



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

TITULO TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO DE UN MODELO DE ADHESIÓN CELULAR “*IN VITRO*”
PARA EL ESTUDIO DE LA ADHESIÓN TROFOBLÁSTICA AL ENDOMETRIO
HUMANO: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA FASE
INICIAL DE LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA**

Memoria presentada por

JUAN IGNACIO IMBAUD MARTÍNEZ

Para optar al grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Director de Tesis: Dr. José Luis Castrillo Díez

Madrid, 2006



El presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido desarrollado en el Laboratorio C-106 del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), en la Facultad de Ciencias (Edificio de Biología) de la Universidad Autónoma de Madrid, España.



Ciudad Universitaria de Cantoblanco

Ctra. de Colmenar km 15

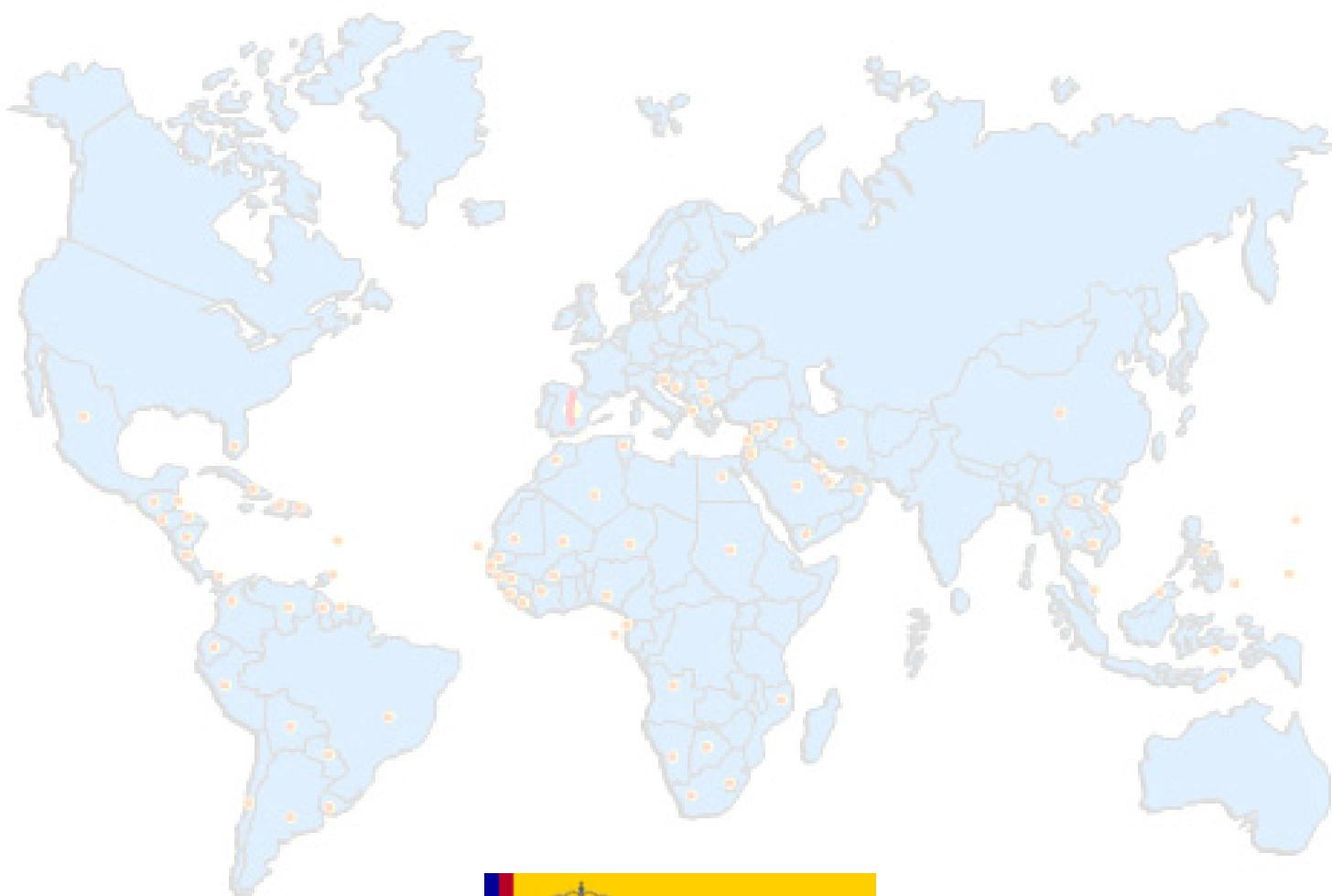
28049 Madrid

<http://www.uam.es>





Agencia Española de
Cooperación Internacional



La ejecución del presente trabajo de investigación fue posible mediante el otorgamiento de una beca MAE-AECI para estudios de Doctorado de la Agencia Española de Cooperación Internacional, Ministerio de Asuntos Exteriores de España.

*Las ciencias tienen las raíces amargas,
pero muy dulces los frutos.*

Aristóteles

*La mayoría de las ideas fundamentales de la ciencia son
esencialmente sencillas y, por regla general pueden ser
expresadas en un lenguaje comprensible para todos.*

Albert Einstein

*La ciencia se compone de errores, que a su vez,
son los pasos hacia la verdad.*

Julio Verne

*Son vanas y están plagadas de errores las ciencias que no han
nacido del experimento, madre de toda certidumbre.*

Leonardo Da Vinci

Preliminares

| | |
|--|------|
| Material Adicional: CD con Tablas Completas de Resultados del Análisis con Microarrays | |
| Listado de Figuras y Tablas | VI |
| Registro de Abreviaturas | VIII |
| Abstract | XI |

Contenido

Apartado 1. Introducción

| | |
|---|----|
| 1. Implantación Embrionaria | 1 |
| 1.1. Aspectos generales de la reproducción humana y medicina de la reproducción | 1 |
| 1.2. Período pre-implantación | 3 |
| 1.2.1. Acondicionamiento endometrial | 3 |
| 1.2.1.1. Regulación endocrina | 3 |
| 1.2.1.2. Regulación autocrina-paracrina | 5 |
| 1.2.2. Receptividad endometrial | 7 |
| 1.2.3. Activación del blastocisto | 8 |
| 1.2.4. Primera fase de la implantación: la Aposición | 9 |
| 1.3. Período de implantación | 10 |
| 1.3.1. Segunda fase de la implantación: la Adhesión | 10 |
| 1.3.2. Tercera fase de la implantación: la Invasión | 11 |
| 1.4. Diferenciación del Trofoblasto | 13 |
| 1.4.1. El coriocarcinoma | 13 |
| 2. Modelos de adhesión Embrión/Trofoblasto-Endometrio | 14 |
| 2.1. Modelos basados en la observación visual | 14 |
| 2.2. Modelos basados en fuerzas centrífugas | 14 |
| 2.3. Modelos basados en microscopía de fuerza atómica | 15 |
| 2.4. Modelos basados en fluorimetría | 15 |
| 3. Generalidades de la expresión génica diferencial | 17 |
| 3.1. Técnicas para el estudio de la expresión génica diferencial | 18 |
| 3.2. Micromatrices de DNA, Biochips o DNA microarrays | 18 |
| 3.2.1. Aplicaciones de las micromatrices de DNA | 19 |
| 3.2.2. Ventajas y desventajas | 20 |

Apartado 2. Objetivos

| | |
|-----------------------------|----|
| 4. Objetivo general | 21 |
| 4.1. Objetivos particulares | 21 |

Apartado 3. Materiales y Métodos

| | |
|---|----|
| 5. Cultivo de células | 22 |
| 5.1. Líneas celulares | 22 |
| 5.2. Condiciones de cultivo | 22 |
| 5.3. Mantenimiento y propagación | 23 |
| 5.4. Congelación | 23 |
| 5.5. Determinación de la viabilidad celular | 23 |
| 5.6. Nivel de seguridad biológica | 24 |
| 6. Transferencia génica retroviral | 24 |
| 6.1. Construcción del vector y la línea celular empaquetadora | 24 |
| 6.2. Producción de sobrenadantes retrovirales | 25 |
| 6.3. Transducción de células con retrovirus | 25 |
| 6.4. Determinación de la eficiencia de la infección retroviral | 25 |
| 6.4.1. Análisis de expresión por microscopía de fluorescencia | 25 |
| 6.4.2. Análisis de expresión por citometría de flujo | 26 |
| 6.5. Separación diferencial de células EGFP positivas por citometría de flujo (Cell Sorting) | 26 |
| 7. Ensayos de adhesión celular | 27 |
| 7.1. Desarrollo de un nuevo modelo de adhesión celular <i>in vitro</i> basado en la citometría de flujo para el estudio de la adhesión de trofoblastos al endometrio humano | 27 |
| 7.2. Recuento absoluto de células por citometría de flujo utilizando tubos BD TruCOUNT™ | 30 |
| 7.3. Modulación de la diferenciación celular | 31 |
| 7.4. Análisis estadístico de los datos | 31 |
| 8. Genómica Funcional: técnicas de análisis de RNA, DNA y Proteínas | 32 |
| 8.1. Aplicación del modelo de adhesión celular trofoblasto-epitelio endometrial desarrollado para análisis de expresión génica | 32 |
| 8.2. Obtención de tejido placentario a término | 34 |
| 8.3. Extracción de RNA total de líneas celulares y de tejidos | 34 |
| 8.3.1. Método de extracción de RNA total con el reactivo TRIzol™ | 35 |
| 8.3.2. Aislamiento de RNA total con el equipo NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel) | 36 |
| 8.4. Cuantificación de ácidos nucleicos | 37 |
| 8.5. Análisis de integridad de los RNAs | 38 |
| 8.5.1. Electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes | 38 |
| 8.5.2. Análisis de RNA por Bioanalizador | 38 |
| 8.6. Digestión enzimática de DNA genómico en muestras de RNA total | 39 |
| 8.7. Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos | 40 |
| 8.7.1. RT-PCR en dos pasos | 40 |
| 8.7.2. RT-PCR en un solo paso | 41 |
| 8.7.3. Diseño de oligonucleótidos | 43 |
| 8.7.4. RT-PCR semicuantitativa | 43 |
| 8.7.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa | 45 |
| 8.7.6. RT-PCR Cuantitativa: análisis en Tiempo Real con el Sistema LightCycler | 46 |

| | |
|---|----|
| 8.7.7. Normalización de los datos de expresión génica | 50 |
| 8.8. Técnicas de análisis de DNA | 51 |
| 8.8.1. Preparación de Vector T | 51 |
| 8.8.2. Ligación de bandas de PCR | 54 |
| 8.8.3. Obtención y análisis de DNA plasmídico | 54 |
| 8.8.3.1. Preparación de bacterias competentes | 55 |
| 8.8.3.2. Transformación | 56 |
| 8.8.3.3. Minilisados de DNA | 56 |
| 8.8.3.4. Midi y Maxi preparaciones de DNA | 57 |
| 8.8.3.5. Análisis de DNA por digestión con enzimas de restricción | 57 |
| 8.8.3.6. Secuenciación de DNA | 58 |
| 8.8.3.7. Análisis informático de las secuencias y búsqueda en bases de datos | 58 |
| 8.9. Técnicas para el análisis de proteínas | 59 |
| 8.9.1. Extracción de proteínas celulares | 59 |
| 8.9.2. Cuantificación de los extractos proteicos | 60 |
| 8.9.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida/SDS | 61 |
| 8.9.4. Análisis de proteínas por Western Blot | 62 |
| 8.9.4.1. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa: Sistema Húmedo | 62 |
| 8.9.4.2. Inmunodetección | 63 |
| 8.9.5. Inmunofluorescencia | 64 |
| 8.9.6. Microscopía óptica y confocal <i>in vivo</i> | 65 |
| 9. Micromatrices de DNA (<i>DNA</i> Microarrays) | 65 |
| 9.1. Análisis de expresión génica con la plataforma GeneChip® de Affymetrix® | 66 |
| 9.2. Comparación de la expresión génica entre las distintas muestras | 68 |
| 9.3. Criterios para el análisis de los resultados y selección de genes candidatos | 70 |
| 9.4. Búsqueda de información en las bases de datos | 71 |
| 9.5. Confirmación de la expresión diferencial de los genes seleccionados | 71 |

