevo nivel de complejidad a la regulación génica.

Existen varios tipos de ARN no codificantes que se clasifican en tres grupos según su biogénesis, función y mecanismo de acción: ARN interferente pequeño (o de sus siglas en inglés, siRNA), microARN (o de sus siglas en inglés, miRNA) y ARN de interacción con piwi (o de sus siglas en inglés, piRNA). En esta tesis nos centraremos en el estudio de los miRNAs.

miRNAs

Los miRNAs son moléculas de ARN monocatenario de unos 18-22 nt de longitud cuya función es regular la expresión génica a través de la unión a sus ARNm diana. Fueron descubiertos por primera vez en 1993 en *C.elegans* donde se demostró que la mutación en dos de ellos let-7 y lin-4 alteraba el desarrollo de las larvas (Lee y cols., 1993, Wightman y cols., 1993). Estudios recientes de análisis de expresión de los miRNAs han demostrado como se expresan en los tejidos de manera muy específica durante el desarrollo (Wienholds y cols., 2005, Kloosterman y cols., 2005, Makker y Singh, 2006, Aboobaker y cols., 2005). Esto nos indica que los miRNAs podrían estar contribuyendo a la determinación y el mantenimiento del linaje celular. En la actualidad se ha descrito la implicación de los miRNAs en procesos esenciales como el desarrollo embrionario, la morfogénesis (Stefani y Slack, 2008), la proliferación, la diferenciación y la apoptosis (Bushati y Cohen, 2007, Williams, 2008). También se ha asociado una expresión aberrante de

miRNAs con la aparición de enfermedades tales como la esquizofrenia o distintos tipos de cáncer (Kumar y cols., 2007).

5.3.2 Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNAs

Los miRNAs se transcriben por acción de la RNA pol II como largos transcritos primarios o pri-miRNA (Cai y cols., 2004, Lee y cols., 2004). Estos son procesados a través de un complejo de acción nuclear formado por la RNasa Drosha y DCGR8 (Lee y cols., 2003) dando lugar así a un pre-miRNA de unos 70 nucleótidos con una estructura de horquilla. Estas moléculas son transportadas al citoplasma mediante la exportina 5 (Kim, 2004) y allí son fragmentados por la RNasa III Dicer formando un miRNA maduro de unos 22 nt (Hammond, 2005). Los miRNAs maduros son integrados en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) a través del cual realizan su función (Hutvagner, 2005). Este complejo posee como componente activo la endonucleasa Argonata 2, encargada de cortar el ARNm diana complementario a la secuencia de reconocimiento o región “semilla” del miRNA (Figura 14).

Tras la incorporación al RISC los miRNAs se unen al extremo 3' UTR del ARNm diana. Si la complementariedad entre las secuencias de reconocimiento del miRNA y el ARNm es completa, el mensajero es degradado. En cambio una complementariedad parcial provoca la represión del proceso de traducción (Figura 14). Por lo tanto los miRNAs regulan la expresión génica a través del silenciamiento y este mecanismo lo comparten tanto los animales como las plantas.

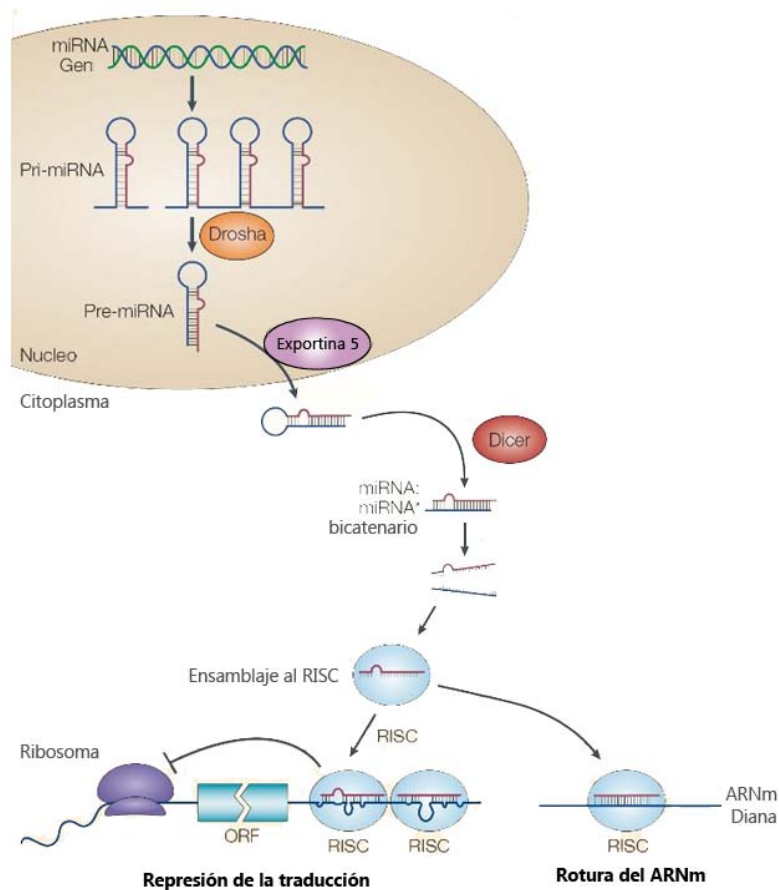


Figura 14. Proceso de maduración y mecanismo de acción de los miRNAs. Los miRNAs maduros son moléculas de unos 20-25 nt de longitud formados a partir del procesamiento secuencial de largos transcritos primarios mediado por las endonucleasas Droscha, DGR8 y Dicer. Los miRNAs maduros se unen al complejo proteico RISC e impide o la traducción de la proteína o provoca la degradación del ARNm (Adaptada de He y Halnnon, 2004).

Un único miRNA puede unirse a cientos de ARNm, ya que al menos en animales, no es necesaria una complementariedad perfecta entre las secuencias de reconocimiento (Bartel, 2004). Algunos miRNAs con dianas moleculares comunes se co-expresan desde un mismo conjunto génico provocando un efecto amplificado de represión de los transcritos. Por otro lado los miembros de una familia de

miRNAs poseen las mismas secuencias de reconocimiento o “semilla” y pueden provocar la represión de transcritos idénticos. Además los miRNAs y sus ARNm pueden formar un bucle de regulación recíproco, aportando un nivel adicional de control de la expresión génica (Burk y cols., 2008, Fazi y cols., 2005).

En la actualidad, según el último recuento presente en miRbase, se sugiere la existencia de aproximadamente 1000 miRNAs diferentes en el genoma humano, cada uno tal vez con múltiples ARNm como potenciales dianas (Kozomara y Griffiths-Jones, 2011). Además, se cree que los miRNAs regulan aproximadamente el 30% de los genes codificantes (Lewis y cols., 2005). Estos datos reflejan su relevancia como finos reguladores de la expresión génica y por tanto de la función celular (Berezikov y cols., 2006).

La compleja red de regulación en la que los miRNAs participan junto con las dificultades que suponen los métodos experimentales actuales para confirmar sus potenciales dianas, hace que a día de hoy a pesar la multitud de miRNAs identificados muy pocos están caracterizados funcionalmente.

5.3.3 Caracterización funcional de los miRNAs

Debido al constante aumento del número de miRNAs identificados se han diseñado nuevas herramientas, basadas en la tecnología de microarrays, que permitan el estudio de los perfiles de los miRNAs. Para su posterior caracterización funcional, se han diseñado plataformas computacionales que permiten la identificación de las potenciales dianas de los miRNAs (Kong y cols., 2008). Estos programas están basados en algoritmos de predicción que permiten identificar sus posibles ARNm diana. Estos modelos se basan generalmente en la búsqueda de aquellos ARNm con secuencias complementarias al extremo 5' de la región “semilla” de los miRNAs y con secuencias de unión en el extremo 3' final para aquellos casos en los que la complementariedad de secuencias no es perfecta (Brodersen y Voinnet, 2009).

Comparar perfiles de expresión génica con perfiles de expresión de miRNAs y correlacionar el aumento o la disminución de sus niveles respectivamente o viceversa puede ser muy útil para seleccionar aquellos miRNAs que cumplen una importante función en el proceso celular a estudio.

Existen también bases de datos que informan de los procesos y rutas que están más representados por un conjunto de miRNAs diferencialmente expresados. Esta información es útil para poder establecer modelos de regulación de un determinado proceso mediado por los miRNAs. Las bases de datos más utilizadas son Gene Ontology, Ingenuity Pathway Analysis (IPA) o Diana miR-Path database.

El hecho de que un solo miRNA potencialmente modifique la expresión de cientos de ARNm dificulta mucho la caracterización de la función reguladora de los miRNAs. Los algoritmos de predicción desarrollados constituyen un paso previo al estudio funcional de los miRNAs y puesto que aportan una gran información están siendo usados en múltiples estudios.

Una aproximación al estudio funcional de los miRNAs es la utilización de animales mutantes para una de las enzimas necesarias para la biogénesis de los miRNAs. Por ejemplo los ratones mutantes para Dicer muestran defectos globales en la síntesis de los miRNAs y mueren en fases tempranas del desarrollo embrionario (Bernstein y cols., 2003, Yang y cols., 2005). En cambio mutantes condicionales para el gen de Dicer sobreviven hasta la edad adulta y son un instrumento ideal para estudiar los efectos globales de los miRNAs en células o en tejidos específicos (Hong y cols., 2008, Nagaraja y cols., 2008, Otsuka y cols., 2008). Estudios realizados con este tipo de ratones nos indican que Dicer y por lo tanto también los miRNAs son esenciales para la morfogénesis de la epidermis, el epitelio de pulmón (Andl y cols., 2006)(Harris y cols., 2006, Yi y cols., 2006) y el desarrollo de las extremidades de los vertebrados (Harfe, 2005).

5.3.4 miRNAs como biomarcadores y terapia molecular

Los miRNAs se pueden detectar fácilmente en multitud de tejidos e incluso en los líquidos biológicos, como el suero, la saliva o la orina ya que son resistentes a la degradación de las RNAsas (Hoefig y cols., 2008). Diferentes estudios de los perfiles de expresión de miRNAs revelan que una gran cantidad de miRNAs están desregulados en diversas patologías como por ejemplo en cáncer (Calin y Croce, 2006). Por ello los perfiles específicos de expresión de miRNAs de tejidos o de células constituyen una herramienta adecuada para la búsqueda de nuevos biomarcadores y agentes terapéuticos.

La alteración en la expresión de miRNAs en patologías multifactoriales sugiere que podría ser un factor común en las enfermedades multigénicas. Por otro lado también existen enfermedades en las que los niveles de ARNm están alterados aunque los niveles de miRNAs no se ven modificados. En este caso se podría restablecer el fenotipo normal adicionando miRNAs sintéticos que normalicen los niveles de estos ARNm (Wurdinger y Costa, 2007) ya que un conjunto de miRNAs con un mismo ARNm diana podrían ser el objeto del agente terapéutico. Estos datos sugieren que la actuación sobre los miRNAs podría abrir puertas hacia nuevas terapias (Kasinski y Slack, 2011).

Para la modificación de los niveles de miRNAs endógenos se han establecido diversas estrategias. Una de ellas es la administración de oligonucleótidos con secuencias anti-sentido o anti-miRs que establecen la unión con el miRNA complementario provocando su degradación (Hutvagner y cols., 2004, Krutzfeldt y cols., 2005). Estas secuencias de oligonucleótidos se presentan de manera conjugada con grupos hidroxilo o con moléculas de colesterol que mejoran la eficacia de inhibición de la actividad de los miRNAs.

Para la sobreexpresión de los miRNAs la mayor parte de los estudios realizados se basan en la utilización de secuencias de doble cadena de ARN denominados mimetizadores o *mimic* que permiten la unión del ARNm diana en el complejo RISC provocando su degradación. Esta tecnología actualmente solo ha sido utilizada para el estudio *in vivo* de los miRNAs (McLaughlin y cols., 2007).

Sin embargo a pesar de los grandes avances realizados en el uso de los miRNAs como agentes terapéuticos estas aproximaciones están todavía en su fase inicial. Es necesario evaluar muchos aspectos moleculares, como la posible saturación de la maquinaria de biosíntesis y aparición de efectos no específicos por la actuación de estos miRNAs sobre células y tejidos que no son el objetivo terapéutico (Kasinski y Slack 2011).

5.4 Mecanismos epigenéticos en el aparato reproductor femenino

5.4.1 Metilación del ADN en el endometrio

Actualmente existen diversos estudios que ponen de manifiesto la implicación del mecanismo de metilación del ADN en la regulación de la fisiología endometrial (Guo, 2011).

Se ha establecido una asociación entre los niveles del receptor de progesterona y la metilación del ADN sugiriendo que este mecanismo está implicado en la respuesta de las células endometriales a las hormonas esteroideas durante el ciclo menstrual (Ghabreau y cols., 2004).

También se han observado cambios en la expresión de las ADN metiltransferasas, así como cambios en los niveles de metilación a largo del ciclo menstrual (Yamagata y cols., 2009, van Kaam y cols., 2011). No se ha llegado a un consenso en los resultados del estudio de expresión de las DNMTs durante fase proliferativa y fase secretora. En cambio en todos los estudios se observan diferencias de expresión de estas enzimas, lo que nos indica que el mecanismo de

metilación del ADN tiene un importante papel en la regulación de los cambios que acontecen en el endometrio durante el ciclo menstrual. Para poder llegar a un mayor entendimiento de la implicación de la metilación del ADN, sería necesario identificar aquellos promotores génicos metilados y que se encuentran bajo el control directo de este mecanismo epigenético

Por último patrones de metilación alterados en el endometrio se han asociado a la aparición de patologías como el cáncer endometrial o la endometriosis (Tao y Freudenheim, 2010, Wu y cols., 2007, Wurdinger y Costa, 2007, Wu y cols., 2005). También se ha encontrado un estado hipermetilado en genes supresores de tumores como E-caherina, HIC1 y p16 en molas hidatidiformes y en coriocarcinomas (Perry y cols., 2009).

5.4.2 Acetilación de histonas en el endometrio y durante la implantación

Existen varios estudios que sugieren la implicación de la acetilación de las histonas en el establecimiento del estado receptivo y el posterior desarrollo del embarazo. De hecho un estudio realizado por Krusche y cols determina la presencia de cambios en los niveles de expresión de las HDACs de clase I, a lo largo del ciclo menstrual (Krusche y cols., 2007).

El análisis de los niveles globales de acetilación de histonas durante el ciclo menstrual muestra altos niveles de acetilación durante fase proliferativa temprana y en fase secretora tras la ovulación (Munro y cols., 2010). Puesto que la acetilación de las histonas está asociado a un aumento en la transcripción génica, es lógico pensar que los cambios en la acetilación de las histonas son responsables, en parte, de la activación de rutas que intervienen en el proceso de diferenciación decidual que tiene lugar tras la ovulación. Estos resultados coinciden también con el hecho de que el AMPc, cuyos niveles aumentan durante la decidualización induce la vía de activación de las HATs.

También se ha visto como el tratamiento de las ESC con el HDACi TSA provoca un aumento en la expresión de marcadores de decidualización como IGFBP-1 (Sakai y cols., 2003). Otros trabajos han descrito como el tratamiento de las ESC, las ECC e incluso de muestras de adenocarcinoma endometrial con HDACi provoca citodiferenciación celular (Uchida y cols., 2005, Uchida y cols., 2006). Estos estudios nos indican que la acetilación de las histonas podría estar regulando procesos de diferenciación en las células endometriales.

En conjunto estos datos sugieren que existe un patrón epigenético en el endometrio que respondiendo a las hormonas esterodeas participa en el desarrollo de los acontecimientos que trascurren a lo largo del ciclo menstrual. Es necesario un mayor conocimiento de la manera en que estos mecanismos están regulando importantes genes y coordinando los cambios funcionales en el endometrio.

Actualmente se ha establecido una correlación directa entre la metilación del ADN o la acetilación de histonas y los niveles de expresión de importantes genes involucrados en el proceso de implantación como LIF, HOXA10, glicodelina, MMPS, TIMPs, y MUC1 (Munro y cols., 2010).

En cuanto al proceso de invasión embrionaria también se ha encontrado como la acetilación de las histonas participa en la regulación del potencial invasivo de las células trofoblásticas (Dokras y cols., 2006). Por el contrario, no existe ningún estudio que relacione los mecanismos de regulación epigenética en aquellos genes expresados en las células estromales endometriales responsables del control del proceso invasivo embrionario.

5.4.3 Relevancia de los miRNAs en el aparato reproductor femenino

Varios estudios recientes revelan que ratonas carentes de miRNAs maduros como consecuencia de la eliminación de Dicer, son estériles. Estas ratonas han sido utilizadas como modelo para evaluar la función de los miRNAs en las distintas funciones reproductivas. Además estos estudios han puesto de manifiesto la

función de Dicer para el correcto desarrollo del ovario, los oviductos y el útero (Hong y cols., 2008, Nagaraja y cols., 2008, Gonzalez y Behringer 2009). Concretamente las ratonas mutantes condicionales de Dicer, poseen defectos en la maduración ovocitaria (Murchison y cols., 2007, Tang y cols., 2007). Los ovocitos de estas ratonas presentan un huso meiótico desorganizado y un exceso de transcritos maternos.

Por otro lado, el útero de estas ratonas presenta modificaciones morfológicas tales como una menor longitud y peso en comparación con las ratonas silvestres. Además el endometrio de estas ratonas no es capaz de establecer el embarazo, provocando infertilidad, aunque la respuesta a los estrógenos y al estímulo decidual parece normal.

Estos estudios nos revelan que el procesamiento de los miRNAs por Dicer tiene un papel relevante en importantes procesos reproductivos como maduración ovocitaria desarrollo temprano del embrión, implantación y esteroidogenesis.

5.4.4 miRNAs en el endometrio

Ya se ha definido el perfil de expresión de miRNAs tanto en el endometrio total como en las células estromales y epiteliales (Pan y cols., 2007). Las principales dianas moleculares de los miRNAs identificados son miembros de la familia del TGF β , los ERs y los PRs cuyo papel en las respuestas endometriales ya ha sido descrito. Estos datos nos informan de la importancia de los miRNAs en la regulación del tejido endometrial.

También se ha establecido el perfil de expresión de miRNAs del proceso de receptividad endometrial (Chakrabarty y cols., 2007, Kuokkanen y cols., 2010, Liu y cols., 2011, Sha y cols., 2011). La expresión diferencial de miRNAs durante la ventana de implantación, sugiere que las hormonas esteroideas contribuyen a la regulación de la expresión de determinados miRNAs. El análisis bioinformático de las vías potencialmente reguladas por los miRNAs diferencialmente expresados

determina que se están inhibiendo productos de progresión de ciclo celular como ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas sugiriendo que los miRNA estarían implicados en la disminución de la proliferación en las EEC (Kuokkanen y cols., 2010).

En cuanto al proceso de implantación, un estudio de Chakrabarty y col realizado en ratones establece una expresión diferencial espacio-temporal de los miRNAs. Estos datos nos indican la posible contribución de los miRNAs en el proceso de implantación y en el establecimiento del embarazo.

Algunos de los miRNAs aumentados en el periodo implantatorio tienen como diana potencial a COX-2 cuyo papel durante proceso de implantación es esencial (Marions y cols., 1999). Además los cambios de expresión de estos miRNAs se correlacionan con cambios en los niveles de COX-2 en el útero. También identifican miRNAs cuyas dianas génicas son reguladores de la expresión de COX-2. Estos resultados revelan la presencia de múltiples interacciones en la acción reguladora de los miRNAs.

Por otro lado el análisis de expresión de miRNAs entre las zonas de implantación y las zonas inter-implantadoras, revela la expresión diferencial de 13 miRNAs (Chakrabarty y cols., 2007) implicando al embrión y a las hormonas esteroideas en la regulación de los miRNAs.

También se ha encontrado un perfil de expresión de miRNAs asociado a estados endometriales alterados como la endometriosis, cáncer o preeclampsia.

Existen múltiples evidencias de una alteración en la expresión génica en pacientes con endometriosis (Hever y cols., 2007, Hull y cols., 2008). Algunos de estos genes son potenciales dianas de los miRNAs con una expresión diferencial en tejido endometriósico (Ohlsson Teague y cols., 2009, Pan y cols., 2007; Pan y cols., 2008). Por ello se sugiere que las alteraciones en la expresión de los miRNAs podrían ser responsables del desarrollo de la endometriosis.

También se ha encontrado una expresión aberrante de miRNAs en varios tipos de cáncer. Los genes que codifican para los miRNAs se localizan en zonas de

inestabilidad genética (Calin y cols., 2004, Zhang y cols., 2006), por lo que deleciones, duplicaciones cromosómicas y alteraciones epigenéticas se encuentran entre las causas más frecuentes responsables de la expresión aberrante de miRNAs en las células malignas (Calin y Croce, 2007). Concretamente se ha descrito en diversos estudios la presencia de un perfil alterado de miRNAs en cáncer e hiperplasia endometrial (Boren y cols., 2008, Wu y cols., 2009, Cohn y cols., 2010).

Por último también se han descrito los perfiles de expresión de miRNAs en placentas de pacientes con preeclampsia.(Pineles y cols., 2007). El análisis bioinformático de los miRNAs diferencialmente expresados en preeclampsia, revela la implicación de sus posibles dianas en procesos como la respuesta inmune, los procesos antiapoptóticos y el metabolismo de los lípidos.

Un perfil diferencial de expresión de miRNAs para cada una de estas complicaciones ginecológicas puede tener un gran valor pronóstico, diagnóstico o terapéutico.

II. HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

El proceso de decidualización implica cambios morfológicos y funcionales importantes del compartimento estromal, que están caracterizados por un proceso de remodelación de la matriz extracelular, disminución de la respuesta inmune y la diferenciación de las células estromales decidualizadas. El fin biológico de esta transformación tisular es dotar al endometrio de un control del proceso de invasión embrionaria y para la correcta formación de la placenta.

Actualmente se han identificado múltiples genes que participan de manera coordinada en la diferenciación de las células estromales. Por lo que es lógico pensar que los mecanismos epigenéticos puedan estar regulando la compleja red molecular que interviene en el proceso de decidualización.

Por lo tanto nuestra hipótesis es que el conocimiento de los mecanismos epigenéticos implicados en la regulación de la decidualización nos permitirá no solo mejorar el entendimiento de este exclusivo proceso sino modificarlo en aquellos casos en los que estos mecanismos se puedan encontrar alterados.

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

1.1 Objetivos generales

- Determinar la implicación de la acetilación de las histonas sobre la regulación del mecanismo de remodelación de la matriz extracelular en las células estromales endometriales (hESC) durante el proceso de decidualización *in vitro*.
- Analizar el patrón de expresión de los miRNAs durante el proceso de decidualización.
- Establecer un posible modelo de regulación post-transcripcional de los miRNAs durante el proceso de decidualización *in vitro*.
- Caracterizar el papel funcional de una de las moléculas responsables de la biogénesis de los miRNAs como es Dicer durante el proceso de decidualización.

1.2 Objetivos específicos

- Estudiar el efecto del inhibidor de las histona deacetilasas, TSA, sobre la movilidad celular en las hESC y sobre la invasión embrionaria.
- Analizar el efecto del TSA sobre la regulación de la maquinaria de remodelación de la matriz extracelular en las hESC.
- Comparar los niveles de acetilación en los promotores génicos de TIMP-1 y TIMP-3 en las hESC control vs tratadas con TSA.
- Analizar el efecto de la decidualización *in vitro* sobre el balance de la maquinaria de remodelación de la matriz extracelular en las hESC.

- Comparar los niveles de acetilación de histonas en los promotores de TIMP-1 y TIMP-3 durante el proceso de decidualización *in vitro*.

- Analizar la expresión de 704 miRNAs en las hESC mediante la técnica de miRNA PCR array e identificar aquellos miRNAs que se encuentran diferencialmente expresados durante el proceso de decidualización.

- Identificar las potenciales dianas y rutas más representadas por los miRNAs diferencialmente expresados en el proceso de decidualización *in vitro* mediante el análisis *in silico*.

- Analizar los niveles de Dicer durante el proceso de decidualización *in vivo* e *in vitro*.

- Determinar el efecto del silenciamiento de Dicer durante el proceso de decidualización *in vitro* analizando diversos marcadores bioquímicos y morfológicos específicos del proceso.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV. MATERIAL Y MÉTODOS.

1.- CULTIVO CELULAR

1.1 Muestras de endometrio

Este proyecto, así como los procedimientos utilizados, fueron aprobados por el Comité ético del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) (0901-EN-023-FD).

Se tomaron un total de 60 muestras de tejido endometrial que fueron obtenidas de donantes en el momento de la extracción ovocitaria, mediante una cánula de aspiración endometrial. Todas las pacientes se encontraban en edad reproductiva (23-37 años), con ciclos menstruales regulares y sin ninguna patología asociada.

También se utilizaron 10 muestras endometriales de pacientes, obtenidas durante el ciclo natural en fase secretora temprana (ST) entre los días 15-17 y en fase secretora tardía o avanzada (SA) entre los días 24-27. El dataje de las muestras se estableció de acuerdo a los criterios morfológicos establecidos por Noyes (Noyes y cols., 1975).

Todas las muestras fueron obtenidas tras firma del consentimiento informado por parte de las pacientes.

1.2 Separación y cultivo primario de células endometriales epiteliales y estromales

Este proceso se realizó de acuerdo con protocolos previamente publicados por nuestro grupo (Simon y cols., 1993). De forma resumida, las muestras de endometrio se lavaron en solución salina estéril (PBS) (Gibco) y se trocearon en

pequeños pedazos. Posteriormente se pusieron en digestión, a 4°C durante toda la noche en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*; Sigma) conteniendo 10mg/ml de colagenasa tipo IA (Sigma).

La separación de los diferentes tipos celulares, células endometriales estromales humanas (hESC) y células epiteliales endometriales humanas (hEEC), se realizó por gradiente de sedimentación mediante decantación.

El sobrenadante, que contiene la fracción de las hESC, fue filtrado y centrifugado. El pellet celular se resuspendió en DNAasal (Sigma) y se añadió tampón de lisis (1.5 NH₄CL, 100 mMNaH₂CO₃, 1 mM EDTA pH 7,4) para eliminar los eritrocitos. Las células fueron centrifugadas y puestas en cultivo en medio DMEM/F12 (1:1) (Gibco) suplementado con el 10% de suero fetal bovino (SFB).

El pellet, que corresponde a las hEEC, se resuspendió en DMEM. Las células fueron sometidas a dos incubaciones de 15 minutos en flasks (Falcon, Becton-Dickinson) tras las cuales se recogió el sobrenadante. Estas incubaciones eliminan las hESC persistentes en la fracción epitelial. Finalmente las células se cultivaron en medio DMEM y MCDB-105 (3:1, V: V) (Sigma) suplementado con un 10% de SFB, 5 µg/ml de insulina, gentamicina (50mg/ml) y fungizona (0,25 mg/ml).

La pureza de las poblaciones celulares se verificó mediante inmunofluorescencia. Para ello las células se marcaron con vimentina (marcador estromal) y E-cadherina (marcador epitelial).

1.3 Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas para este trabajo, se obtuvieron de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA,) y se detallan en la tabla 1:

Línea celular	Número	Origen	Morfología
CCD-1112Sk	CRL-2429	Piel; prepucio	Fibroblasto
THESC	CRL-4003	Endometrio; fibroblastos inmortalizados con hTERT	Fibroblasto
JEG-3	HTB-36	Placenta; coriocarcinoma	Epitelial

Tabla 1. Líneas celulares utilizadas.

1.4. Condiciones de cultivo.

- Células human foreskin fibroblast (HFF) (CRL-2429): se empleó medio de cultivo Iscoves (Iscove's modified Dulbecco's; ATCC) 10% de SFB (Gibco), fungizona (0,25 mg/ml).y gentamicina. (50mg/ml).

- Células THESC (CRL-4003): se utilizó medio DMEM/F12, 10% de SFB, 0.1% fungizona y 0.1% de gentamicina.

- Células JEG-3 (HTB-36): fueron crecidas en medio de cultivo EMEM (Eagle's Minimal Essential médium; PPA), 10% de SFB, 0.1% fungizona y 0.1% de gentamicina

Todas las células se cultivaron a 37°C en aire saturado de humedad y con un 5% de CO₂, en un incubador termostatzado y con regulación del flujo de CO₂. La manipulación de las células se llevó a cabo en campanas de flujo laminar y en condiciones estériles.

1.5. Tratamiento con Trichostatina A (TSA)

Para llevar a cabo la inhibición de las histona deacetilasas (HDACs) se utilizó el HDACi TSA (Sigma). Esta droga interfiere con los grupos acetilos impidiendo su eliminación por las HDACs.

Los diferentes tipos celulares (hEEC, hESC y HFF) se crecieron en cultivo hasta llegar a una confluencia del 70-80 %. En ese momento se añadió TSA a sus respectivos medios a las concentraciones de 0.1 μM y 1 μM durante 48 horas. Puesto que el TSA es un producto químicamente inestable el medio se renovó cada 24h.

1.6. Inducción del proceso de decidualización *in vitro* de las ESC

Para inducir el proceso de decidualización *in vitro* se utilizaron dos procedimientos diferentes. El primero se basó en la estimulación hormonal mediante estrógenos y progesterona y el segundo método consistió en el tratamiento con adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y medroxiprogesterona (MPA). Ambos procedimientos están ampliamente caracterizados y la selección del método de inducción decidual se determinó en función de las necesidades experimentales (Irwin et al. 1989; Tang et al. 1993).

Para el tratamiento de las hESC con las hormonas esteroideas E_2+P_4 , se añadió al medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con el 2% de SFB, ácido ascórbico a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de transferrina, progesterona (1 μM) y 17 β -estradiol (30 nM) durante 9 días. Las hESC control se cultivaron en paralelo sin el tratamiento hormonal. El medio se renovó cada 3 días.

Para aquellos experimentos en los que era necesaria una diferenciación decidual más rápida, las ESC (hESC y THESC) se trataron con AMPC y MPA. Para ello se añadió al medio de cultivo, suplementado con SFB al 2%, 8-Br-cAMP (0.5 mM) (Sigma) y MPA a 1 μM (Sigma) durante 5 días. El medio se renovó cada 3 días

El fenotipo de las ESC decidualizadas, se verificó por evaluación de la morfología y por cuantificación de los niveles de prolactina (PRL) en el medio celular mediante ELISA (Abnova).

1.7 Embriones de ratón

Los embriones de ratón fueron obtenidos de hembras embarazadas que de la cepa B6C3F1 (Charles River laboratorios, Barcelona). Los animales fueron controlados y mantenidos en el animalario de la Facultad de Medicina de la universidad de Valencia, en condiciones adecuadas de estabulación. Los embriones se obtuvieron en día 2.5 tras someter a las ratonas a un protocolo de hiperestimulación con 10UI de PMSG (gonadotropina sérica de yegua preñada; Sigma) y 10UI de hCG (gonadotropina coriónica humana; Sigma)

Una vez extraídos los embriones se pusieron en cultivo, en medio CCM (Vitrolife), durante unos 2-3 días hasta el momento en que los blastocistos eclosionaron, es decir, son liberados de la zona pelúcida que es el momento en que son competentes para la implantación.

1.8 Medios condicionados

Para la obtención de los medios condicionados (CCM), las hESC se trataron previamente con TSA a 0.1 y 1 μ M durante 48 horas, con 0.5 mM 8-Br-cAMP y 1mM MPA durante 5 días o con vehículo control. Una vez terminado el tratamiento se añadió medio fresco DMEM/F12 suplementado con el 2% de SFB, durante 24 horas. Los diferentes CCMs se utilizaron para posteriores análisis de zimografía, ensayos de invasión trofoblástica o para western-blot.

1.9 Determinación de la viabilidad celular

La viabilidad de las células se determinó en función de la integridad de sus membranas celulares utilizando para ello el método de exclusión del colorante vital Trypan Blue. Este método evalúa la capacidad de exclusión de colorantes que muestran las membranas celulares intactas

Para este fin las células se trataron con TSA a distintas concentraciones (0.1 y 1 μM) vs vehículo control durante 48 horas. Posteriormente se añadió Trypan Blue (Sigma) en proporción 1:1 (V/V) a la suspensión celular. El conteo celular se realizó mediante recuento visual en cámara de Neubauer, considerando como no viables aquellas células que estaban teñidas de azul

2.- ENSAYOS DE MOVILIDAD CELULAR

2.1 Ensayo de migración / wound-healing

El ensayo de migración o “wound-healing” es uno de los métodos más simple y preciso, que se ha desarrollado para el estudio de la migración celular direccional *in vitro* (Rodríguez y cols., 2005).

Para realizar los ensayos de migración (wound-healing), las hESC se trataron con TSA a las concentraciones de 0.1 y 1 μM o vehículo control durante 48 horas. Posteriormente las células se lavaron con PBS y con una punta de pipeta se realizó una incisión o brecha sobre la monocapa celular. Para analizar la capacidad de migración de las células se capturó la imagen de la brecha con el microscopio (Nikon) a tiempo 0 y pasadas 24 horas. Finalmente se cuantificó la longitud de la brecha, siendo la tasa de cierre la diferencia porcentual entre los valores tomados en los diferentes tiempos, expresada como % de migración.

2.2. Ensayos de invasión

Los estudios de invasión se llevaron a cabo con el kit comercial QCM-collagen invasión chamber (Millipore). Este kit incluye unos insertos en cuya base presentan una fina capa de colágeno que imita las características bioquímicas de la matriz extracelular, por lo que constituye un buen modelo para los ensayos de invasión *in vitro*.

Para el ensayo de movilidad de las hESC, las células se trataron con TSA (a 0.1 y 1 μM) o con vehículo control durante 48 horas. Posteriormente las células se añadieron en la parte superior del inserto a una densidad de 1×10^6 células/ml en medio DMEM/F12 sin SFB. En la parte inferior del inserto se añadió medio DMEM/F12 al 10% de SFB, creando un gradiente de SFB que actúa como quimioatrayente.