Apartado 4. Resultados

Sección 1

| | |
|---|----|
| 10. Diseño de un Nuevo Modelo de Adhesión Celular <i>in vitro</i> Basado en la Citometría de Flujo para el Estudio de la Adhesión de Trofoblastos a Células Epiteliales Endometriales | 72 |
| 10.1. Diseño experimental | 72 |
| 10.2. Estudios preliminares de adhesión | 73 |
| 10.3. Transducción <i>in vitro</i> de las líneas celulares JAR, JEG-3 y 293 con el vector retroviral | 74 |
| 10.4. Separación diferencial de células JAR/G, JEG-3/G y 293/G por Citometría de Flujo | 74 |
| 10.5. Cuantificación de la adhesión trofoblasto-endometrio con el modelo desarrollado | 77 |
| 10.6. Validación del modelo <i>in vitro</i> de adhesión trofoblasto-endometrio diseñado | 80 |
| 10.6.1. Modificación de la adhesión de trofoblastos a células epiteliales endometriales por agentes inductores de la diferenciación celular | 81 |

Sección 2

| | |
|--|-----|
| 11. Genómica funcional | 86 |
| 11.1. Preselección de los genes candidatos para el análisis de expresión génica | 86 |
| 11.2. Análisis de expresión génica | 87 |
| 11.2.1. Obtención de RNA total a partir de células JAR/G y RL95-2 co-cultivadas y separadas diferencialmente por citometría de flujo | 87 |
| 11.2.2. Determinación de la pureza e integridad de los RNAs obtenidos | 87 |
| 11.2.3. Análisis de expresión génica: Tamizaje por RT-PCR semicuantitativa | 90 |
| 11.2.4. Cuantificación de los niveles de expresión de mRNAs por RT-PCR en Tiempo Real | 92 |
| 11.2.4.1. Cuantificación del mRNA de PLA-1 en células JAR/G co-cultivadas | 93 |
| 11.2.4.2. Cuantificación de la proteína PLA-1 por Western Blot | 95 |
| 11.2.4.3. Detección de PLA-1 por Inmunofluorescencia | 96 |
| 11.2.4.4. Cuantificación del mRNA de TEF-5 en células JAR/G co-cultivadas | 97 |
| 11.2.4.5. Cuantificación de la proteína TEF-5 por Western Blot | 97 |
| 11.2.4.6. Detección de TEF-5 por Inmunofluorescencia | 99 |
| 11.2.4.7. Cuantificación del mRNA de IGFBP7/MAC-25 en células RL95-2 | 100 |
| 11.2.4.8. Cuantificación de la proteína IGFBP7/MAC-25 por Western Blot | 102 |
| 11.2.4.9. Detección de IGFBP7/MAC-25 por Inmunofluorescencia | 102 |
| 11.2.4.10. Cuantificación del mRNA de MUC-1 en células RL95-2 co-cultivadas | 103 |
| 11.2.4.11. Cuantificación de la Proteína MUC-1 por Western Blot | 103 |
| 11.2.4.12. Detección de MUC-1 por Inmunofluorescencia | 105 |
| 11.2.4.13. Cuantificación del mRNA de UBA-2 en células RL95-2 Co-cultivadas | 106 |

Sección 3

| | |
|---|-----|
| 12. Identificación de nuevos genes humanos expresados durante la fase de adhesión de células trofoblásticas a células epiteliales endometriales | 108 |
| 12.1. Resultados del protocolo de procesamiento de las muestras | 108 |
| 12.2. Análisis de los controles | 110 |
| 12.3. Comparación de la expresión génica entre las distintas muestras | 111 |
| 12.4. Selección de los mejores genes candidatos | 114 |
| 12.4.1. Resultados de la comparación RL95-2_42hs vs. RL95-2 control | 114 |
| 12.4.1.1. Comprobación de genes candidatos por Inmunofluorescencia | 114 |
| 12.4.2. Resultados de la comparación JAR/G_42hs vs. JAR/G control | 116 |
| 12.4.3. Resultados de la comparación HEC-1A vs. RL95-2 | 116 |
| 12.4.4. Análisis de los Resultados de la Comparación JAR/G vs. JAR | 117 |
| Genes sobreexpresados y reprimidos RL95-2_42hs vs. RL95-2 (Tabla parcial) | 118 |
| Genes sobreexpresados y reprimidos JAR/G_42hs vs. JAR/G (Tabla parcial) | 119 |
| Genes sobreexpresados y reprimidos HEC-1A vs. RL95-2 (Tabla parcial) | 120 |
| Genes sobreexpresados y reprimidos JAR/G vs. JAR (Tabla parcial) | 121 |
| Análisis de datos [HEC-1A vs. RL95-2] vs [RL95-2_42hs vs. RL95-2] (Tabla) | 122 |

Apartado 5. Discusión

| | |
|---|-----|
| 13. Receptividad endometrial e implantación embrionaria | 123 |
| 14. El modelo de adhesión trofoblasto-endometrio basado en la técnica de citometría de flujo | 123 |
| 14.1. Agentes inductores de la diferenciación celular reducen la adhesión de trofoblastos a células epiteliales endometriales | 125 |
| 15. La aplicación del modelo de adhesión trofoblasto-endometrio desarrollado para estudios de expresión génica | 126 |
| 15.1. Genes identificados en células epiteliales endometriales RL95-2 | 127 |
| 15.1.1. Molécula de anti-adhesión MUC-1 | 128 |
| 15.1.2. Molécula IGFBP7/MAC-25 | 130 |
| 15.1.3. Molécula UBA-2 | 131 |
| 15.2. Genes identificados en células trofoblásticas JAR/G | 132 |
| 15.2.1. El Factor Transcripcional PLA-1/SKN-1A | 132 |
| 15.2.2. El Factor Transcripcional TEF-5 | 133 |
| 16. Micromatrices de DNA e Identificación de Nuevos Genes Humanos | 134 |
| 16.1. Rol de las Integrinas en la Implantación Embrionaria | 136 |

Apartado 6. Conclusiones

138

Apartado 7. Bibliografía

139

Listado de Figuras

- Figura 1** Representación esquemática del proceso de fecundación e implantación de embriones en humanos.
- Figura 2** Regulación hormonal y proliferación endometrial durante el ciclo menstrual.
- Figura 3** Fase de aposición u orientación del blastocisto.
- Figura 4** Moléculas de adhesión: ligandos y receptores involucrados en la adhesión del trofoblasto al endometrio.
- Figura 5** Fases finales de la implantación del blastocisto: la adhesión y la invasión.
- Figura 6** Modelos para el estudio de la adhesión de trofoblastos/embriones a células epiteliales endometriales.
- Figura 7** Representación esquemática del vector retroviral LZRS-EGFP
- Figura 8** Representación esquemática del modelo de adhesión *in vitro* de trofoblastos a células epiteliales endometriales.
- Figura 9** Fórmula para el recuento absoluto de células EGFP-positivas con tubos BD TruCOUNT™.
- Figura 10** Aplicación del modelo de adhesión celular trofoblasto-endometrio desarrollado en estudios de la expresión génica.
- Figura 11** Esquema del vector pBluescript® II KS(+) [Stratagene] y la secuencia del Sitio Múltiple de Clonación (MCS).
- Figura 12** Representación esquemática del proceso para el análisis de expresión génica: plataforma GeneChip® Affymetrix.
- Figura 13** Diseño experimental utilizado para mimetizar las interacciones trofoblasto-endometrio durante la implantación.
- Figura 14** Gráficos "tamaño vs. complejidad celular" del análisis de co-cultivos por citometría de flujo.
- Figura 15** Análisis por citometría de flujo del clon de células empaquetadoras PG13/LZRS-EGFP.
- Figura 16** Análisis por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia de las células post infección retroviral.
- Figura 17** Análisis por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia de las células establemente transducidas.
- Figura 18** Patrón de fluorescencia de las células transducidas en mezclas conteniendo células endometriales.
- Figura 19** Determinación de la viabilidad celular por tinción con yoduro de propidio.
- Figura 20** Ejemplo del recuento absoluto de células por citometría de flujo utilizando tubos TruCOUNT™ (BD).
- Figura 21** Cuantificación de la adhesión de células trofoblásticas a células endometriales con el modelo diseñado.
- Figura 22** Cuantificación de la adhesión de células de riñón 293/G sobre células endometriales y trofoblásticas (Control).
- Figura 23** Cuantificación de la adhesión trofoblasto-endometrio por microscopía de fluorescencia confocal *in vivo*.
- Figura 24** Cinética de adhesión de células JAR/G sobre monocapas de células endometriales RL95-2 y HEC-1A.
- Figura 25** Efecto de los agentes inductores de la diferenciación celular sobre la adhesión de células trofoblásticas.
- Figura 26** Análisis por microscopía confocal *in vivo* del efecto producido por diferenciación de las células con foskolina.
- Figura 27** Separación diferencial por citometría de flujo de células JAR/G y RL95-2 co-cultivadas durante 42 horas.
- Figura 28** Análisis de pureza e integridad de los RNAs totales obtenidos.
- Figura 29** Análisis de expresión génica por RT-PCR semicuantitativa.
- Figura 30** Cuantificación relativa de los niveles de expresión de mRNA de genes analizados por densitometría.
- Figura 31** Cuantificación en tiempo real de los niveles de expresión del gen PLA-1 en células JAR/G co-cultivadas.
- Figura 32** Análisis por Western Blot de los niveles de proteína PLA-1 en células JAR/G co-cultivadas.
- Figura 33** Análisis por Inmunofluorescencia de los niveles de proteína PLA-1 en células JAR/G co-cultivadas.
- Figura 34** Cuantificación en tiempo real de los niveles de expresión del gen TEF-5 en células JAR/G co-cultivadas.
- Figura 35** Análisis por Western Blot de los niveles de proteína TEF-5 en células JAR/G co-cultivadas.
- Figura 36** Análisis por Inmunofluorescencia de los niveles de proteína TEF-5 en células JAR/G co-cultivadas.
- Figura 37** Cuantificación en tiempo real de los niveles de expresión de IGFBP7/MAC-25 en células RL95-2 co-cultivadas.
- Figura 38** Análisis por Western Blot de los niveles de proteína IGFBP7/MAC-25 en células RL95-2 co-cultivadas.
- Figura 39** Análisis por Inmunofluorescencia de los niveles de proteína IGFBP7/MAC-25 en células RL95-2 co-cultivadas.
- Figura 40** Cuantificación en tiempo real de los niveles de expresión del gen MUC-1 en células RL95-2 co-cultivadas.
- Figura 41** Análisis por Western Blot de los niveles de proteína MUC-1 en células RL95-2 co-cultivadas.
- Figura 42** Análisis por Inmunofluorescencia de los niveles de proteína MUC-1 en células RL95-2 co-cultivadas.
- Figura 43** Cuantificación en tiempo real de los niveles de expresión del gen UBA-2 en células co-cultivadas.
- Figura 44** Geles de agarosa RNAs purificados, cRNAs sintetizados y cRNAs fragmentados en la preparación de los arrays
- Figura 45** Análisis comparativo de la expresión génica global.
- Figura 46** Comparación de los niveles de expresión diferencial obtenidos por RT-PCR semicuantitativa y con microarrays.
- Figura 47** Microscopía óptica confocal de las integrinas $\alpha 1$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$ en células RL95-2 pre y post co-cultivo con JAR/G.

- Figura 48** Posibles roles de la mucina MUC-1 durante la interacción inicial trofoblasto-endometrio.
- Figura 49** Resultados del estudio global por Microarrays del transcriptoma humano en células endometriales y trofoblásticas

Listado de Tablas

- Tabla 1** Líneas celulares utilizadas.
- Tabla 2** Composición del tampón utilizado para el análisis de células por citometría de flujo.
- Tabla 3** Composición del tampón utilizado para la separación de células por citometría de flujo (*Cell Sorting*).
- Tabla 4** Tipos de co-cultivos de células trofoblásticas y endometriales realizados.
- Tabla 5** Mezcla de reacción para la transcripción reversa (RT) del RNA utilizando la enzima AMV-RT de Promega.
- Tabla 6** Mezcla de reacción para la amplificación (PCR) utilizando la enzima AmpliTaq® DNA polimerasa (Perkin Elmer).
- Tabla 7** Mezcla de reacción para la RT-PCR en un solo paso con el kit *AccessQuick™ RT-PCR System* (Promega).
- Tabla 8** Listado de oligonucleótidos específicos para cada gen utilizados en las reacciones de RT-PCR semicuantitativa.
- Tabla 9** Mezcla de reacción para RT-PCR semicuantitativa con el kit *AccessQuick™ RT-PCR System* (Promega).
- Tabla 10** Listado de oligonucleótidos utilizados para las reacciones de RT-PCR cuantitativa en tiempo real (LightCycler).
- Tabla 11** Mezclas de reacción utilizadas para las RT-PCRs cuantitativas empleando los equipos comerciales *LightCycler RNA Amplification Kit SYBR Green I* (Roche) y *QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR* (QIAGEN).
- Tabla 12** Condiciones de programación del Sistema Light Cycler para el kit *LightCycler RNA Amplification Kit SYBR Green I*.
- Tabla 13** Condiciones de programación del Sistema Light Cycler para el kit *QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR*.
- Tabla 14** Listado de co-cultivos de células trofoblásticas y endometriales realizados.
- Tabla 15** Mezcla de reacción para la digestión enzimática del vector pBluescript® II KS (+) con *EcoRV*.
- Tabla 16** Mezcla de reacción para la adición de las timidinas (T) durante la preparación del Vector T.
- Tabla 17** Mezcla de reacción para la ligación en el vector T de fragmentos de DNA.
- Tabla 18** Composición de las soluciones utilizadas para la preparación de bacterias competentes.
- Tabla 19** Soluciones utilizadas para la purificación de DNA plasmídico mediante mini lisados.
- Tabla 20** Mezcla de reacción para la digestión con enzimas de restricción y liberación de los insertos clonados en Vector T.
- Tabla 21** Composición del tampón de lisis celular RIPA (Sigma) para la extracción de proteínas de células y tejidos.
- Tabla 22** Composición de los geles de resolución y apilamiento para geles de poliacrilamida/SDS.
- Tabla 23** Muestras de RNA total utilizadas para la hibridación con micromatrices de DNA (Microarrays de Affymetrix).
- Tabla 24** Comparaciones de la expresión génica realizadas con el programa GCOS 1.2 (Affymetrix).
- Tabla 25** Medida espectrofotométrica de la concentración y pureza de los RNAs purificados para los microarrays.
- Tabla 26** Medida de concentración y pureza de los cRNA purificados durante la preparación de los microarrays.
- Tabla 27** Valores de los parámetros de calidad para cada uno de los chips (microarrays) analizados.
- Tabla 28.A** Genes sobreexpresados en células epiteliales RL95-2 por interacción durante 42 horas con trofoblastos JAR/G.
- Tabla 28.B** Genes reprimidos en células epiteliales RL95-2 por interacción durante 42 horas con trofoblastos JAR/G.
- Tabla 29.A** Genes sobreexpresados en células trofoblásticas JAR/G por interacción durante 42 horas con RL95-2.
- Tabla 29.B** Genes reprimidos en células trofoblásticas JAR/G por interacción durante 42 horas con RL95-2.
- Tabla 30.A** Genes sobreexpresados en células epiteliales "no adherentes" HEC-1A respecto a las "adherentes" RL95-2.
- Tabla 30.B** Genes reprimidos en células epiteliales "no adherentes" HEC-1A respecto a las "adherentes" RL95-2.
- Tabla 31.A** Genes sobreexpresados en células trofoblásticas transducidas JAR/G respecto a células JAR control.
- Tabla 31.B** Genes reprimidos en células trofoblásticas transducidas JAR/G respecto a células JAR control.
- Tabla 32** Genes sobreexpresados y reprimidos comunes entre las comparativas [R_42h vs. R] y [H vs. R].

*Nota: las tablas completas **28, 29, 30, 31** y **32**, tanto **A** como **B**, se encuentran en el disco compacto (CD) adjunto a esta Tesis.

Registro de Abreviaturas

| | |
|------------------------|--|
| ~ | aproximado |
| 293/G | población de células 293 que expresa establemente el transgen EGFP |
| A | adenina |
| A₂₆₀ | absorbancia medida a una longitud de onda de 260 nm |
| AMV | virus de la mieloblastocis aviar (en inglés, <i>Avian myeloblastosis virus</i>) |
| APS | persulfato de amonio |
| ATCC | Colección Americana de Tipos de Celulares (del inglés, <i>American Type Culture Collection</i>) |
| ATP | adenosina tri fosfato |
| BD | Becton Dickinson |
| BioB | cRNA antisentido biotinilado obtenido de <i>E. coli</i> utilizado como control de hibridación del array |
| BioC | cRNA antisentido biotinilado obtenido de <i>E. coli</i> utilizado como control de hibridación del array |
| BioD | cRNA antisentido biotinilado obtenido de <i>E. coli</i> utilizado como control de hibridación del array |
| BSG | gen que codifica la síntesis de la proteína basiginina (en inglés, <i>basigin</i>) |
| CCD | dispositivo microelectrónico integrado sensible a la luz empleado para captar imágenes [en inglés, <i>charge-coupled device</i> , o sea, dispositivo de cargas (eléctricas) interconectadas] |
| cDNA | DNA complementario |
| col | colaboradores |
| COX-1, 2 | ciclooxigenasas (en inglés, <i>cyclooxygenase</i>) |
| Cre | cRNA antisentido biotinilado obtenido del Bacteriófago P1; control de hibridación usado en los arrays |
| cRNA | RNA complementario |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro |
| DEPC | dietyl pirocarbonato |
| DMSO | dimetil sulfóxido |
| DNA | ácido desoxirribonucléico (del inglés, <i>Deoxyribo-Nucleic Acid</i>) |
| dNTP | desoxirribonucleótido tri fosfato |
| dsDNA | DNA de doble cadena (en inglés, <i>double strand DNA</i>) |
| DTT | di-tio-treitol |
| dTTP | desoxitimidina tri fosfato |
| EDTA | ácido etilen-diamino-tetra-acético |
| EGF | factor de crecimiento epidérmico (del inglés, <i>epidermal growth factor</i>) |
| EGFP | proteína verde fluorescente potenciada (del inglés, <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>) |
| FITC | isotiocianato de fluoresceína (en inglés, <i>fluorescein isothiocyanate</i>) |
| FL1 | filtro de paso de banda 530/30 nm (verde) para detección del láser azul de Argón (488 nm) |
| FL2 | filtro de paso de banda 585/42 nm (amarillo) para detección del láser azul Argón (488 nm) |
| FL3 | filtro de paso largo LP670 nm (rojo) para detección del láser azul de Argón (488 nm) |
| FL4 | filtro de paso de banda 660/13 nm (rojo) para detección del láser rojo de Helio-Neón (633 nm) |
| FSH | hormona folículo estimulante (del inglés, <i>follicle stimulating hormone</i>) |
| FSK | foskolina (en inglés, <i>forskolin</i>) |
| g/L | gramos por litro |
| GaLV | virus de la leucemia de mono de Gibbon (en inglés, <i>Gibbon ape leukemia virus</i>) |
| HB-EGF | factor de crecimiento epidérmico ligado a la heparina (<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>) |
| hCG | hormona gonadotropina coriónica humana (en inglés, <i>human chorionic gonadotropine hormone</i>) |
| HCGβ5 | gen que codifica la síntesis del polipéptido beta 5 de la gonadotropina coriónica humana (del inglés, <i>human chorionic gonadotropin, beta polypeptide 5</i>) |
| HEPES | ácido N-2 hidroxietil primeracina-N'-2 etanosulfónico |
| HGF | factor de crecimiento hepático (del inglés, <i>hepatocyte growth factor</i>) |
| HSPG | cadena de heparan-sulfato de proteoglicanos de la sup. celular (<i>heparan sulfate proteoglycan</i>) |