Para el ensayo del potencial invasivo del trofoblasto, la línea celular trofoblástica JEG-3 se resuspendió en los CCM de las hESC control vs CCM de las hESC tratadas con TSA 0.1 y 1 μM durante 48 horas. Las células JEG-3 se cultivaron en los insertos siguiendo el mismo procedimiento descrito para las hESC.

Las células se incubaron en los insertos de invasión celular durante 48 horas a 37°C. Posteriormente se eliminaron las células que no han invadido y que estaban situadas en la parte superior de la membrana del inserto. Las células invasivas se fijaron y tiñeron a la membrana con un colorante proporcionado por el kit. Finalmente se añadió un volumen constante de tampón de extracción y se midió la absorbancia a 590 nm, siendo este valor proporcional al número de células con potencial invasivo. Los datos se expresaron como % de invasión, tomando como valor arbitrario de 100% al índice de invasión de las células control. Todos los ensayos de invasión se realizaron por triplicado en tres muestras independientes.

3. Modelo de invasión embrionario *in vitro* basado en Co-cultivo

Para poder estudiar el efecto de la inhibición de las HDAC en las hESCs y su impacto durante el proceso de invasión embrionaria, se realizó un ensayo heterólogo *in vitro* de co-cultivo de embriones de ratón sobre una monocapa de hESC. Este modelo de co-cultivo, ya fue descrito por J. Carver y cols., (Carver y cols., 2003) y constituye una adecuada aproximación para el estudio *in vitro* de los factores que regulan las interacciones endometrio-embrión durante el proceso de invasión.

Las hESC fueron tratadas con TSA 1 μ M o con vehículo control durante 48 horas. Posteriormente las células se lavaron con PBS y se añadieron los embriones de ratón a la monocapa celular permaneciendo en co-cultivo 48 horas.

La extensión de la invasión embrionaria fue valorada mediante inmunofluorescencia. Para ello las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4%, 0.1% Triton y 0.1% deoxicolato sódico durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de 4 lavados con PBS, se bloquearon en PBS con el 0.3% Triton-X100, 0.03% de azida y 1% de seroalbumina bovina (BSA) (Sigma) durante 30 minutos. Las células se incubaron con los anticuerpos primarios anti-vimentina humana (1:50) (Sigma; V6630) y anti-E-cadherina (1:100) (Abcam; ab53033) toda la noche a 4°C, y posteriormente con sus correspondientes anticuerpos secundarios 1 hora a temperatura ambiente. El montaje de las muestras se realizó utilizando el medio de montaje Vectashield que contiene Dapi para la tinción de los núcleos celulares. Las preparaciones fueron examinadas y fotografiadas en el microscopio confocal invertido Sp2 de Leica.

El área de invasión embrionaria se visualiza de forma clara por la ausencia de células estromales. La cuantificación del área de invasión embrionaria se realizó utilizando el programa ImageJ: <http://rsbweb.nih.gov/ij/links.html>. Los ensayos *in vitro* de invasión embrionaria se realizaron en al menos tres muestras independientes, utilizando al menos 8 embriones por cada muestra y condición.

4. ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEÍCICOS

4.1. Extracción de ARN total

El aislamiento del ARN celular de las diferentes muestras se llevó a cabo mediante el método TRIzol™ (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

La cuantificación y la pureza del ARN aislado se determinaron mediante técnicas espectrofotométricas, para lo cual se utilizó el NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer).

La comprobación de la integridad del ARN, que posteriormente se utilizará para los ensayos del miRNA PCR array, se efectuó utilizando el Bioanizador Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). El software del Bioanalyzer 2100 determina un parámetro indicativo de la integridad del ARN denominado RIN que se calcula a partir de los ratios entre los ARN ribosomales. Valores de este parámetro mayores de 7 confirman un ARN de alta calidad.

4.2 Retrotranscripción

Para la obtención de la primera cadena de ADN complementario (ADNc) de los ARNm se realizó una transcripción reversa con el kit comercial Advantage RT-for-PCR- (Clontech), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para llevar a cabo la retrotranscripción se añadió 1µg de ARN a una mezcla de reacción preparada de acuerdo a las instrucciones determinadas por la casa comercial. Esta mezcla contiene un primer oligo- dT, que permite la amplificación específica de los ARNm y la enzima MMLV Reverse Transcriptase (MMLV; Moloney Murine Leukemia Virus, recombinant). La reacción de retrotranscripción se realizó en un termociclador

T3000 Thermocycler (Biometra) empleando el siguiente programa: 42 °C durante 60 minutos y 94°C durante 3 minutos

Para la retrotranscripción de los ADNc de los miRNAs se utilizaron dos Kits comerciales diferentes en función de los análisis posteriores a los que se sometió la muestra. Se utilizó el miScript reverse Transcription Kit (Qiagen) para los ensayos de qRT-PCR y el RT² miRNA First Strand Kit (SABiosciences) para los ensayos del miRNA PCRarray. Los miRNAs a diferencia de los ARNm no poseen cola de poliadeninas, por lo que ambos kits incluyen un paso previo de poliadenilación del extremo 3'. Esta secuencia es reconocida por un cebador universal que permite el inicio de la retrotranscripción (Figura 15).

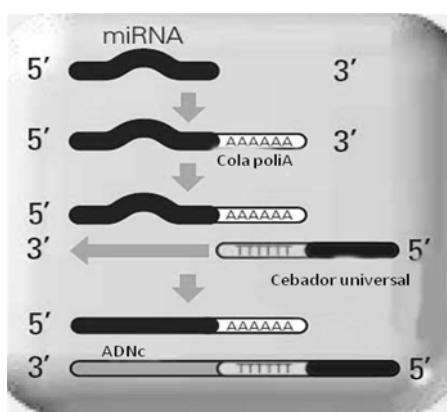


Figura 15. Esquema del proceso de retrotranscripción de los miRNAs.

La mezcla de reacción se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción de retrotranscripción se realizó en el termociclador T3000 Thermocycler siguiendo los siguientes programas:

- 2 horas a 37°C y 5 minutos a 90°C cuando se utilizó el kit RT² miRNA First Strand
- 1 hora a 37°C y 5 minutos 95°C cuando se utilizó el kit miScript reverse Transcription.

4.3 Diseño de oligonucleótidos

Las parejas de cebadores que se utilizaron en la amplificación de los ARNm se diseñaron a través de la web: Primer3 input versión 0.4.0: <http://frodo.wi.mit.edu>. Las secuencias de cebadores utilizadas para la amplificación de los diferentes genes fueron las siguientes:

Gen	Secuencia de oligonucleótidos
GAPDH	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'
MMP-2	5'-CAAAAACAAGAAGACATACATCTT-3 5'-GCTTCCAAACTTCACGCTC-3'
- MMP-9	5'-TGGGGGGCAACTCGGC-3' 5'-GGAATGATCTAAGCCCAG-3'
TIMP-1	5'-CTGTTGTTGCTGTGGCTGATA-3' 5'-CCGTCCACAAGCAATGAGT-3'
TIMP-3	5'-ATGGTGTAGACCAGCGTGC-3' 5'-AGGACGCCTTCTGCAACTC-3'
uPA	5'-CACGCAAGGGGAGATGAA-3' 5'-ACAGCATTTTGGTGGTGACTION-3'
RECK	5'-CTCGGTTTGTTCAGTTATGC-3' 5'-AGAGGCGCAATAATTTTCCACT-3'
Dicer	5'-TGCTATGTCGCCTTGAATGTT-3' 5'-AATTTCTCGATAGGGGTGGTCTA-3'

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en los análisis de qRT-PCR.

Los cebadores utilizados para la amplificación de los miRNAs fueron diseñados y obtenidos por la casa comercial Qiagen.

4.4 PCR cuantitativa a tiempo real o qRT-PCR

La qRT-PCR es una variante de la PCR que permite la amplificación y detección simultánea del producto en cada ciclo de reacción. En este sistema la PCR se acopla a la emisión de una señal fluorescente que va a ser proporcional a la cantidad de producto y el software de análisis representa dicha fluorescencia gráficamente, donde queda reflejada la cinética de la reacción.

En nuestros experimentos se utilizó el kit LC-Fast Start master SYBR Green (Roche Applied Science) para las PCR de los ARNm. Para el análisis de expresión de los miRNAs se utilizó el kit miScript SYBR Green PCR (Qiagen). Ambos kits contienen el fluoróforo SYBR Green, que emite su máximo de fluorescencia cuando se encuentra unido al ADN de doble cadena. Todas las reacciones se realizaron por triplicado en tres muestras independientes y las mezclas de reacción de la PCR se prepararon, siguiendo las indicaciones de la casa comercial, de la siguiente manera (Tabla 3):

qRT-PCR de ARNm		
Producto	Concentración Final	Volumen
Cebador sentido	0.5 μ M	1 μ l/pocillo
Cebador antisentido	0.5 μ M	1 μ l/pocillo
CIMg2		1 μ l/pocillo
SYBR Green I		1 μ l/pocillo
Agua		4 μ l/pocillo
ADNc		2 μ l/pocillo
Volumen final		10 μl/pocillo

qRT-PCR de miRNAs	
Producto	Volumen
2x RT2 SYBR Green PCR master mix	25 μ l/pocillo
ADNc	5 μ l/pocillo
10 x Cebador universal	2 μ l/pocillo
10 X Cebador miScript	2 μ l/pocillo
Agua libre de nucleasas	11 μ l/pocillo
Volumen final	50 μl/pocillo

Tabla 3. Mezclas de reacción preparadas para la qRT-PCR.

La reacción de PCR se realizó en el sistema LightCycler 480 (Roche Molecular Biomedicals). Para la amplificación de los ARNm se realizaron los siguientes pasos: un ciclo de preincubación de 10 minutos a 95°C, 40 ciclos formados por una fase de desnaturalización de la doble hebra de ADN a 95°C 10 segundos, seguido de una fase de hibridación de los cebadores a 60°C 8 segundos y una fase de extensión de 9 segundos a 72° C. Para la amplificación de los miRNAs las reacciones fueron incubadas a 95°C durante 15 minutos, seguido de 45 ciclos formados por una fase de 95°C durante 15 segundos, un paso de 30 segundos a 55°C y una fase de 72 grados durante 30 segundos.

El sistema LightCycler permite diferenciar la fluorescencia inespecífica producida por subproductos de la reacción de PCR (dímeros de oligonucleótidos cebadores). Mediante el análisis de la curva de desnaturalización del producto se determina su temperatura de disociación o T_m , que es específica para cada producto. Este programa adicional permite confirmar la identidad del producto tras completar los ciclos de amplificación.

La emisión de fluorescencia del SYBR green I es detectada por el sistema al final de la fase de elongación en cada uno de los ciclos de PCR y finalmente se recogen los valores Ct (threshold cycle) que son inversamente proporcionales a la concentración inicial de ADN de la muestra. Los valores de Ct de las muestras de análisis de mensajeros, se normalizaron con respecto a un gen de referencia de expresión estable (housekeeping) que en nuestro caso hemos seleccionado GAPDH. En el análisis de expresión de los miRNAs el gen housekeeping utilizado fue SNORD44. Como control negativo de la qRT-PCR se emplearon muestras de retrotranscripción a las que se añadió agua en lugar de ARN y como control positivo de la reacción se utilizaron los genes GAPDH y el SNORD44

El análisis cuantitativo se realizó utilizando el programa: RT² profiler PCR Array Data Analysis versión 3.0 (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). Este programa realiza la cuantificación relativa de la expresión génica usando el método comparativo, descrito de forma detallada por Livak y col, denominado método del 2 delta-delta Ct o $2\Delta\Delta Ct$ (Livak KJ, 2001). La expresión diferencial se indicó como tasa de cambio.

4.5 miRNA PCRarray

El miRNA PCRarray es una tecnología diseñada para el análisis de la expresión de múltiples miRNAs diferentes utilizando para ello el método de la qRT-PCR. Una de las ventajas de esta técnica es que a diferencia de los microarrays convencionales esta tecnología utiliza el producto SYBR green para la detección de los niveles de expresión y por lo tanto no necesita de experimentos de validación posterior. La lista completa de los miRNAs analizados se encuentra disponible en la siguiente página web: <http://www.sabiosciences.com>.

El procedimiento del PCRarray incluye dos pasos principales, una retrotranscripción para la formación de la cadena simple del ADNc de los miRNAs y una reacción de PCR cuantitativa.

Las hESC aisladas fueron decidualizadas *in vitro* con E₂+P₄ durante 9 días. Para el análisis de expresión de los miRNAs se seleccionaron un total de 6 muestras (3 control vs 3 decidualizadas) obtenidas de 3 pacientes diferentes con niveles de expresión de PRL semejantes (138 ng/ml±19.49 comparado con los 2.38 ng/ml±0.9 en las células control).

Tras la extracción del ARN, se realizó la retrotranscripción a partir de 4 µg de ARN total con el kit comercial RT² miRNA First Strand según las instrucciones de la casa comercial. Posteriormente se preparó la mezcla de reacción para la qRT-PCR de acuerdo con las indicaciones del kit comercial RT² qRT-PCR Master Mix y se añadió a los correspondientes pocillos. En cada pocillo están incluidos los cebadores para la amplificación específica de los diferentes miRNAs, por lo que incluye una secuencia universal y una secuencia específica de cada miRNA. Finalmente se realizó la reacción de PCR en el sistema lightcycler y se cuantificaron los niveles de expresión total así como la expresión relativa utilizando el método del 2 $\Delta\Delta$ Ct.

4.6. Inmunoprecipitación de la cromatina

La inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) es un método bioquímico usado principalmente para determinar la localización en el genoma de proteínas unidas al ADN, como pueden ser factores de transcripción o histonas. La ChIP consta básicamente de dos pasos:

- Inmunoprecipitación: Primero se produce un entrecruzamiento del ADN a las proteínas unidas con formaldehído que mantiene intactas las interacciones proteína-ADN. Posteriormente se realiza la inmunoprecipitación de los complejos

proteína-ADN presentes en extractos de cromatina fragmentada con anticuerpos específicos dirigidos a residuos modificados de las histonas (figura 15).

- Amplificación mediante PCR: Se revierte el entrecruzamiento de los fragmentos de ADN-proteína y se procede al aislamiento del ADN. Las secuencias específicas de ADN inmunoprecipitadas y aisladas son entonces amplificadas por PCR para determinar el enriquecimiento de los genes seleccionados (Kuo y Allis, 1999)(Figura 15).

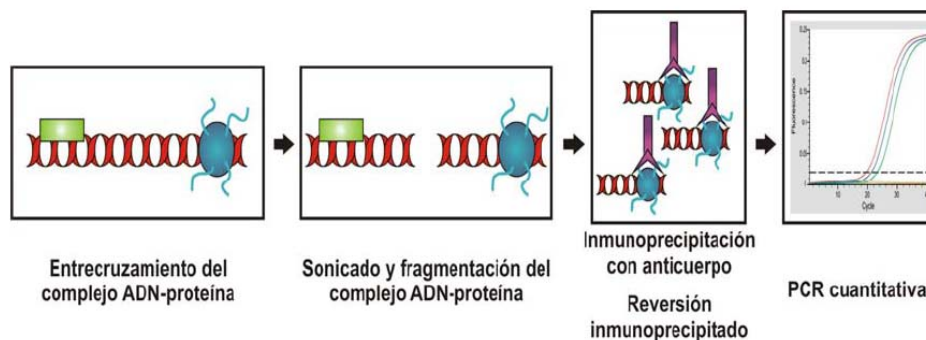


Figura 15. Esquema de los pasos de un CHIP.

Con el fin de evaluar los niveles de acetilación de las histonas H3 y H4 a nivel de promotores génicos específicos, se realizó una CHIP en las hESC control vs TSA y las hESC control vs AMPc + MPA tratadas durante 24h. Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito por el kit de la casa comercial chromatin immunoprecipitation assay kit (Millipore)

Primero se entrecruzó el ADN y las proteínas con formaldehído al 1% durante 10 minutos y se añadió glicina 0.125 M para detener la reacción. Los lisados celulares se sonicaron durante 20 minutos en ciclos de 30 segundos a máxima potencia utilizando el sonicador Sonicator 3000 (Misonix) hasta que se obtuvieron fragmentos de cromatina de aproximadamente 500pb de longitud

La inmunoprecipitación de la cromatina unida a la proteína de interés, se llevó a cabo añadiendo anticuerpos primarios específicos para las histonas H3 acetiladas (Millipore, 06-599) y las histonas H4 acetiladas (Millipore, 06-598) .Como control positivo se utilizó un anticuerpo no específico anti-IgG (Input) y una muestra a la que no se le añade anticuerpo como control negativo para verificar que no existe ruido de fondo.

Los complejos ADN-proteína precipitados se recuperaron mediante un proceso que incluye la captura del anticuerpo con proteína A-Agarosa (Upstate) y lavados sucesivos con tampones de fuerza iónica creciente. Para aislar el ADN, la muestra se eluyó en SDS 1% y NaHCO₃ 0.1 M durante 15 minutos, se centrifugó y se incubaron en una solución de NaCl a 0.4 M a 65° C durante 4 horas. Con esto se consiguió separar el ADN de las proteínas entrecruzadas. Tras la incubación, se añadieron 2 µl de proteinasa K (10 mg/ml) (Invitrogen) y los tampones proporcionados por la casa comercial y se incubaron las muestras 1 hora a 55° C. El ADN se purificó tras precipitación en etanol utilizando el kit de purificación Qiaquick DNA Purification kit (Qiagen)

Las muestras fueron analizadas por qRT-PCR utilizando SYBR-Green para su detección y el sistema LightCycler 480 para su análisis, siguiendo el protocolo anteriormente descrito. La amplificación se realizó utilizando cebadores específicos, que incluían la región 5' de las secuencias génicas de TIMP-1 Y TIMP-3 situadas cerca del inicio de la transcripción sugiriendo ser la zona promotora. Para el diseño de estos cebadores se utilizó como herramienta la web: WebPromoterScan: <http://wye.cit.nih.gov/molbio/proscan/>. Las secuencias de los cebadores fueron:

TIMP-1: 5'-TTTCCTCTCTGCCACCCCTCACCA-3' y 5'-CCGCCTCAGCGGAGAGCTTAG-3'

TIMP-3: 5'-CGGCAATGACCCCTTGGCTCG-3' y 5'GGAGCGCTTACCGATGTCGGA-3'

Tras la realización de la qRT-PCR se evaluó el enriquecimiento relativo de las secuencias diana normalizadas respecto a su ADN *Input*. Todos los ensayos de ChIP se realizaron por triplicado en tres muestras independientes.

4.7 Silenciamiento de Dicer

La proteína Dicer fue silenciada mediante transfección celular con un ARNi (ARN de interferencia) específico para Dicer. Como control negativo se utilizó el ARNi AllStars Negative que contiene una secuencia de oligonucleótidos que carece de homología con los genes de los mamíferos. Ambos ARNi fueron proporcionados por la casa comercial de Qiagen.

Las hESC y las THESC se cultivaron hasta alcanzar un 40-70% de confluencia y se dejaron 24h en medio DMEM/F12 suplementado con el 10% de SFB y libre de antibióticos. Las hESC y las THESC se transfectaron con el ARNi para Dicer o con el ARNi control negativo disueltos en medio OptiMEM (Invitrogen) a 50nM. La transfección se realizó usando el agente de transfección lipofectamine 2000 (Invitrogen). El volumen de lipofectamine para la transfección fue optimizado según el tipo celular y el formato de la placa de cultivo utilizado. Se mezcló la lipofectamine y el ARNi y se incubó la solución durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió la mezcla de transfección a las placas de cultivo y las células se incubaron con el ARNi y la lipofectamine durante 24h. Finalmente el medio es reemplazado con medio fresco y las células son utilizadas para posteriores análisis (figura 16).

El silenciamiento de Dicer se comprobó mediante qRT-PCR y por Western Blot a las 72 y 96 horas después de la transfección.

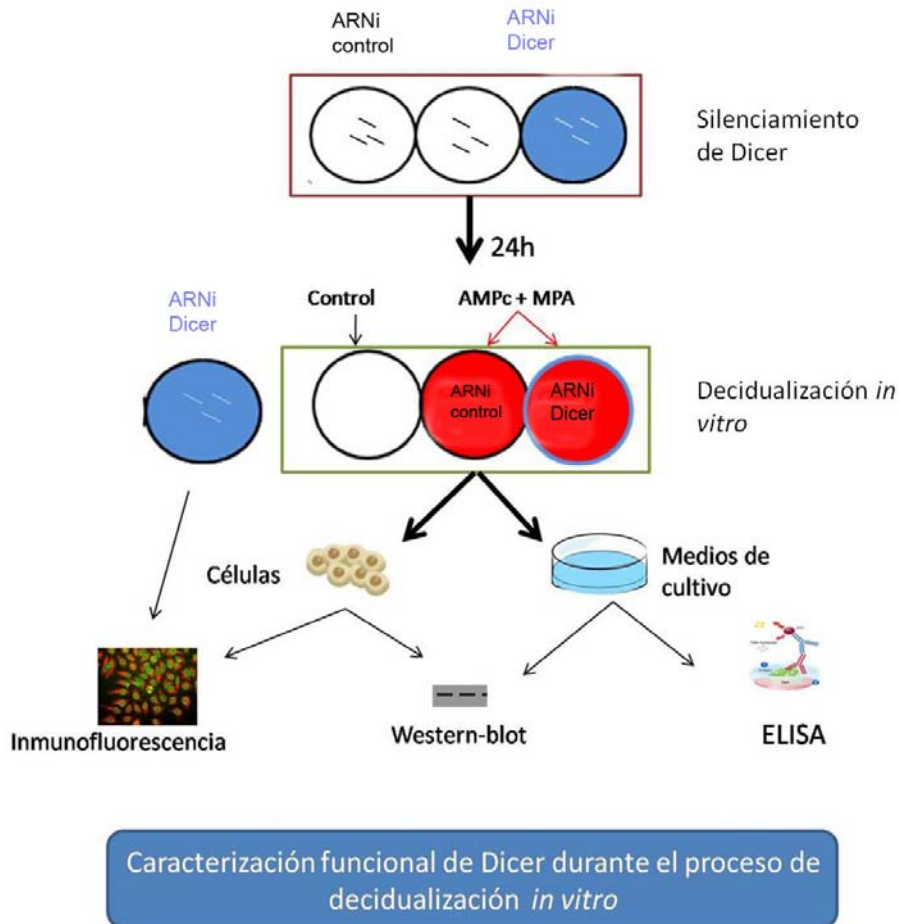


Figura 16. Diseño experimental de la caracterización funcional de Dicer durante el proceso de decidualización *in vitro* en las ESC.

4.8 Transfección celular con mimetizadores de miRNAs

Los niveles endógenos de 2 miRNAs, el miR96 y el miR135b fueron modificados mediante transfección con mimetizadores de miRNAs o miRNA mimics. La tecnología de los miRNA mimics se basa en la utilización de oligonucleótidos

sintéticos de ARN de doble cadena, cuya secuencia es complementaria con el extremo 3'UTR de los ARNm diana de los miRNAs que mimetiza. Por lo tanto este abordaje experimental se basa en la ganancia de función de un determinado miRNA.

Las hESC se cultivaron hasta alcanzar un 40-70% de confluencia y se dejaron 24h en medio DMEM/F12 suplementado con el 10% de SFB y libre de antibióticos. Posteriormente las células se transfectaron con el miRNA mimic del miRNA 96, del miRNA 135b o con el ARNi control negativo disueltos en medio OptiMEM (Invitrogen) a 50nM. Para la transfección se utilizó el agente de transfección lipofectamine 2000 (Invitrogen) y las secuencias de los miRNA mimetizadores y del ARNi control fueron obtenidas de la casa comercial Qiagen. La transfección se realizó tal y como se ha detallado en el apartado anterior. La sobreexpresión de los miRNAs se comprobó mediante qRT-PCR a las 72 horas después de la transfección.

5. ANALISIS DE PROTEINAS

5.1 Extracción de proteína

La extracción de proteína total de las células se realizó utilizando tampón de lisis 2x (300mM NaCl, 20mM Tris, 10mM EDTA, 2% (v/v) Triton X-100, pH=7.3) suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (Roche). Los lisados celulares se mantuvieron durante 20 minutos en hielo y se centrifugaron a máxima velocidad.

Para la extracción proteica de los CCMs se realizó una precipitación de las proteínas con acetona. Para ello se añadió al medio celular 5 volúmenes de acetona fría, se mezcló con vortex y se dejó a -20 °C al menos durante 3 horas. Por último se centrifugó a 6000xg durante 5 minutos, se dejó secar el pellet y se resuspendió en tampón de lisis.

La cuantificación de las proteínas se realizó utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976). Este ensayo constituye una técnica analítica colorimétrica basada en el cambio de color del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad) del rojo al azul cuando este se encuentra unido a las proteínas. Primero se realizó una curva patrón estándar con diferentes concentraciones de BSA a las concentraciones de: 0, 2, 4, 6, 8 y 10 µg/µl. La lectura de las muestras se realizó por espectrofotometría a 595 nm. La curva patrón se utilizó para extrapolar los valores de absorbancia de los extractos proteicos de las muestras problema.

5.2 Western-blot

Los extractos proteicos se mezclaron con tampón de carga 4X (0,225 M Tris-HCl pH 6.8; 50% glicerol; 5% SDS; 0,05% azul de bromofenol; 15% β-mercaptoetanol) y se desnaturalizaron por calentamiento a 99°C durante 5 minutos en el bloque térmico (thermomixer comfort; Eppendorf)

La electroforesis se realizó en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS al 10-12%, donde se cargaron cantidades equivalentes de proteína en cada carril (entre 20 y 40 µg dependiendo del experimento) y se separaron a 125 V durante 2 horas. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF de 0,45µm de tamaño de poro (Biorad) a 290 mA durante 1 hora a 4°C. Terminada la transferencia se lavó la membrana en PBS con un 0.1% tween-20 (PBS-T) y se bloqueó en PBS-T con el 5% de leche desnatada (o BSA dependiendo del anticuerpo) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Luego las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios específicos contra proteínas humanas, que fueron los siguientes: DICER(1:1000) (Cell Signaling, 3363), C/EBPβ (1:200)(Santa Cruz, sc-56637), COX2 (1:1000) (Abcam, ab15191), HOXA10 (1:200)(Santa Cruz, sc-17159), FOXO1 (1:200)(Santa Cruz, sc-11350), SP1(1:250)(Santa Cruz, sc-420), TIMP-3 (1:750)(Abcam, ab39184), TIMP-1 (1:250)(Abcam, ab102D1) y β-Actina (1:1000)(Santa Cruz, sc-47778). Todos los

anticuerpos se disolvieron en una solución de PBS-T con el 3% de leche (o BSA) desnatada y se incubaron toda la noche a 4°C. Posteriormente las membranas se lavaron y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), a una dilución 1:2000 en una solución de PBS-T con el 3% de leche desnatada (o BSA) durante 45 minutos a temperatura ambiente en agitación. Finalmente las membranas se revelaron mediante un sistema quimioluminescente para lo cual se incubó la membrana durante 1 minuto con el producto ECL-plus (Amersham) y la emisión de la señal se lee en el sistema LAS300.

Los niveles de proteína se cuantificaron mediante análisis densitométrico de las bandas, utilizando para ello el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/links.html>).

5.3 Análisis de proteasas: Zimografía

La zimografía es una técnica electroforética que se realiza en geles de poliacrilamida polimerizados en presencia de gelatina soluble (colágeno desnaturalizado) que es el sustrato de las proteasas. Tras realizar la separación electroforética en condiciones desnaturalizantes, pero no reductoras, las proteínas son renaturalizadas y los geles se incuban en una solución que favorece la acción de las proteasas. El resultado de este tipo de geles, es que en la zona donde se localiza una proteasa, la gelatina presente en el gel habrá sido degradada. Esta degradación se revela tiñendo el gel con colorantes afines a las proteínas, observándose una banda blanca en donde hubo degradación y que corresponde a la proteasa.

Este método permite diferenciar por su diferente peso molecular a las diferentes MMPs así como la forma activa de la inactiva de la misma MMP. Por lo tanto podemos analizar la cantidad de proteína total así como los niveles de las

formas activas e inactivas utilizado para determinar el nivel de activación de MMPs (Figura 17).

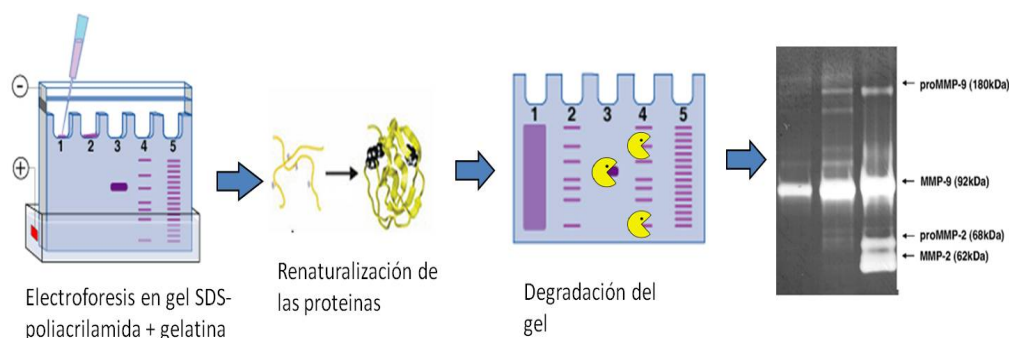


Figura 17. Esquema del procedimiento experimental de la zimografía.

Se realizaron zimogramas para el estudio de la actividad proteolítica de las MMP-2 y las MMP-9 presentes en los CCMs obtenidos de las hESC tratadas con TSA vs hESC control durante 48 horas. 7µg de proteína se separaron por electroforesis en condiciones no reductoras en geles SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida conteniendo 1mg/mL de gelatina (Sigma) Una vez finalizada la separación electroforética los geles se lavaron en Triton X-100 al 2,5% durante 1 hora en agitación para eliminar el SDS y renaturalizar las proteínas. Posteriormente los geles se incubaron en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8, con 10 mM de CaCl₂, durante toda la noche a 37° C. Para revelar las zonas de degradación de las proteínas, los geles se tiñeron con azul Coomassie al 0.1% durante 30 minutos y el exceso de colorante se elimina hasta que se diferencien las bandas de lisis correspondientes a las MMPs.

El área e intensidad de las bandas líticas se cuantificó por densitometría utilizando el programa imageJ. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias correspondientes a los valores densidad óptica. Todos los ensayos de zimografía se realizaron en tres muestras independientes.

5.4. Inmunohistoquímica

Las muestras de tejido endometrial obtenidas de 10 pacientes con ciclo natural y recogidas en fase secretora temprana (5) y fase secretora tardía (5) fueron fijadas en formol y embebidas en parafina. Posteriormente se realizaron pequeñas secciones del tejido de unos 3µm de grosor que fueron analizadas mediante inmunohistoquímica utilizando para ello el kit LSAB Peroxidase (DAKO).

Las muestras fueron desparafinadas, rehidratadas y sometidas a un paso de activación de antígeno. A continuación las secciones fueron bloqueadas con BSA al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente y tras varios lavados con PBS se incubaron durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda con el anticuerpo anti-Dicer humano 1/100 (Santa-cruz; sc-30226). Como control negativo se utilizó un corte de endometrio incubado con un anticuerpo control de isotipo de la misma especie que los secundarios (Dako). Como controles positivos del anticuerpo primario se incluyó una muestra de ovario donde se ha descrito que Dicer se expresa a niveles detectables (Zhang y Farwell, 2008; Zhang y cols., 2008). Posteriormente se bloqueó la posible actividad peroxidasa endógena del tejido con agua oxigenada y las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios proporcionados por el kit comercial. La inmunotinción se establece al añadir el cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) que es sustrato de la HRP presente en los anticuerpos secundarios. Finalmente se realizó una contra tinción con hematoxilina para teñir los núcleos celulares y las muestras se montaron en cubreobjetos utilizando el medio de montaje Eukit (Sigma)

La inmunotinción de las diferentes muestras se evaluó por 6 observadores independientes asignando los valores de 0-3 en función de la menor o mayor intensidad de tinción de Dicer para cada una de las 10 muestras

5.5 Inmunofluorescencia

Para evaluar la morfología de las hESC se aplicaron ensayos de inmunofluorescencia. Las hESC fueron expuestas a 4 condiciones diferentes: ARNi control y ARNi de Dicer y ARNi control vs ARNi de Dicer expuestas al estímulo decidual durante 48 horas.

Las células fueron fijadas y bloqueadas como se ha detallado anteriormente. Posteriormente las muestras se incubaron a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario: anti-Vimentina humana 1:50 (Sigma; V6630). Tras varios lavados las células se incubaron con los anticuerpos secundarios: anti-IgG de ratón Alexa Fluor 488 1/1000 (Invitrogen) y Faloidina-tetrametilrodamina B isotiocianato conjugado a 0.1 µg/mL (fluka 77418), durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Las muestras fueron montadas con el medio vectashield que contiene Dapi y las imágenes fueron capturadas en el microscopio confocal invertido *Sp2* de Leica.

5.6 ELISA

Las hESC y las THESC fueron sometidas a tres condiciones experimentales diferentes: ESC ARNi control y ESC ARNi control vs ESC ARNi Dicer tratadas con el estímulo decidual. Los medios de cultivo de las hESC y las THESC fueron recogidos 48 y 72 horas del estímulo decidual y analizados mediante kits comerciales de ELISA para cuantificar los niveles de PRL (Abnova), IGFBP-1(Raybiotech) y MPIF-1 (Raybiotech), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los valores de absorción a 480nm obtenidos en las muestras estándar fueron utilizados para realizar una curva patrón estándar. La concentración proteica de las muestras se calculó extrapolando los valores de absorbancia en la curva estándar realizada. Para evitar que los valores de concentración proteica se salieran fuera

del rango establecido por las curva de concentración estándar, los medios de cultivo fueron diluidos a 1/500 para el caso de IGFBP-1.

6. Análisis bioinformático

Se realizó un análisis computacional de los miRNAs para la identificación de sus potenciales dianas génicas. Existen varias plataformas bioinformáticas que utilizan algoritmos de predicción para la identificación de las potenciales dianas génicas de cada miRNA. Los algoritmos de predicción de estas bases de datos se basan en la complementareidad de secuencias entre la región de reconocimiento o región semilla de los miRNAs y la región 3'-UTR de los ARNm. Para el análisis computacional de los miRNA se utilizaron cuatro plataformas predictoras diferentes: targetscan: <http://www.targetscan.org/>, miRanda: miRNA.org, microCosm: <http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/> y PicTar: <http://pictar.mdc-berlin.de/>. Únicamente se seleccionaron aquellas potenciales dianas génicas identificadas en al menos dos de los algoritmos de predicción.

También se realizó un análisis computacional de las rutas y procesos más representados por los miRNAs diferencialmente expresados durante el proceso de decidualización *in vitro*. Para llevar a cabo esta aproximación al estudio funcional de los miRNAs se obtuvo la información de la página web: Diana miR-Path database (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/pathways/>).

7. Análisis Estadístico de los Datos

Para cada experimento se utilizó al menos en 3 muestras independientes (n=3) con tres repeticiones paralelas en cada experimento. Los valores obtenidos en los diferentes ensayos se representaron como el promedio \pm el error estándar de la media (SEM).

La significancia estadística, es decir, que la diferencia encontrada entre los grupos no sea producto del azar fue determinada mediante el test t-Student con la aplicación disponible en línea en la página Web: Graph-Pad Prism version 3.0: (<http://www.graphpad.com>). La significancia estadística se definió como $p \leq 0.05$.

VI. RESULTADOS

VI. RESULTADOS

1. Estudio de los cambios en la acetilación de las histonas y sus efectos durante la decidualización de las células estromales endometriales (hESCs)

1.1- Efecto del TSA sobre el fenotipo de las hESC

Para evaluar el efecto de acetilación de las histonas sobre las hESC, la estrategia seleccionada fue la utilización del inhibidor de las histonas de deacetilasas (HDACs) de clase I y II, Trichostatin A (TSA).

Las hESC fueron aisladas de biopsias endometriales y la pureza de las poblaciones celulares se evaluó mediante inmunofluorescencia utilizando el marcador estromal vimentina y el marcador epitelial E-cadherina. Los resultados nos muestran la eficacia del aislamiento de los diferentes tipos celulares endometriales (Figura 18). Posteriormente las hESC se trataron con TSA a las concentraciones de 0.1 μM y 1 μM durante 48 horas y tanto las células como los medios celulares se utilizaron para posteriores experimentos. Este diseño experimental se mantuvo a lo largo de los diferentes análisis realizados en este estudio.

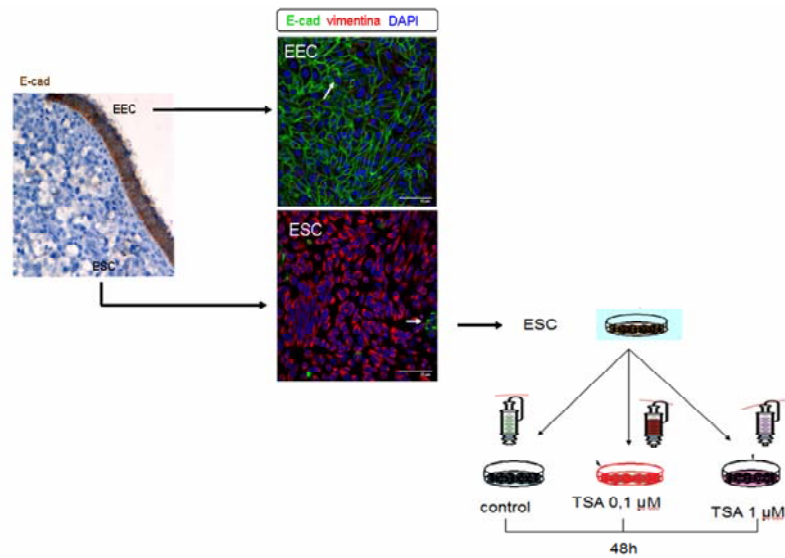


Figura 18 Análisis de la pureza de las células endometriales aisladas y diseño experimental utilizado para el tratamiento con TSA. (A) Imagen de una muestra de endometrio total con el epitelio marcado mediante inmunohistoquímica con E-cadherina y posterior marcaje de la población aislada de las hEECs marcadas con E-cadherina (en verde) y las hESC marcadas con vimentina (rojo). Aunque la separación del compartimento estromal del epitelial es casi total, existen una pequeña población (<5%) de células epiteliales en el compartimento estromal y viceversa (flechas). (B) Diseño experimental utilizado en el tratamiento de las hESC con TSA.

La eficacia del TSA como inhibidor de las HDAC ha sido demostrado en multitud de estudios (Kim y Bae 2011, Sakai y cols., 2003) y específicamente en las hESC fue demostrada por Sakai y col, tras comprobar cómo el tratamiento de las células con TSA induce un aumento en los niveles de acetilación de las histonas H3 y H4.

Para asegurarnos de que las concentraciones de TSA utilizadas no provocaban efectos nocivos sobre las hESC, se analizó la viabilidad celular

mediante el método de exclusión del colorante vital Trypan Blue. Los datos obtenidos muestran que el tratamiento de las hESC con TSA no afecta a su supervivencia (Figura 19).

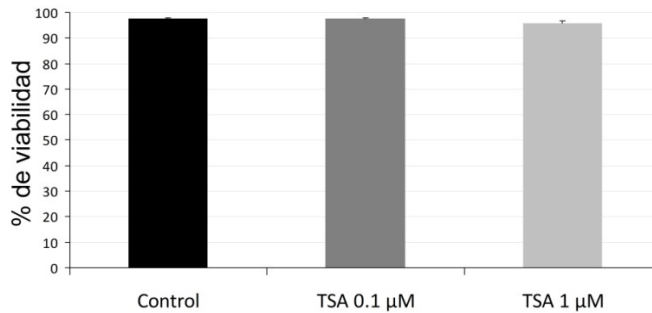


Figura 19. Análisis de viabilidad de las hESC control vs hESC tratadas con TSA. El % de viabilidad se estableció en función del número de células vivas/nº total de células, en las hESC control vs hESC tratadas con TSA. El gráfico representa la media \pm SEM de tres muestras independientes. Las barras representan el error medio estándar o SEM.

1.1 Efecto del TSA sobre la movilidad de las hESC

Una vez comprobado que el tratamiento de las hESC con TSA no afecta a la viabilidad celular, el primer objetivo propuesto fue determinar la implicación de la acetilación de las histonas sobre la movilidad celular. Se ha demostrado que el desplazamiento de las células estromales endometriales (ESC) en la zona de implantación es necesario para el proceso de invasión embrionaria (Grewal y cols., 2008, Grewal y cols., 2010). Esta movilidad celular debe estar regulada para que tenga lugar un correcto proceso de invasión y por tanto de implantación embrionaria en el compartimento estromal. La movilidad celular fue evaluada mediante ensayos de migración e invasión celular.

Análisis de migración celular

Mediante ensayos de cicatrización o de "wound-healing", el potencial migratorio de las células se evalúa en función de la capacidad de cerrar una brecha creada artificialmente en la monocapa celular.

Los resultados de este ensayo muestran que las hESC tratadas con TSA a la concentración de 1 μ M poseen menor tasa de migración celular (8%) en comparación con las hESC expuestas a vehículo control (32%). Por otro lado las hESC expuestas a TSA a la concentración de 0.1 μ M no muestran diferencias significativas en su potencial de migración (Figura 20).

Análisis de invasión

Cualquier movimiento celular *in vivo* requiere de la degradación parcial de la matriz extracelular (MEC) que rodea a las células. Este fenómeno puede ser evaluado *in vitro* mediante ensayos de invasión.

Por ello analizamos el efecto del TSA sobre la movilidad de las hESC mediante un ensayo de invasión en insertos cubiertos de colágeno. El colágeno tipo IV es uno de los componentes mayoritarios de la MEC de la decidua materna, por lo que este ensayo constituye una adecuada herramienta para el estudio *in vitro* de la movilidad de las hESC. El % de invasión fue establecido en función del número de células capaces de atravesar la membrana después de haber sido tratadas con TSA o con vehículo control.

Los resultados obtenidos nos muestran que las hESC tratadas con el 0.1 μ M y 1 μ M de TSA presentan una disminución del potencial invasivo (38% y 57% menos respectivamente) comparado con las hESC control (Figura 20).

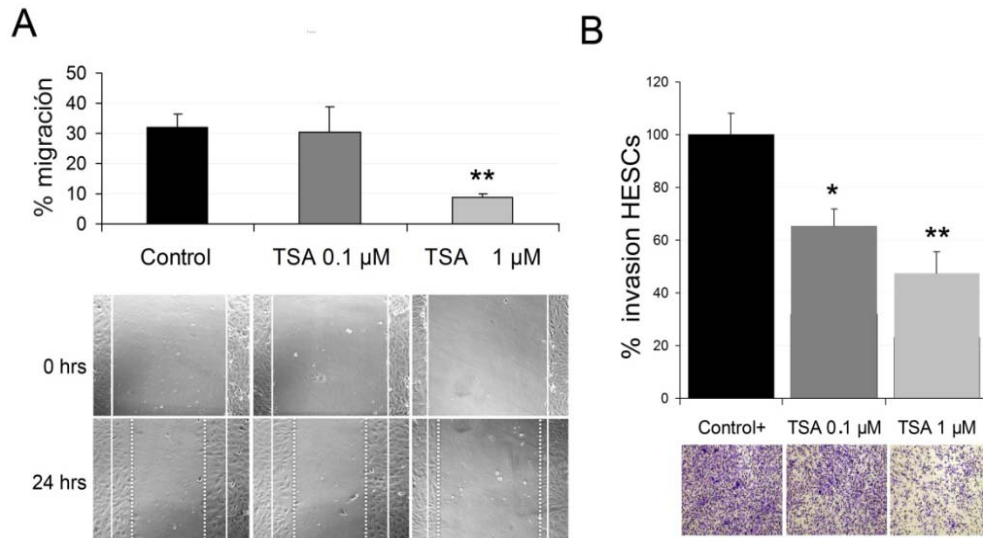


Figura 20. Análisis del efecto del TSA sobre la movilidad celular en las hESC. (A) Representación gráfica de los datos recogidos en el ensayo de wound-healing (arriba) junto con las imágenes de la brecha a las 0 y 24 horas, en las hESC control vs hESC tratadas con TSA. (B) En la gráfica se muestra el % de invasión de las hESC, donde se ha considerado un 100% el potencial invasivo de las células control. Imagen representativa de las células invasoras en cada una de las condiciones (abajo). Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas entre las hESC control vs hESC TSA se han expresado como * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ (arriba).

Los resultados nos muestran que el tratamiento de las hESC con el HDACi TSA reduce de manera dosis-dependiente la movilidad celular de las hESC, evaluada mediante un ensayo de migración y por su capacidad para atravesar una membrana cubierta de colágeno.

1.2- Implicación del TSA sobre el proceso de invasión embrionaria

1.2.1 Ensayos de invasión trofoblástica

El estroma cumple un papel activo en la regulación del proceso de invasión embrionaria. Se sabe que multitud de proteasas, citoquinas y factores de crecimiento van a ser secretados por las hESC y actuando de forma local en el espacio extracelular van a regular la capacidad invasiva del trofoblasto.

Por ello analizamos la influencia que los medios condicionados (CCMs) derivados de las hESC control vs hESC tratadas con TSA ejercen sobre el potencial invasivo de las células trofoblásticas. Primero las hESCs se trataron durante 48 horas con TSA a distintas concentraciones ($1\mu\text{M}$ y $0.1\mu\text{M}$) o vehículo control. Posteriormente la línea celular trofoblástica JEG-3 se expuso a los diferentes CCMs recogidos y se realizó un ensayo de invasión (Figura 21). Los resultados obtenidos determinan que el potencial invasivo de las JEG-3 se reduce en presencia de los CCMs derivados de las hESC tratadas con TSA en comparación con los CCMs de las hESC control (Figura 21).

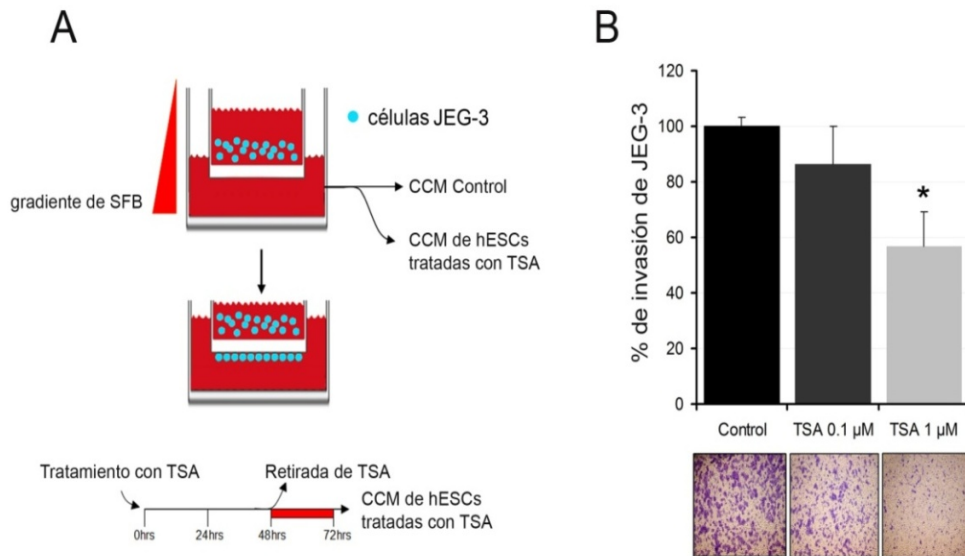


Figura 21. Análisis del efecto del TSA sobre el potencial invasivo del trofoblasto.

(A) Imagen representativa del diseño experimental del ensayo de invasión. (B) La gráfica muestra el % de invasión evaluado en función del número de células JEG-3 capaces de atravesar una membrana de colágeno, tomando como valor arbitrario de 100% al número de células JEG-3 invasivas expuestas al CCM control. Los datos corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes. La significancia estadística se indica como * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

1.2.2 Ensayos de invasión embrionaria sobre una monocapa de hESC

Para estudiar el efecto de la acetilación de las histonas sobre las interacciones moleculares embrión-estroma se utilizó un sistema heterólogo “*in vitro*” detallado previamente por Carver y cols y ampliamente utilizado en distintos estudios (Carver y cols., 2003, Grewal y cols., 2008, Grewal y cols., 2010). Este modelo propone el co-cultivo de blastocistos de ratón sobre una monocapa de hESC, donde el trofoblasto es capaz de crecer, expandirse y atravesar la monocapa de las hESC (Figura 22). La extensión del proceso invasivo va a depender del potencial invasivo de las células del trofoblasto y de la permisividad de las células

endometriales estromales a esta invasión. Por lo tanto este es un modelo adecuado para el estudio *in vitro* del efecto del TSA sobre el proceso de invasión embrionaria.

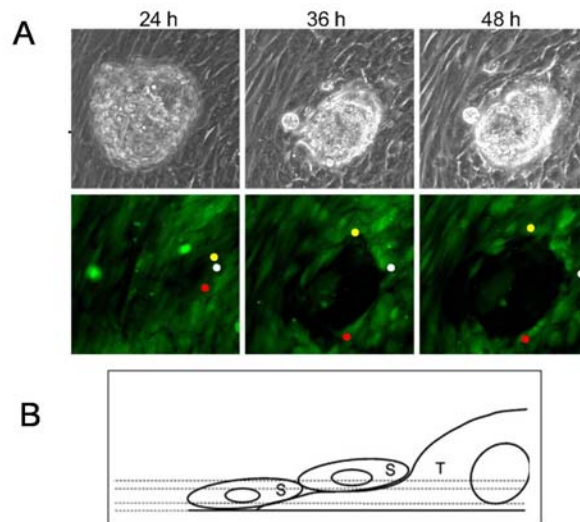


Figura 22. Modelo *in vitro* de invasión embrionaria. A. En la imagen se recoge la secuencia del co-cultivo de los embriones en la monocapa de ESC donde se observa la progresión del proceso de invasión embrionaria. El movimiento de tres células individuales queda indicado por los puntos. B. Imagen recogida del área de contacto entre las ESC y el trofoblasto. S; células estromales endometriales, T; Trofoblasto. (Adaptada de Carver y cols., 2003).

Las hESC fueron tratadas con TSA ($1\mu\text{M}$ y $0.1\mu\text{M}$) vs vehículo control durante 48 horas y posteriormente se añadieron los blastocistos de ratón durante 48 horas. Previamente a la adición de los embriones, las hESC fueron lavadas y se añadió medio nuevo, de modo que los efectos del TSA sobre el proceso de invasión embrionaria actuaran únicamente a través de cambios en las hESC.

Las células fueron marcadas mediante inmunofluorescencia, y se midió el área de invasión del trofoblasto. Los resultados del ensayo de invasión embrionaria *in vitro* muestran como los blastocistos co-cultivados sobre una monocapa de hESC tratadas con $1\mu\text{M}$ de TSA muestran una reducción en la capacidad de invasión

embrionaria del 50% en comparación con blastocistos co-cultivos con las hESC control (Figura 23).

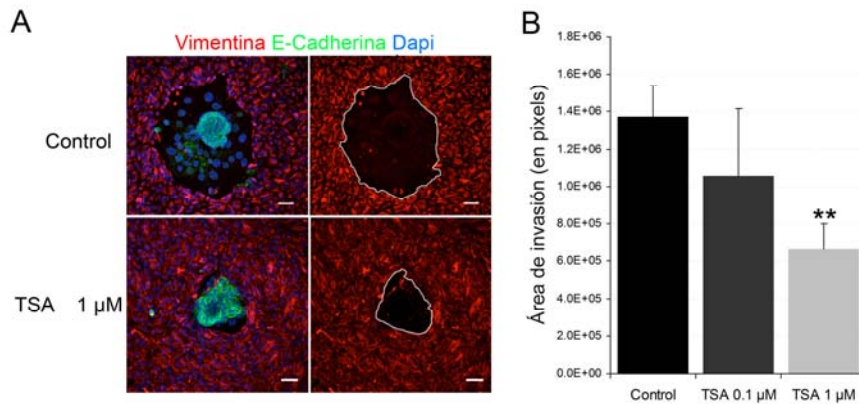


Figura 23. Estudio del efecto del TSA sobre el proceso de invasión embrionaria *in vitro*. (A) Imagen del co-cultivo de embriones de ratón marcados con E-Cadherina (verde) sobre las hESC control o las hESC tratadas con TSA marcadas con vimentina (rojo). (B) En el gráfico se representan los valores en pixels del área de invasión embrionaria tras 48 horas de co-cultivo. Los datos corresponden a la media \pm SEM entre tres muestras independientes utilizando un n° de embriones > de 8 por muestra. La significancia estadística queda indicada de la siguiente manera ** $p < 0.01$.

El tratamiento de las hESC con TSA provoca una disminución en la movilidad celular así como en el potencial invasivo de las células trofoblásticas. Estos cambios en el fenotipo de las hESC tratadas con TSA, provocan una reducción en el proceso de invasión embrionaria, evaluada mediante un ensayo *in vitro* de co-cultivo.

1.3.- Efecto del TSA en la expresión génica del sistema de las MMPs

Como hemos detallado previamente, durante la fase secretora del ciclo menstrual tiene lugar un importante proceso de remodelación de la matriz

extracelular que contribuye al control del proceso de invasión embrionaria. El colágeno tipo IV es el componente mayoritario de la matriz extracelular de la decidua materna, siendo el principal sustrato de la MMP-2 y la MMP-9 (Iwahashi y cols., 1996). También se conoce que importantes reguladores post-transcripcionales de estas metaloproteasas (MMPs), como uPA y algunos inhibidores tisulares de tejido (TIMPs) se expresan diferencialmente por las hESC en la interfase materno-embionaria (Salamonsen y Nie, 2002). Además las MMPs desempeñan un papel esencial en los procesos de migración e invasión celular, así como en el control del proceso de invasión embrionaria (Alexander y cols., 1996, Kessenbrock y cols., 2010).

Acabamos de demostrar como el tratamiento de las hESC con HDACi está regulando la movilidad celular y provoca una reducción en la capacidad invasiva del trofoblasto. Por lo tanto nos planteamos la idea de determinar el efecto de la acetilación de las histonas sobre la transcripción del sistema de las metaloproteasas.

El análisis mediante PCR semicuantitativa y cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) muestra una disminución en la expresión génica de MMP-2 (14.7 veces), MMP-9 (-2.5 veces) y del activador de la actividad proteolítica uPA (-23.2 veces) en las hESC tratadas con TSA en comparación con las hESC control. Por otro lado aumenta la expresión de sus inhibidores TIMP-1 (13 veces) y TIMP-3 (2.1. veces) mientras que los niveles de expresión de RECK, otro regulador de las MMPs, no se ven modificados tras la inhibición de las HDACs (Figura 24).

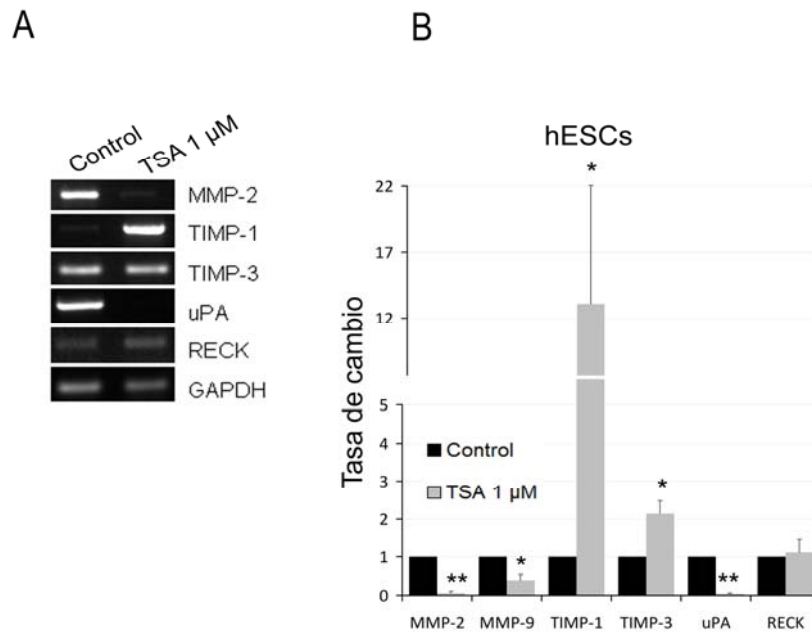


Figura 24. Efectos transcripcionales del TSA sobre del sistema de las metaloproteasas en las hESC. PCR semicuantitativa (A) y qRT-PCR (B) de los diferentes genes analizados: MMP-2, TIMP-1, TIMP-3, uPA y RECK en las hESCs tratadas con TSA a 1 μ M o vehículo control durante 48 horas. MMP-9 presenta niveles muy bajos de transcripción y no pudo ser detectada sobre un gel de agarosa. Los valores de expresión de cada gen fueron normalizados con los niveles de GAPDH. Los datos muestran la media \pm SEM de tres experimentos independientes y el análisis estadístico de las diferencias entre las hESCs control vs hESCs tratadas con TSA se indican como * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Debido a su asociación en importantes procesos fisiológicos o patológicos el sistema de las metaloproteasas ha sido ampliamente estudiado en múltiples tipos celulares. Estos estudios asocian un papel de los HDACi en la regulación de los diferentes componentes del sistema enzimático, obteniendo resultados variables dependiendo de la línea o tipo celular objeto de estudio (Clark y cols., 2007, Ailenberg y Silverman 2003, Kaneko y cols., 2004). Estos datos indican que para

determinar el papel de los HDACi en la regulación del sistema de las MMPs es necesario el estudio individualizado en cada tejido y tipo celular.

Por ello consideramos interesante comprobar si el patrón de regulación inducido por el TSA sobre las enzimas implicadas en la remodelación de la MEC es específico de las células endometriales. Para ello realizamos el análisis transcripcional del sistema de las metaloproteasas en las células epiteliales endometriales (hEEC) y en fibroblastos de la línea hFFC (human foreskin fibroblast cells) tratados con TSA a 1 μ M o vehículo control durante 48 horas.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de la qRT-PCR muestran como el patrón de transcripción inducido en las hESC por el tratamiento con TSA, se mantiene en las hEEC, al menos en los genes analizados con una disminución en los niveles de MMP-2 (-4.6 veces), MMP-9 (-2 veces, aunque la diferencia no es significativa), uPA (-23 veces) y un aumento en la expresión de sus inhibidores TIMP-1 (13 veces) y TIMP-3 (3.9 veces). Pero a diferencia de las hESCs, el tratamiento con TSA en las hEEC provoca un aumento significativo de RECK (8.7 veces). Por otro lado el tratamiento con TSA de las hFFC no induce los mismos efectos transcripcionales, MMP-2 disminuye (-2.5 veces), MMP-9 aumenta (60 veces), TIMP-1 y TIMP-3 no cambian significativamente mientras que uPA aumenta (3.3 veces) y RECK disminuyen (-1.72 veces) (Figura 25).

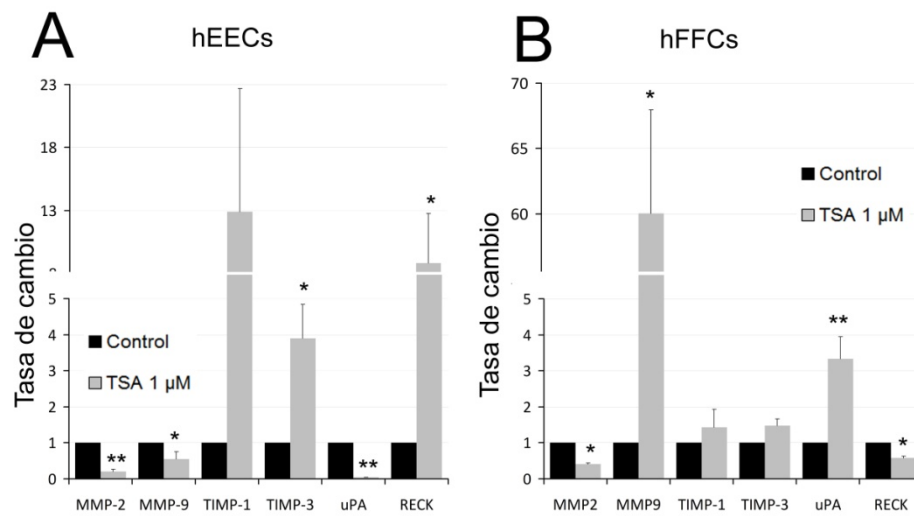


Figura 25. Efectos transcripcionales inducidos por el tratamiento con TSA en el sistema de las MMPs en las hEEC y en las hFFC. En las gráficas se representan los datos obtenidos en el análisis de la qRT-PCR en las hEEC (A) y las hFFC (B) tratadas con TSA vs vehículo control. Los datos corresponden a la media±SEM entre tres experimentos independientes. La significancia del análisis estadístico está indicado de la siguiente manera * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Estos resultados sugieren que el tratamiento de las hESC y las hEEC con HDACi modifica la transcripción génica de los componentes del sistema de las metaloproteasas disminuyendo la expresión de las enzimas proteolíticas MMP-2 y MMP-9 así como de su activador uPA y aumentando los niveles de sus inhibidores TIMP-1 y TIMP-3. Además este perfil de regulación transcripcional es específico en las células endometriales.

1.4. Efectos del TSA en la actividad de las MMPs

La actividad de las MMPs posee tres niveles principales de regulación: a nivel génico, por activación post-transcripcional o por inhibición de la actividad proteica (Chakraborti y cols., 2003). Por ello el nivel de actividad enzimática de las MMPs va a depender de los niveles globales de proteína secretados así como de los niveles de activadores e inhibidores presentes en el medio extracelular encargados de su regulación post-transcripcional.

Ya hemos demostrado como el tratamiento de las hESC con TSA provoca una disminución en los niveles de transcripción de MMP-2 y MMP-9 y una activación de sus inhibidores TIMP-1 y TIMP-3. El siguiente paso fue verificar si el efecto transcripcional se correlaciona con los niveles proteicos secretados y si el tratamiento de las hESC con TSA está modulando la activación o inhibición post-transcripcional de MMP-2 y MMP-9.

El análisis mediante zimografía de los CCMs obtenidos de las hESCs tratadas con TSA y control muestra la presencia de tres bandas claramente diferenciadas y correspondientes a 92kda (pro-MMP-9), 72 kDa (pro-MMP-2) y 62 kDa (act-MMP-2) (Figura 26). Los niveles de expresión proteica global de la MMP-9 son muy bajos y la banda correspondiente a la MMP-9 activa no pudo detectarse mediante zimografía.

El análisis densitométrico de las bandas muestra que el CCM de las células tratadas con TSA presenta menor cantidad de MMP-2 total en comparación con el medio control, disminuyendo tanto la forma inactiva de MMP-2 (pro-MMP2) como la forma activa (act-MMP2) y presenta menores niveles de pro-MMP-9 en comparación con el CCM de las hESC control.

Por otro lado el ratio entre la forma activa y la inactiva (pro-MMP/act-MMP) es un parámetro que nos permite valorar el nivel de activación/inhibición post-transcripcional de las enzimas. El ratio pro-MMP2/act-MMP2 fue significativamente mayor en los CCM de las hESC tratadas con TSA comparados con los CCM de las hESC control (Figura 26).

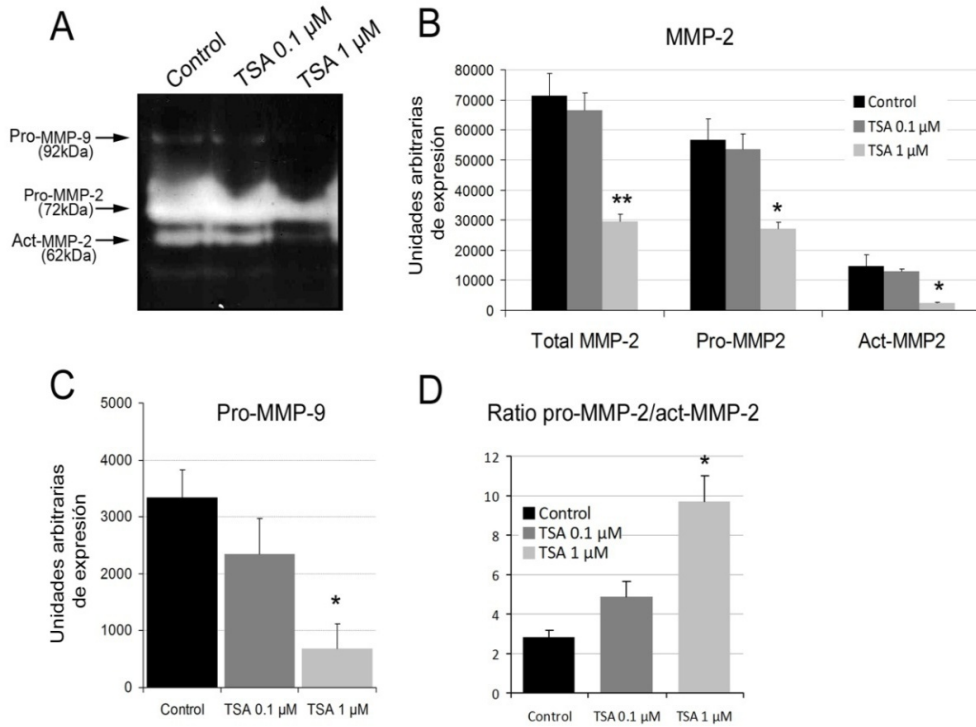


Figura 26. Análisis del efecto del TSA sobre la actividad enzimática de la MMP-2 y la MMP-9. (A) Imagen del gel del zimograma donde se pueden observar las bandas de las diferentes gelatinas correspondientes a 92 kDa (pro-MMP-9), 72 kDa (pro-MMP-2) y 62 kDa (act-MMP-2). Representación gráfica de los valores del análisis densitométrico de las bandas de la MMP-2 (B) o la MMP-9 (C) en los CCMs control vs CCMs TSA. (D) Representación gráfica de los valores del ratio entre la pro-MMP-2/act-MMP-2. Los valores corresponden a la media±SEM entre tres experimentos independientes y la significancia estadística se indica como * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Estos datos nos indican que el medio extracelular de las hESC tratadas con TSA presenta menores niveles proteicos de MMP-2 y MMP-9 y menor actividad enzimática de MMP-2. Un aumento en el nivel de inhibición o una disminución de la

activación post-transcripcional de los propéptidos podrían ser la causa de la actividad proteolítica reducida.

1.5. Efecto del TSA sobre los niveles proteicos de los TIMPs

Los TIMPs se expresan de forma constitutiva por la mayoría de los tejidos y ejercen su acción en el medio extracelular donde se unen a las MMPs bloqueando su acción proteolítica.

Ya hemos determinado como el tratamiento de las hESC con TSA induce un aumento en la expresión génica de TIMP-1 y de TIMP-3. Además el medio extracelular derivado de estas células muestra una actividad enzimática reducida para las MMPs, siendo una de las posibles causas un aumento en los niveles de TIMPs extracelulares. Por ello consideramos importante el análisis de los niveles proteicos de TIMP-1 y TIMP-3 presentes en el medio extracelular.

Los CCMs derivados de las hESC tratadas con TSA o con vehículo control fueron analizados mediante western-blot. Los resultados muestran que los niveles de TIMP-3 son mayores en los CCMs obtenidos de las hESC tratadas con TSA en comparación con los CCMs control (Figura 27). Mientras que por otro lado la cantidad de TIMP-1 secretado permanece prácticamente inalterada.