| | |
|-------------------------------------|--|
| Igepal® | octil-fenil-polietilen-glicol detergente no desnaturizante y no iónico (Igepal® CA-630) |
| IGFBP7/ MAC-25 | gen que codifica la síntesis de la proteína de unión de factores de crecimiento análogos a insulina (del inglés, <i>insulin-like growth factor-binding protein 7</i>) |
| IL | interleuquinas (en inglés, <i>interleukin</i>) |
| IPTG | Isopropil tio-β-D-galactopiranosido |
| IRES | sitio interno de entrada para ribosomas (del inglés, <i>Internal Ribosomal Entry Site</i>) |
| JAR/G | población de células JAR que expresa establemente el transgen EGFP |
| JEG-3/G | población de células JEG-3 que expresa establemente el transgen EGFP |
| K₂HPO₄ | fosfato monoácido de potasio |
| Kb | Kilobase |
| KCl | Cloruro de Potasio |
| KDa | kilo Daltones |
| LB | medio de cultivo Luria Bertani |
| LH | hormona luteinizante (del inglés, <i>luteinizing hormone</i>) |
| LH+11 | 11º día del ciclo menstrual considerado a partir del pico máximo de hormona LH en sangre |
| LH+7 | 7º día del ciclo menstrual considerado a partir del pico máximo de hormona LH en sangre |
| LIF | factor inhibidor de leucemia (del inglés, <i>leukemia inhibitory factor</i>) |
| LTR | secuencia repetitiva terminal larga (del inglés, <i>Long Terminal Repeat</i>) |
| M | molar, forma de expresar la concentración de una solución |
| MCS | sitio múltiple de clonación (del inglés, <i>Multiple Cloning Site</i>) |
| mg | miligramos |
| MIP, MCP | proteínas quimiotácticas de macrófagos y de monocitos (del inglés, <i>major intrinsic protein</i>) |
| ml | mililitros |
| mM | milimolar |
| mm | milímetros |
| MMP | metaloproteasas de matriz (del inglés, <i>matrix metalloproteinase</i>) |
| MOPS | ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico |
| mRNA | RNA mensajero |
| MUC-1 | gen que codifica la síntesis de la glicoproteína mucina 1 de superficie celular (<i>mucin 1</i>) |
| NaCl | cloruro de sodio |
| NaOH | hidróxido de sodio |
| nm | nanometros |
| NTPs | nucleótidos tri fosfato |
| O/N | toda la noche (del inglés, <i>Over Night</i>) |
| OD | densidad óptica (del inglés, <i>Optical Density</i>) |
| OL/ | designación interna del laboratorio para los oligonucleótidos |
| PAI-2 | gen que codifica la síntesis del inhibidor tipo 2 del activador del plasminógeno (del inglés, <i>plasminogen activator inhibitor type 2</i>) |
| PAPP-A | gen que codifica la síntesis de la proteína plasmática A asociada al embarazo (del inglés, <i>pregnancy-associated plasma protein A</i>) |
| pb | pares de bases |
| PBS | tampón fosfato salino (del inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i>) |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| PL-3 | gen que codifica la síntesis de la hormona lactógeno placentario (en inglés, <i>placental lactogen 3</i>) |
| PLA-1 | gen que codifica la síntesis del factor transcripcional POU específico de placenta PLA-1 |
| PMA | forbol-miristato-acetato (del inglés, <i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>) |
| PP14 | gen que codifica la síntesis de la proteína placentaria 14 (del inglés, <i>placental protein 14</i>) |
| RGD | secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp |
| RIPA | tampón de lisis celular para la extracción de proteínas (en inglés, <i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>) |

| | |
|----------------------|---|
| RNA | ácido ribonucleico (del inglés, <i>Ribo-Nucleic Acid</i>) |
| rpm | revoluciones por minuto |
| RT | transcripción en reverso (del inglés, <i>Reverse Transcription</i>) |
| SAPE | estreptavidina (SA) conjugada con ficoeritrina (PE) |
| SDS | dodecil sulfato sódico |
| SDS-PAGE | electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (del inglés, <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>) |
| seg | segundos |
| SFB | Suero Fetal Bovino |
| ssDNA | DNA de cadena simple (del inglés, <i>single strain DNA</i>) |
| T | timidina |
| TA | Temperatura Ambiente |
| T_A | temperatura de anillamiento (en inglés, <i>annealing</i>) |
| TAE | tampón Tris-Acetato-EDTA |
| TBE | tampón Tris-Borato-EDTA |
| TBS | tampón tris salino (en inglés, <i>Tris Buffered Saline</i>) |
| TBS-T | tampón tris salino con Tween 20 (<i>Tris Buffered Saline Tween</i>) |
| TEF-5 | gen que codifica la síntesis del factor 5 potenciador de la transcripción (del inglés, <i>transcriptional enhancer factor 5</i>) |
| TEMED | N N N' N' Tetrametil-etilen-diamino |
| TGFβ | factor transformador del crecimiento beta (del inglés, <i>transforming growth factor, beta</i>) |
| TIMP | inhibidor tisular de metaloproteasas (del inglés, <i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>) |
| T_M | temperatura de disociación o desnaturalización del producto de PCR (en inglés, <i>melting</i>) |
| t-PA | activador del plasminógeno tisular (del inglés, <i>plasminogen activator, tissue</i>) |
| Tritón®X100 | polietilen-glycol-tert-octil-fenil-eter |
| Tween 20 | poli-oxi-etilén-sorbitan-monolaurato |
| U | unidades |
| UBA-2 | gen que codifica la síntesis del activador 2 semejante a ubiquitina (<i>ubiquitin-like activator 2</i>) |
| u-PA | activador del plasminógeno uroquinasa (del inglés, <i>plasminogen activator, urokinase</i>) |
| VEGF | factor de crecimiento del endotelio vascular (del inglés, <i>vascular endothelial growth factor</i>) |
| X-Gal | 5-bromo-3-indolil-β-D-galactopiranosido |
| λ | longitud de onda |
| μg | microgramos |
| μl | microlitros |
| μm | micrometros |

The low efficiency of embryo implantation is one of the major limiting factors in human reproduction. One of the initial events in this process is the adhesion of trophoblast cells to the uterine epithelium. In latest years, researchers made several trials in order to decipher signalling mechanisms occurring during this stage. In this way, numerous factors have been identified as potential markers of endometrial receptivity. Nevertheless, the molecular mechanisms underlying embryo implantation are still poorly understood.

Several systems have been described in the literature for the measurement of embryonic adhesion and studying the roles of potential implantation factors. However, most of them can not be practiced in any laboratory, are difficult to beginners or requires sophisticated and expensive equipment.

In this work, we have developed a new method for studying trophoblast to uterine epithelial cells adhesion forces in humans and, furthermore, analyse environmental and molecular factors surrounding this initial stage of embryo implantation.

The goal of our adhesion trophoblast-endometrium model was the introduction of the EGFP gene in trophoblast type cells (JAR and JEG-3) by retroviral gene transfer, to generate cells that stably express green fluorescent protein (JAR/G and JEG-3/G). Stable expression allowed a rapid detection, analysis and selection of fluorescent cells by flow cytometry after co-culture onto endometrial epithelial monolayers (RL95-2 and HEC-1A). Trophoblast adhesion was quantified at several times. This new trophoblast-endometrial adhesion model also allowed temporal-spatial analysis of several factors involved during embryo implantation, as well as the study of genes and proteins at different cell-cell interaction times.

Using this model, we have performed gene expression analysis of pre-selected genes in order to identify those that are specifically upregulated or downregulated during the initial adhesion process. We have identified three differentially expressed genes in endometrial cells and two in JAR/G trophoblasts after 42 hours co-culture. Mucin MUC-1 and UBA-2 showed to be upregulated in RL95-2 cells while IGFBP7/MAC-25 was repressed. In JAR/G trophoblast cell line the tissue specific transcriptional factor PLA-1 was upregulated and TEF-5 slightly downregulated in response to 42 hours interaction with RL95-2 endometrial cells. Protein level analyses developed by Western Blot and Immunofluorescence demonstrated a narrow correlation with mRNA levels previously quantified by real time RT-PCR.

We have also performed microarray analyses of endometrial (RL95-2 and HEC-1A) and trophoblast (JAR/G) cell lines before and after co-culture. Data analysis allowed us to identify several genes upregulated and downregulated in endometrial (“adherent” vs. “non adherent cells”) and trophoblast cells, probably involved in human embryo implantation, placentation and early pregnancy maintenance.

As normal implantation and placentation are critical for successful pregnancy, a better understanding of the molecular mechanisms responsible for these processes will improve clinicians’ ability to treat disorders as infertility, early pregnancy loss or preeclampsia, and also to increase embryo implantation rates in assisted reproduction techniques as *in vitro* fertilization.

Introducción



1. Implantación Embrionaria

1.1. Aspectos Generales de la Reproducción Humana y Medicina de la Reproducción

Podemos definir a la implantación embrionaria como la fijación del blastocisto al endometrio materno. La baja eficiencia de este proceso es uno de los mayores factores limitantes de la reproducción humana, siendo la infertilidad y la pérdida espontánea del embarazo las principales causantes de los problemas reproductivos observados en miles de parejas.

A pesar de ser una etapa crítica para la supervivencia de la especie, la reproducción humana en general es un proceso relativamente ineficiente. Se ha descrito en la especie humana que en condiciones naturales alrededor del 30% de los embriones consiguen implantar. Es decir, fisiológicamente sólo la tercera parte de los ciclos menstruales considerados fértiles acaban en embarazo (Zinaman y *col.*, 1996; Miller y *col.*, 1980). De todas las concepciones producidas, sólo entre un 50 y un 60% superarán la semana 20 de gestación. Ahora bien, si sólo tenemos en cuenta el total de embarazos que se pierden, alrededor del 75% corresponden a fallos en la implantación y por consiguiente gran parte de ellos no llegarán a ser reconocidos clínicamente como embarazos (Wilcox y *col.*, 1988). Por otra parte, los fallos en la implantación constituyen uno de los principales factores limitantes de las técnicas de reproducción asistida, habiéndose descrito tasas de implantación promedio cercanas al 23%, las cuales se mantienen constantes hasta los 35 años de edad para luego disminuir significativamente de manera lineal a razón del 2,8% por cada año adicional (Spandorfer y *col.*, 2000).

Las causas de esta baja tasa de éxito son originadas de manera equitativa por: (a) el embrión, dado que *in vivo* alrededor del 30% de los blastocistos son morfológicamente anómalos en el momento de la implantación, o bien (b) por un defectuoso diálogo entre embrión y el endometrio materno, ya que el 30% de las pérdidas gestacionales precoces ocurren antes del momento de la menstruación (Wilcox y *col.*, 1988). Este porcentaje de pérdidas es aún mayor en el caso de pacientes sometidas a tratamientos de reproducción asistida (Simón y *col.*, 1999). Sólo entre 20-25% de los embriones transferidos en el útero tras efectuar tratamientos de fecundación *in vitro* (FIV) son capaces de implantar en el endometrio materno y dar lugar a una gestación (Meikle y *col.*, 1999). El principal problema asociado con la tecnología de reproducción asistida son los embarazos múltiples, alcanzándose porcentajes de hasta un 35% de los nacidos vivos. En comparación con embarazos únicos, un embarazo con fetos múltiples incrementa los riesgos tanto para la madre como para el niño. En el caso de la madre existirán riesgos de desordenes hipertensivos, anemia, placenta previa, parto prematuro, la necesidad de realizar cesárea con sus riesgos asociados o muerte. Los mayores riesgos para los niños son aquellos relacionados con la prematuridad, el bajo peso al nacer, anomalías congénitas, y muerte prenatal (Rebar y DeCherney, 2004). No obstante, la transferencia selectiva de un único embrión en mujeres de menos de 36 años de edad, reduce dramáticamente la tasa de embarazos múltiples, alcanzándose tasas de nacimientos vivos no mucho menores a las alcanzadas con transferencias de múltiples embriones (Turín y *col.*, 2004).

En la actualidad es posible controlar y mejorar la mayoría de las fases del proceso reproductor, exceptuando la capacidad del embrión para anidar en el endometrio materno. Debido a las limitaciones éticas y legales existentes para la manipulación y utilización de embriones humanos, y el consiguiente estudio del proceso de implantación, son muy pocos los casos que documentan las primeras semanas

del desarrollo embrionario y gran parte de la información procede de estudios realizados con modelos animales, mayoritariamente en mamíferos. Sin embargo, pese a las similitudes entre las distintas especies de mamíferos, gran parte de estos datos no son extrapolables a nuestra especie (Norwitz y col., 2001). Asimismo, eventos cruciales como la adhesión del blastocisto humano al epitelio uterino nunca han sido observadas. La comprensión de los mecanismos y factores moleculares que intervienen en el proceso de implantación embrionaria incrementaría, sin ninguna duda, la eficacia de los tratamientos en parejas con desórdenes reproductivos tales como la infertilidad o la pérdida temprana de embarazos, siendo por ello de gran interés para clínicos e investigadores.

La fertilización del oocito por el espermatozoide tiene lugar en las trompas de Falopio dentro de las 12-24 horas posteriores a la ovulación. Las primeras etapas del desarrollo y división, desde el óvulo fecundado (cigoto) hasta una masa de 12-16 células (mórula), ocurren a medida que el embrión pasa a través de la trompa, encapsulado en una cubierta protectora no adherente conocida como la zona pelúcida. A los tres días la mórula penetra en la cavidad uterina. La aparición de una cavidad interna llena de líquido dentro de la masa de células marca la transición de mórula a blastocisto y es acompañada por diferenciación celular: las células de la superficie se convierten en trofoblastos (que darán origen a las estructuras extraembrionarias, incluida la placenta), y la masa celular interna dará origen al embrión. Dentro de las 72 horas, contadas a partir de su entrada a la cavidad uterina, tendrá lugar la ruptura y desprendimiento de la zona pelúcida, exponiendo así el embrión su cubierta externa de trofoblastos y sincitiotrofoblastos (células multinucleadas). La implantación ocurre aproximadamente seis o siete días luego de la concepción (fertilización) [Figura 1].

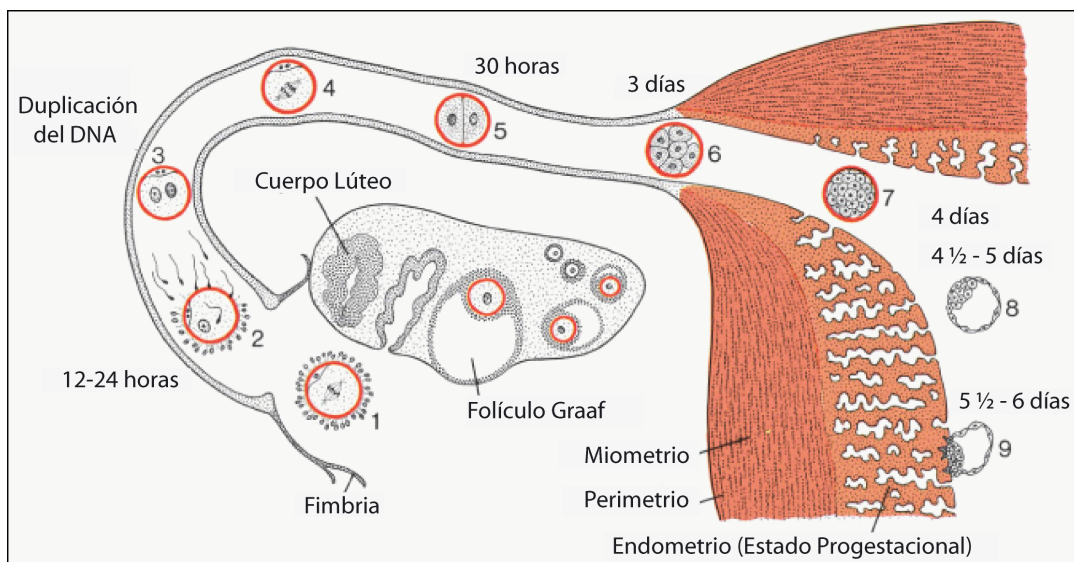


FIGURA 1. Representación esquemática del proceso de fecundación e implantación de embriones en humanos. Fecundación del oocito por el espermatozoide (1 y 2), maduración del embrión en la trompa de Falopio (3 a 6), penetración en la cavidad uterina con eliminación de la zona pelúcida (7 y 8) e implantación en el endometrio (9).

En la medida en que el proceso de implantación humano sea análogo a los eventos que ocurren en diversas especies de primates, podemos postular que no se trata de un hecho puntual, sino probablemente de un proceso que consta de tres fases consecutivas, que tienen lugar durante dos períodos (Enders y Lopata, 1999):

- A. *Período Pre-implantación*: correspondiente a la fase primera de **aposición** u orientación del blastocisto hacia una zona determinada del endometrio.
- B. *Período de Implantación*: que consta de la segunda fase de **adhesión**, donde la cubierta externa del blastocisto formada por células trofoblásticas contacta directamente con el epitelio endometrial, y una tercera fase de **invasión** donde penetra el trofoblasto embrionario en el endometrio materno.

1.2. Período Pre-Implantación

La pre-implantación es la etapa que reúne todos los procesos previos a la implantación, siendo imprescindibles modificaciones tanto del endometrio como del embrión. Durante muchos años se había considerado al endometrio (epitelio luminal, epitelio glandular, estroma y vasos) como la parte pasiva del proceso de implantación. Sin embargo, hoy sabemos que el endometrio es un tejido regulado hormonalmente que participa activamente en la implantación embrionaria, en especial el epitelio endometrial. Este epitelio consiste en una monocapa de células de morfología cuboidal polarizadas que tapizan el interior del útero y proporcionan protección frente a los agentes patógenos, a la vez que permite y facilita la implantación del embrión.

1.2.1. Acondicionamiento Endometrial

El éxito de la implantación, es el resultado final de interacciones moleculares complejas entre el útero hormonalmente pre-acondicionado (receptividad endometrial) y el blastocisto maduro (Enders, 2000). Ha habido en los últimos años, numerosos intentos de los investigadores por descifrar los mecanismos sincronizados de señalización implicados en la maduración del blastocisto y en la preparación del útero (Psychoyos, 1986; Bergh y Navot, 1992). Sin embargo, gran parte de estas interacciones moleculares son aún desconocidas. De los diferentes aspectos del proceso de sincronización, sin duda alguna la regulación hormonal es la más comprendida, y en especial el rol de las hormonas esteroides (Kodaman y Taylor, 2004; Psychoyos, 1976).

1.2.1.1 Regulación Endocrina

La producción de hormona glicoproteica folículo estimulante (FSH) por parte de las células beta de la hipófisis anterior, facilita el desarrollo de los ovarios y estimula el crecimiento folicular y la secreción de estradiol por parte del folículo. Una vez maduro el folículo (folículo de Graaf), la hormona glicoproteica luteinizante (LH) promoverá la ovulación. La aparición de un pico sérico durante la fase ovulatoria de un ciclo menstrual indica que la ovulación ocurrirá en las siguientes 24 horas, induciendo a su vez la producción de estrógenos y progesterona por el cuerpo lúteo (**Figura 2**).

El endometrio, y especialmente el epitelio endometrial, sufren una serie de transformaciones para que se realice con éxito el proceso de implantación. Estos cambios suponen: la disminución progresiva de las mitosis, la aparición en el epitelio endometrial de vacuolas basales ricas en glucógenos, el edema en el estroma, y la reacción decidua e infiltración leucocitaria (Caballero-Campo y col., 2000). Los cambios histológicos son bien marcados. El endometrio se vuelve más edematoso y vascular, las glándulas endometriales muestran una mayor actividad secretora y se desarrollarán pinópodos en la superficie luminal del epitelio (**Figura 2**). Estas transformaciones son debidas a la acción

de los estrógenos (17β -estradiol; regulación endocrina), que permiten que las células endometriales se diferencien y proliferen, creando un microambiente adecuado para la implantación al transformar a las células epiteliales endometriales en mediadoras del diálogo entre el embrión implantatorio y el lecho endometrial. De este modo, el epitelio endometrial transformado convertirá los estímulos hormonales en respuestas autocrina-paracrina a través de citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y proteínas de invasión que actuarán a nivel local en las fases de adhesión e invasión.

Otra hormona esteroide cuyos niveles son bajos durante la fase folicular, la progesterona, se producirá inicialmente en el cuerpo lúteo (ovario) durante las primeras semanas de gestación, y luego en la placenta (a partir de la semana 12), permitiendo así el mantenimiento del feto durante el embarazo, promoviendo el desarrollo glandular mamario e incrementando la temperatura corporal basal. La producción de esta hormona, a su vez, estará promovida inicialmente en el cuerpo lúteo por la gonadotropina coriónica humana (HCG), una hormona glicoproteica específica del embarazo que es secretada en cantidades muy escasas por la placenta desde el momento de la implantación, con un pico o nivel sérico máximo en el tercer mes del embarazo.

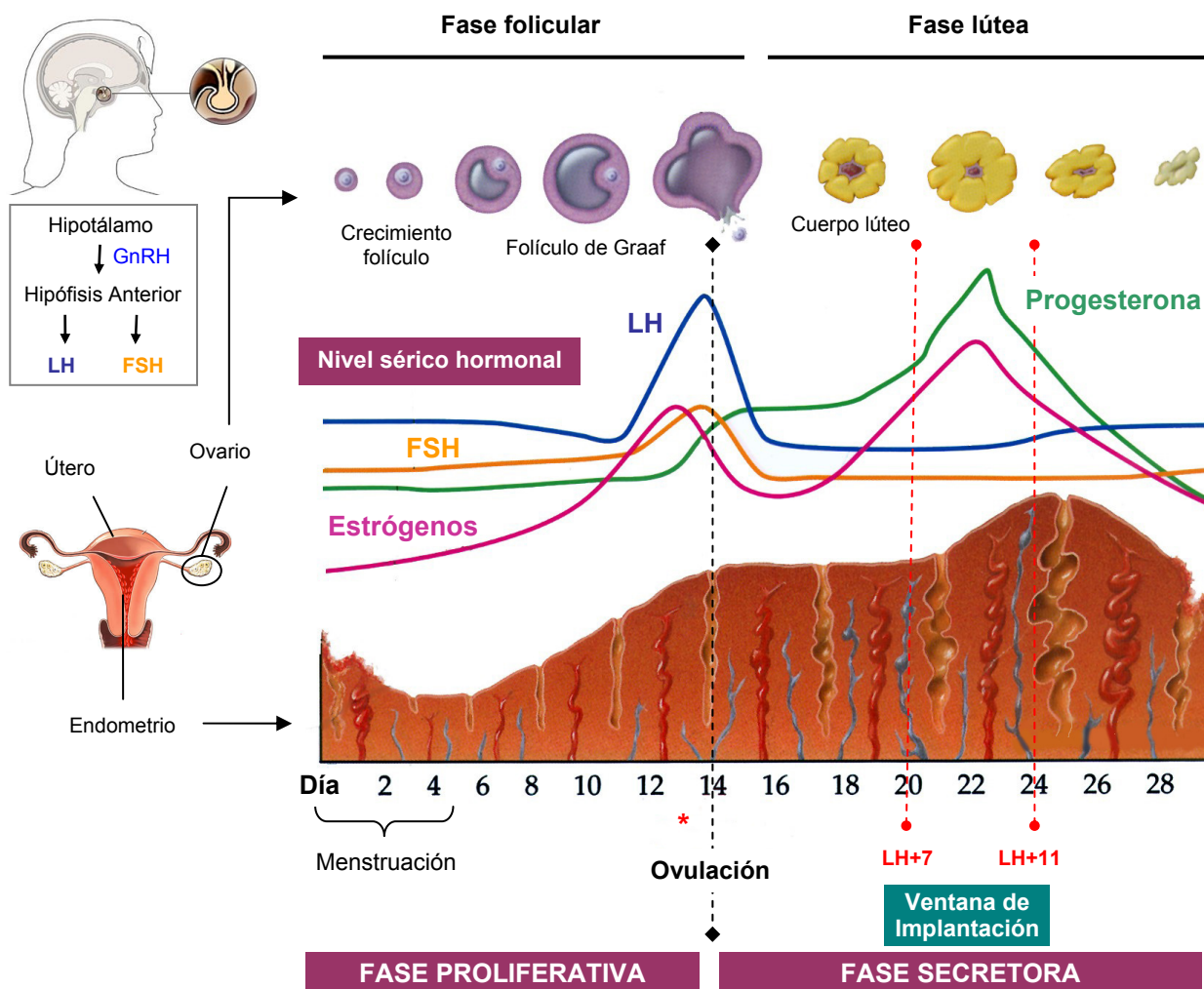


FIGURA 2. Regulación hormonal y proliferación endometrial durante el ciclo menstrual. Biosíntesis de hormonas glicoproteicas LH y FSH en hipófisis anterior, que estimulan la producción de hormonas esteroideas estradiol y progesterona en los folículos ováricos, cuerpo lúteo y placenta. Receptividad endometrial delimitada en el período denominado “ventana de implantación” (LH+7 y LH+11).