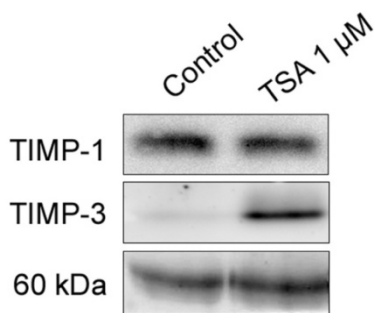


Figura 27. Análisis de los niveles proteicos de los TIMPs en los CCMs derivados de las hESC control vs hESC TSA. Imagen del western-blot de los niveles de TIMP-1 y TIMP-3 presentes en los extractos proteicos obtenidos de los CCM de las hESC control vs TSA. La banda de 60 kDa corresponde a la tinción de la membrana con ponceau utilizada como control de carga. El experimento se realizó en tres muestras independientes.

El tratamiento de las hESC con TSA induce un aumento en los niveles proteicos de TIMP-3 secretados al medio extracelular, sugiriendo que podría ser responsable de la disminución de la actividad proteolítica de MMP-2.

1.6. Efecto del TSA sobre los niveles de acetilación de las histonas: análisis de los promotores génicos de TIMP-1 y TIMP-3

La influencia de las HDACs en el establecimiento de un patrón génico determinado puede estar mediado por la modificación directa de las colas de las histonas o por la modificación post-transcripcional de la actividad de múltiples coreguladores de la transcripción, como factores de transcripción (Kouzarides 2007).

Para afianzar la idea de que los cambios transcripcionales observados tras el tratamiento con TSA son debido a un efecto directo de la modificación de las colas de las histonas asociadas a los promotores de TIMP-1 y TIMP-3, realizamos un análisis mediante la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina o CHIP. Los resultados de la CHIP muestran un aumento en los niveles génicos del promotor de TIMP-1 asociado a las histonas H3 acetilada y a la H4 acetilada en las hESC tratadas con TSA en comparación con las células control. Del mismo modo también se observa un aumento en los niveles del promotor de TIMP-3 asociado a la histona H4 acetilada aunque no en la H3 acetilada en las hESC tratadas con TSA vs hESC control (Figura 28).

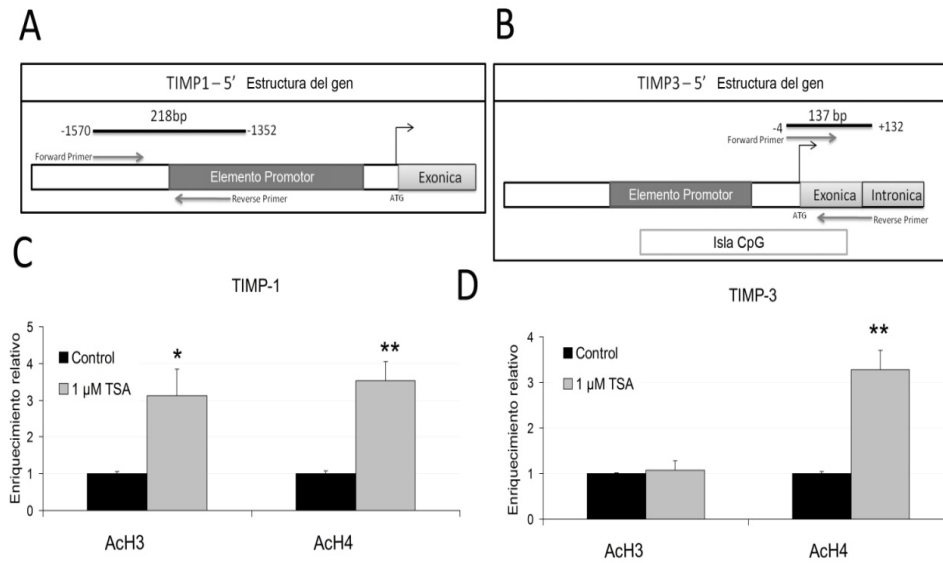


Figura 28. Efecto del TSA sobre los niveles de acetilación de las histonas H3 y H4 a nivel de los promotores génicos de TIMP-1 y de TIMP-3. Representación esquemática del extremo 5' flanqueante a la región promotora amplificada en los genes codificantes de TIMP-1 (A) y TIMP-3 (B). (C) En la gráfica se representa el enriquecimiento relativo de TIMP-1 (C) y TIMP-3 (D) inmunoprecipitado con anticuerpos contra la H3 y H4 acetiladas en las hESC tratadas con TSA vs células control. Los valores de expresión fueron normalizados con el Input. El experimento fue realizado por triplicado en tres muestras independientes y los valores muestran la media±SEM. La significancia estadística se indica como * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Los resultados obtenidos muestran como el tratamiento de las hESC con TSA provoca un aumento en la transcripción de TIMP-1 y TIMP-3 probablemente inducido por mayores niveles de acetilación de las histonas asociadas a sus promotores génicos.

El tratamiento de las hESC con TSA, a través de una disminución en su movilidad y de cambios en el balance de MMPs y de TIMPs, provoca la reducción del proceso de invasión embrionaria. Estos procesos podrían estar regulados, al

menos en parte, por un aumento en la acetilación de las histonas asociadas a los promotores de los TIMPs.

1.7. Efecto de la decidualización en el balance de los moduladores de la MEC y su asociación con la acetilación de las histonas

Por un lado ya está descrito que tanto las MMPs como los TIMPs tienen una expresión diferencial en el endometrio a lo largo del ciclo menstrual (Osteen y cols., 2003). La función del sistema de las metaloproteasas en el endometrio durante la fase secretora se asocia al proceso de remodelación de la matriz extracelular que tiene lugar durante la decidualización y que contribuye al control del proceso de implantación embrionaria (Goldman y Shalev, 2003, Ramathal y cols., 2010). Por otro lado también se ha demostrado un aumento en los niveles de H3 y H4 acetiladas en las hESC decidualizadas (Sakai y cols., 2003). Nuestros resultados muestran como existe una relación entre la acetilación de las histonas y los niveles transcripcionales de las MMPs y los TIMPs, sugiriendo que este mecanismo epigenético puede estar regulando al sistema de las metaloproteasas en las hESC. Por ello nos planteamos investigar si la acetilación de las histonas, a través de cambios en la expresión de las MMPs y de los TIMPs, podría estar regulando el proceso de remodelación de la matriz extracelular durante la decidualización.

El proceso de decidualización *in vitro* fue inducido tras el tratamiento de las hESC con AMPc +MPA durante 5 días. Se comprobó el fenotipo decidualizado de las hESC mediante el análisis de marcadores morfológicos (datos no mostrados) y el análisis de los niveles de marcadores moleculares específicos del proceso, concretamente la secreción de PRL (Figura 29).

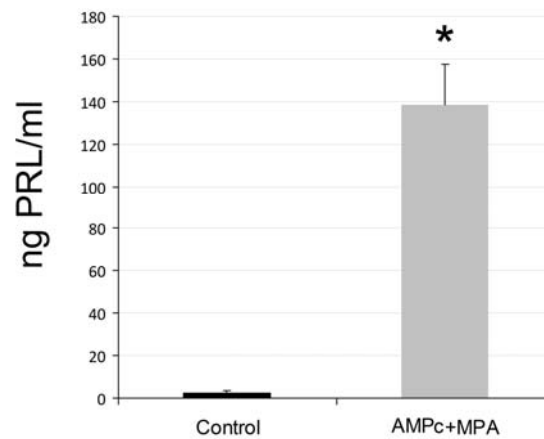


Figura 29. Caracterización del fenotipo de las hESC decidualizadas. Representación gráfica de los niveles de PRL secretados en las hESC control vs hESC tratadas con AMPc+MPA

Los resultados muestran como las hESC tratadas de las con AMPc y MPA durante 5 días aumentan los niveles secretados de PRL.

Posteriormente se realizó un análisis transcripcional del sistema de las metaloproteasas mediante qRT-PCR en las hESC control vs hESC tratadas con AMPc+MPA. Los resultados muestran como las hESC decidualizadas aumentan la expresión de TIMP-1 (4.5 veces) y de TIMP-3 (32.7 veces) mientras que disminuyen los niveles de MMP-9 (-16.6 veces), uPA (-5.8 veces) y RECK (-1.78 veces) (Figura 30). Por otro lado MMP-2 se mantiene sin cambios significativos.

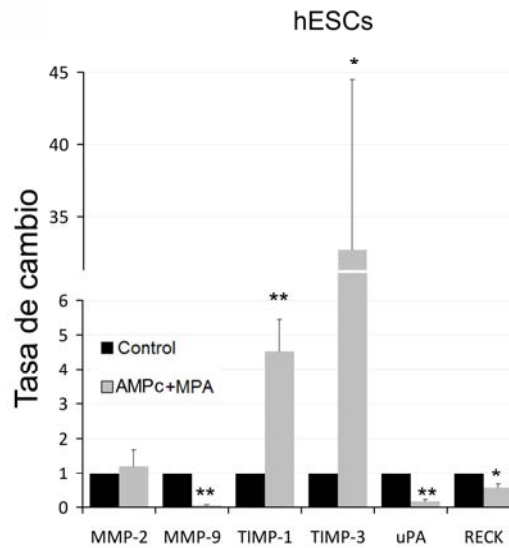


Figura 30. Efecto de la decidualización in vitro de las hESC sobre el balance transcripcional del sistema de las metaloproteasas. En la gráfica se representa la tasa de cambio de los genes del sistema de la metaloproteasas en las hESC tratadas con AMPc y MPA durante 5 días vs hESC control. Los datos corresponden a la media \pm SEM entre tres experimentos independientes. La significancia del análisis estadístico está indicado de la siguiente manera * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Diversos estudios han demostrado la inducción génica y el aumento en los niveles proteicos de TIMP-1 y de TIMP-3 durante el proceso de decidualización (Dimitriadis y cols., 2005a, Irwin y cols., 2001). El aumento de TIMP-3 durante la decidualización es tan relevante que incluso a día de hoy es considerado un marcador de este proceso.

Para establecer un paralelismo con los resultados del análisis proteico de TIMP-1 y de TIMP-3 en los CCMs obtenidos en las hESC tratadas con TSA, se cuantificaron los niveles de TIMPs secretados por las hESC control vs hESC tratadas con AMPc y MPA (Figura 31).

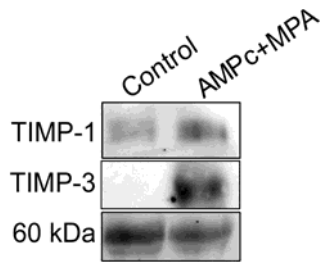


Figura 31. Análisis proteico de TIMP-1 y de TIMP-3 en los CCMs obtenidos en las hESC control vs deciduadas. Western-blot de los niveles proteicos de TIMP-1 y de TIMP-3 presentes en los CCMs de las hESC control vs CCMs de las hESC tratadas con AMPc+MPA.

El análisis mediante western-blot revela como el CCM derivado de las hESC tratadas con AMPc y MPA presenta un aumento en los niveles proteicos de TIMP-1 y TIMP-3 en comparación con el CCM de las hESC control.

Por último quisimos esclarecer si durante el proceso de deciduación *in vitro* la regulación transcripcional de TIMP-1 y TIMP-3 se debe a un cambio en la acetilación de las histonas asociadas a sus promotores génicos.

Para ello se realizó una ChIP de las hESC expuestas a AMPc y MPA durante 24 horas. Los resultados obtenidos nos indican que las hESC deciduadas *in vitro* muestran un aumento en los niveles de la histona H4 acetilada a nivel del promotor génico de TIMP-1, así como un aumento en las histonas H4 y H3 acetiladas asociados al promotor de TIMP-3 (Figura 32).

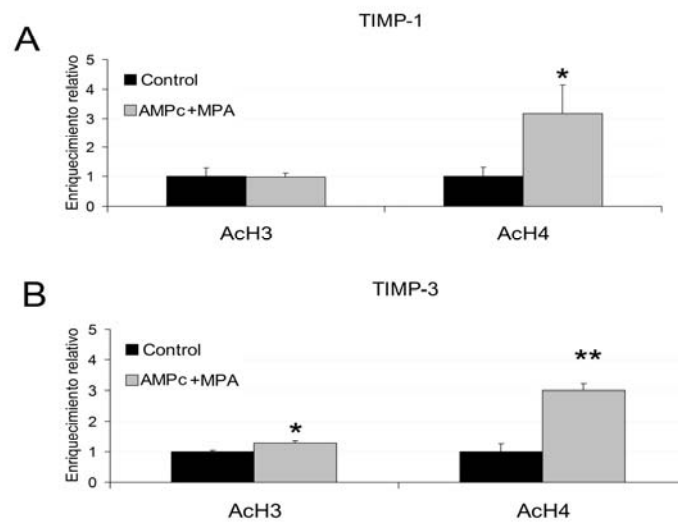


Figura 32. Análisis de los niveles de acetilación de las histonas H3 y H4 a nivel de los promotores génicos de TIMP-1 y de TIMP-3 durante el proceso de decidualización *in vitro*. En la gráfica se representa la expresión relativa de TIMP-1 (A) y TIMP-3 (B) inmunoprecipitado con anticuerpos contra H3 y H4 acetiladas en las hESC control vs hESC AMPc + MPA. Los valores de expresión fueron normalizados con el Input. El experimento fue realizado por triplicado en tres muestras independientes y los valores muestran la media \pm SEM. La significancia estadística queda indicada como * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Estos resultados nos indican que la decidualización *in vitro* de las hESC induce un aumento de la expresión de TIMP-1 y TIMP-3 que posiblemente pueda estar mediado por un aumento en la acetilación de las histonas H3 y H4 asociadas a sus promotores génicos.

Acabamos de demostrar como tanto el tratamiento con TSA o con AMPc y MPA inducen en las hESC un patrón de expresión génica similar en el sistema de las metaloproteasas que posiblemente está mediado por el mecanismo de acetilación de las histonas. Quisimos comprobar si ambos mecanismos producen un efecto sinérgico en el control transcripcional de estas moléculas. El análisis

mediante qRT-PCR determina que no existen diferencias significativas entre los niveles transcripcionales de MMP-2, MMP-9, uPA, TIMP-1, TIMP-3 o RECK entre hESC decidualizadas y hESC tratadas con el estímulo decidual más TSA. Por lo que los datos nos indican que no existe un efecto sinérgico en los cambios transcripcionales al añadir TSA a células expuestas al estímulo de decidualización *in vitro* (Figura 33).

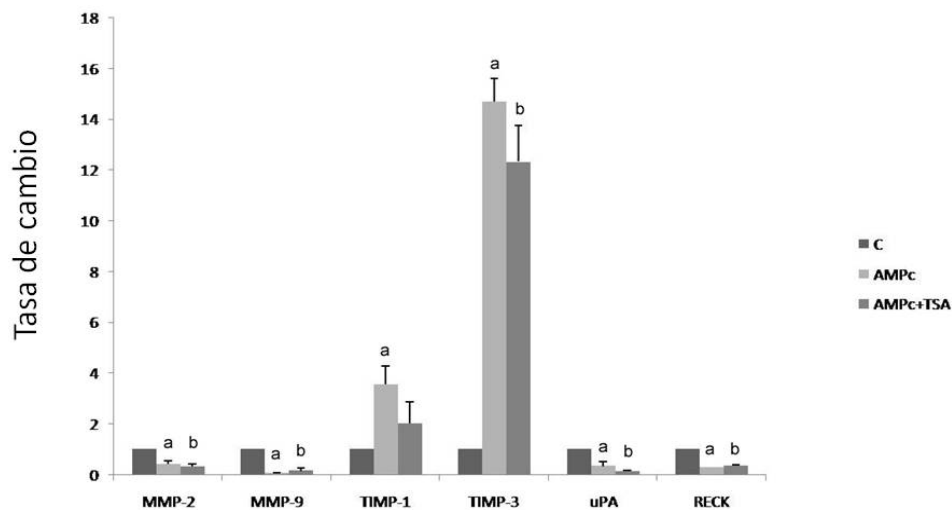


Figura 33. Análisis del efecto del TSA durante el proceso de decidualización *in vitro* en el balance transcripcional del sistema de las metaloproteasas. En la gráfica se representan los datos de expresión relativa obtenidos en el análisis de la qRT-PCR en las hESC control, hESC tratadas con AMPc y MPA y hESC con el estímulo de decidualización junto con TSA. Los datos corresponden a la media±SEM entre tres experimentos independientes. La significancia estadística queda indicada de la siguiente manera, entre las hESC control vs hESC con AMPc+MPA a= $p < 0.05$ o $p < 0.01$ y en las hESC control vs hESC TSA mas el estímulo decidual, b= $p < 0.05$ o $p < 0.01$.

2.. Estudio de la expresión y función de los miRNAs durante el proceso de decidualización *in vitro*

2.1 Análisis del perfil de expresión de los miRNAs en las hESC decidualizadas *in vitro*

Trabajos recientes han establecido el papel crucial que los miRNAs poseen regulando las distintas funciones reproductivas (Teague y cols., 2010). En cambio no se conoce todavía el papel de la regulación post-transcripcional de los miRNAs en el proceso de decidualización de las hESC.

Existen también múltiples estudios transcriptómicos de las células estromales decidualizadas, que demuestran la regulación de una gran cantidad de genes, que incluyen factores de crecimiento, citoquinas, reguladores del ciclo celular, factores de transcripción y proteínas de la matriz extracelular (Brar y cols., 2001)(Popovici y cols., 2000).. Es lógico pensar que la expresión diferencial de los miRNAs pueda estar regulando la expresión de genes que intervienen en la diferenciación decidual de las hESC.

Por ello el primer objetivo de este estudio fue establecer el perfil transcripcional de los miRNAs en las hESC control vs hESC decidualizadas.

Existe un estudio previo donde se realizó una primera aproximación al estudio del perfil de miRNAs durante el proceso de decidualización, en el que se utiliza la tecnología de los microarrays para la identificación de los miRNAs diferencialmente expresados. Nuestro abordaje experimental propone el estudio de hasta 704 miRNAs, 269 miRNAs más que en el estudio anterior. Otra diferencia importante es el método de decidualización *in vitro* utilizado. En nuestro caso hemos empleado el estímulo hormonal inducido por estrógenos y progesterona, un método más fisiológico que el estímulo del AMPc utilizado en el estudio de Qian y col.

Hasta un total de 20 biopsias endometriales fueron procesadas y las hESC aisladas fueron decidualizadas *in vitro* mediante estímulo hormonal con progesterona (P_4) y 17β -estradiol (E_2) durante 9 días. El fenotipo decidual se evaluó a través de parámetros morfológicos así como por el análisis de los niveles de PRL secretados tal y como hemos mostrado anteriormente. Se seleccionaron 3 biopsias cuyos niveles de PRL secretados fueron similares ($138 \text{ ng/ml} \pm 19.49$ comparado con los $2.38 \text{ ng/ml} \pm 0.9$ en las hESC control)(Figura 34).

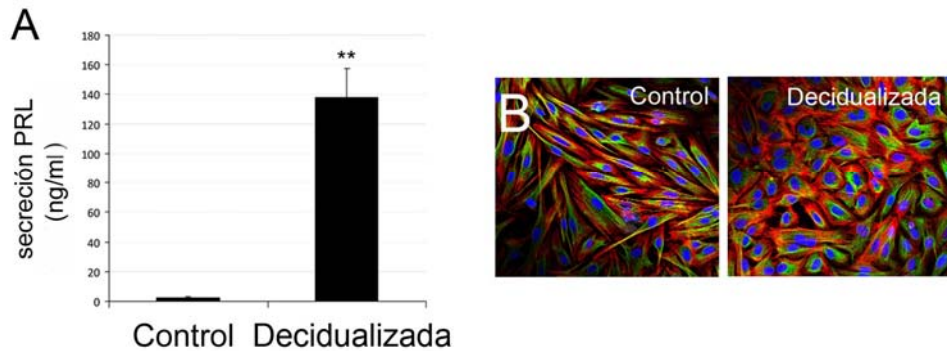


Figura 34. Caracterización del fenotipo de las hESC decidualizadas. Representación gráfica de los niveles de PRL secretados en las hESC control vs hESC tratadas con $E_2 + P_4$ (B) Caracterización morfológica de las hESC mediante inmunofluorescencia marcadas con vimentina (verde) y F-actina (Rojo). Los núcleos se tiñeron con Dapi (azul). Nótese el cambio de morfología de las células después del tratamiento con $E_2 + P_4$.

Para determinar el perfil de expresión de los miRNAs en las hESC control vs hESC $E_2 + P_4$ se realizó un PCR array para los miRNAs. Esta técnica nos permitió evaluar la expresión de hasta 704 miRNAs diferentes. De todo el conjunto de miRNAs analizados seleccionamos los 20 miRNAs más expresados tanto en las hESC control como en las hESC decidualizadas, 10 de los cuales coinciden con los miRNAs más expresados identificados en el estudio de Qian y col (Tabla 4).

hESCs Control	Total Exp.	hESCs Decidual	Total Exp.
miR-21	111.4	miR-21	83.5
miR-940	33.3	miR-940	44.9
miR-125b	7.3	miR-125b	8.3
miR-199a-3p	6.5	miR-199a-3p	7.4
miR-23a	6.1	miR-1234	7
miR-424	5.7	miR-424	5.7
miR-27a	4	miR-23a	4.5
miR-24	4	miR-24	4.4
miR-1234	3.4	miR-720	3.6
miR-26a	3.2	miR-1260	3.5
miR-125a-5p	2.4	miR-1181	3.2
miR-23b	1.7	miR-135a*	3.1
miR-1260	1.7	miR-26a	2.9
let-7a	1.7	miR-125a-5p	2.5
miR-27b	1.6	miR-27a	2.2
miR-1181	1.5	miR-23b	2.2
miR-19b	1.3	let-7a	2.1
miR-720	1.3	miR-27b	1.8
miR-29a	1.2	miR-19b	1.4
miR-19a	1.1	miR-29a	1.2

Tabla 4. miRNAs con mayores niveles de expresión en las hESC control y hESC tratadas con E₂+P4. Los valores de expresión fueron normalizados con el gen control SNOR44. En negro están marcados los miRNAs identificados en el estudio comparativo de Qian y col, 2008.

Posteriormente identificamos aquellos miRNAs diferencialmente expresados durante el proceso de decidualización *in vitro*. Se seleccionaron aquellos miRNAs que presentaban una tasa de cambio de al menos 2 veces (tanto para la sobreexpresión como para la disminución) y con una significancia estadística de $p < 0.05$. El análisis de los datos del PCR array para miRNAs identifica un total de 43 miRNAs diferencialmente expresados, dentro de los cuales 26 miRNAs están aumentados y 17 miRNAs están disminuidos (Tabla 5). Sorprendentemente solo 2 miRNAs (miR-181b y miR-181d) coinciden con el estudio de Qian y col. Las diferencias de los datos obtenidos entre los dos estudios pueden ser debidas al diferente tratamiento utilizado para la inducción de la decidualización, a la herramienta molecular empleada o al número de miRNAs analizados.

miRNA aumentados	valor p	tasa de cambio	miRNA disminuidos	valor p	tasa de cambio
miR-95	0.001	22.7	miR-146a	0.047	-6
miR-888	0.005	4.1	miR-155	0.02	-3.3
miR-936	0.016	3.9	miR-181b	0.005	-3.1
miR-1185	0.016	3.7	miR-181a*	0.021	-3
miR-518f*	0.028	3.6	miR-135b	0.03	-3
miR-548k	0.044	3.3	miR-181d	0.004	-2.9
miR-593	0.001	3.2	miR-200c	0.008	-2.9
miR-486-5p	0.046	3.1	miR-141	0.039	-2.8
miR-29c*	0.014	3	miR-182	0.011	-2.7
miR-449b*	0.043	2.9	miR-429	0.019	-2.7
miR-300	0.003	2.8	miR-483-3p	0.049	-2.5
miR-371-5p	0.007	2.8	miR-200a	0.012	-2.5
miR-1224-3p	0.034	2.6	miR-96	0.019	-2.5
miR-891a	0.016	2.5	miR-183	0.012	-2.4
miR-365	0.038	2.5	miR-9	0.028	-2.3
miR-541*	0.044	2.4	miR-30a	0.006	-2.3
miR-409-5p	0.009	2.3	miR-126	0.004	-2.2
miR-33b*	0.01	2.3			
miR-154*	0.034	2.2			
miR-376a*	0.027	2.2			
miR-133a	0.019	2.1			
miR-218-2*	0.043	2.1			
miR-22*	0.041	2.1			
miR-614	0.023	2.1			
miR-369-3p	0.032	2			
miR-185	0.019	2			

Tabla 5. miRNAs diferencialmente expresados durante el proceso de decidualización *in vitro*. La tasa de cambio fue calculada utilizando el método comparativo del $2\Delta\Delta Ct$. Los valores corresponden a la media entre tres muestras independientes. La significancia estadística queda indicada en la tabla. En negro están marcados los miRNAs identificados en el estudio comparativo de Qian y col.

Posteriormente para un mejor entendimiento de la regulación hormonal implicada en la expresión de los miRNAs, las hESC fueron tratadas únicamente con E_2 , P_4 o con E_2+P_4 juntos. Se seleccionaron el miR-95, el miR-135b y el miR-96 por presentar una expresión más diferencial en nuestro tratamiento de decidualización *in vitro* y se analizaron los niveles de expresión de cada uno de ellos y para cada una de las condiciones mediante qRT-PCR.

Los resultados obtenidos muestran como la expresión del miR-95 no cambia significativamente con el tratamiento individual con E_2 y aumenta tras el tratamiento

con P_4 o con $E_2 + P_4$. Estos datos nos indican que P_4 es la hormona dominante en la regulación de la expresión del miR-95. Por otro lado, tanto el miR-135b como el miR-96 disminuyen con E_2 o con P_4 así como con el estímulo hormonal conjunto (Figura 35).

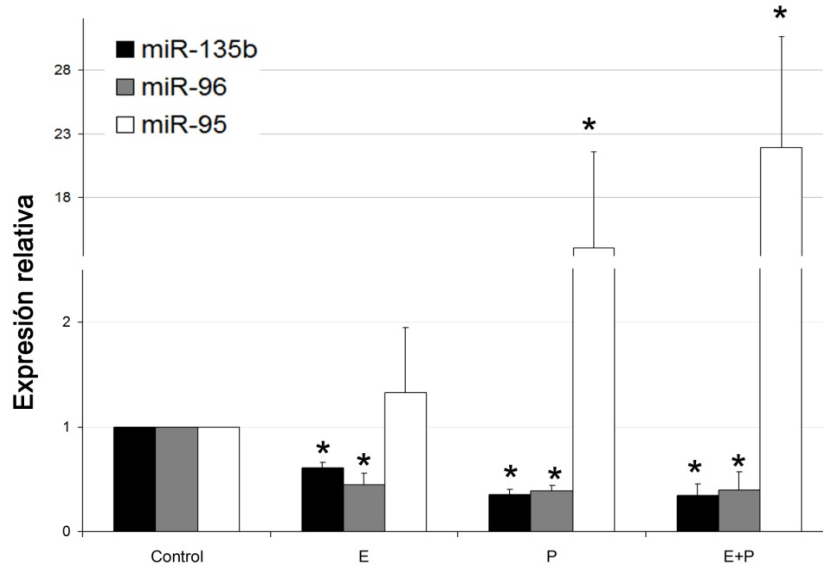


Figura 35. Análisis de expresión de los miRNAs ante los diferentes tratamientos hormonales. (A) Niveles de expresión del miR-95, miR-135b y miR-96 en las hESCs tratadas con 17β -estradiol (E_2), progesterona (P_4) o ambos ($E+P$) durante 9 días. Los valores de expresión fueron normalizados con el gen control SNORD44. Los valores representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes. El análisis estadístico queda indicado de la siguiente manera * $p < 0.05$.

2.2. Análisis de los potenciales genes diana de los miRNAs diferencialmente expresados durante la decidualización

Para poder determinar la contribución de los miRNAs diferencialmente expresados en el proceso de decidualización, es necesario identificar sus genes

diana potenciales. Para ello se realizó un análisis bioinformático de los miRNAs diferencialmente expresados durante la decidualización de las hESC. La herramienta seleccionada para este fin fue la utilización de bases de datos, que basados en algoritmos de predicción, determinan las posibles dianas moleculares de cada miRNA. Los algoritmos de predicción de estos programas se basan en la complementareidad de secuencias entre la región de reconocimiento o “semilla” de los miRNAs y la región 3'-UTR de los ARNm. Los programas bioinformáticos utilizadas fueron Targetscan, miRanda, microCosm y PicTar. De todas las posibles dianas que se identificaron para cada miRNA, solo se seleccionaron aquellas que coinciden en al menos dos de los programas de predicción. Encontramos múltiples dianas moleculares que incluyen factores de crecimiento, citoquinas, factores de transcripción así como enzimas implicadas en la remodelación de la matriz extracelular (Tabla 6).

Especialmente destacable es la identificación de dianas moleculares que constituyen importantes moléculas asociadas con el proceso de decidualización, como son factores de transcripción (FOXO1, C/EBP β , SP1, HOXA10 o STAT5), interleuquinas (IL-1A, IL-1B, IL-5) y factores de crecimiento y sus receptores (VEGFA, HB-EGF, EGFR, TGFB-1).

	Diana	miRNAs aumentados	miRNAs disminuidos
Factores de transcripción	FOXO1	miR-486-5p; miR-369-3p	miR-183; miR-135b; miR-96
	Hoxa10		miR-135b; miR-182; miR-96
	Sp1	miR-369-3p; miR-154*; miR-593; miR-936	miR-135b; miR-155
	Sp3	miR-548k; miR-154*; miR-133a; miR-369-3p	miR-141; miR-135b; miR-182; miR-96; miR-30a; miR-155
	STAT3		
	STAT5A		miR-141; miR-200a; miR-200c
	STAT5B		miR-141; miR-200a
	ETS1	miR-1224-3p; miR-95	miR-181b; miR-155; miR-9; miR-429; miR-181d; miR-200c
	CREB1		miR-96; miR-181b; miR-182; miR-181d
	CREB3		miR-181d; miR-181b
	CREB5	miR-365; miR-133a	miR-429; miR-200c
	CREBM	miR-936; miR-218-2*	miR-30a
	CEBPB	miR-369-3p	miR-155
Factores de crecimiento	IGF-1	hsa-miR-936	miR-483-3p
	IGF-1R		miR-182; miR-96
	IGF-2		miR-181d
	IGF-2R	miR-185	miR-30a; miR-200c
	VEGFA		miR-126; miR-429; miR-200c
	HB-EGF		miR-96; miR-183; miR-135b; miR-182
	EGF-R	miR-133a	miR-141; miR-200a
	TGFB-1	miR-593; miR-548k	miR-9; miR-181d; miR-429; miR-181b; miR-200c
	TGFB-R1	miR-548k; miR-369-3p; miR-133a	miR-181d; miR-181b
	TGFB-2		miR-141; miR-200a
	TGFB-2R		miR-155; miR-9
	LEFTY2		miR-181d; miR-181b
	INHBA		miR-135b
	LIF		miR-181b; miR-181d
	Interleuquinas	IL-1A	
IL-1B		miR-888	
IL-2		miR-154*	miR-181b; miR-181d
IL-3			miR-146a
IL-5			miR-429; miR-200c
IL-6		miR-365; miR-371-5p; miR-369-3p	
IL-7		miR-376a*	miR-181d
IL-8			miR-182
IL-10		miR-888	
IL-11		miR-154*	
IL-12A			miR-9
IL-12B			miR-183
IL-13		miR-300	miR-155
Proteínas de remodelación de la MEC	LAMC1	miR-95; miR-548k	miR-96; miR-182; miR-429; miR-200c; miR-181d; miR-181b
	TIMP-2	miR-891a; miR-369-3p	miR-429; miR-200c; miR-30a
	TIMP-3		miR-181b; miR-181d; miR-30a
	TIMP-4		miR-146a; miR-96
	FN1		miR-200c; miR-429; miR-96; miR-182

Tabla 6. Potenciales dianas moleculares de los miRNAs diferencialmente expresados durante el proceso de decidualización in vitro. En la tabla se muestra la clasificación de los diferentes grupos de moléculas reguladas, las potenciales dianas génicas identificadas y los miRNAs que las regulan.

Para profundizar más en la posible contribución de los miRNAs en el proceso de decidualización, se realizó una búsqueda de las potenciales vías moleculares reguladas por los miRNAs diferencialmente expresados durante el modelo de decidualización *in vitro* utilizado. Para ello utilizamos el programa informático Diana miR-Path database. Este programa informático permite interpretar los datos en términos de sus implicaciones biológicas, más que como una mera comparación de listas de miRNAs y genes dianas.

Las 5 vías principales más representadas por las potenciales dianas de los miRNAs disminuidos durante el proceso de decidualización, incluyen la vía de la orientación axonal, proceso relacionado con la polaridad celular, las uniones adherentes, reguladores del citoesqueleto de actina, la señalización de ErbB (EGFR) y el carcinoma de células renales que se asocia a procesos de angiogénesis y proliferación (Tabla 7). Por otro lado, las principales dianas del grupo de los miRNAs sobreexpresados participan principalmente en vías que incluyen reguladores del citoesqueleto de actina, la señalización de Wnt, las uniones adherentes y la vía de la MAPK (Tabla 7).

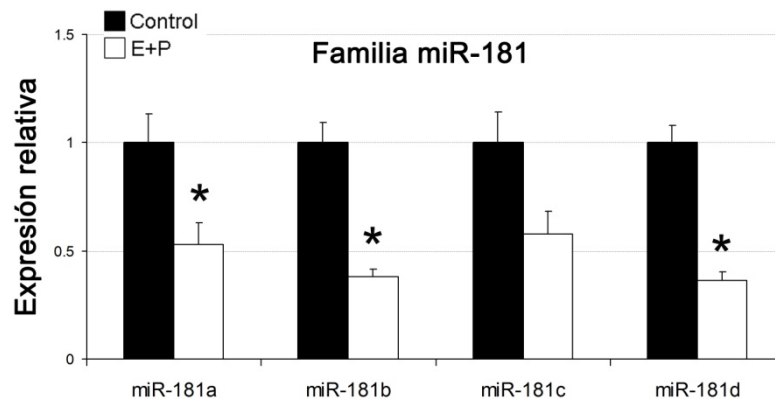
Vías representadas	
miRNA disminuidos	Orientación axonal Uniones adherentes Regulación del citoesqueleto de actina Señalización de ErbB (EGFR) Carcinoma de células de renales
miRNA aumentados	Regulación del citoesqueleto de actina Señalización de Wnt Uniones adherentes Vía de la MAPK.