1.2.1.2 Regulación Autocrina-Paracrina

Conjuntamente con la regulación de la implantación humana efectuada a nivel sistémico (endocrino) por la presencia y funcionalidad de las hormonas esteroides, existen mecanismos reguladores a nivel local (autocrino-paracrino) en el cual participan tres tipos de moléculas: citoquinas, moléculas de adhesión y proteínas de invasión que actúan principalmente en las fases de adhesión e invasión del blastocisto. Estos mecanismos reguladores tienen lugar mayoritariamente una vez que el embrión alcanza el útero, elimina la membrana o zona pelúcida y se posiciona en una zona determinada del útero conocida como *fundus*, en el tercio superior de la cara posterior del útero. Allí comenzará en diálogo embrión-endometrio en el que estarán involucradas numerosas moléculas (**Figuras 3 y 4**), algunas de ellas postuladas como potenciales marcadores de receptividad endometrial.

Además de la participación de 17β estradiol y progesterona en la proliferación y diferenciación de las células epiteliales endometriales, así como células del estroma (Peyron y *col.*, 1993; Csapo y Pulkkinen, 1978), se han identificado y estudiado numerosos factores relacionados con el proceso de implantación embrionaria:

Citoquinas, Quimioquinas y Factores de Crecimiento: las citoquinas son un grupo de polipéptidos producidos por los linfocitos, monocitos y macrófagos que actúan en mecanismos de defensa inmune y, además, están ampliamente implicadas en funciones biológicas del sistema reproductor (Tabibzadeh, 1994a; Tabibzadeh y *col.*, 1994b). Las *quimioquinas*, polipéptidos de 70-80 aminoácidos (8 a 10 kDa), son una subfamilia de las *citoquinas* que ejercen una atracción selectiva sobre distintos tipos celulares (quimiotaxis), aunque parece ser que la acción de estas moléculas queda restringida a la atracción de linfocitos y otras células inmunitarias. Se dividen en dos subfamilias (Simón y *col.*, 1998a):

- Subfamilia α o quimioquinas CXC: tienen dos cisteínas separadas por un aminoácido. Pertenecen a este grupo la interleuquina 8 (IL-8), la proteína activadora de neutrófilos 1 (NAP-1) y el inositol fosfato 10 (IP-10).
- Subfamilia β o quimioquinas CC: tienen dos cisteínas adyacentes. Entre ellos se encuentran el regulador de la activación de la expresión y secreción de células T (RANTES), las proteínas quimiotácticas de monocitos (MCP-1, -2 y -3) y las proteínas quimiotácticas de macrófagos (MIP-1 α y β).

Las quimioquinas, producidas como respuesta a irritantes exógenos o mediadores endógenos de reacciones inflamatorias, actúan junto a factores de crecimiento facilitando la señalización entre el blastocisto y el útero. Entre estos factores encontramos:

- factor inhibidor de la leucemia (LIF), cuyos niveles en epitelio uterino luminal y glandular se incrementan dramáticamente en la fase secretora media del ciclo menstrual, siendo importante para la implantación y la decidualización (Cullinan y *col.*, 1996). Una secreción disminuida de este factor se ha visto asociada con pérdidas recurrentes del embarazo (Chaouat y *col.*, 1995).
- factores de crecimiento de tipo epidérmico ligado a la heparina (HB-EGF), que se une a receptores de EGF y proteoglicanos de heparán sulfato, ambos en la superficie celular, facilitando el crecimiento, diferenciación e invasión endometrial del trofoblasto (Das y *col.*, 1994; Wang y *col.*, 2000).

- factor de crecimiento hepático (HGF), regulador del crecimiento, motilidad y morfogénesis celular que actúa activando la cascada de señalización de la tirosina kinasa. Regula la profundidad de la invasión de los citotrofbastos en el endometrio (Nasu y *col.*, 2000).
- factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que regula la permeabilidad vascular y el remodelamiento del endometrio. Regulado por las células del epitelio glandular y del estroma a través de las hormonas esteroides y gonadotropinas, incrementa sus niveles en el período peri-implantación y en la fase secretora tardía pre-menstrual. Deficiencias en la angiogénesis se asocian a disfunción menstrual, fallos en la implantación y aborto espontáneo durante el primer trimestre (Nardo, 2005; Athanassiades y *col.*, 1998).

Factores inmunológicos: participan en la inmunosupresión y previenen el posterior rechazo fetal:

- Interleuquinas 10 y 4 (IL-10, IL-4), producida por las células T maternas confinadas y acumuladas en la decidua, contribuyen a la creación de un microentorno para el desarrollo del embrión pre-implantación y el mantenimiento del embarazo (Piccinni, 2002).
- HLA-G, una molécula no clásica del complejo mayor de histocompatibilidad clase Ib (MHC), expresada únicamente en tejido placentario, encontrada principalmente en cantidades crecientes en citotrofbastos a medida que invaden el tejido decidual y las arterias espirales maternas, con actividad inmunosupresora al inducir apoptosis de células T CD8(+) activadas y modular la proliferación de células T CD4(+) (Le Bouteiller, 2004).
- indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO), que degrada el triptofano, sustrato esencial para la activación de linfocitos T y la acción de los macrófagos. Se encuentra sobreexpresada en la ventana de implantación sugiriendo un rol esencial en tolerancia inmune (Lobo y *col.*, 2004).

Proteasas, inhibidores de proteasas y moléculas de adhesión: regulan la invasión del trofoblasto y facilitan la imitación vascular de los trofoblastos:

- metaloproteasas de matriz-2, 9 y 14 (MMP-2, -9 y -14), producidas por los citotrofbastos, contribuyen a la invasividad por degradación de la matriz extracelular (Bai y *col.*, 2005; Huppertz y *col.*, 1998; Librach y *col.*, 1991), reguladas a su vez por inhibidores de proteasas.
- inhibidor tisular de metaloproteasa-1, 2 y 3 (TIMP-1, -2 y -3), controlan la invasión del trofoblasto durante los procesos de implantación y placentación (Bai y *col.*, 2005)
- catepsinas B y L (CTSB y CTSL), proteasas de cisteína reguladas por el inhibidor cistatina C. Estudios en ratón demostraron que ambas son necesarias para el desarrollo embrionario normal y la decidualización uterina (Afonso y *col.*, 1997)
- mucinas (MUC1), componente mayoritario del moco, son glicoproteínas de elevado peso molecular altamente glicosiladas, presentes en la superficie de células epiteliales y también secretadas, con propiedades tanto adherentes como anti-adherentes, con sus mayores niveles durante el período receptivo de la implantación (Hey y *col.*, 1994; Aplin y *col.*, 1998).
- caderinas (E-cad y cad-11), moléculas de adhesión celular con actividades opuestas. E-cad participa en la invasión inicial del citotrofblasto, del cual desaparece luego de la fusión y diferenciación a sincitiotrofbastos o citotrofbastos extraviloso, momento en el cual se incrementan los niveles de cad-11, molécula que actuaría como anclaje dado que también se expresa en las células endometriales (Aplin, 1997).

- integrinas, poco estudiadas en trofoblastos humanos y ampliamente analizadas en endometrio, tienen la capacidad de unirse a ligandos extracelulares [fibronectina, osteopontina, vitronectina y otras secuencias RGD (Arg-Gly-Asp)] formando puentes entre las superficies celulares del embrión y el endometrio materno (Lessey, 1998).

Otros factores:

- ciclooxigenasa endógena e inducible (COX-1 y COX-2), participan en la conversión de ácido araquidónico en prostaglandinas. COX-1 es inhibida por progesterona y estradiol durante la fase secretora durante la implantación, mientras que la producción de COX-2 no es afectada por hormonas esteroides y se restringe al sitio de implantación en presencia del blastocisto. La prostaglandina I₂ producida por acción de COX-2 es ligando esencial del receptor nuclear PPAR δ para la placentación (Marions y Danielsson, 1999; Lim y col., 1999 y 1997).
- tensión de oxígeno, regula el balance entre la proliferación y la diferenciación del trofoblasto, incluyendo la producción de integrinas α 1 β 1 (Red-Horse y col., 2004).

Sin embargo, todo este amplio acumulo de información resulta insuficiente al intentar abordar el estudio de la primera fase de la implantación del embrión, momento en el cual el trofoblasto debe adquirir competencia para la adhesión al epitelio uterino, condición determinante cuyas bases biológicas aún se hallan lejos de ser comprendidas.

1.2.2. Receptividad Endometrial

La existencia de una fase receptiva o “ventana” para la implantación del embrión se conoce en ratas y ratones desde hace más de 30 años (Psychoyos, 1986). En estas especies, la duración de la fase receptiva es inferior a 24 horas. En la mujer, en cambio, este acontecimiento es de una duración aproximada de 4 ó 5 días, que abarcaría desde el día 20 al 24 del ciclo menstrual (Bergh y Navot, 1992). Tomando como punto de referencia el pico (nivel sérico máximo) de hormona luteinizante (LH) en sangre, que precede a la ovulación alrededor de 36 horas, se puede fijar la duración de esta fase receptiva entre los días LH+7 y LH+11 (**Figura 2**).

La adhesión del embrión al epitelio uterino es un fenómeno común a muchas especies animales, aunque no necesariamente implique que los mecanismos moleculares involucrados sean compartidos. En humanos, un gran porcentaje de los embriones transferidos fallan en su implantación, sugiriendo que el útero podría estar imponiendo una barrera selectiva. Si consideramos la proporción relativamente alta de embriones anormales en humanos en relación a otras especies, y la elevada tasa de abortos espontáneos que se producen, podríamos suponer que el endometrio impone un proceso selectivo a favor de aquellos embriones sanos. Por ejemplo, se ha observado una reducción significativa de MUC1, un inhibidor de la adhesión ubicado en la superficie celular, en el endometrio de mujeres con abortos espontáneos recurrentes (Serle y col., 1994; Hey y col., 1995). Ello sugiere que, en conjunto, el proceso de selección es deficiente ya que inicialmente permite la implantación de embriones que no son competentes para su desarrollo a término. En este escenario, un entorno maternal defectuoso o anormal podría permitir la supervivencia de embriones con anomalías intrínsecas predecibles (Aplin, 1997).

Una hipótesis simple del control de la unión embrión-endometrio es la inducción por hormonas esteroides de una o más moléculas de adhesión en la superficie de las células del epitelio endometrial

luminal. Estos receptores podrían interactuar con ligandos conocidos de la superficie trofoectodérmica externa del blastocisto una vez que éste ha perdido su membrana pelúcida (*Hatching*). En este sentido, se han obtenido numerosos avances en cuanto a la composición de ambas superficies celulares en ratón y en humanos. Como resultado de estos estudios ha surgido una segunda hipótesis: la pérdida de moléculas anti-adherentes podría facilitar la unión del embrión al endometrio (Hey y col., 1994; Surveyor y col., 1995). Experimentos recientes sugieren la co-existencia de ambos mecanismos.

1.2.3. Activación del Blastocisto

Como anteriormente hemos mencionado, para que la implantación embrionaria discurra de forma correcta debe producirse el desarrollo sincronizado tanto del endometrio como del embrión, permitiendo así una comunicación adecuada entre ambos.

El embrión alcanza el útero en el período del ciclo menstrual conocido como “ventana de implantación” y sigue su transformación hasta la fase de blastocisto. La aparición de líquido folicular en el interior de la cavidad de la masa celular marca la transición del estadio de mórula a blastocisto. El embrión aún se encuentra protegido por la zona pelúcida. Ésta deberá ser degradada en un proceso que recibe el nombre de eclosión o “hatching”, aproximadamente 6 días posteriores a la fecundación. El mismo blastocisto es capaz de romper la zona pelúcida *in vitro* o en regiones ectópicas, significando que para ello no es necesaria la participación del endometrio, aunque si se ha observado que la eclosión *in vitro* demora un día más en producirse (Simón, 1996). La plasmina es posiblemente el factor lítico principal responsable del mecanismo de degradación de la zona pelúcida. Se trata de una proteína sérica de amplia especificidad, producida a partir del plasminógeno endógeno por acción de los activadores tisular (t-PA) y de tipo uroquinasa (u-PAs) que convierten al plasminógeno inactivo (zimógeno) en plasmina. El efecto de esta proteasa ha sido comparado *in vitro* e *in vivo*, observándose tasas superiores de implantación de embriones de rata en los ensayos realizados *in vivo* como consecuencia de los mayores niveles de u-PA endógeno presentes en el endometrio (Aflalo y col., 2004).

Tras la fertilización, durante los primeros días del desarrollo embrionario, se comienzan a segregar sustancias esenciales para el embarazo, las cuales se pueden detectar en sangre materna. El factor de embarazo temprano (EPF), un homólogo de la chaperonina 10 (cpn10), es secretado por el ovario como respuesta a una señal del embrión, para luego ser generado por el propio embrión tras la implantación. Las funciones que se le atribuyen son inmunosupresoras y se asocia con la proliferación y crecimiento celular (Morton, 1998). Otras sustancias, como la gonadotropina coriónica humana (HCG), no se detecten en la madre en las etapas iniciales del embarazo, aunque se piensa que se comienzan a producir por el propio embrión antes de la implantación, ya que se ha observado en cultivo que es sintetizado por éste 7-8 días tras la fertilización. Uno de los papeles más importantes que juega esta hormona es el luteotrópico, es decir, el manteniendo del cuerpo lúteo durante las primeras semanas del embarazo para promover la producción de progesterona, hormona necesaria para la decidualización endometrial, hasta que la placenta asume el control. También puede regular la producción de otros esteroides en el feto e inhibir la función de los linfocitos, modulando la respuesta inmune, o intervenir en la síntesis y secreción de otras hormonas peptídicas. Asimismo, se conoce que gran parte del aumento de la actividad tiroidea observado durante el embarazo es el resultado de la estimulación por la HCG.

1.2.4. Primera Fase de la Implantación: la Aposición

Tal como se describió anteriormente en 1.1, esta primera fase del proceso de implantación posiblemente ocurra dentro del período de pre-implantación. La **aposisión** consiste en la orientación y unión inestable del embrión a la pared uterina y tiene lugar entre los días 5 ½ y 6 a partir de la concepción. Este proceso suele ocurrir en una zona determinada del endometrio, en el tercio superior de la cara posterior del útero tras la pérdida de la zona pelúcida por acción enzimática y mecánica (ciclos de contracción y expansión del blastocisto). Las células del trofoectodermo (células externas) expresan prolongaciones o extensiones citoplasmáticas, las cuales aparentemente comienzan a penetrar la zona pelúcida por la región donde se producirá su lisis, permitiendo que tras su eliminación entren en contacto directo las células trofoblásticas con el endometrio materno (Gonzales y col., 1996). A partir de este momento, comenzarán las interacciones iniciales entre las microvellosidades de los sincitiotrofoblastos y los pinópodos del epitelio endometrial (microvellosidades ectoplasmáticas que se han transformado en proyecciones aplanadas, siendo estas el marcador morfológico más útil del período de receptividad endometrial) [Figura 3]. A continuación, comenzará la comunicación embrión-endometrio, con una regulación autócrina-parácrina en las que estarán involucrados numerosos factores moleculares (descritos en el apartado 1.2.1.2) que condicionarán el éxito del proceso de implantación del embrión.

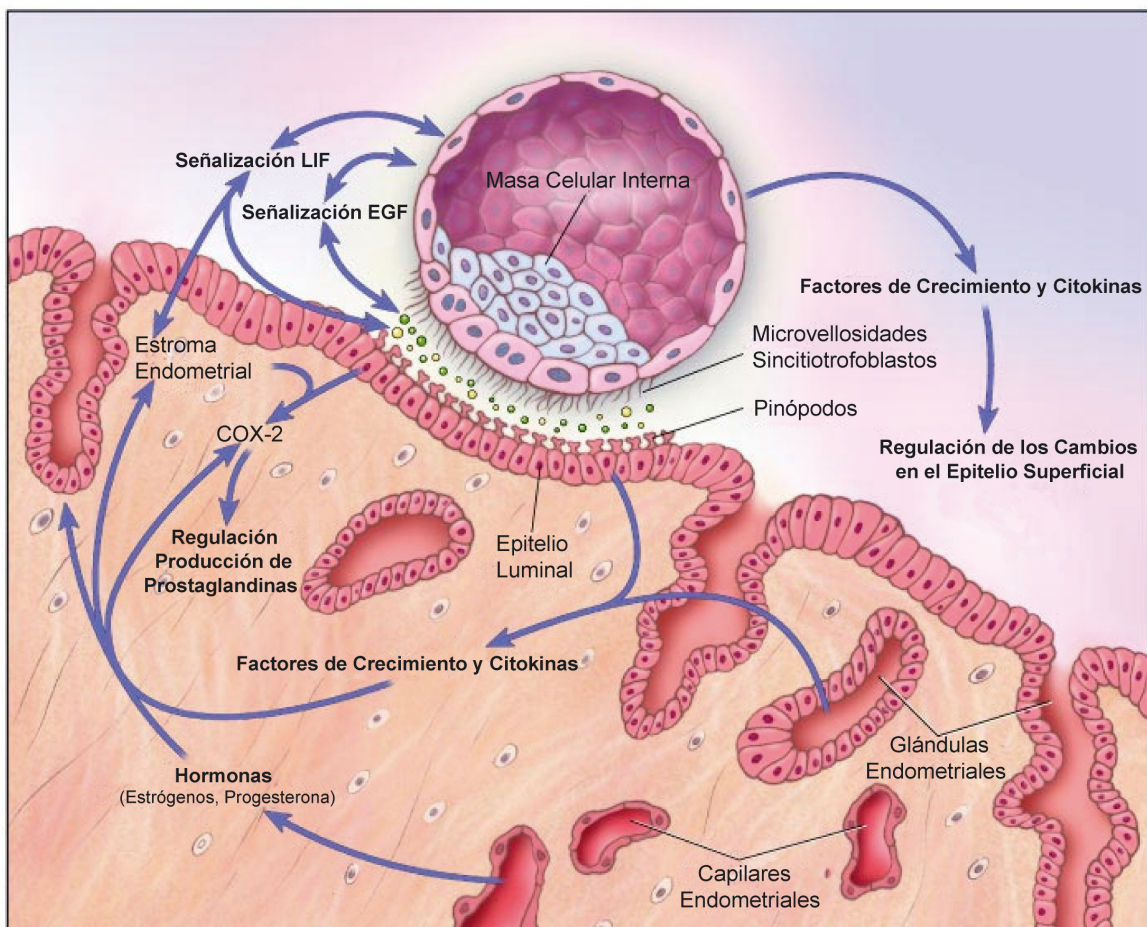


FIGURA 3. Fase de aposición u orientación del blastocisto. Primera fase del proceso de implantación embrionaria que se desarrolla durante el período de pre-implantación (5 ½ - 6 días desde la concepción). Se señalan los procesos y rutas de señalización que se creen son necesarias para la receptividad uterina y la aposición del blastocisto (Norwitz y col., 2001).

La rotura de la zona pelúcida no implica capacidad de adhesión instantánea, sino que esta capacidad deberá ser adquirida en un período que oscila entre minutos y horas. En este aspecto, se cree que señales procedentes del embrión preimplantatorio podrían inducir la producción de citoquinas y/o quimioquinas por el endometrio, que a su vez y mediante la unión a receptores específicos de membrana, activarían la expresión de moléculas de adhesión, como las integrinas, encargadas de mediar la adhesión del blastocisto (Domínguez y *col.*, 2002).

La localización del embrión, por otra parte, será de gran importancia porque determinará la posición de la placenta. La masa celular interna ocupará un lugar específico que varía según cada especie. En humanos, se encuentra en la zona en la que se va a desarrollar el trofoblasto invasor, mientras que en el ratón se encuentra en el lado opuesto.

Esta fase de la implantación embrionaria es la menos estudiada, posiblemente por su escasa duración y la dificultad para determinar su comienzo y/o los factores que inicialmente la regulan.

1.3. Período de Implantación

Para que la implantación pueda realizarse es necesaria la existencia de una relación íntima entre la madre y el embrión cuyo fin último es la formación de la placenta. Este período lo podemos dividir en:

1.3.1. Segunda Fase de la Implantación: la Adhesión

Durante la fase de **adhesión**, se produce el contacto directo entre las células trofoectodérmicas, que forman la cubierta externa del embrión, y la región apical de las células del epitelio endometrial. Aparecen interdigitaciones de las microvellosidades y formación de uniones intercelulares laxas entre el trofoblasto y el epitelio, siendo su mecanismo molecular desconocido. Para ello, se deberán haber producido los cambios moleculares necesarios en ambas superficies celulares, de modo tal que permitan el contacto entre células de orígenes distintos sin que se produzca reconocimiento y rechazo. En este aspecto, se han observado cambios funcionales y morfológicos en el endometrio distintos a los existentes en el mismo período de un ciclo menstrual sin embarazo (Fazleabas y Strakova, 2002).