Tabla 7. Vías más representadas por los miRNAs diferencialmente expresados durante el proceso de decidualización *in vitro*. En la tabla quedan indicados el proceso representado y el conjunto de miRNA responsable de su regulación.

2.3 Análisis de las familias de miRNAs representadas durante la decidualización

Una familia de miRNAs está compuesta por aquellos miRNAs que poseen una misma o muy semejante secuencia de reconocimiento o región “semilla”, a través de la cual establece la unión con el extremo 3' UTR del ARNm provocando su silenciamiento. Es por ello que varios miRNAs pueden actuar conjuntamente provocando la represión de los mismos genes diana. Además algunos de sus miembros suelen localizarse en los mismos loci, de manera que van a regularse de manera coordinada provocando una regulación de la expresión génica de forma interconectada. Sorprendentemente hemos identificado 3 familias de miRNAs: la familia del miR-181, la familia del miR-183 y la familia del miR-200 cuyos miembros disminuyen sus niveles durante el proceso de decidualización *in vitro*. El hecho de que todos los miembros de una misma familia de miRNAs se comporten de la misma manera durante el estímulo decidual nos indica que los miRNAs podrían ejercer su acción reguladora de una manera sincronizada y cooperativa durante la decidualización de las ESC.

La familia del miR-181 incluye 6 miRNAs precursores: el miR-181a-1, el miR-181a-2, el miR-181b-1, el miR-181b-2, el miR-181c y el miR-181d que se localizan en 3 loci diferentes (en el cromosoma 1, 9 y 19) y cuyos miembros disminuyen su expresión durante el proceso de decidualización *in vitro* (Figura 35). Estos miRNAs comparten la misma región “semilla”, sugiriendo que regulan las mismas dianas moleculares. A través de la información disponible en la base de datos de Diana miR-Path identificamos las principales vías reguladas por esta familia. Las dos vías más representadas por la familia del miR- 181 son: la vía de señalización del TGF β y la vía de señalización del receptor de células T (Figura 35).



Via de señalización del receptor de células T
 CD4, NCK2, FOS, NFATC2, IFNG, MAP3K8, TNF, KRAS, CARD11, SOS1, IL10, PAK4, IL2, CBLB, NFAT5, PAK7, PIK3R3, AKT3

Via de señalización de TGF-beta
 E2F5, IFNG, TGFBR1, ID4, TNF, SMAD7, SMAD2, ACVR2A, MAPK1, PPP2R2C, CREBBP, BMP2, ACVR2B, TFD1, BMP2, DCN, RPS6KB1

Figura 35. Análisis de expresión de los miembros de la familia del miR-181 durante el proceso de decidualización in vitro. En el gráfico se representa la expresión relativa de cada uno de los miembros de la familia del miR-181, en las hESCs control vs hESCs E+P durante 9 días. Los datos corresponden a la media±SEM entre tres experimentos independientes. La significancia estadística queda indicada como * $p < 0.05$. Los principales procesos así como sus dianas moleculares implicadas quedan indicados (abajo)

Otra de las familias de miRNAs que se expresa diferencialmente en el proceso de decidualización es la familia del miR-200. Se localiza en dos loci diferentes situados en el cromosoma 1 y 12. Incluye el miR-141, el miR-429, el miR-200a, el miR-200b y el miR-200c. Los niveles de expresión de estos miRNAs disminuyen en las hESCs decidualizadas (Figura 36). Estos miRNAs comparten la misma región “semilla” excepto en el caso del miR-141 y el miR-200a que cambia un nucleótido en la posición 4. El número de dianas que comparten los miembros de la familia del miR200 es pequeño y principalmente van a estar asociadas al ciclo celular por lo que estos miRNAs podrían ser interpretados como miRNAs antiproliferativos.

También se analizaron aquellas vías más representadas por el conjunto de las dianas moleculares de los 4 miembros de la familia del miR-200. En este caso las vías más representadas son el carcinoma de células renales y la señalización de ErbB (Figura 36).

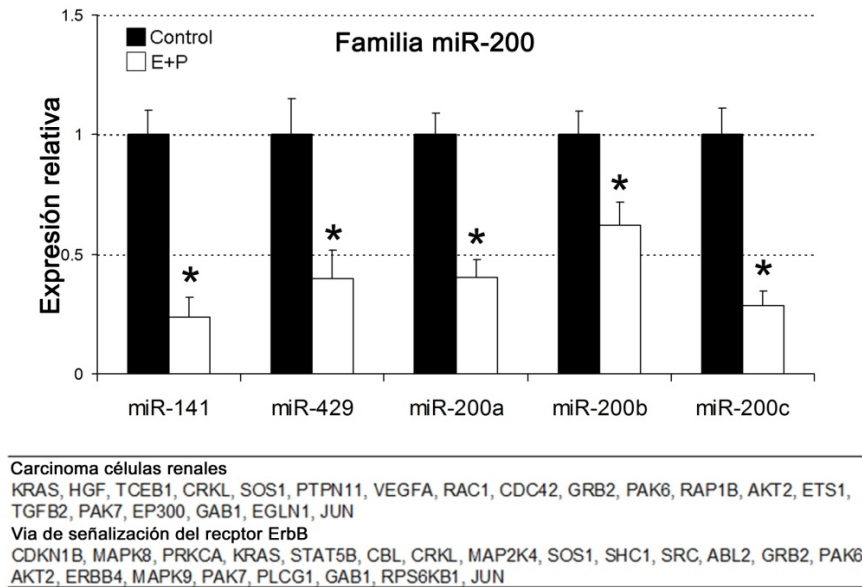


Figura 36. Análisis de expresión de los miembros de la familia del miR-200 durante el proceso de decidualización in vitro. En el gráfico se representa la expresión relativa de cada uno de los miembros de la familia del miR-200 en las hESCs control vs hESCs E₂+P₄ durante 9 días. Los datos corresponden a la media±SEM entre tres experimentos independientes. La significancia estadística queda indicada como * p<0.05. Los principales procesos así como sus dianas moleculares implicadas quedan indicados (abajo)

Otros miRNAs destacables son el miR-96, el miR-183 y el miR-182, todos ellos se sitúan en el mismo loci (cromosoma 7) y su expresión disminuye en las hESC decidualizadas (Figura 37). Mientras que miR-182 y miR-96 comparten la misma región de reconocimiento, miR-183 solo se diferencia en un nucleótido situado en la

posición 2. Las vías más representadas por sus potenciales dianas moleculares son la orientación axonal y la regulación del citoesqueleto (Figura 37).

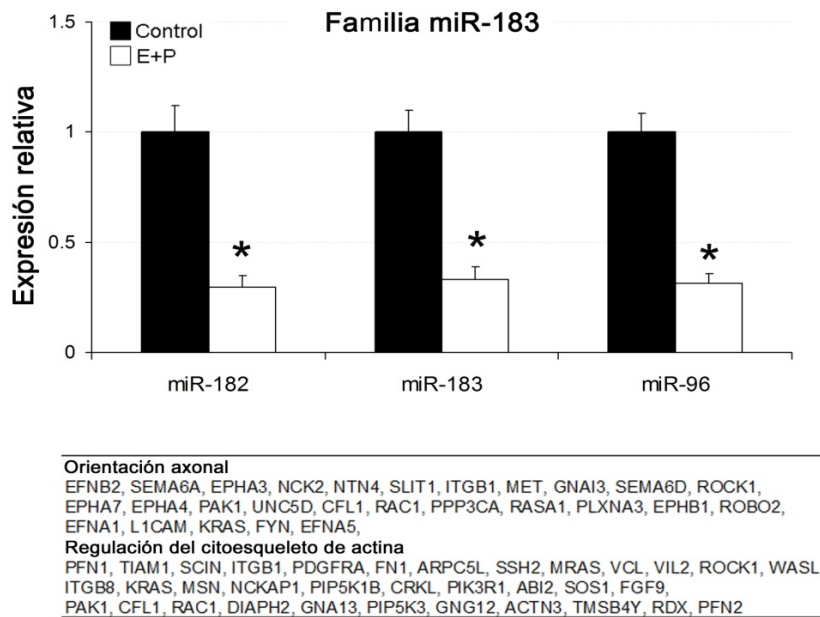


Figura 37. Análisis de expresión de los miembros de la familia del miR-183 durante el proceso de decidualización in vitro. En el gráfico se representa la expresión relativa de cada uno de los miembros de la familia del miR-181, en las hESCs control vs hESCs E₂+P₄ durante 9 días. Los datos corresponden a la media±SEM entre tres experimentos independientes. La significancia estadística queda indicada como * p<0.05. Los principales procesos así como sus dianas moleculares implicadas quedan indicadas (abajo).

2.4 Caracterización funcional del miR96 y el miR135b

Por último para reforzar la idea de la importancia del papel de los miRNAs en la regulación de la expresión de genes necesarios para la diferenciación de las hESC se realizó un análisis funcional de miRNAs mediante experimentos de transfección celular. Para ello modificamos los niveles de 2 miRNAs, el miR96 y el

miR135b, que se expresan diferencialmente durante el proceso de decidualización de las hESC mediante adición ectópica de secuencias mimetizadoras.

Las hESC fueron transfectadas con el ARNi control, con el miRNA mimetizador del miR96 y con el miRNA mimetizador del miR135b y puesto que ambos disminuyen sus niveles durante la diferenciación de las hESC, también se realizó una transfección conjunta. Transcurridas 24 horas desde el inicio de la transfección las hESC fueron tratadas con AMPc y MPA o vehículo control durante 48 y 72 horas.

La eficacia de la transfección se evaluó mediante qRT-PCR obteniendo un aumento en los niveles de expresión del miRNA 96 y el miRNA 135b superior a 100 veces en las hESC transfectadas con los miRNA mimetizadores específicos en comparación con las células control (Figura 38).

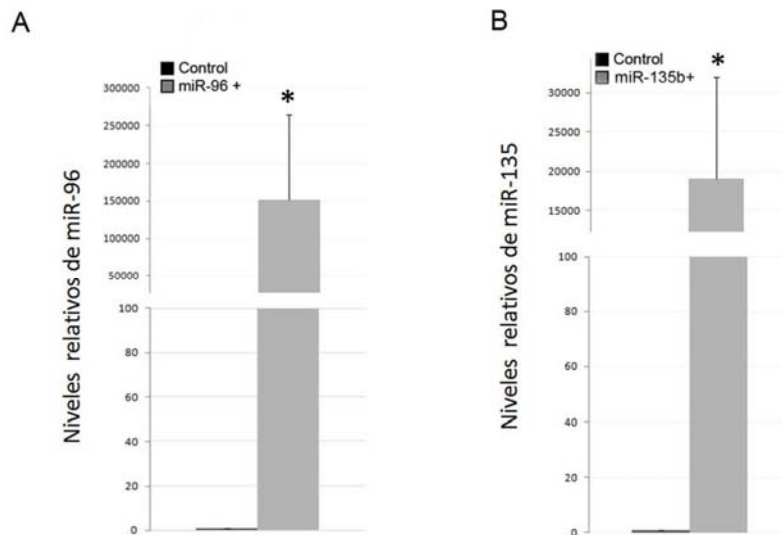


Figura 38. Análisis del efecto de la sobreexpresión del miR-96 y miR135b después de la transfección con los miRNA mimetizadores. Niveles relativos de expresión miR96 (A) y miR135b (B) a las 72h después de la transfección con sus respectivos mimetizadores. Los valores de expresión fueron normalizados con el gen control SNORD44. Los valores

representan la media±SEM de tres experimentos independientes. El análisis estadístico queda indicado de la siguiente manera * $p < 0.05$.

También se evaluó el efecto de los miRNAs sobre la expresión de sus potenciales dianas. Estudios previos ya han validado a FOXO1 y HOXA10 como dianas génicas del miR96 y del miR135b respectivamente (Myatt y cols., 2011; Petracco y cols., 2011). El análisis de qRT-PCR nos determina que los niveles de FOXO1 y de HOXA10 disminuyen en las hESC transfectadas con el mimetizador del miR96 y el mimetizador de miR135b respectivamente en comparación con las células control (Figura 39).

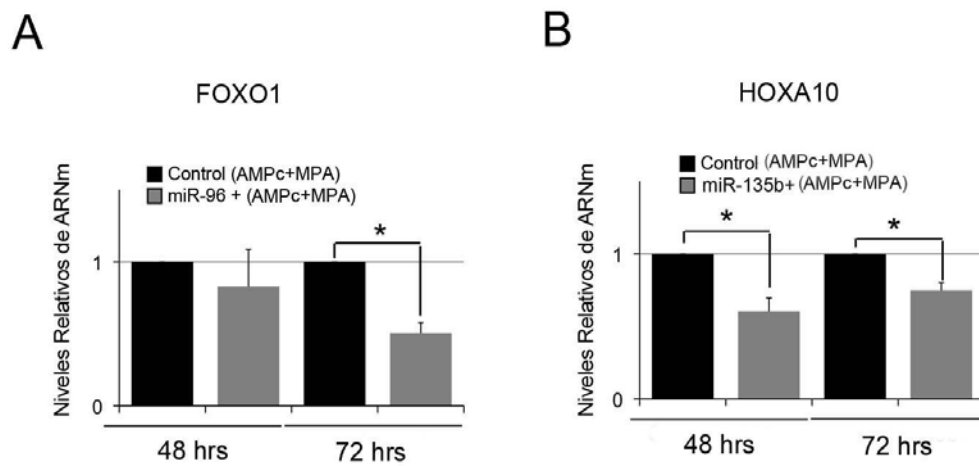


Figura 39. Análisis del efecto del miR96 y miR135b sobre la expresión de FOXO1 y HOXA10 respectivamente. En la gráfica se representan los datos de expresión relativa de FOXO1(A) y HOXA10 (B) obtenidos en el análisis de la qRT-PCR en las hESC control y hESC transfectadas con mimetizadores del miRNA 96 y miRNA 135b todas ellas tratadas con AMPc y MPA durante 48 y 72 horas. Los datos corresponden a la media±SEM entre tres experimentos independientes. La significancia estadística queda indicada como * $p < 0.05$.

Por último evaluamos el efecto del miR96 y el miR135b sobre la regulación de los niveles de IGFBP-1, un marcador principal del proceso de decidualización y

cuyos niveles aumentan por acción de los factores de transcripción FOXO1 y HOXA10 (Kim y cols., 2005).

Los resultados muestran como un aumento en los niveles de miR96, miR135b o de ambos provocan una disminución en los niveles secretados de IGFBP-1 (Figura 40). Los valores absolutos de concentración de IGFBP-1 obtenidos fueron muy variables entre cada una de las biopsias y esta diferencia interindividual provocó que el análisis estadístico fue no significativo. En cambio la tasa de disminución de los niveles de IGFBP-1 en las hESC transfectadas con miRNA mimetizadores del miR96 Y el miR135b fue mayor que cinco en comparación con las células control en todas las muestras endometriales analizadas.

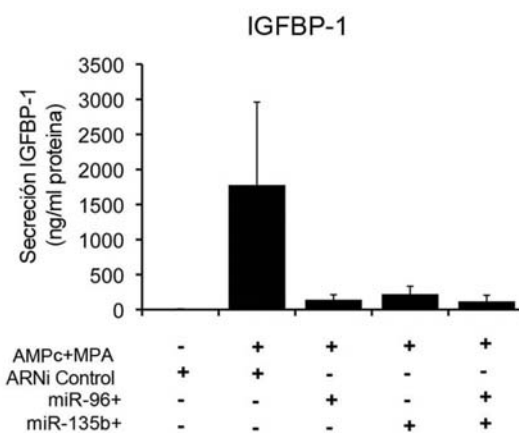


Figura 40. Análisis del efecto del miR96 y miR135b sobre los niveles de IGFBP-1.

En la gráfica se representan los niveles secretados de IGFBP-1 en las hESC control y en las hESC transfectadas con mimetizadores del miRNA 96, del miRNA 135b y de ambos tratadas con AMPc y MPA durante 48 horas. Los valores de IGFBP-1 secretados fueron normalizados con la concentración de proteína total presente en su correspondiente medio. Los datos corresponden a la media±SEM entre tres experimentos independientes.

Por lo tanto nuestros datos sugieren que el miR96 y el miR135b tienen un importante papel en la regulación de importantes factores de transcripción

implicados en la diferenciación de la ESC como son FOXO1 y HOXA10 provocando un efecto sobre la expresión de marcadores del proceso como IGFBP-1.

3. Caracterización funcional de Dicer durante la decidualización *in vitro* de las hESC

3.1. Expresión de Dicer durante la decidualización

Dicer-1 es una ribonucleasa con un papel esencial en la ruta de biosíntesis de los miRNAs (Hammond, 2005). Las alteraciones en su función provocan deficiencias en el desarrollo del aparato reproductor femenino (Luense y cols., 2009) y han sido asociadas como una posible causa de la desregulación de los perfiles de miRNAs observada en varias patologías como por ejemplo en cáncer (Kumar y cols., 2007).

Puesto que hemos encontrado que existe un perfil de expresión de miRNAs específico del proceso de decidualización *in vitro*, el objetivo de este estudio fue evaluar el papel de la proteína Dicer en el proceso de diferenciación de las células endometriales estromales.

3.1.1 Análisis de los niveles de Dicer durante el proceso de decidualización *in vivo*

Para el análisis de la expresión de Dicer durante el proceso de decidualización *in vivo* se realizó una inmunohistoquímica de cortes de endometrio obtenidos en fase secretora temprana y fase secretora tardía. Estas fases del ciclo menstrual corresponden respectivamente al momento en que se va a iniciar la diferenciación y la fase en que el proceso de decidualización está ya inducido.

El estudio mediante inmunohistoquímica nos permite determinar el patrón proteico espacio-temporal de Dicer durante el proceso de decidualización *in vivo*. Los resultados de la inmunohistoquímica nos revelan una tinción positiva de Dicer en todos los compartimentos celulares (epitelio luminal, epitelio glandular y estroma) del endometrio tanto en fase secretora temprana (ST) como en fase secretora tardía (SA). Además la intensidad de la tinción de Dicer tiende a ser mayor en la fase SA en todos los compartimentos endometriales (Figura 41). Para obtener una evaluación más cuantitativa de los niveles de Dicer, se determinó el nivel de intensidad del marcaje de Dicer por varios miembros del laboratorio, puntuándose con los valores de 0, 1, 2, 3 dependiendo de la mayor (3) o menor intensidad (0).

Los resultados obtenidos revelan que se observa un discreto aumento en los niveles de Dicer en la fase secretora tardía en todos los compartimentos endometriales (Figura 41).

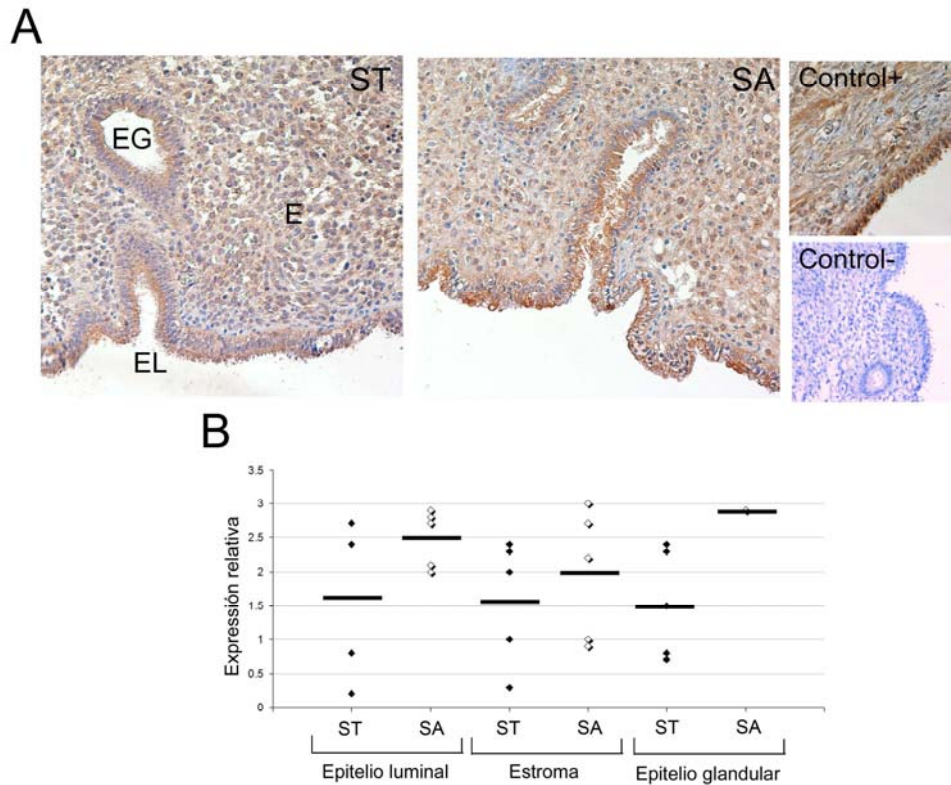


Figura 41. Inmunohistoquímica de Dicer en muestras en el endometrio durante el proceso de decidualización. La inmunohistoquímica se realizó en cortes de tejido obtenidos en fase secretora temprana (ST) (A) y fase secretora tardía (SA) (B). (C) El control negativo fue incubado con un anticuerpo inespecífico de isotipo. (D) Inmunotinción de corte de ovario usado como control positivo del anticuerpo de Dicer. (E) En el gráfico se representan los valores de intensidad del marcaje de Dicer en los distintos compartimentos endometriales durante ambas fases del ciclo. Cada punto corresponde a la media de la intensidad del marcaje de Dicer determinada por varios investigadores para una muestra. En total 5 muestras endometriales se analizaron por fase. EG, epitelio glandular; EL, epitelio luminal, células estromales; E.

3.1.2 Análisis de los niveles de Dicer durante el proceso de decidualización *in vitro*

También se analizaron los niveles de expresión génica y de proteína en las hESC control vs hESC decidualizadas *in vitro*. El proceso de decidualización se indujo utilizando dos métodos diferentes: la inducción hormonal por E₂+P₄ durante 9 días y el tratamiento con AMPc y MPA durante 5 días. El fenotipo decidual se comprobó mediante el análisis morfológico y la cuantificación de los niveles de PRL secretados, tal y como hemos mostrado anteriormente.

El análisis mediante qRT-PCR nos indica que existe un aumento significativo en los niveles de expresión de Dicer durante el proceso de decidualización *in vitro* (figura 42).

Los niveles de proteína de Dicer en las hESC fueron analizados mediante western-blot. El análisis densitométrico de las bandas nos determina que Dicer aumenta tras el estímulo decidual con AMPc+MPA pero este aumento no es significativo cuando las hESC son tratadas con E₂+P₄ (Figura 42).

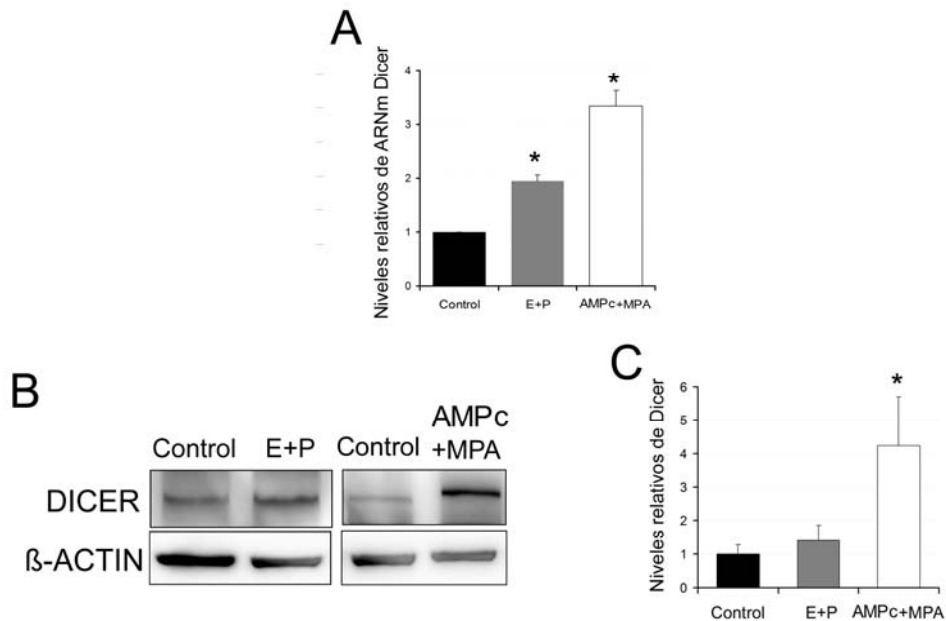


Figura 42. Análisis de los niveles de Dicer durante el proceso de deciduación *in vitro* (A) En el gráfico se representan los datos del análisis mediante qRT-PCR de la expresión génica de Dicer en las hESC deciduadas con E+P (9 días) y AMPc + MPA (5 días) vs control. Los valores fueron normalizados con los niveles de la GAPDH (B) Imagen de western blot de Dicer en las hESC control vs deciduadas. (C) En el gráfico se representa el análisis densitométrico de Dicer. Los valores se normalizaron con los niveles de β -actina. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes. La significancia estadística queda indicada como * $p < 0.05$.

Los resultados indican que tanto los niveles transcripcionales como proteicos de Dicer aumentan durante el proceso de deciduación *in vivo* e *in vitro*, al menos tras el tratamiento con AMPc y MPA.

3.2. Efecto del silenciamiento de Dicer sobre el proceso de deciduación *in vitro*

Para determinar la importancia funcional que los miRNAs puedan ejercer regulando el proceso de la deciduación de las hESC, la estrategia seleccionada fue inhibir la función de la proteína Dicer utilizando un ARN de interferencia (ARNi) específico que debe provocar su silenciamiento a nivel del ARNm. En el diseño experimental utilizado, tal y como se muestra en el apartado de material y métodos, las hESCs se transfectaron con el ARNi de Dicer y a las 24 horas, se indujo el proceso de deciduación *in vitro* con AMPc y MPA durante las 48 y 72 horas sucesivas.

Mediante western blot se determinó la eficacia del ARNi de Dicer analizando los niveles proteicos a las 48 y 72 horas sucesivas a la inducción del proceso deciduación *in vitro* (Figura 43). Como control negativo de la transfección se utilizó un ARNi control que no afecta a la expresión de Dicer

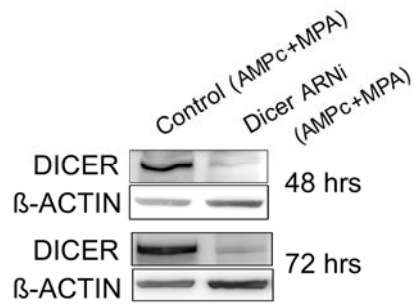


Figura 43. Silenciamiento de Dicer después de la transfección con el ARNi en las hESCs deciduadas. Imagen del western blot de Dicer a las 48h y 72h de la inducción de la deciduación (72h y 96h después de la transfección de las hESC con ARNi de

Dicer vs ARNi control).

Los resultados muestran que el silenciamiento de Dicer se mantiene a las 72 y 96 horas después de la transfección.

3.2.1. Efecto del silenciamiento de Dicer sobre los niveles de marcadores moleculares característicos del proceso de deciduación

Como se ha detallado anteriormente, el proceso de deciduación está caracterizado por una transformación bioquímica y morfológica de las células estromales. Unos de los procesos más evidentes de la diferenciación de las ESC es el aumento en los niveles secretados de PRL, IGFBP-1 y TIMP-3 (Higuchi y cols., 1995, Salamonsen y cols., 2003). Otra proteína recientemente caracterizada como marcador del proceso es MPIF-1, cuyos niveles extracelulares aumentan durante el proceso de deciduación *in vitro* (Garrido-Gomez y cols., 2011).

Para caracterizar la implicación funcional de Dicer durante el proceso de deciduación, analizamos el efecto del silenciamiento de Dicer sobre los niveles proteicos de estos marcadores. Las hESC fueron sometidas a tres condiciones experimentales diferentes: 1) hESC transfectadas con ARNi control sin deciduación, 2) hESC transfectadas con ARNi control tratadas con AMPc y MPA y 3) hESC transfectadas con ARNi de Dicer tratadas con AMPc y MPA. Los medios se recogieron a las 48 y 72 horas del inicio del estímulo decidual y los niveles de

IGFBP-1, PRL y MPIF-1 se cuantificaron mediante ELISA y mediante western-blot los niveles de TIMP-3.

Los resultados obtenidos del análisis mediante ELISA de los diferentes CCMs muestran como los niveles de PRL, IGFBP-1 y MPIF-1 aumentan significativamente en las hESC tratadas con AMPc y MPA en comparación con las hESC sin decidualizar, ambas transfectadas con el ARNi control (Figura 44).

Por otro lado los niveles de PRL secretados disminuyen significativamente en las hESC transfectadas con el ARNi de Dicer en comparación con las hESC transfectadas con el ARNi control a las 48 horas del inicio del estímulo decidual, aunque a las 72 horas esta diferencia no es significativa. En cuanto a los niveles de IGFBP-1 a pesar de que existe una tendencia a que los niveles disminuyan cuando Dicer está silenciado, las diferencias no fueron significativas (Figura 44). Al contrario que IGFBP-1 y PRL los niveles de MPIF-1 aumentan en las hESC transfectadas con el ARNi Dicer vs hESC transfectadas con el ARNi control decidualizadas, aunque las diferencias no fueron significativas.

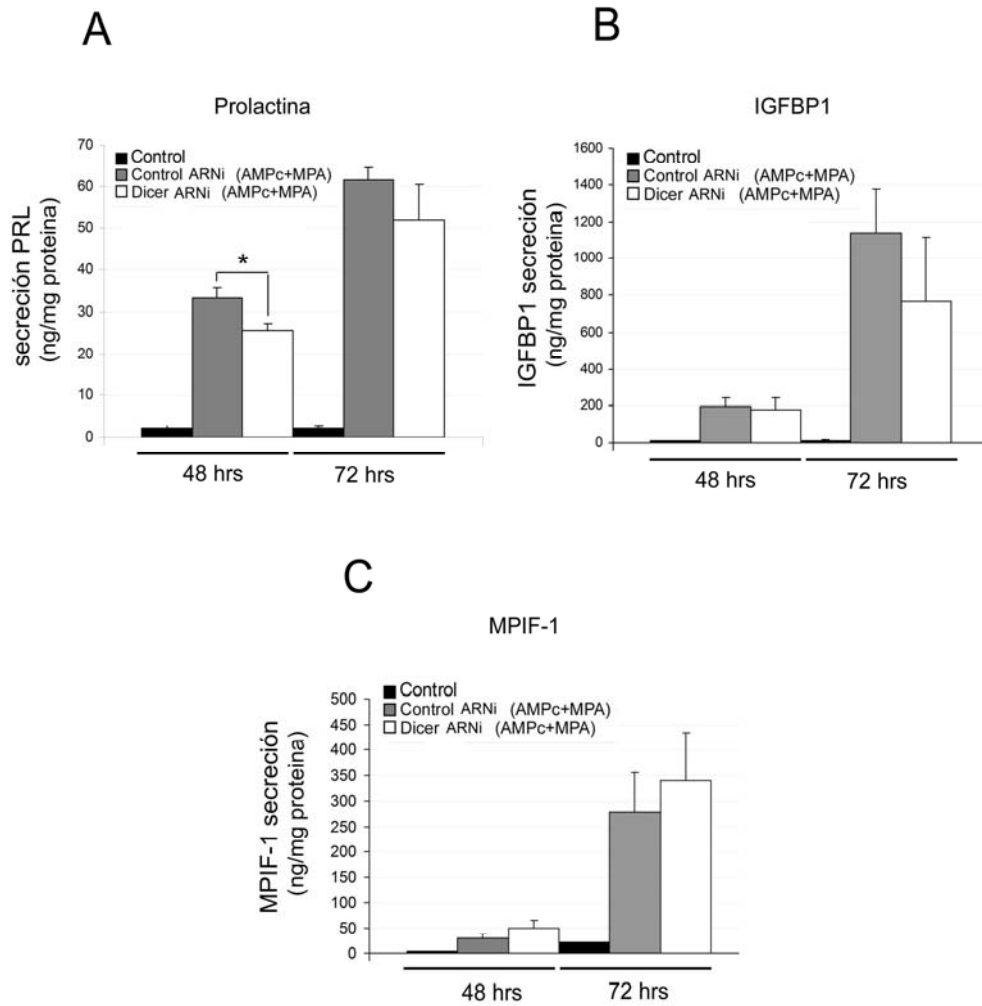


Figura 44. Análisis de la implicación de Dicer sobre los marcadores bioquímicos del proceso de decidualización en las hESC. Gráficos donde se representan los niveles de PRL (A) IGFBP-1 (B) y MPIF-1 (C) secretados por la hESC ARNi control y hESC ARNi de Dicer expuestas al estímulo decidual durante 48 y 72 horas. Los valores fueron normalizados con la concentración de proteína total. Los valores están expresados como la media \pm SEM de tres experimentos independientes. La significancia estadística queda indicada como * $p < 0.05$.

Los niveles del TIMP-3 secretados por las hESC transfectadas con ARNi de Dicer vs ARNi control, ambas tratadas con AMPc y MPA fueron analizados mediante western-blot. El análisis densitométrico de las bandas determinó que el silenciamiento de Dicer en las hESC expuestas al estímulo decidual no cambia significativamente los niveles de TIMP-3 secretados al medio (Figura 45).

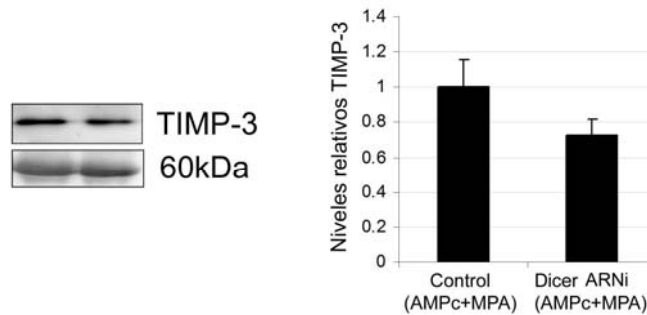


Figura 45. Análisis del papel de Dicer sobre los niveles secretados del TIMP-3. Western-blot de los niveles secretados de TIMP-3 en las hESC ARNi de Dicer vs ARNi control tratadas con AMPc y MPA durante 48 horas, la banda de 60kda corresponde a la tinción de la membrana con ponceau. En el gráfico se representan los datos del análisis densitométrico de TIMP-3 normalizados con los valores de la tinción de ponceau. Los valores corresponden a la media \pm SEM entre tres muestras independientes.

Una de las principales razones que dificultó llegar a una conclusión clara del efecto de Dicer sobre los marcadores del proceso de decidualización, es la gran variabilidad en los resultados obtenidos entre las hESC obtenidas de muestras endometriales humanas. Por ello nos planteamos realizar este mismo experimento en una línea endometrial estromal, obtenida a partir de fibroblastos de endometrio e inmortalizada con telomerasa (THESC). El hecho de trabajar con una línea celular nos eliminará la heterogeneidad existente en las respuestas celulares en las muestras obtenidas de pacientes.

Las THESC se transfectaron con el ARNi de Dicer y el ARNi control y 24 horas después se añadió AMPc y MPA durante 48 horas. Las células fueron analizadas mediante western-blot para evaluar la eficacia del silenciamiento de Dicer. Los resultados muestran una ausencia de proteína Dicer en las THESC transfectadas con el ARNi de Dicer (Figura 46).



Figura 46. Silenciamiento de Dicer en las THESC transfectadas con el ARNi de Dicer. (A) Western-blot de Dicer en las THESC tratadas con ARNi control vs ARNi Dicer a las 72 horas después de la transfección.

El análisis de los niveles de PRL, IGFBP-1 y MPIF-1 fue realizado mediante ELISA. Al igual que en las hESCs, los niveles de PRL e IGFBP-1 aumentan tras el estímulo decidual. Sorprendentemente los niveles de MPIF-1 no aumentan en las THESC decidualizadas (Figura 47). Los valores obtenidos muestran como no existen diferencias significativas en los niveles de marcadores específicos de decidualización tras el silenciamiento de Dicer.

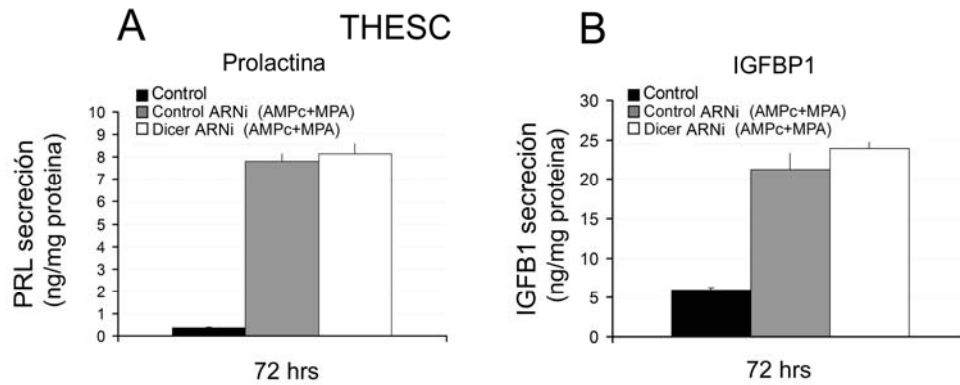


Figura 47. Análisis de la implicación de Dicer sobre los marcadores bioquímicos del proceso de decidualización en las THESC. Gráfico donde se representan los valores de PRL, IGFBP-1, MPIF-1 cuantificados por ELISA y normalizados con la concentración de proteína total. Los valores corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

Analizando el conjunto de datos obtenidos en las hESC y las HESC llegamos a la conclusión de que el silenciamiento de Dicer durante la inducción del proceso de decidualización de las ESC, no afecta significativamente a la secreción de marcadores específicos del proceso decidual tales como IGFBP-1, PRL, MPIF-1 o TIMP-3.

3.2.2. Efecto del silenciamiento de Dicer sobre los niveles de señalizadores relevantes del proceso de diferenciación

El aumento de los niveles intracelulares del AMPc activa diferentes vías de señalización que actuando en una red coordinada van a llevar a cabo este proceso de diferenciación (Gellersen y Brosens 2003). Los mecanismos moleculares activados por el estímulo decidual requieren la participación de multitud de factores de transcripción, que de forma sinérgica convergen en los promotores génicos de los genes encargados de la diferenciación decidual. Hemos visto como no existen

diferencias significativas en la inducción de algunos de estos marcadores como IGFBP-1, PRL o MPIF-1. Por ello analizar los efectos sobre los niveles de los factores de transcripción así como de moléculas implicadas en las rutas de señalización del proceso de decidualización, nos puede aportar más conocimiento sobre los mecanismos precisos que están regulados por Dicer durante el proceso de decidualización.

Para ello analizamos el efecto del silenciamiento de Dicer sobre los niveles de los factores de transcripción implicados en la señalización decidual tales como FOXO1, HOXA10, C/EBP β y SP1 o importantes moléculas implicadas en el proceso como COX2 (Salamonsen y Nie 2002, Scherle y cols., 2000). Con este propósito Dicer se silenció en las hESC durante el estímulo decidual *in vitro* siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito. El análisis mediante western-blot de los extractos proteicos, muestra una disminución significativa en los niveles de HOXA10 en las hESC transfectadas con el ARNi de Dicer en comparación con las hESC ARNi control. Por otro lado no existen diferencias significativas en los niveles de FOXO1, C/EBP β , SP1 y COX2 en las hESC transfectadas con ARNi de Dicer vs hESC ARNi control a las 72h del inicio del estímulo decidual (Figura 48).

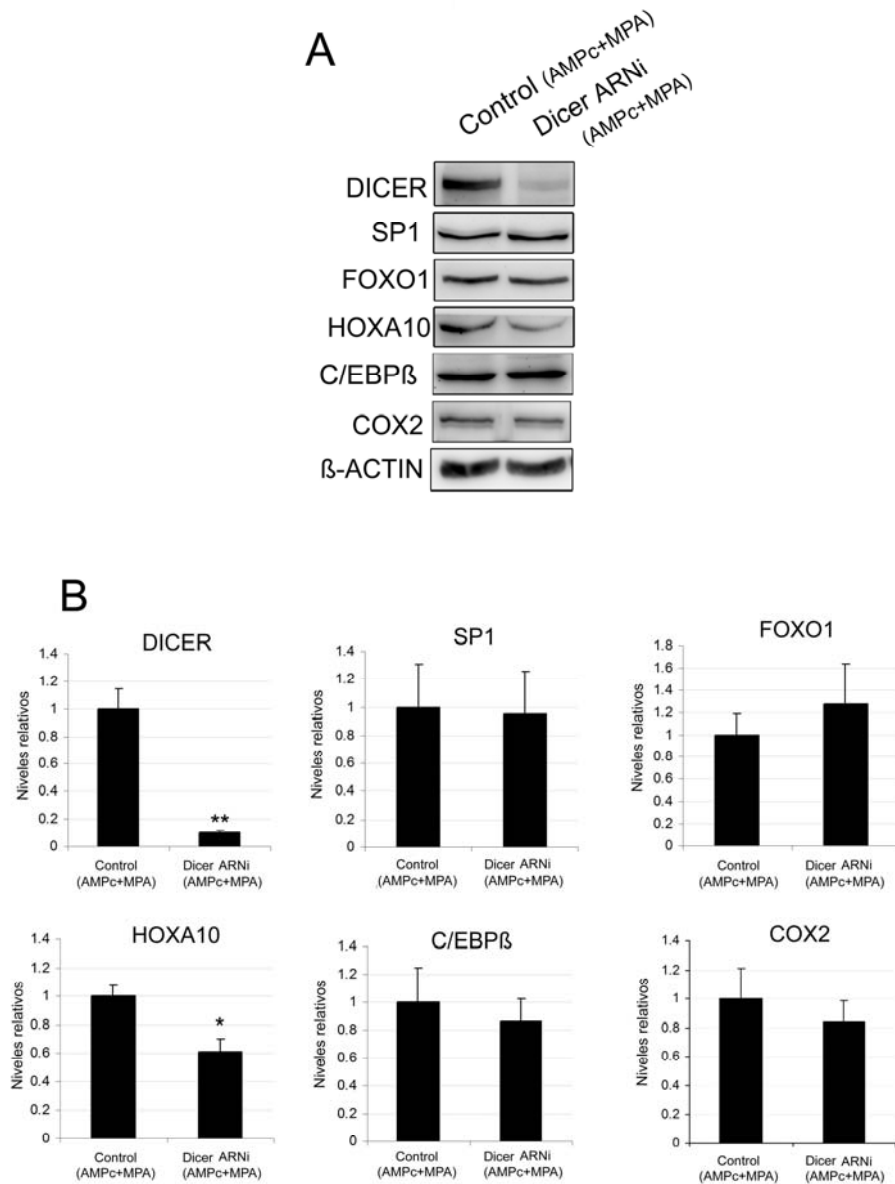


Figura 48. Efecto del silenciamiento de Dicer en las hESC tratadas con AMPc y MPA sobre los niveles de moléculas implicadas en la transformación decidual. (A) Western-blot de Dicer, FOXO1, HOXA10, C/EBPβ, SP1 y COX2 en las hESC control vs hESC ARNi de Dicer tras 72 horas de tratamiento con AMPc+MPA. (B) Se representan los valores del análisis densitométrico de las bandas normalizados con β-actina. Los valores

representan la media \pm SEM entre tres muestras independientes. La significancia estadística queda indicada como * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

3.3. Implicación de Dicer sobre la morfología de las hESC

Las hESC, durante la transformación decidual modifican su morfología de un aspecto fibroblástico fusiforme para hacerse gradualmente más redondeadas adoptando un aspecto epiteloide. Por lo tanto investigamos si el silenciamiento de Dicer tiene un efecto sobre el cambio morfológico de las hESC.

Las hESC fueron sometidas a cuatro condiciones diferentes: hESC transfectadas con el ARNi control vs hESC transfectadas con el ARNi Dicer y este mismo diseño añadiendo el estímulo decidual (AMPc y MPA). Pasadas las 72 horas después de la transfección con los ARNi se analizó la morfología mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-vimentina, un marcador de las células endometriales estromales y anti-F-actina que marcará los filamentos de actina.

Los resultados de la inmunofluorescencia revelan como las hESC transfectadas con el ARNi de Dicer vs hESC ARNi control, comparten la misma orientación longitudinal de los filamentos de F-actina, indicando que Dicer en ausencia del estímulo decidual no provoca cambios observables en la disposición de filamentos de actina. Por otro lado observamos, como las hESC transfectadas con el ARNi control y decidualizadas *in vitro* presentan una disposición más aleatoria de los filamentos de F-actina, adquiriendo una morfología poligonal característica del fenotipo decidualizado de las hESC (Figura 49). Por último el silenciamiento de Dicer durante el proceso de decidualización induce cambios morfológicos, provocando una estructura celular más redondeada, con una disposición periférica de los filamentos de F-actina que no corresponden al fenotipo característico de las hESC decidualizadas (Figura 49).

Los resultados indican que los miRNAs, cuya maduración está mediada por Dicer, podrían estar contribuyendo a la transformación morfológica durante el proceso de decidualización.

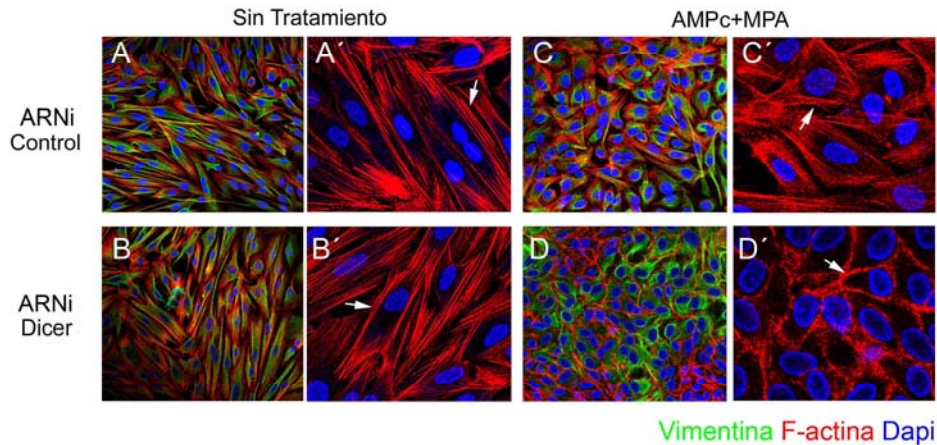


Figura 49. Efecto del silenciamiento de Dicer sobre la morfología de las hESC tratadas con o sin el estímulo decidual. hESCs transfectadas con el ARNi control vs hESCs ARNi Dicer (A, B) sin tratamiento decidual. En ambos casos las células presentan un aspecto fibroblástico con una disposición longitudinal de los filamentos de F-actina (flecha) (C) hESCs transfectadas con el ARNi control tratadas con AMPc+MPA durante 72 horas, presentan la estructura poligonal característica de las células decidualizadas y la distribución difusa de los filamentos de actina (flecha). D hESCs ARNi Dicer tratadas con AMPc+MPA, la morfología de las células es más redondeada y presentan una disposición más periférica de los filamentos de actina (flecha) A-D, F-actina (rojo), vimentina (verde) y Dapi (azul).

Todos estos resultados indican que Dicer tiene un papel minoritario sobre la ruta de señalización implicada en la diferenciación de la hESC durante el proceso de decidualización in vitro, al menos, a nivel de los marcadores analizados aunque provoca una alteración en la transformación morfológica característica del proceso.

VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

El proceso de decidualización es crucial para la regulación del proceso de invasión embrionaria, el correcto desarrollo de la placenta y el establecimiento del embarazo. Por lo tanto el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la diferenciación de las células estromales endometriales (ESC) durante este proceso es crucial para el entendimiento de la reproducción humana.

En la actualidad se han descrito detalladamente gran parte de los cambios moleculares que acontecen en las ESC durante la decidualización y que preparan al endometrio para el proceso de implantación embrionaria. Por otro lado, también se ha demostrado el importante papel que los mecanismos epigenéticos ejercen en la regulación de la expresión génica y por lo tanto su impacto sobre la fisiología celular. En cambio todavía existe muy poca información acerca del papel que cumplen los mecanismos epigenéticos en la regulación de la expresión génica de las ESC durante la decidualización.

Por este motivo, el propósito del presente trabajo fue determinar el papel de los mecanismos epigenéticos, en concreto la acetilación de las histonas y los miRNAs, durante el proceso de decidualización en las células endometriales estromales humanas (hESC) e identificar posibles dianas moleculares relevantes en la función de las hESC decidualizadas, que se encuentren bajo la regulación de estos mecanismos epigenéticos.

Implicación de la acetilación de las histonas en las hESC sobre la regulación de la remodelación de la matriz extracelular y la invasión embrionaria. Su asociación durante el proceso de decidualización *in vitro*

El proceso de invasión embrionaria ha sido comparado con la invasión tumoral ya que las células trofoblásticas presentan un potencial de crecimiento invasivo semejante a un fenotipo maligno. En cambio una de las principales diferencias entre

ambos procesos es que las células trofoblásticas no se diseminan a otras localizaciones, sino que el proceso de invasión embrionaria está controlado espacio-temporalmente. El microambiente tumoral al igual que el endometrio deciduado se pueden comparar a una respuesta inflamatoria de reparación donde tienen lugar procesos de angiogénesis, remodelación de la matriz extracelular y movimiento de células tumorales/trofoblásticas. Pero mientras que el estroma circundante al tumor es permisivo a la metástasis tumoral, el estroma deciduado de la interfase materno-embrionaria contribuye de manera activa al control del proceso invasivo.

En relación con el potencial papel de la acetilación de las histonas en las células estromales endometriales, existe un estudio previo donde se describe un aumento en los niveles globales de acetilación de las histonas, especialmente en la fase secretora tardía (Munro y cols., 2010) coincidiendo con el momento en que tiene lugar el proceso de diferenciación decidua. En cambio no existe ningún estudio que identifique las dianas génicas responsables del control del proceso invasivo reguladas por los mecanismos epigenéticos en las hESC.

Para estudiar el papel de la acetilación de las histonas en las hESC, la estrategia seleccionada fue la utilización del inhibidor de histonas deacetilasas (HDACi) TSA. Su eficacia como inductor de la acetilación de las histonas en las hESC ya ha sido demostrada en estudios previos (Sakai y cols., 2003). Con el objetivo de focalizar los efectos del TSA sobre las propiedades fenotípicas de las hESC responsables del control del proceso de invasión embrionaria evaluamos la movilidad celular mediante ensayos de migración y ensayos de invasión.

Nuestros resultados demuestran que el tratamiento de las hESC con TSA disminuye la movilidad celular de las mismas. También evaluamos el efecto del TSA sobre las interacciones estroma-embrión mediante ensayos de invasión embrionaria *in vitro*. Los resultados obtenidos nos muestran una disminución en la capacidad invasiva del embrión sobre las hESC tratadas con TSA sugiriendo que la capacidad de movimiento de las hESC regula el proceso de invasión embrionaria

Estos resultados coinciden con trabajos previos realizados en cáncer en los que se demuestra que el movimiento de las células estromales a través de la matriz extracelular que rodea a los tumores regula el proceso de metástasis (Bhowmick y cols., 2004, Elzer y cols., 2008) En relación al proceso de invasión embrionaria otros estudios han demostrado el impacto de la movilidad de las hESC sobre el proceso de invasión embrionaria, determinando que una capacidad reducida de movimiento de las hESC limita dicho proceso (Grewal y cols., 2008, Grewal y cols., 2010). Por lo que en conclusión se puede determinar que el desplazamiento de las células estromales endometriales en la zona de implantación embrionaria es un factor determinante para el correcto proceso de invasión embrionaria y que este proceso se puede ver alterado mediante el tratamiento con inhibidores de la deacetilación de las histonas, al menos en las hESC.

En cuanto al efecto del TSA sobre la movilidad celular de las hESC, nuestros resultados coinciden con estudios realizados en cáncer donde demuestran que el tratamiento de las células tumorales con HDACi provoca una disminución en la capacidad de migración e invasión celular. Además el estudio molecular del efecto fenotípico inducido por los HDACi sobre estas células, establece la implicación de las histonas deacetilasas (HDAC) sobre la expresión de genes relacionados con la remodelación de la matriz extracelular (MEC), principalmente sobre el sistema de las MMPs (Whetstine y cols., 2005, Liu y cols., 2006).

En el endometrio y concretamente en relación al papel de las MMPs en la interfase materno-embriónica durante el proceso de invasión existe una dramática remodelación de la MEC: el trofoblasto secreta las proteasas MMP-2 y MMP-9 (Cohen y cols., 2006) mientras que las células estromales decidualizadas secretan los inhibidores tisulares TIMP-1 y TIMP-3 (Irwin y cols., 2001, Lockwood y cols., 1998)(Dimitriadis y cols., 2005b). El balance entre MMPs y TIMPs es necesario para la correcta invasión embrionaria.

Por ello evaluamos el efecto que los HDACi ejercen sobre las hESC en la transcripción de la maquinaria de remodelación de la MEC. Nuestros resultados

demuestran como el tratamiento de las hESC con TSA provoca la inhibición en la expresión de proteasas (MMP-2, MMP-9 y uPA) mientras que activa la expresión de sus inhibidores (TIMP-1 y TIMP-3). Este perfil de expresión coincide con la disminución de la movilidad celular y con la reducida invasión embrionaria observada en las hESC tratadas con TSA.

Puesto que estos componentes del sistema de las MMPs actúan a nivel extracelular evaluamos el efecto de los medios condicionados derivados de las hESC tratadas con TSA vs hESC control sobre el potencial de migración del trofoblasto. Nuestros resultados determinan como el microambiente extracelular desarrollado por las hESC tratadas con TSA disminuye la capacidad del potencial invasivo del trofoblasto, sugiriendo un potencial papel de las HDAC en la regulación de los factores paracrinicos implicados en las interacciones establecidas en la interfase materno-embrionaria. Esta disminución de la capacidad invasiva del trofoblasto coincide con la disminución de los niveles proteicos y de la actividad de MMP-2 y MMP-9 así como un aumento en los niveles de TIMP-3 presentes el medio extracelular de las hESC tratadas con TSA.

Como ya hemos descrito en la introducción la acetilación de las histonas está ligada a una mayor activación transcripcional. En otros estudios se ha demostrado como en los efectos transcripcionales de las HDAC sobre la maquinaria del sistema de las metaloproteasas participa una cascada de señalización que incluye modificaciones en la acetilación de las histonas, pero también reclutamiento de factores de transcripción y remodelación de la cromatina (Clark y cols., 2007). Nuestros resultados demuestran que el aumento en la activación transcripcional de TIMP-1 y TIMP-3 está ligado a un incremento en la acetilación de las histonas cercanas a los promotores génicos de estos genes sugiriendo que podrían ser potenciales dianas moleculares reguladas por la modificación post-traducciona l de las histonas en las hESC.

El patrón de expresión génico inducido por el tratamiento con TSA en las hESCs es muy semejante al descrito durante el proceso de decidualización:

aumento de TIMP-1 y TIMP-3 y disminución en la expresión de MMP-9 (Iwahashi y cols., 1996).

Por ello testamos el patrón de expresión de moduladores de la MEC en las hESC decidualizadas *in vitro*. Nuestros resultados muestran una disminución de la expresión de MMP-9 y uPA y un aumento en los niveles transcripcionales y proteicos de TIMP-1 y de TIMP-3 en las hESC decidualizadas. Por otro lado la ausencia de cambio transcripcional de MMP-2 durante el estímulo decidual observada en el presente trabajo coincide con estudios previos de análisis de expresión de las MMPs en el endometrio a lo largo del ciclo menstrual (Osteen y cols., 2003).

Existe un estudio realizado por Sakai y col que demuestra que el tratamiento de las hESC con el estímulo hormonal de los estrógenos y la progesterona provoca un aumento en los niveles histonas acetiladas. Además la adicción del HDACi TSA provoca un aumento sinérgico en los niveles de marcadores específicos del proceso de decidualización, como PRL e IGFBP-1.

El estudio de Sakai y col está sugiriendo que el mecanismo de acetilación de las histonas participa en el proceso de decidualización. Por otro lado nuestros resultados demuestran que durante el estímulo decidual se establece un patrón de expresión del sistema de la metaloproteasas semejante al inducido por el TSA. Por ello evaluamos mediante una ChIP los niveles de las histonas H3 y H4 acetiladas asociadas a los TIMPs, demostrando como la acetilación de las histonas a nivel de los promotores génicos del TIMP-1 y del TIMP-3 aumenta en las células decidualizadas. Estos datos nos están indicando que el mecanismo de acetilación de las histonas podría estar regulando la transcripción de moduladores de la MEC durante el proceso de decidualización.

También analizamos si existe un posible efecto sinérgico del TSA y el estímulo decidual sobre los cambios transcripcionales de los moduladores de la MEC. Los resultados obtenidos nos determinan que el TSA no modifica el perfil transcriptómico del sistema de las MMPs establecido por el estímulo decidual. Estos resultados pueden deberse al hecho de que el estímulo decidual podría aumentar la

acetilación de las histonas en los promotores génicos de TIMP-1 y TIMP-3 hasta la saturación y el tratamiento con TSA no modificaría los efectos transcripcionales provocados por el AMPc. En cambio todavía queda por esclarecer si ante respuestas deciduales deficientes los niveles de acetilación de histonas se ven alterados. Si este fuera el caso sería interesante evaluar el posible efecto del TSA como coadyuvante de la respuesta decidual reestableciendo los niveles de acetilación de histonas necesarios para el establecimiento del balance de los moduladores de la MEC y por lo tanto controlando la correcta invasión embrionaria.

Nuestros resultados sugieren la posibilidad de que la decidualización *in vitro* de las hESC induzca un aumento en la acetilación de las histonas provocando el aumento de la expresión de TIMP-1 y TIMP-3 (Figura 50). Por lo tanto los TIMPs son importantes dianas génicas que se regulan epigenéticamente en las hESC mediante un mecanismo de acetilación de las histonas durante la decidualización.

Además también hemos demostrado como el tratamiento de las hESC con inhibidores de la deacetilación de las histonas tipo TSA, modifica el equilibrio del sistema de las metaloproteasas provocando la reducción de la movilidad de las células estromales endometriales y en consecuencia alterando la correcta invasión embrionaria *in vitro*. La posible implicación de la acetilación de las histonas en la regulación de estos mecanismos durante la decidualización podría ser responsable del control de la invasión embrionaria en la decidua materna (Figura 50).

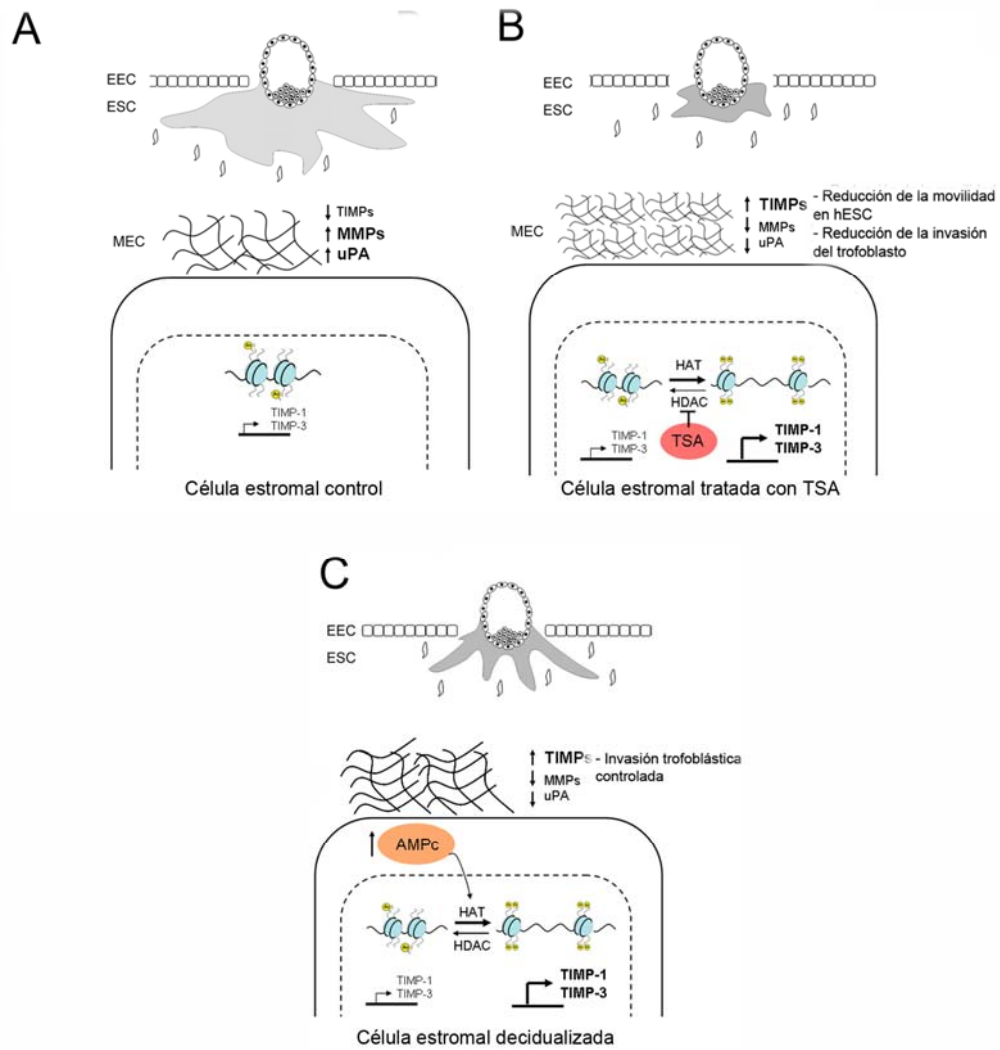


Figura 50. Modelo propuesto de la implicación funcional de la acetilación de las histonas en la remodelación MEC y la invasión embrionaria durante el proceso de decidualización. (A) hESC en ausencia del estímulo de decidualización. (B) hESC tratadas con TSA. (C) En las hESC decidualizadas el aumento en los niveles de acetilación de las histonas reduce la movilidad celular e induce un aumento en la transcripción de los TIMPs regulando el proceso de invasión embrionaria.

Perfil de miRNAs durante el proceso decidualización

El proceso de decidualización de las ESC ha sido ampliamente caracterizado a nivel transcriptómico y proteómico identificando, la participación de genes implicados en procesos tales como la diferenciación celular, la proliferación celular, la apoptosis, la remodelación de la matriz extracelular o la organización del citoesqueleto (Borthwick y cols., 2003, Okada y cols., 2003, Popovici y cols., 2000). Investigaciones recientes han puesto de manifiesto la implicación de los miRNAs en la regulación de estos procesos (Bushati y Cohen 2007, Williams 2008). En cambio todavía existe muy poca información del papel que cumplen los miRNAs en la regulación post-transcripcional del proceso de decidualización de las ESC.

En nuestro estudio hemos identificado el perfil de miRNAs específico de las células estromales decidualizadas *in vitro*. Además la identificación de potenciales dianas y vías asociadas a estos miRNAs vinculadas al proceso de decidualización, permite establecer un posible modelo de regulación post-transcripcional del proceso.

Existe un estudio previo realizado por Qian y cols en el cual, utilizando la tecnología de los microarrays analizan la expresión de 435 miRNAs en las hESC decidualizadas *in vitro* con AMPc y MPA (Qian y cols., 2009). El abordaje experimental de nuestro estudio propone el análisis de la expresión de 704 miRNAs, 269 más miRNAs que en el estudio de Qian y cols. Además se utilizó el estímulo hormonal con E₂ y P₄ como método de decidualización que supone un tratamiento más fisiológico que la adición de AMPc y MPA. El análisis de expresión identificó 43 miRNAs diferencialmente expresados, y por lo tanto relevantes en el proceso de decidualización. Sorprendentemente solo 2 de estos miRNAs (miR-181b y miR-181d) coincidían con el trabajo de Qian y col. Posibles causas de la divergencia entre los resultados obtenidos podrían ser el diferente estímulo de decidualización aplicado, la técnica de análisis de expresión utilizada y el número de miRNAs analizados.

El análisis computacional de las potenciales dianas génicas de los miRNAs diferencialmente expresados durante la decidualización *in vitro* identificó genes esenciales durante la decidualización tales como: CEBP β , SP1, FOXO1, HOXA10, SP3, TIMP-3, MMP-2 o IL-1. Estos datos nos indican el importante papel de los miRNAs en la regulación del proceso de decidualización.

Uno de los miRNAs diferencialmente expresados durante el proceso de decidualización es el miR135b. Un trabajo reciente ha demostrado la inhibición del factor de transcripción HOXA10 por el miR135b validándolo como su diana génica (Petracco y cols., 2011). HOXA10 tiene una función esencial en la fertilidad femenina, al menos en ratones, cuya ausencia impide el establecimiento del embarazo (Benson y cols., 1996, Satokata y cols., 1995) y por lo tanto su regulación es necesaria para la reproducción. En humanos se ha demostrado como este factor de transcripción se induce ante el estímulo hormonal de E₂ y P₄ activando la transcripción de genes necesarios para la decidualización (Taylor y cols., 2004). También se ha encontrado una expresión aberrante del miR135b en pacientes con endometriosis, sugiriendo ser responsable de la desregulación de HOXA10 en esta patología (Petracco y cols., 2011). Además en nuestro estudio hemos encontrado como la sobreexpresión del miR135b y el silenciamiento de Dicer en las hESC provocan la disminución de HOXA10, apoyando la idea de la regulación post-transcripcional de HOXA10 por los miRNAs y de la importancia del miR135b en la fisiología de las ESC.

Otro destacado miRNA que disminuye durante la decidualización es el miR96. Existe un trabajo que demuestra como miR-96 regula negativamente el factor de transcripción FOXO1 en las células endometriales tumorales (Myatt y cols., 2010). Nuestros datos muestran una regulación de FOXO1 por el miR96 confirmando los resultados realizados en este estudio previo. FOXO1 se induce durante la decidualización donde participa en la regulación de multitud de genes entre ellos, el marcador IGFBP-1 (Christian y cols., 2002)(Kim y cols., 2005).

Nuestros resultados demuestran que la alteración en los niveles del miR96, de miR135b o de ambos conjuntamente provoca una desregulación en los niveles de importantes marcadores del proceso de decidualización como es IGFBP-1.

Por lo tanto estos datos nos sugieren que durante la decidualización el estímulo hormonal mediado por las hormonas esteroideas y por el aumento de los niveles de AMPc induce cambios en la expresión de miRNAs responsables de la regulación de importantes genes implicados en la diferenciación decidual de las ESC.

También se realizó un análisis de las potenciales rutas reguladas por los miRNAs implicados en el proceso de decidualización *in vitro*. Entre las principales vías identificadas encontramos procesos tales como la orientación axonal, las uniones adherentes y la regulación del citoesqueleto de actina. Estas vías están relacionadas con la regulación del citoesqueleto de actina, un proceso ampliamente caracterizado durante la diferenciación de las ESC y que incluye a importantes dianas génicas como Rac1, CDC42, RhoA o ROCK1 (Grewal y cols., 2008, Tsuno y cols., 2009). Estos genes están implicados en la transformación morfológica de las células estromales decidualizadas y afectan a la movilidad celular por lo que están regulando el proceso de invasión embrionaria (Ihnatovych y col., 2009; Grewal y cols., 2008).

Otras de las vías reguladas por los miRNAs durante la decidualización es la señalización mediada por el receptor ErbB (EGFR) y el carcinoma de células renales. Estas vías están relacionadas con la diferenciación celular, la migración y la angiogénesis, procesos necesarios durante la decidualización de las ESC y durante el proceso de implantación embrionaria. Además estas vías incluyen potenciales dianas génicas como VEGFA y TGF β 2, importantes moléculas que se regulan durante la decidualización y que parecen contribuir a la remodelación de la MEC durante la fase secretora y a la formación de nuevos vasos durante la placentación (Popovici y cols., 1999, Lockwood y cols., 2009, Gaide Chevronnay y cols., 2008).

En nuestro trabajo se han identificado entre los miRNAs diferencialmente expresados durante la decidualización de las hESC a miembros de tres familias de miRNAs diferentes, la familia del miR-181, del miR-200 y del miR-183.

Los miembros de una misma familia de miRNAs suelen localizarse en un mismo loci y suelen compartir la misma secuencia “semilla”. En nuestro estudio hemos encontrado que los miembros de la misma familia de miRNAs se regulan de manera similar durante la diferenciación de las hESC. Estos resultados sugieren que durante el estímulo hormonal de la decidualización los miembros de una misma familia de miRNAs se regulan de manera coordinada pudiendo actuar sinérgicamente sobre un mismo mecanismo relevante durante la decidualización.

Dentro de la familia del miR-181 las dos vías más representadas son la señalización mediada por el TGF β y la señalización mediada por el receptor de células T. Existen evidencias de que la vía de señalización del TGF β contribuye a la diferenciación de las células estromales (Stoikos y cols., 2008, Bruner y cols., 1995). Además algunas de las principales dianas de los miRNAs de la familia del miR-181 incluyen el receptor del TGF β y transductores de la señal como Smad2 y la proteína de unión a CREB (CREBBP) que están implicadas en la proliferación celular (Chrivia y cols., 1993, Luo y cols., 2003). La vía del receptor de células T está implicada en la tolerancia inmunológica durante el embarazo. En esta vía participan moléculas como CD-4, TNF o IL-10 (Wang y cols., 2010, Piccinni, 2010). Otra importante molécula diana del miR-181b, que ya ha sido validada, es TIMP-3 y que como se ha detallado anteriormente tiene una importante función durante la decidualización y la invasión embrionaria (Wang y cols., 2010).

Las vías potencialmente reguladas por la familia del miR-200, incluyen el carcinoma de células renales y la señalización mediada por ErbB. El primer proceso incluye potenciales dianas génicas como VEGFA que como he detallado anteriormente está implicada en la angiogénesis. También incluye genes de regulación del citoesqueleto de actina como RAC1. La remodelación del citoesqueleto de actina durante el proceso de decidualización de las ESC es un proceso ampliamente detallado y su alteración impide la correcta diferenciación de

las ESC (Popovici y cols., 2000, Ilnatovych y col., 2009). Además RAC1 está directamente implicado en la regulación del movimiento de las ESC, necesario para el correcto proceso de invasión embrionaria (Grewal y cols., 2008).

La vía de señalización del ErbB incluye dianas como STAT5b un factor de transcripción que se asocia al promotor génico de PRL (Mak y cols., 2002). Además el factor de transcripción ZEB1, una diana validada de la familia del miR-200 aumenta durante la fase secretora en el estroma y una alteración en su expresión se asocia a la transición epitelio-mesenquimal y a la progresión del cáncer endometrial (Mak y cols., 2002). Su función en la decidualización todavía no está descrita.

La otra familia de miRNAs incluye el miR-96, el miR-182 y el miR-183 cuyas vías más representadas incluye la reorganización del citoesqueleto de actina con dianas génicas tales como RAC1 e ITGB1. Ambos genes como acabo de detallar están implicados en la decidualización de la ESC y en el proceso de implantación (Grewal y cols., 2008, Myatt y cols., 2010). ITGB1 o integrina β 1 es el receptor de fibronectina y parece ser que la unión de la ITGB1 a los componentes de la MEC de la decidua podría contribuir a la activación de señales intracelulares que participan en el proceso de decidualización (Ramathal y cols., 2011). Además el factor de transcripción FOXO1, cuya expresión se induce tras la inducción hormonal de E_2+P_4 y es necesario para la activación transcripcional de genes implicados en el proceso de decidualización se regula por el miR-182 y el miR-96 (Kim y cols., 2005).

Función de Dicer durante la decidualización

Una aproximación al estudio funcional de los miRNAs es la utilización de modelos mutantes para Dicer, una ribonuceasa necesaria para la biogénesis de los miRNAs (He y Halnnon, 2004). Existen múltiples estudios que demuestran que Dicer tiene un papel esencial para la fertilidad femenina. Ratones mutantes para

Dicer presentan defectos en el desarrollo del ovario, los ovocitos y el útero y son incapaces de establecer un embarazo, indicando que los miRNAs son un mecanismo de regulación de la función del sistema reproductivo femenino y por lo tanto de la fertilidad (Gonzalez y Behringer 2009, Hong y cols., 2008, Nagaraja y cols., 2008). En cambio el papel de Dicer durante el proceso de decidualización humano no había sido todavía descrito.

Nosotros hemos realizado la primera caracterización funcional de Dicer durante el proceso de decidualización *in vitro*, determinando que el impacto de Dicer sobre el proceso de decidualización es mínimo, al menos a nivel de los marcadores de decidualización analizados.

Nuestros resultados demuestran que los niveles de Dicer aumentan durante la decidualización *in vivo* e *in vitro* sugiriendo que los miRNAs podrían estar contribuyendo al proceso de diferenciación decidual. En cambio, el análisis de marcadores del proceso determina que el silenciamiento de Dicer durante la decidualización *in vitro* no provoca cambios significativos en los niveles de PRL, IGFBP-1, MPIF-1 y TIMP-3.

Tampoco se observaron cambios en los niveles de importantes señalizadores del proceso de diferenciación, tales como FOXO1, C/EBP β , SP1 o relevantes moléculas implicadas en la decidualización como COX-2, a pesar de que si observamos una disminución en los niveles del factor de transcripción HOXA10 tras el silenciamiento de Dicer.

Existe un estudio previo que demuestra que ratonas mutantes para HOXA10 son infértiles y muestran una respuesta decidual disminuida, presentando fallos en la proliferación de las ESC (Benson y cols., 1996)(Lim y cols., 1999). A pesar de que nuestros resultados demuestran que los niveles de HOXA10 disminuyen tras el silenciamiento de Dicer, un estudio reciente ha determinado que la disminución de los niveles de Dicer en las células endometriales tumorales no afecta a la proliferación celular (Katherine B, 2012). Por lo tanto es posible que el silenciamiento de Dicer esté alterando posibles mecanismos compensatorios que

impiden la alteración de la proliferación celular, a pesar de la disminución en los niveles de HOXA10 en las hESC carentes de Dicer. Para poder afirmar esta hipótesis sería necesario realizar un estudio más detallado que analice en profundidad el efecto de Dicer sobre la proliferación celular en las hESC y por lo tanto sobre el proceso de decidualización.

Por otro lado en humanos se ha descrito que HOXA10 no se une al promotor de PRL mientras que aumenta la actividad promotora del IGFBP-1 de manera cooperativa junto con FOXO1. Además mientras que FOXO1 es capaz de elevar por sí solo los niveles de IGFBP-1, el efecto individual de HOXA10 sobre los niveles de este es mínimo (Kim y cols., 2005). Nuestros resultados muestran que el silenciamiento de Dicer en las hESC disminuye los niveles de HOXA10 pero no modifica los niveles de FOXO1, por lo que estos datos podrían explicar la ausencia de cambios en los niveles de estos marcadores en las hESC carentes de Dicer.

Por último el estudio morfológico de las hESC demuestra que el silenciamiento de Dicer altera la transformación morfológica característica de las células decidualizadas. Un estudio previo realizado en ratonas mutantes condicionales para Dicer, muestra como la respuesta decidual no está afectada a nivel de la transformación morfológica característica de las células decidualizadas (Nagaraja y cols., 2008). Las vías activadas por las hormonas esteroideas durante el proceso de decidualización presentan ligeras diferencias entre las dos especies y por lo tanto el efecto del silenciamiento de Dicer sobre este proceso no tiene que ser necesariamente similar (Ramathal y cols., 2010).

La falta de un claro fenotipo en las hESC carentes de Dicer durante la decidualización puede ser debido a varias posibilidades. En primer lugar la larga vida media de los miRNAs endógenos puede enmascarar la falta de fenotipo en las hESC tratadas con el ARNi de Dicer ya que estos experimentos se realizaron en periodos cortos de tiempo de 72 a 96 horas (Kim, 2005).

En segundo lugar, la existencia de vías alternativas de procesamiento de miRNAs podrían mantener niveles de miRNAs maduros a pesar de la falta de Dicer

(Yang y Lai 2011). Estudios realizados en modelos mutantes para los distintos componentes de la maquinaria de biosíntesis de los miRNAs, como Dicer, Drosha o DGR8 presentan una disminución en los niveles globales de miRNAs maduros pero el efecto sobre el fenotipo celular es diferente (Babiarz y cols., 2011, Suh y cols., 2010). De hecho estudios realizados en ovocitos muestran cómo mientras que la falta de Dicer provoca defectos en la meiosis, la falta de DGR8 no provoca cambios en el fenotipo. Estos datos apoyan la idea de la posible existencia de vías alternativas de maduración de miRNAs.

Por último en nuestro estudio, sólo el 6.1 % de los 704 miRNAs analizados muestran una expresión diferencial durante el proceso de deciduación. Estos cambios en la expresión de un pequeño número de miRNAs durante la deciduación podrían estar indicando que los miRNAs cumplen un papel específico en la regulación de los diferentes procesos implicados en la diferenciación decidual, en lugar de funciones globales analizadas mediante el silenciamiento de componentes de la maquinaria de biosíntesis.

En conclusión podemos determinar que durante el proceso de deciduación las hESC expresan miRNAs de manera diferencial sugiriendo un importante papel de estos en el proceso. Importantes mediadores del proceso de deciduación como FOXO1 o HOXA10 dianas génicas de los miRNAs identificados y previamente validados se encuentran bajo el control de este complejo mecanismo epigenético. También hemos demostrado como la modificación en los niveles del miR96 y el miR135b altera los niveles del marcador del proceso de deciduación IGFBP-1. Estos datos determinan el potencial papel de los miRNAs en la diferenciación de las hESC. En cambio todavía existen múltiples preguntas por responder hasta poder determinar el efecto de los miRNAs en la regulación del proceso de deciduación de las hESC.

Perspectivas futuras: Aplicaciones de la epigenética en el endometrio

Aplicaciones de los inhibidores de las histona deacetilasas: HDACi

Puesto que la regulación de la expresión génica mediada por los mecanismos epigenéticos es un proceso reversible, se han desarrollado multitud de fármacos que actuando a través de las HDACs modifiquen el estado transcripcional de las células. Actualmente los HDACi constituyen una nueva clase de agentes terapéuticos anti-cancerígenos que actuando a través de mecanismos epigenéticos y no-epigenéticos provocan una reducción de la proliferación y la inducción de la diferenciación celular y de la apoptosis (Johnstone, 2002, Uchida y cols., 2005).

Los resultados de nuestro estudio demuestran que el tratamiento de las hESC con el HDACi TSA afecta a la movilidad celular y al proceso de invasión embrionaria, a través de la alteración en el balance de los moduladores de la remodelación de la MEC. Existen múltiples estudios que establecen la implicación de los HDACi en la regulación del sistema de las metaloproteasas. Sorprendentemente los efectos del mismo HDACi sobre la expresión de estos genes pueden ser variables y contradictorios dependiendo del tipo celular que se esté estudiando (Clark y cols., 2007, Jeon y Lee, 2010). Nosotros evaluamos el efecto del TSA sobre la regulación de la maquinaria de remodelación de la MEC, en las hESC, las hEECs y en fibroblastos concluyendo que el patrón de transcripción establecido por el TSA, anteriormente descrito, es específico de las células endometriales.

Los resultados obtenidos no solo mejoran el conocimiento de los mecanismos epigenéticos que potencialmente regulan el control del proceso de invasión embrionaria sino que identifican importantes dianas de regulación de los HDACi, como son el sistema de las metaloproteasas. El balance entre las MMPs y los TIMPs es responsable de la regulación de importantes procesos como la migración, la proliferación, la apoptosis y la remodelación tisular. Estos procesos están

estrechamente implicados en la función de las células endometriales durante la implantación embrionaria. Además se ha encontrado una expresión aberrante de estas enzimas en situaciones endometriales patológicas como en la preeclampsia, la endometriosis y el cáncer (Sillem y cols., 1998, Lockwood y cols., 2008, Di Nezza y cols., 2002). Por lo tanto el tratamiento de las células endometriales con el HDACi TSA podría ser un potencial fármaco para la mejora del proceso de implantación embrionaria y para el tratamiento de patologías endometriales

Aplicaciones de los miRNAs

Por otro lado los miRNAs son importantes reguladores negativos de la expresión génica, contribuyendo al correcto balance de los procesos celulares que establecen el fenotipo celular. Desde que una expresión alterada de los miRNAs se ha podido asociar a la aparición de diversas patologías, el estudio del perfil de miRNAs ha sido propuesto como una posible fuente de nuevos biomarcadores.

Los miRNAs se expresan de manera específica dependiendo del tipo celular o tejido (Luu y cols., 2008) además puesto que cada miRNA puede regular la expresión de múltiples transcritos, los miRNAs ofrecen la posibilidad de ser importantes biomarcadores para aquellas patologías en las que varias vías están alteradas.

En la actualidad se han definido perfiles específicos de miRNAs en una gran variedad de tipos de cáncer (Rosenfeld y cols., 2008). También se han encontrado perfiles específicos de miRNAs asociados a patologías endometriales como la preeclampsia, la endometriosis o diversos tipos de cáncer endometrial (Hever y cols., 2007, Hull y cols., 2008, Cohn y cols., 2010, Pan y cols., 2007, Ohlsson Teague y cols., 2009). Sorprendentemente algunos de los miRNAs identificados en nuestro estudio como potenciales reguladores post-transcripcionales de la decidualización de las hESC se encuentran desregulados en patologías como la endometriosis (e.j. miR-9, miR-135b y miR-141) (Petracco y cols., 2011, Teague y

cols., 2010), la preeclampsia (e.j. miR-155, miR-183 y miR-181b miR-182) (Pineles y cols., 2007)(Zhang y cols., 2010) o el cáncer endometrial (e.j. la familia de miR-200 y miR-96) (Lam y cols., 2012).

Estos miRNAs identificados podrían ser estudiados y caracterizados como biomarcadores de estas patologías. La utilización de precisos biomarcadores permitiría el diagnóstico precoz de estas enfermedades evitando muchos de los riesgos asociados a estas. Además puesto que algunos de los miRNAs identificados en nuestro estudio como posibles reguladores de los procesos fisiológicos endometriales, en este caso la decidualización, tengan una expresión alterada en estas disfunciones del endometrio nos está indicando que estos miRNAs podrían ser responsables del desarrollo de estas patologías. Estos datos abren nuevas puertas para el estudio de los miRNAs como potenciales dianas moleculares terapéuticas.

Es necesario desarrollar más estudios para identificar aquellos miRNAs relevantes en un determinado tejido y proceso, junto con la caracterización de sus potenciales funciones biológicas tanto en el estado fisiológico como en el patológico. Conocer el papel de los miRNAs nos permite asociarlos al mantenimiento de la homeostasis celular normal o por contra al desarrollo de fenotipos patológicos. Este conocimiento es crucial para la utilización de estas moléculas como biomarcadores en diversas patologías.

Actualmente se han desarrollado grandes avances en las tecnologías de detección y cuantificación de miRNAs, focalizados a los estudios de los perfiles de expresión de miRNAs. Además los miRNAs presentan grandes ventajas, como la gran estabilidad de sus moléculas y el gran impacto que tienen en la regulación de las complejas redes génicas. Por ello la identificación de potenciales biomarcadores basados en miRNAs, podría ser actualmente la estrategia más adecuada para el diagnóstico clínico. A pesar de los avances realizados en la caracterización de los miRNAs como potenciales biomarcadores, para su posible aplicación en clínica es necesario desarrollar más estudios, evaluando grandes cohortes muestrales que validen el valor clínico de los miRNAs como biomarcadores de estas patologías.

VI. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

1. El tratamiento de las células endometriales estromales (hESCs) con el inhibidor de las deacetilasas de histonas TSA (es decir la inducción de la acetilación) provoca una reducción de su movilidad celular (40% aproximadamente), limita el proceso de invasión embrionaria (50%) y altera el balance de la maquinaria de remodelación de la matriz extracelular (MEC).

2. La expresión de TIMP-1 y TIMP-3 en las hESC se regula, al menos en parte, mediante la acetilación de las histonas y durante el proceso de decidualización *in vitro* los niveles de histonas acetiladas aumentan en los promotores génicos de estos.

3. Por lo tanto la acetilación de las histonas es un mecanismo epigenético implicado durante la decidualización de las hESC en la regulación de la maquinaria de remodelación de la MEC necesaria para el proceso de implantación.

4. Hemos identificado 42 miRNAs diferencialmente expresados durante el proceso de decidualización *in vitro* que podrían estar implicados en el proceso de diferenciación de las hESC.

5. El análisis *in silico* de los miRNAs diferencialmente expresados durante el proceso de decidualización *in vitro*, ha identificado las potenciales dianas génicas, implicadas en procesos como la angiogénesis, movilidad celular, regulación del citoesqueleto de actina o remodelación de la MEC, procesos con un papel relevante durante el proceso de diferenciación de las hESC.

6. El miR96 y el miR135b regulan la expresión de FOXO1 y HOXA10 respectivamente. El aumento en los niveles de estos miRNAs durante el proceso de decidualización *in vitro*, provoca una disminución en los niveles del marcador decidual IGFBP-1.

7. Los niveles de Dicer aumentan durante el proceso de deciduación *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, su silenciamiento durante el proceso de deciduación *in vitro* no modifica los niveles de marcadores deciduales específicos, ni afecta los niveles de señalizadores relevantes en el proceso de diferenciación. Aunque Dicer altera el cambio morfológico específico de las células estromales deciduales.

8. La posible existencia de vías alternativas de biogénesis de miRNAs podría ser responsable de la falta de un fenotipo claro en las hESC con Dicer silenciado.

9. Los miRNAs podrían actuar de manera específica en la regulación del proceso de deciduación, en lugar de cumplir funciones globales evaluadas mediante el silenciamiento de Dicer

VII BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

Aboobaker AA, Tomancak P, Patel N, Rubin GM and Lai EC. Drosophila microRNAs exhibit diverse spatial expression patterns during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**:18017-18022.

Ailenberg M and Silverman M. Differential effects of trichostatin A on gelatinase A expression in 3T3 fibroblasts and HT-1080 fibrosarcoma cells: implications for use of TSA in cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;**302**:181-185.

Ait-Si-Ali S, Ramirez S, Barre FX, Dkhissi F, Magnaghi-Jaulin L, Girault JA, Robin P, Knibiehler M, Pritchard LL, Ducommun B *et al.* Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A. *Nature* 1998;**396**:184-186.

Alexander CM, Hansell EJ, Behrendtsen O, Flannery ML, Kishnani NS, Hawkes SP and Werb Z. Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development* 1996;**122**:1723-1736.

Andl T, Murchison EP, Liu F, Zhang Y, Yunta-Gonzalez M, Tobias JW, Andl CD, Seykora JT, Hannon GJ and Millar SE. The miRNA-processing enzyme dicer is essential for the morphogenesis and maintenance of hair follicles. *Curr Biol* 2006;**16**:1041-1049.

Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L and Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 1997;**72**:1-22.

Aplin JD. The cell biological basis of human implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000;**14**:757-764.

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

Apparao KB, Murray MJ, Fritz MA, Meyer WR, Chambers AF, Truong PR and Lessey BA. Osteopontin and its receptor alphavbeta(3) integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**:4991-5000.

Babiarz JE, Hsu R, Melton C, Thomas M, Ullian EM and Blelloch R. A role for noncanonical microRNAs in the mammalian brain revealed by phenotypic differences in Dgcr8 versus Dicer1 knockouts and small RNA sequencing. *RNA* 2011;**17**:1489-1501.

- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;**116**:281-297.
- Benson GV, Lim H, Paria BC, Satokata I, Dey SK and Maas RL. Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development* 1996;**122**:2687-2696.
- Bentin-Ley U, Sjogren A, Nilsson L, Hamberger L, Larsen JF and Horn T. Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in vitro. *Hum Reprod* 1999;**14**:515-520.
- Berezikov E, van Tetering G, Verheul M, van de Belt J, van Laake L, Vos J, Verloop R, van de Wetering M, Guryev V, Takada S *et al.* Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis. *Genome Res* 2006;**16**:1289-1298.
- Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R and Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* 2009;**23**:781-783.
- Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV and Hannon GJ. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 2003;**35**:215-217.
- Bhowmick NA, Neilson EG and Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004;**432**:332-337.
- Bird A. The essentials of DNA methylation. *Cell* 1992;**70**:5-8.
- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A and Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;**4**:197-250.
- Bischof P and Campana A. Trophoblast differentiation and invasion: its significance for human embryo implantation. *Early Pregnancy* 1997;**3**:81-95.
- Bischof P, Meisser A and Campana A. Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion--a review. *Placenta* 2000;**21 Suppl A**:S55-60.
- Bissell MJ, Hall HG and Parry G. How does the extracellular matrix direct gene expression?. *J Theor Biol* 1982;**99**:31-68.
- Bonewald LF. Regulation and regulatory activities of transforming growth factor beta. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1999;**9**:33-44.

Boren T, Xiong Y, Hakam A, Wenham R, Apte S, Wei Z, Kamath S, Chen DT, Dressman H and Lancaster JM. MicroRNAs and their target messenger RNAs associated with endometrial carcinogenesis. *Gynecol Oncol* 2008;**110**:206-215.

Borthwick JM, Charnock-Jones DS, Tom BD, Hull ML, Teirney R, Phillips SC and Smith SK. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2003;**9**:19-33.

Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B and Bestor TH. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 2001;**294**:2536-2539.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;**72**:248-254.

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

Brenner RM and West NB. Hormonal regulation of the reproductive tract in female mammals. *Annu Rev Physiol* 1975;**37**:273-302.

Brew K, Dinakarandian D and Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000;**1477**:267-283.

Brodersen P and Voinnet O. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;**10**:141-148.

Bruner KL, Rodgers WH, Gold LI, Korc M, Hargrove JT, Matrisian LM and Osteen KG. Transforming growth factor beta mediates the progesterone suppression of an epithelial metalloproteinase by adjacent stroma in the human endometrium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;**92**:7362-7366.

Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S and Brabletz T. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep* 2008;**9**:582-589.

Bushati N and Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;**23**:175-205.

Cai X, Hagedorn CH and Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004;**10**:1957-1966.

Calin GA and Croce CM. Chromosomal rearrangements and microRNAs: a new cancer link with clinical implications. *J Clin Invest* 2007;**117**:2059-2066.

Calin GA and Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006;**6**:857-866.

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M *et al*. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:2999-3004.

Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De Vos R, van den Oord JJ, Collen D and Mulligan RC. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 1994;**368**:419-424.

Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA and Yoshinaga K. Embryo implantation. *Dev Biol* 2000;**223**:217-237.

Carson DD, Lagow E, Thathiah A, Al-Shami R, Farach-Carson MC, Vernon M, Yuan L, Fritz MA and Lessey B. Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Mol Hum Reprod* 2002;**8**:871-879.

Carver J, Martin K, Spyropoulou I, Barlow D, Sargent I and Mardon H. An in-vitro model for stromal invasion during implantation of the human blastocyst. *Hum Reprod* 2003;**18**:283-290.

Cervero A, Horcajadas JA, Dominguez F, Pellicer A and Simon C. Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function. *Reprod Biomed Online* 2005;**10**:217-223.

Cervero A, Dominguez F, Horcajadas JA, Quinonero A, Pellicer A and Simon C. Embryonic adhesion is not affected by endometrial leptin receptor gene silencing. *Fertil Steril* 2007;**88**:1086-1092.

Chakrabarty A, Tranguch S, Daikoku T, Jensen K, Furneaux H and Dey SK. MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:15144-15149.

Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A and Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 2003;**253**:269-285.

Chou CS, MacCalman CD and Leung PC. Differential effects of gonadotropin-releasing hormone I and II on the urokinase-type plasminogen

activator/plasminogen activator inhibitor system in human decidual stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;**88**:3806-3815.

Christian M, Zhang X, Schneider-Merck T, Unterman TG, Gellersen B, White JO and Brosens JJ. Cyclic AMP-induced forkhead transcription factor, FKHR, cooperates with CCAAT/enhancer-binding protein beta in differentiating human endometrial stromal cells. *J Biol Chem* 2002;**277**:20825-20832.

Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR and Goodman RH. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 1993;**365**:855-859.

Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G and Li BF. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* 1997;**277**:1996-2000.

Clark IM, Swingler TE and Young DA. Acetylation in the regulation of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases gene expression. *Front Biosci* 2007;**12**:528-535.

Cohen M, Meisser A and Bischof P. Metalloproteinases and human placental invasiveness. *Placenta* 2006;**27**:783-793.

Cohn DE, Fabbri M, Valeri N, Alder H, Ivanov I, Liu CG, Croce CM and Resnick KE. Comprehensive miRNA profiling of surgically staged endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2010;**202**:656.e1-656.e8.

Condon JC, Jeyasuria P, Faust JM, Wilson JW and Mendelson CR. A decline in the levels of progesterone receptor coactivators in the pregnant uterus at term may antagonize progesterone receptor function and contribute to the initiation of parturition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**:9518-9523.

Coutifaris C, Kao LC, Sehdev HM, Chin U, Babalola GO, Blaschuk OW and Strauss JF,3rd. E-cadherin expression during the differentiation of human trophoblasts. *Development* 1991;**113**:767-777.

Couture JF and Trievel RC. Histone-modifying enzymes: encrypting an enigmatic epigenetic code. *Curr Opin Struct Biol* 2006;**16**:753-760.

Curry TE, Jr and Osteen KG. Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. *Biol Reprod* 2001;**64**:1285-1296.

Das SK, Wang XN, Paria BC, Damm D, Abraham JA, Klagsbrun M, Andrews GK and Dey SK. Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse

uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development* 1994;**120**:1071-1083.

Di Nezza LA, Misajon A, Zhang J, Jobling T, Quinn MA, Ostor AG, Nie G, Lopata A and Salamonsen LA. Presence of active gelatinases in endometrial carcinoma and correlation of matrix metalloproteinase expression with increasing tumor grade and invasion. *Cancer* 2002;**94**:1466-1475.

Diaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martinez-Conejero JA, Esteban FJ, Alama P, Pellicer A and Simon C. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril* 2011;**95**:50-60, 60.e1-15.

Dimitriadis E, Stoikos C, Baca M, Fairlie WD, McCoubrie JE and Salamonsen LA. Relaxin and prostaglandin E(2) regulate interleukin 11 during human endometrial stromal cell decidualization. *J Clin Endocrinol Metab* 2005a;**90**:3458-3465.

Dimitriadis E, White CA, Jones RL and Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update* 2005b;**11**:613-630.

Dokras A, Coffin J, Field L, Frakes A, Lee H, Madan A, Nelson T, Ryu GY, Yoon JG and Madan A. Epigenetic regulation of maspin expression in the human placenta. *Mol Hum Reprod* 2006;**12**:611-617.

Dolinoy DC. Epigenetic gene regulation: early environmental exposures. *Pharmacogenomics* 2007;**8**:5-10.

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

Douglas DA, Shi YE and Sang QA. Computational sequence analysis of the tissue inhibitor of metalloproteinase family. *J Protein Chem* 1997;**16**:237-255.

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

Elzer KL, Heitzman DA, Chernin MI and Novak JF. Differential effects of serine proteases on the migration of normal and tumor cells: implications for tumor microenvironment. *Integr Cancer Ther* 2008;**7**:282-294.

- Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008;**358**:1148-1159.
- Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V, De Marchis ML, Nervi C and Bozzoni I. A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* 2005;**123**:819-831.
- Fuks F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr Opin Genet Dev* 2005;**15**:490-495.
- Gaide Chevronnay HP, Cornet PB, Delvaux D, Lemoine P, Courtoy PJ, Henriot P and Marbaix E. Opposite regulation of transforming growth factors-beta2 and -beta3 expression in the human endometrium. *Endocrinology* 2008;**149**:1015-1025.
- Galan A, Herrer R, Remohi J, Pellicer A and Simon C. Embryonic regulation of endometrial epithelial apoptosis during human implantation. *Hum Reprod* 2000;**15 Suppl 6**:74-80.
- Ganef C, Chatel G, Munaut C, Frankenne F, Foidart JM and Winkler R. The IGF system in in-vitro human decidualization. *Mol Hum Reprod* 2009;**15**:27-38.
- Gao F, Chen XL, Wei P, Gao HJ and Liu YX. Expression of matrix metalloproteinase-2, tissue inhibitors of metalloproteinase-1, -3 at the implantation site of rhesus monkey during the early stage of pregnancy. *Endocrine* 2001;**16**:47-54.
- Gardiner-Garden M and Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 1987;**196**:261-282.
- Garrido-Gomez T, Dominguez F, Lopez JA, Camafeita E, Quinonero A, Martinez-Conejero JA, Pellicer A, Conesa A and Simon C. Modeling human endometrial decidualization from the interaction between proteome and secretome. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;**96**:706-716.
- Gellersen B, Brosens IA and Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin Reprod Med* 2007;**25**:445-453.
- Gellersen B and Brosens J. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol* 2003;**178**:357-372.
- Gendron RL, Paradis H, Hsieh-Li HM, Lee DW, Potter SS and Markoff E. Abnormal uterine stromal and glandular function associated with maternal reproductive defects in Hoxa-11 null mice. *Biol Reprod* 1997;**56**:1097-1105.

- Ghabreau L, Roux JP, Niveleau A, Fontaniere B, Mahe C, Mokni M and Frappart L. Correlation between the DNA global methylation status and progesterone receptor expression in normal endometrium, endometrioid adenocarcinoma and precursors. *Virchows Arch* 2004;**445**:129-134.
- Giess R, Tanasescu I, Steck T and Sendtner M. Leukaemia inhibitory factor gene mutations in infertile women. *Mol Hum Reprod* 1999;**5**:581-586.
- Glasser SR and Julian J. Intermediate filament protein as a marker of uterine stromal cell decidualization. *Biol Reprod* 1986;**35**:463-474.
- Glozak MA, Sengupta N, Zhang X and Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 2005;**363**:15-23.
- Goffin F, Munaut C, Frankenne F, Perrier D'Hauterive S, Beliard A, Fridman V, Nervo P, Colige A and Foidart JM. Expression pattern of metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in cycling human endometrium. *Biol Reprod* 2003;**69**:976-984.
- Goldman S and Shalev E. The role of the matrix metalloproteinases in human endometrial and ovarian cycles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;**111**:109-121.
- Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X, Golic KG, Jacobsen SE and Bestor TH. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* 2006;**311**:395-398.
- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H and Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;**74**:111-122.
- Gonzalez G and Behringer RR. Dicer is required for female reproductive tract development and fertility in the mouse. *Mol Reprod Dev* 2009;**76**:678-688.
- Gonzalez RR, Leary K, Petrozza JC and Leavis PC. Leptin regulation of the interleukin-1 system in human endometrial cells. *Mol Hum Reprod* 2003;**9**:151-158.
- Graham CH. Effect of transforming growth factor-beta on the plasminogen activator system in cultured first trimester human cytotrophoblasts. *Placenta* 1997;**18**:137-143.
- Graham CH and Lala PK. Mechanisms of placental invasion of the uterus and their control. *Biochem Cell Biol* 1992;**70**:867-874.

Grewal S, Carver J, Ridley AJ and Mardon HJ. Human endometrial stromal cell rho GTPases have opposing roles in regulating focal adhesion turnover and embryo invasion in vitro. *Biol Reprod* 2010;**83**:75-82.

Grewal S, Carver JG, Ridley AJ and Mardon HJ. Implantation of the human embryo requires Rac1-dependent endometrial stromal cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**:16189-16194.

Guo SW. The endometrial epigenome and its response to steroid hormones. *Mol Cell Endocrinol* 2011:.

Hammond SM. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett* 2005;**579**:5822-5829.

Harfe BD. MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 2005;**15**:410-415.

Harris KS, Zhang Z, McManus MT, Harfe BD and Sun X. Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:2208-2213.

Hawkins SM and Matzuk MM. The menstrual cycle: basic biology. *Ann N Y Acad Sci* 2008;**1135**:10-18.

Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E and Iwata K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* 1992;**298**:29-32.

Herceg Z and Vaissiere T. Epigenetic mechanisms and cancer: an interface between the environment and the genome. *Epigenetics* 2011;**6**:804-819.

Hever A, Roth RB, Hevezi P, Marin ME, Acosta JA, Acosta H, Rojas J, Herrera R, Grigoriadis D, White E *et al.* Human endometriosis is associated with plasma cells and overexpression of B lymphocyte stimulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:12451-12456.

Higuchi T, Kanzaki H, Nakayama H, Fujimoto M, Hatayama H, Kojima K, Iwai M, Mori T and Fujita J. Induction of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 gene expression during in vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 1995;**136**:4973-4981.

Hockly E, Richon VM, Woodman B, Smith DL, Zhou X, Rosa E, Sathasivam K, Ghazi-Noori S, Mahal A, Lowden PA *et al.* Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**:2041-2046.

Hoefig KP, Thorns C, Roehle A, Kaehler C, Wesche KO, Repsilber D, Branke B, Thiere M, Feller AC and Merz H. Unlocking pathology archives for microRNA-profiling. *Anticancer Res* 2008;**28**:119-123.

Hong X, Luense LJ, McGinnis LK, Nothnick WB and Christenson LK. Dicer1 is essential for female fertility and normal development of the female reproductive system. *Endocrinology* 2008;**149**:6207-6212.

Horcajadas JA, Riesewijk A, Martin J, Cervero A, Mosselman S, Pellicer A and Simon C. Global gene expression profiling of human endometrial receptivity. *J Reprod Immunol* 2004;**63**:41-49.

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

Huang JR, Tseng L, Bischof P and Janne OA. Regulation of prolactin production by progestin, estrogen, and relaxin in human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 1987;**121**:2011-2017.

Hull ML, Escareno CR, Godsland JM, Doig JR, Johnson CM, Phillips SC, Smith SK, Tavaré S, Print CG and Charnock-Jones DS. Endometrial-peritoneal interactions during endometriotic lesion establishment. *Am J Pathol* 2008;**173**:700-715.

Hutvagner G. Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation. *FEBS Lett* 2005;**579**:5850-5857.

Hutvagner G, Simard MJ, Mello CC and Zamore PD. Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* 2004;**2**:E98.

Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 2009;**326**:1216-1219.

Ihnatovych I, Livak M, Reed J, de Lanerolle P and Strakova Z. Manipulating actin dynamics affects human in vitro decidualization. *Biol Reprod* 2009;**81**:222-230.

Iizuka M and Smith MM. Functional consequences of histone modifications. *Curr Opin Genet Dev* 2003;**13**:154-160.

Ingber D. Extracellular matrix and cell shape: potential control points for inhibition of angiogenesis. *J Cell Biochem* 1991;**47**:236-241.

Irving JA and Lala PK. Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF-beta, IGF-II, and IGFBP-1. *Exp Cell Res* 1995;**217**:419-427.

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

Irwin JC, Suen LF, Faessen GH, Popovici RM and Giudice LC. Insulin-like growth factor (IGF)-II inhibition of endometrial stromal cell tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and IGF-binding protein-1 suggests paracrine interactions at the decidua:trophoblast interface during human implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**:2060-2064.

Iwahashi M, Muragaki Y, Ooshima A, Yamoto M and Nakano R. Alterations in distribution and composition of the extracellular matrix during decidualization of the human endometrium. *J Reprod Fertil* 1996;**108**:147-155.

Jenuwein T and Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001;**293**:1074-1080.

Jeon HW and Lee YM. Inhibition of histone deacetylase attenuates hypoxia-induced migration and invasion of cancer cells via the restoration of RECK expression. *Mol Cancer Ther* 2010;**9**:1361-1370.

Jirtle RL and Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* 2007;**8**:253-262.

Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2002;**1**:287-299.

Juliano PB, Blotta MH and Altemani AM. ICAM-1 is overexpressed by villous trophoblasts in placentitis. *Placenta* 2006;**27**:750-757.

Kamijo T, Rajabi MR, Mizunuma H and Ibuki Y. Biochemical evidence for autocrine/paracrine regulation of apoptosis in cultured uterine epithelial cells during mouse embryo implantation in vitro. *Mol Hum Reprod* 1998;**4**:990-998.

Kaneko F, Saito H, Saito Y, Wakabayashi K, Nakamoto N, Tada S, Suzuki H, Tsunematsu S, Kumagai N and Ishii H. Down-regulation of matrix-invasive potential of human liver cancer cells by type I interferon and a histone deacetylase inhibitor sodium butyrate. *Int J Oncol* 2004;**24**:837-845.

- Kasinski AL and Slack FJ. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2011;**11**:849-864.
- Kelly RW, King AE and Critchley HO. Cytokine control in human endometrium. *Reproduction* 2001;**121**:3-19.
- Kessenbrock K, Plaks V and Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010;**141**:52-67.
- Kim HJ and Bae SC. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am J Transl Res* 2011;**3**:166-179.
- Kim JJ, Buzzio OL, Li S and Lu Z. Role of FOXO1A in the regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 in human endometrial cells: interaction with progesterone receptor. *Biol Reprod* 2005;**73**:833-839.
- Kim JJ, Taylor HS, Lu Z, Ladhani O, Hastings JM, Jackson KS, Wu Y, Guo SW and Fazleabas AT. Altered expression of HOXA10 in endometriosis: potential role in decidualization. *Mol Hum Reprod* 2007;**13**:323-332.
- Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;**6**:376-385.
- Kim VN. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol* 2004;**14**:156-159.
- Kloosterman B, Vorst O, Hall RD, Visser RG and Bachem CW. Tuber on a chip: differential gene expression during potato tuber development. *Plant Biotechnol J* 2005;**3**:505-519.
- Kong YW, Cannell IG, de Moor CH, Hill K, Garside PG, Hamilton TL, Meijer HA, Dobbyn HC, Stoneley M, Spriggs KA *et al*. The mechanism of micro-RNA-mediated translation repression is determined by the promoter of the target gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**:8866-8871.
- Kornberg RD. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 1974;**184**:868-871.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007;**128**:693-705.
- Kozomara A and Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2011;**39**:D152-7.

Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M *et al.* Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 2005;**37**:495-500.

Krikun G and Lockwood CJ. Steroid hormones, endometrial gene regulation and the Sp1 family of proteins. *J Soc Gynecol Investig* 2002;**9**:329-334.

Krikun G, Schatz F, Mackman N, Guller S, Demopoulos R and Lockwood CJ. Regulation of tissue factor gene expression in human endometrium by transcription factors Sp1 and Sp3. *Mol Endocrinol* 2000;**14**:393-400.

Krusche CA, Vloet AJ, Classen-Linke I, von Rango U, Beier HM and Alfer J. Class I histone deacetylase expression in the human cyclic endometrium and endometrial adenocarcinomas. *Hum Reprod* 2007;**22**:2956-2966.

Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M and Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005;**438**:685-689.

Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR and Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 2007;**39**:673-677.

Kuo MH and Allis CD. In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods* 1999;**19**:425-433.

Kuo MH and Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 1998;**20**:615-626.

Kuokkanen S, Chen B, Ojalvo L, Benard L, Santoro N and Pollard JW. Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium. *Biol Reprod* 2010;**82**:791-801.

Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dunphy BC, Li TC and Zhang X. The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod* 1997;**12**:569-574.

Lala PK, Chatterjee-Hasrouni S, Kearns M, Montgomery B and Colavincenzo V. Immunobiology of the feto-maternal interface. *Immunol Rev* 1983;**75**:87-116.

Lam EW, Shah K and Brosens JJ. The diversity of sex steroid action: the role of micro-RNAs and FOXO transcription factors in cycling endometrium and cancer. *J Endocrinol* 2012;**212**:13-25.

Lash GE, Otun HA, Innes BA, Bulmer JN, Searle RF and Robson SC. Inhibition of trophoblast cell invasion by TGFB1, 2, and 3 is associated with a decrease in active proteases. *Biol Reprod* 2005;**73**:374-381.

Leco KJ, Apte SS, Taniguchi GT, Hawkes SP, Khokha R, Schultz GA and Edwards DR. Murine tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (Timp-4): cDNA isolation and expression in adult mouse tissues. *FEBS Lett* 1997;**401**:213-217.

Leco KJ, Edwards DR and Schultz GA. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 is the major metalloproteinase inhibitor in the decidualizing murine uterus. *Mol Reprod Dev* 1996;**45**:458-465.

Lee RC, Feinbaum RL and Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;**75**:843-854.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;**425**:415-419.

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH and Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004;**23**:4051-4060.

Lengauer C, Kinzler KW and Vogelstein B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;**94**:2545-2550.

Lessey BA. Integrins and the endometrium: new markers of uterine receptivity. *Ann N Y Acad Sci* 1997;**828**:111-122.

Lessey BA and Castelbaum AJ. Integrins and implantation in the human. *Rev Endocr Metab Disord* 2002;**3**:107-117.

Lessey BA, Castelbaum AJ, Buck CA, Lei Y, Yowell CW and Sun J. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil Steril* 1994a;**62**:497-506.

Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, Buck CA, Schinnar R, Bilker W and Strom BL. Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994b;**79**:643-649.

Lewis BP, Burge CB and Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;**120**:15-20.

- Li E, Beard C and Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 1993;**366**:362-365.
- Lim H, Ma L, Ma WG, Maas RL and Dey SK. Hoxa-10 regulates uterine stromal cell responsiveness to progesterone during implantation and decidualization in the mouse. *Mol Endocrinol* 1999;**13**:1005-1017.
- Lindner HH. Analysis of histones, histone variants, and their post-translationally modified forms. *Electrophoresis* 2008;**29**:2516-2532.
- Littlefield BA. Plasminogen activators in endometrial physiology and embryo implantation: a review. *Ann N Y Acad Sci* 1991;**622**:167-175.
- Liu C, Kelnar K, Liu B, Chen X, Calhoun-Davis T, Li H, Patrawala L, Yan H, Jeter C, Honorio S *et al*. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med* 2011;**17**:211-215.
- Liu T, Kuljaca S, Tee A and Marshall GM. Histone deacetylase inhibitors: multifunctional anticancer agents. *Cancer Treat Rev* 2006;**32**:157-165.
- Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;**25**:402-408.
- Lockwood CJ, Krikun G, Hausknecht VA, Papp C and Schatz F. Matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase inhibitor expression in endometrial stromal cells during progestin-initiated decidualization and menstruation-related progestin withdrawal. *Endocrinology* 1998;**139**:4607-4613.
- Lockwood CJ, Krikun G, Hickey M, Huang SJ and Schatz F. Decidualized human endometrial stromal cells mediate hemostasis, angiogenesis, and abnormal uterine bleeding. *Reprod Sci* 2009;**16**:162-170.
- Lockwood CJ, Oner C, Uz YH, Kayisli UA, Huang SJ, Buchwalder LF, Murk W, Funai EF and Schatz F. Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) expression in preeclamptic decidua and MMP9 induction by tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in human first trimester decidual cells. *Biol Reprod* 2008;**78**:1064-1072.
- Lopez-Otin C and Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2007;**7**:800-808.
- Luense LJ, Carletti MZ and Christenson LK. Role of Dicer in female fertility. *Trends Endocrinol Metab* 2009;**20**:265-272.

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF and Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997;**389**:251-260.

Luo X, Xu J and Chegini N. The expression of Smads in human endometrium and regulation and induction in endometrial epithelial and stromal cells by transforming growth factor-beta. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;**88**:4967-4976.

Luu TH, Morgan RJ, Leong L, Lim D, McNamara M, Portnow J, Frankel P, Smith DD, Doroshow JH, Wong C *et al.* A phase II trial of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in metastatic breast cancer: a California Cancer Consortium study. *Clin Cancer Res* 2008;**14**:7138-7142.

Mak IY, Brosens JJ, Christian M, Hills FA, Chamley L, Regan L and White JO. Regulated expression of signal transducer and activator of transcription, Stat5, and its enhancement of PRL expression in human endometrial stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;**87**:2581-2588.

Makker A and Singh MM. Endometrial receptivity: clinical assessment in relation to fertility, infertility, and antifertility. *Med Res Rev* 2006;**26**:699-746.

Mantena SR, Kannan A, Cheon YP, Li Q, Johnson PF, Bagchi IC and Bagchi MK. C/EBPbeta is a critical mediator of steroid hormone-regulated cell proliferation and differentiation in the uterine epithelium and stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:1870-1875.

Marions L and Danielsson KG. Expression of cyclo-oxygenase in human endometrium during the implantation period. *Mol Hum Reprod* 1999;**5**:961-965.

Marks PA, Richon VM and Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst* 2000;**92**:1210-1216.

Matsuzaki S, Canis M, Pouly JL, Rabischong B, Botchorishvili R and Mage G. Relationship between delay of surgical diagnosis and severity of disease in patients with symptomatic deep infiltrating endometriosis. *Fertil Steril* 2006;**86**:1314-6; discussion 1317.

Mazar AP. The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) as a target for the diagnosis and therapy of cancer. *Anticancer Drugs* 2001;**12**:387-400.

McLaughlin J, Cheng D, Singer O, Lukacs RU, Radu CG, Verma IM and Witte ON. Sustained suppression of Bcr-Abl-driven lymphoid leukemia by microRNA mimics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:20501-20506.

- Meseguer M, Aplin JD, Caballero-Campo P, O'Connor JE, Martin JC, Remohi J, Pellicer A and Simon C. Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biol Reprod* 2001;**64**:590-601.
- Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Corica A, Diaz JI, Williams S, Bocca S and Oehninger S. In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod* 2005;**20**:2104-2117.
- Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, Gutkind JS, Burbelo PD, Akiyama SK and Yamada KM. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol* 1995;**131**:791-805.
- Mueller MD, Vigne JL, Vaisse C and Taylor RN. Glycodelin: a pane in the implantation window. *Semin Reprod Med* 2000;**18**:289-298.
- Munro SK, Farquhar CM, Mitchell MD and Ponnampalam AP. Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 2010;**16**:297-310.
- Murchison EP, Stein P, Xuan Z, Pan H, Zhang MQ, Schultz RM and Hannon GJ. Critical roles for Dicer in the female germline. *Genes Dev* 2007;**21**:682-693.
- Murphy CR. Uterine receptivity and the plasma membrane transformation. *Cell Res* 2004;**14**:259-267.
- Murphy CR and Shaw TJ. Plasma membrane transformation: a common response of uterine epithelial cells during the peri-implantation period. *Cell Biol Int* 1994;**18**:1115-1128.
- Murphy G, Knauper V, Cowell S, Hembry R, Stanton H, Butler G, Freije J, Pendas AM and Lopez-Otin C. Evaluation of some newer matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci* 1999;**878**:25-39.
- Myatt SS, Wang J, Monteiro LJ, Christian M, Ho KK, Fusi L, Dina RE, Brosens JJ, Ghaem-Maghami S and Lam EW. Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer. *Cancer Res* 2010;**70**:367-377.
- Nagaraja AK, Andreu-Vieyra C, Franco HL, Ma L, Chen R, Han DY, Zhu H, Agno JE, Gunaratne PH, DeMayo FJ *et al.* Deletion of Dicer in somatic cells of the female reproductive tract causes sterility. *Mol Endocrinol* 2008;**22**:2336-2352.
- Nagase H and Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;**274**:21491-21494.

Nasu Y, Nishida K, Miyazawa S, Komiyama T, Kadota Y, Abe N, Yoshida A, Hirohata S, Ohtsuka A and Ozaki T. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses synovial inflammation and subsequent cartilage destruction in a collagen antibody-induced arthritis mouse model. *Osteoarthritis Cartilage* 2008;**16**:723-732.

Nothnick WB. Disruption of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene results in altered reproductive cyclicity and uterine morphology in reproductive-age female mice. *Biol Reprod* 2000;**63**:905-912.

Nowak SJ and Corces VG. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* 2004;**20**:214-220.

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

Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, Nishimura S, Imamura Y, Kitayama H, Alexander DB *et al*. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 2001;**107**:789-800.

Ohlsson Teague EM, Van der Hoek KH, Van der Hoek MB, Perry N, Wagaarachchi P, Robertson SA, Print CG and Hull LM. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Mol Endocrinol* 2009;**23**:265-275.

Okada H, Nakajima T, Yoshimura T, Yasuda K and Kanzaki H. Microarray analysis of genes controlled by progesterone in human endometrial stromal cells in vitro. *Gynecol Endocrinol* 2003;**17**:271-280.

Okano M, Bell DW, Haber DA and Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999;**99**:247-257.

Osteen KG, Igarashi TM and Bruner-Tran KL. Progesterone action in the human endometrium: induction of a unique tissue environment which limits matrix metalloproteinase (MMP) expression. *Front Biosci* 2003;**8**:d78-86.

Otsuka AY, Andrade PM, Villanova FE, Borra RC and Silva ID. Human endometrium mRNA profile assessed by oligonucleotide three-dimensional microarray. *Gynecol Endocrinol* 2007;**23**:527-534.

Otsuka M, Zheng M, Hayashi M, Lee JD, Yoshino O, Lin S and Han J. Impaired microRNA processing causes corpus luteum insufficiency and infertility in mice. *J Clin Invest* 2008;**118**:1944-1954.

Palomino WA, Fuentes A, Gonzalez RR, Gabler F, Boric MA, Vega M and Devoto L. Differential expression of endometrial integrins and progesterone receptor during the window of implantation in normo-ovulatory women treated with clomiphene citrate. *Fertil Steril* 2005;**83**:587-593.

Pan Q, Luo X, Toloubeydokhti T and Chegini N. The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression. *Mol Hum Reprod* 2007;**13**:797-806.

Panning B and Jaenisch R. RNA and the epigenetic regulation of X chromosome inactivation. *Cell* 1998;**93**:305-308.

Parmar T, Gadkar-Sable S, Savardekar L, Katkam R, Dharma S, Meherji P, Puri CP and Sachdeva G. Protein profiling of human endometrial tissues in the midsecretory and proliferative phases of the menstrual cycle. *Fertil Steril* 2009;**92**:1091-1103.

Perry JK, Lins RJ, Lobie PE and Mitchell MD. Regulation of invasive growth: similar epigenetic mechanisms underpin tumour progression and implantation in human pregnancy. *Clin Sci (Lond)* 2009;**118**:451-457.

Peterson CL and Laniel MA. Histones and histone modifications. *Curr Biol* 2004;**14**:R546-51.

Petracco R, Grechukhina O, Popkhadze S, Massasa E, Zhou Y and Taylor HS. MicroRNA 135 regulates HOXA10 expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;**96**:E1925-33.

Piccinni MP. T cell tolerance towards the fetal allograft. *J Reprod Immunol* 2010;**85**:71-75.

Piekarz RL, Robey R, Sandor V, Bakke S, Wilson WH, Dahmouch L, Kingma DM, Turner ML, Altemus R and Bates SE. Inhibitor of histone deacetylation, depsipeptide (FR901228), in the treatment of peripheral and cutaneous T-cell lymphoma: a case report. *Blood* 2001;**98**:2865-2868.

Pineles BL, Romero R, Montenegro D, Tarca AL, Han YM, Kim YM, Draghici S, Espinoza J, Kusanovic JP, Mittal P *et al.* Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2007;**196**:261.e1-261.e6.

Pitsos M and Kanakas N. The role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of endometriosis. *Reprod Sci* 2009;**16**:717-726.

Pohnke Y, Kempf R and Gellersen B. CCAAT/enhancer-binding proteins are mediators in the protein kinase A-dependent activation of the decidual prolactin promoter. *J Biol Chem* 1999;**274**:24808-24818.

Popovici RM, Irwin JC, Giaccia AJ and Giudice LC. Hypoxia and cAMP stimulate vascular endothelial growth factor (VEGF) in human endometrial stromal cells: potential relevance to menstruation and endometrial regeneration. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;**84**:2245-2248.

Popovici RM, Kao LC and Giudice LC. Discovery of new inducible genes in in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology* 2000;**141**:3510-3513.

Psychoyos A. Uterine receptivity for nidation. *Ann N Y Acad Sci* 1986;**476**:36-42.

Qian K, Hu L, Chen H, Li H, Liu N, Li Y, Ai J, Zhu G, Tang Z and Zhang H. Hsa-miR-222 is involved in differentiation of endometrial stromal cells in vitro. *Endocrinology* 2009;**150**:4734-4743.

Ramathal C, Wang W, Hunt E, Bagchi IC and Bagchi MK. Transcription factor CCAAT enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) regulates the formation of a unique extracellular matrix that controls uterine stromal differentiation and embryo implantation. *J Biol Chem* 2011;**286**:19860-19871.

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

Riddick DH and Kusmik WF. Decidua: a possible source of amniotic fluid prolactin. *Am J Obstet Gynecol* 1977;**127**:187-190.

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

Rinkenberger JL, Cross JC and Werb Z. Molecular genetics of implantation in the mouse. *Dev Genet* 1997;**21**:6-20.

Rodgers WH, Matrisian LM, Giudice LC, Dsupin B, Cannon P, Svitek C, Gorstein F and Osteen KG. Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest* 1994;**94**:946-953.

Rodriguez LG, Wu X and Guan JL. Wound-healing assay. *Methods Mol Biol* 2005;**294**:23-29.

Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, Benjamin H, Shabes N, Tabak S, Levy A *et al.* MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol* 2008;**26**:462-469.

Rudolph-Owen LA, Hulboy DL, Wilson CL, Mudgett J and Matrisian LM. Coordinate expression of matrix metalloproteinase family members in the uterus of normal, matrilysin-deficient, and stromelysin-1-deficient mice. *Endocrinology* 1997;**138**:4902-4911.

Saha RN and Pahan K. HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ* 2006;**13**:539-550.

Sakai N, Maruyama T, Sakurai R, Masuda H, Yamamoto Y, Shimizu A, Kishi I, Asada H, Yamagoe S and Yoshimura Y. Involvement of histone acetylation in ovarian steroid-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *J Biol Chem* 2003;**278**:16675-16682.

Salamonsen LA. Matrix metalloproteinases and endometrial remodelling. *Cell Biol Int* 1994;**18**:1139-1144.

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

Salamonsen LA and Nie G. Proteases at the endometrial-trophoblast interface: their role in implantation. *Rev Endocr Metab Disord* 2002;**3**:133-143.

Salamonsen LA, Shuster S and Stern R. Distribution of hyaluronan in human endometrium across the menstrual cycle. Implications for implantation and menstruation. *Cell Tissue Res* 2001;**306**:335-340.

Salamonsen LA and Woolley DE. Matrix metalloproteinases in normal menstruation. *Hum Reprod* 1996;**11 Suppl 2**:124-133.

Satoh T, Kobayashi K, Yamashita S, Kikuchi M, Sendai Y and Hoshi H. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1) produced by granulosa and oviduct cells enhances in vitro development of bovine embryo. *Biol Reprod* 1994;**50**:835-844.

Satokata I, Benson G and Maas R. Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice. *Nature* 1995;**374**:460-463.

Schatz F, Aigner S, Papp C, Toth-Pal E, Hausknecht V and Lockwood CJ. Plasminogen activator activity during decidualization of human endometrial stromal cells is regulated by plasminogen activator inhibitor 1. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;**80**:2504-2510.

Scherle PA, Ma W, Lim H, Dey SK and Trzaskos JM. Regulation of cyclooxygenase-2 induction in the mouse uterus during decidualization. An event of early pregnancy. *J Biol Chem* 2000;**275**:37086-37092.

Schmidt A, Groth P, Haendler B, Hess-Stumpff H, Kratzschmar J, Seidel H, Thaele M and Weiss B. Gene expression during the implantation window: microarray analysis of human endometrial samples. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2005;**(52)**:139-157.

Sha AG, Liu JL, Jiang XM, Ren JZ, Ma CH, Lei W, Su RW and Yang ZM. Genome-wide identification of micro-ribonucleic acids associated with human endometrial receptivity in natural and stimulated cycles by deep sequencing. *Fertil Steril* 2011;**96**:150-155.e5.

Shahbazian MD and Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* 2007;**76**:75-100.

Sillem M, Prifti S, Neher M and Runnebaum B. Extracellular matrix remodelling in the endometrium and its possible relevance to the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod Update* 1998;**4**:730-735.

Simon C, Piquette GN, Frances A and Polan ML. Localization of interleukin-1 type I receptor and interleukin-1 beta in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;**77**:549-555.

Simon C, Mercader A, Frances A, Gimeno MJ, Polan ML, Remohi J and Pellicer A. Hormonal regulation of serum and endometrial IL-1 alpha, IL-1 beta and IL-1ra: IL-1 endometrial microenvironment of the human embryo at the apposition phase under physiological and supraphysiological steroid level conditions. *J Reprod Immunol* 1996;**31**:165-184.

Simon C, Moreno C, Remohi J and Pellicer A. Cytokines and embryo implantation. *J Reprod Immunol* 1998a;**39**:117-131.

Simon C, Moreno C, Remohi J and Pellicer A. Molecular interactions between embryo and uterus in the adhesion phase of human implantation. *Hum Reprod* 1998b;**13 Suppl 3**:219-32; discussion 233-6.

- Stefani G and Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;**9**:219-230.
- Sterner DE and Berger SL. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;**64**:435-459.
- Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F and Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 1992;**359**:76-79.
- Stoikos CJ, Harrison CA, Salamonsen LA and Dimitriadis E. A distinct cohort of the TGFbeta superfamily members expressed in human endometrium regulate decidualization. *Hum Reprod* 2008;**23**:1447-1456.
- Strickland S, Reich E and Sherman MI. Plasminogen activator in early embryogenesis: enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. *Cell* 1976;**9**:231-240.
- Suh N, Baehner L, Moltzahn F, Melton C, Shenoy A, Chen J and Blelloch R. MicroRNA function is globally suppressed in mouse oocytes and early embryos. *Curr Biol* 2010;**20**:271-277.
- Suzuki M, Yamada T, Kihara-Negishi F, Sakurai T and Oikawa T. Direct association between PU.1 and MeCP2 that recruits mSin3A-HDAC complex for PU.1-mediated transcriptional repression. *Oncogene* 2003;**22**:8688-8698.
- Tabanelli S, Tang B and Gurpide E. In vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;**42**:337-344.
- Tabibzadeh S. Molecular control of the implantation window. *Hum Reprod Update* 1998;**4**:465-471.
- Tabibzadeh S. The signals and molecular pathways involved in human menstruation, a unique process of tissue destruction and remodelling. *Mol Hum Reprod* 1996;**2**:77-92.
- Talhouk RS, Bissell MJ and Werb Z. Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *J Cell Biol* 1992;**118**:1271-1282.
- Tang B, Guller S and Gurpide E. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate induces prolactin expression in stromal cells isolated from human proliferative endometrium. *Endocrinology* 1993;**133**:2197-2203.

Tang F, Kaneda M, O'Carroll D, Hajkova P, Barton SC, Sun YA, Lee C, Tarakhovsky A, Lao K and Surani MA. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev* 2007;**21**:644-648.

Tang M, Mazella J, Zhu HH and Tseng L. Ligand activated relaxin receptor increases the transcription of IGFBP-1 and prolactin in human decidual and endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2005;**11**:237-243.

Tao MH and Freudenheim JL. DNA methylation in endometrial cancer. *Epigenetics* 2010;**5**:491-498.

Tate PH and Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 1993;**3**:226-231.

Taylor HS, Arici A, Olive D and Igarashi P. HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *J Clin Invest* 1998;**101**:1379-1384.

Teague EM, Print CG and Hull ML. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Hum Reprod Update* 2010;**16**:142-165.

Teklenburg G, Salker M, Heijnen C, Macklon NS and Brosens JJ. The molecular basis of recurrent pregnancy loss: impaired natural embryo selection. *Mol Hum Reprod* 2010;**16**:886-895.

Tsang KY, Cheung MC, Chan D and Cheah KS. The developmental roles of the extracellular matrix: beyond structure to regulation. *Cell Tissue Res* 2010;**339**:93-110.

Tsuno A, Nasu K, Yuge A, Matsumoto H, Nishida M and Narahara H. Decidualization attenuates the contractility of eutopic and ectopic endometrial stromal cells: implications for hormone therapy of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;**94**:2516-2523.

Uchida H, Maruyama T, Nagashima T, Asada H and Yoshimura Y. Histone deacetylase inhibitors induce differentiation of human endometrial adenocarcinoma cells through up-regulation of glycodelin. *Endocrinology* 2005;**146**:5365-5373.

Uchida H, Maruyama T, Nagashima T, Ono M, Masuda H, Arase T, Sugiura I, Onouchi M, Kajitani T, Asada H *et al.* Human endometrial cytodifferentiation by histone deacetylase inhibitors. *Hum Cell* 2006;**19**:38-42.

- van Kaam KJ, Delvoux B, Romano A, D'Hooghe T, Dunselman GA and Groothuis PG. Deoxyribonucleic acid methyltransferases and methyl-CpG-binding domain proteins in human endometrium and endometriosis. *Fertil Steril* 2011;**95**:1421-1427.
- Van Lint C, Emiliani S and Verdin E. The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr* 1996;**5**:245-253.
- Vassalli JD, Sappino AP and Belin D. The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest* 1991;**88**:1067-1072.
- Vigushin DM and Coombes RC. Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment. *Anticancer Drugs* 2002;**13**:1-13.
- Wade PA. Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation. *Oncogene* 2001;**20**:3166-3173.
- Walsh CP, Chaillet JR and Bestor TH. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet* 1998;**20**:116-117.
- Wang B, Hsu SH, Majumder S, Kutay H, Huang W, Jacob ST and Ghoshal K. TGFbeta-mediated upregulation of hepatic miR-181b promotes hepatocarcinogenesis by targeting TIMP3. *Oncogene* 2010;**29**:1787-1797.
- Whetstine JR, Ceron J, Ladd B, Dufourcq P, Reinke V and Shi Y. Regulation of tissue-specific and extracellular matrix-related genes by a class I histone deacetylase. *Mol Cell* 2005;**18**:483-490.
- Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, Horvitz HR, Kauppinen S and Plasterk RH. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* 2005;**309**:310-311.
- Wightman B, Ha I and Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993;**75**:855-862.
- Williams AE. Functional aspects of animal microRNAs. *Cell Mol Life Sci* 2008;**65**:545-562.
- Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991;**5**:2145-2154.
- Wu W, Lin Z, Zhuang Z and Liang X. Expression profile of mammalian microRNAs in endometrioid adenocarcinoma. *Eur J Cancer Prev* 2009;**18**:50-55.

Wu Y, Halverson G, Basir Z, Strawn E, Yan P and Guo SW. Aberrant methylation at HOXA10 may be responsible for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 2005;**193**:371-380.

Wu Y, Strawn E, Basir Z, Halverson G and Guo SW. Aberrant expression of deoxyribonucleic acid methyltransferases DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2007;**87**:24-32.

Wurdinger T and Costa FF. Molecular therapy in the microRNA era. *Pharmacogenomics J* 2007;**7**:297-304.

Xue Q, Lin Z, Cheng YH, Huang CC, Marsh E, Yin P, Milad MP, Confino E, Reierstad S, Innes J *et al.* Promoter methylation regulates estrogen receptor 2 in human endometrium and endometriosis. *Biol Reprod* 2007;**77**:681-687.

Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Maekawa R, Taniguchi K, Taketani T, Matsuoka A, Tamura H and Sugino N. DNA methyltransferase expression in the human endometrium: down-regulation by progesterone and estrogen. *Hum Reprod* 2009;**24**:1126-1132.

Yang JS and Lai EC. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol Cell* 2011;**43**:892-903.

Yang WJ, Yang DD, Na S, Sandusky GE, Zhang Q and Zhao G. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem* 2005;**280**:9330-9335.

Yi R, O'Carroll D, Pasolli HA, Zhang Z, Dietrich FS, Tarakhovskiy A and Fuchs E. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nat Genet* 2006;**38**:356-362.

Yoshida M, Kijima M, Akita M and Beppu T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* 1990;**265**:17174-17179.

Yu Q and Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000;**14**:163-176.

Zanger K, Radovick S and Wondisford FE. CREB binding protein recruitment to the transcription complex requires growth factor-dependent phosphorylation of its GF box. *Mol Cell* 2001;**7**:551-558.

Zeng L and Zhou MM. Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* 2002;**513**:124-128.

Zhang B and Farwell MA. microRNAs: a new emerging class of players for disease diagnostics and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2008;**12**:3-21.

Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR *et al.* microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:9136-9141.

Zhang L, Volinia S, Bonome T, Calin GA, Greshock J, Yang N, Liu CG, Giannakakis A, Alexiou P, Hasegawa K *et al.* Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**:7004-7009.

Zhang Y, Diao Z, Su L, Sun H, Li R, Cui H and Hu Y. MicroRNA-155 contributes to preeclampsia by down-regulating CYR61. *Am J Obstet Gynecol* 2010;**202**:466.e1-466.e7.

Zhang Y and Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 2001;**15**:2343-2360.

Zini JM, Murray SC, Graham CH, Lala PK, Kariko K, Barnathan ES, Mazar A, Henkin J, Cines DB and McCrae KR. Characterization of urokinase receptor expression by human placental trophoblasts. *Blood* 1992;**79**:2917-2929.

Zygmunt M, Wienhard J, Boving B, Munstedt K, Braems G, Bohle RM and Lang U. Expression of cell adhesion molecules in the extravillous trophoblast in placentas of preterm pregnancies and in placentas at term. *Zentralbl Gynakol* 1998;**120**:488-492.

VIII. ANEXOS

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL**Revistas Internaciones:**

Título: Inhibition of histone deacetylase activity in human endometrial stromal cells promotes extracellular matrix remodelling and limits embryo invasion.

Autores: Estella C, Herrer I, Atkinson SP, Quiñonero A, Martínez S, Pellicer A, Simón C.

Revista: plos one(1):e30508.

Fecha: 2012

Título. A novel model of human implantation: 3D endometrium-like culture system to study attachment of human trophoblast (Jar) cell spheroids.

Autores: Wang H, Pilla F, Anderson S, Martínez-Escribano S, Herrer I, Moreno-Moya JM, Musti S, Bocca S, Oehninger S, Horcajadas JA.

Revista: Molecular Human Reproduction; 18(1):33-43.

Fecha: 2011

Congresos Internacionales

C. Estella, I. Herrer, A. *Moreno-Moya*, J. Quiñonero, S. Martínez, A. Pellicer and C. Simón. miRNA signature and Dicer requirement during endometrial stromal decidualization.

Tipo de participación: Presentación oral.

Congreso: 28th Annual meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE).

C. Estella, I. Herrer, A. Quiñonero, S. Martínez, A. Pellicer and C. Simón. The endometrial stromal decidualization miRNA signature.

Tipo de participación: Presentación Poster

Congreso: 67th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine (ASRM)

C. Estella, I. Herrer, A. Quiñonero, S. Martínez, A. Pellicer and C. Simón. Inhibition of histone deacetylase activity in human endometrial stromal cells promotes extracellular matrix remodelling and inhibits embryo invasion.

Tipo de participación: Presentación de póster.

Congreso: 67th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine (ASRM)

I

PUBLICACIONES PENDIENTES DE PUBLICACIÓN

Título: miRNA profiling and Dicer requirement during endometrial stromal cell decidualization

Autores: C. Estella, I. Herrero, A. *Moreno-Moya*, J. Quiñero, S. Martínez, A. Pellicer and C. Simón

Revista: plos one (Under review)