En cuanto a las moléculas intervinientes, tradicionalmente se ha postulado que la adhesión podría estar mediada por la inducción esteroidea (Aplin, 1997) y/o embrionaria (Simón y *col.*, 1998b) de una o más moléculas de adhesión en la superficie del epitelio endometrial durante la ventana de implantación. Estudios de anatomía molecular realizados en humanos y ratones sugieren que posiblemente estén involucradas interacciones ligando-receptor de distintos tipos, como por ejemplo las cadenas de heparan-sulfato de los proteoglicanos de la superficie celular (HSPG) que interaccionan con proteínas básicas de la superficie celular opuesta, las uniones homologas entre caderinas 11 (Cad-11), uniones de una lectina embrionaria con un glicano endometrial (en ratón glicanos H tipo I), entre dos glicanos (tipo H o Lewis) o bien entre dos tropinas con requerimiento citoplasmático de taspina (Aplin, 1997). Es muy factible también que intervengan los receptores más frecuentes, que son a menudo de la familia de las integrinas y pueden estar presentes tanto en el blastocisto como en el endometrio (**Figura 4**). Estas moléculas podrían considerarse esenciales para la implantación, dado que se conoce desde hace tiempo que la expresión de las integrinas disminuye con la administración de anticonceptivos orales, repercutiendo en la capacidad de adhesión al endometrio (Somkuti y *col.*, 1996).

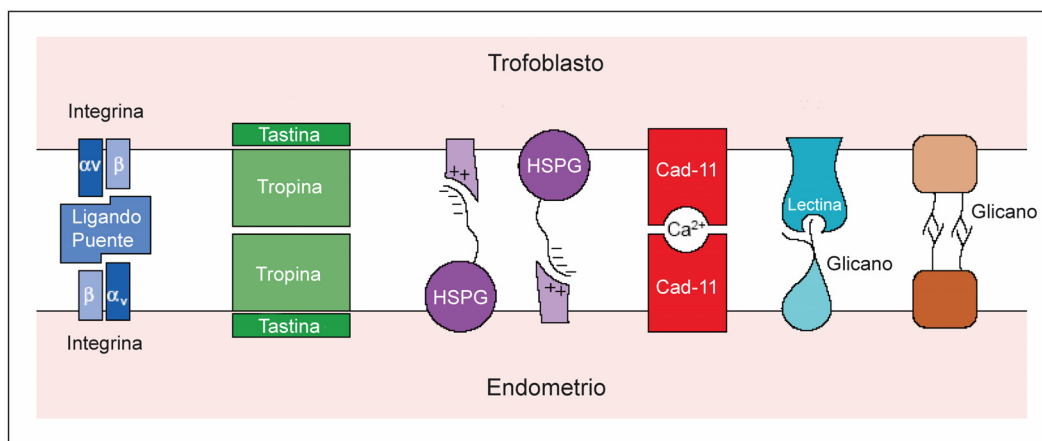


FIGURA 4. Moléculas de adhesión: ligandos y receptores involucrados en la adhesión del trofoblasto al endometrio (Aplin, 1997).

Asimismo, el estudio del sistema inmune y el sistema reproductor ha permitido demostrar la función de determinadas citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento relacionados a implantación. Entre ellos encontramos la interleuquina 11 (IL-11), el factor inhibidor de la leucemia (LIF), la superfamilia del factor transformador del crecimiento beta ($TGF\beta$), incluidas las activinas, el factor estimulante de colonias (CSF-1), los sistemas de interleuquinas 1 y 15 (IL-1 e IL-15), y numerosas quimioquinas con rol en el reclutamiento de leucocitos o el tráfico y diferenciación del trofoblasto (Dimitriadis y col., 2005).

1.3.2. Tercera Fase de la Implantación: la Invasión

A continuación tendrá lugar la fase de **invasión**, donde el trofoblasto embrionario penetra la membrana basal del endometrio materno (**Figura 5.A**) para finalmente invadir el estroma hasta alcanzar los vasos sanguíneos para su alimentación (**Figura 5.B**). El proceso ocurre 8 días después de la fecundación. El blastocisto se embebe en el estroma y el sitio de entrada generado en el epitelio es recubierto rápidamente por fibrina, sobre la cual crecerán nuevamente las células epiteliales endometriales. El proceso de implantación invasivo estará estrictamente regulado para prevenir posibles invasiones patológicas, como ocurre en la preeclampsia o casos donde la placenta se ha fijado con demasiada profundidad (acreta: invade hasta el miometrio; increta: mayor profundidad; percreta: atraviesa el útero e invade órganos circundantes). Los embriones producen proteasas que degradan la membrana basal, permitiendo la penetración de los trofoblastos, pudiendo estar regulada la profundidad de la penetración por un estado de equilibrio entre las proteasas del trofoblasto y los inhibidores de proteasas de la decidua (Bai y col., 2005).

Existen diferentes proteasas que intervienen en el proceso, de las cuales, las más importantes son las serinproteasas, las metaloproteasas y las colagenasas. Las serinproteasas más significativas son los activadores del plasminógeno uroquinasa (u-PA) y tisular (t-PA), catalizadores de la conversión del plasminógeno en plasmina, de amplia actividad proteolítica. El trofoblasto produce u-PA el cual se une a sus propios receptores para u-PA (U-PAR) formando el complejo u-PA-U-PAR. El efecto proteolítico permitirá el avance del trofoblasto. La inhibición de esta enzima con el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), impide la invasión del trofoblasto (Aflalo y col., 2004). Las metaloproteasas pertenecen a la familia de las endopeptidasas dependientes de zinc y poseen actividad proteolítica

contra muchos componentes de las células endometriales. Según su especificidad de sustrato se distinguen tres tipos: (a) las colagenasas, digieren colágeno tipo I, II, III, VII y X, (b) las gelatinasas, digieren colágeno tipo IV y desnaturalizado y (c) las estromalisinas que degradan fibronectina, laminina, colágeno tipo IV, V, VI y proteoglicanos. El colágeno tipo IV es el componente principal de la membrana basal, siendo la colagenasa tipo IV crucial para el proceso de implantación e invasión del trofoblasto (Caballero-Campo y *col.*, 2000). La acción de las metaloproteasas es regulada por la acción del inhibidor de metaloproteasas de tejido (TIMP), siendo la acción coordinada de las metaloproteasas y TIMP la responsable de la degradación equilibrada de la matriz extracelular (Bai y *col.*, 2005). Una vez el trofoblasto encuentra su destino final en el estroma uterino, sintetiza una matriz de proteínas extracelulares que facilita la unión a las arteriolas maternas, estableciendo una placentación hemo-corial en la cual estarán en contacto directo la sangre materna con el trofoblasto embrionario.

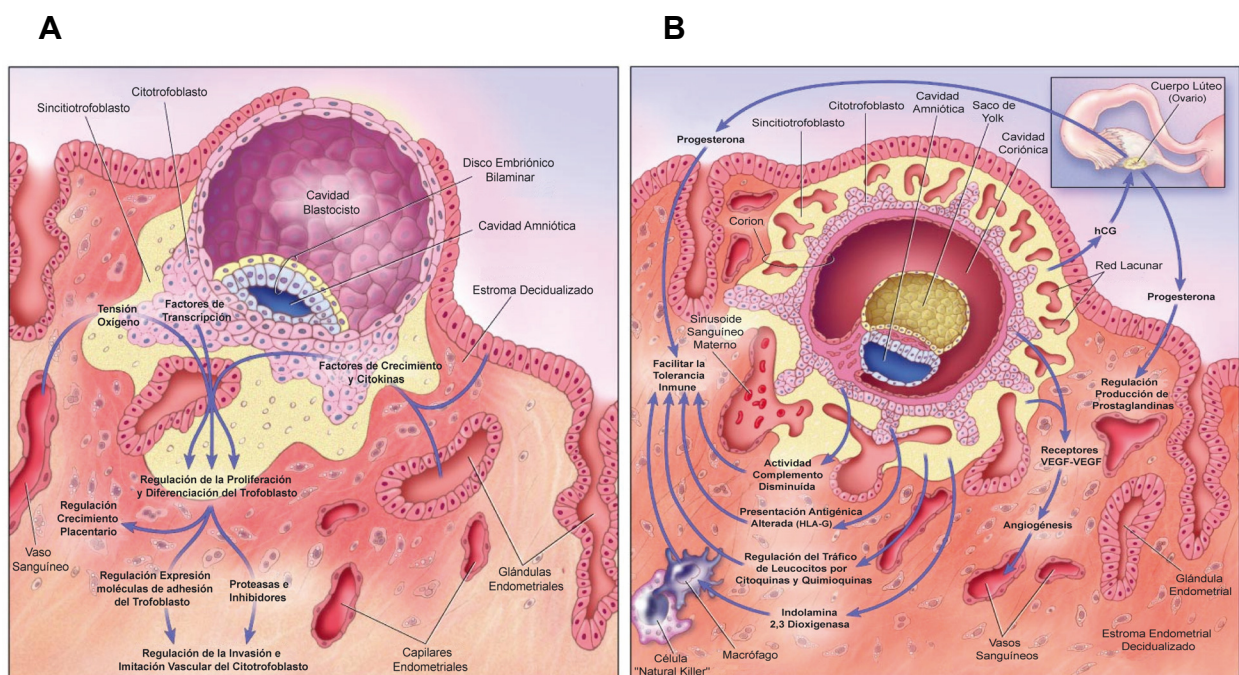


FIGURA 5. Fases finales de la Implantación del blastocisto. En **A** se enseña un diagrama del blastocisto invadiendo el estroma endometrial (días 9 a 10 tras la concepción) y en **B** el embrión ya implantado (14 días tras la concepción). Se indican en cada caso los procesos necesarios para la invasión trofoblástica y el mantenimiento del embarazo respectivamente (Norwitz y *col.*, 2001)

Otro tipo de moléculas importantes en el proceso de invasión, y en general en todo el proceso de implantación, son las citoquinas (descritas previamente en 1.2.1.2). Estas proteínas están relacionadas directamente con las proteínas invasivas citadas en este apartado, las cuales a su vez se hallan bajo regulación hormonal, siendo la progesterona la hormona que mayor control ejerce sobre las moléculas de adhesión del endometrio humano, en especial sobre las integrinas.

Uno de los objetivos propuestos para este trabajo de Tesis Doctoral fue precisamente el estudio de estas fases iniciales de la adhesión embrionaria con el fin de intentar descifrar los mecanismos de regulación existentes y los genes involucrados. También la utilización de tecnologías de última generación para realizar análisis de expresión génica a gran escala con el fin de identificar nuevos marcadores moleculares de implantación y receptividad endometrial.

1.4. Diferenciación del Trofoblasto

Los trofoblastos, principales componentes de la placenta, proceden de la diferenciación que sufren *in vivo* los citotrofoblastos indiferenciados dependiendo de su posterior función, distinguiéndose tres rutas:

- *Sincitiotrofoblasto viloso*: secreta hormonas que son críticas para el mantenimiento del embarazo, como la gonadotropina coriónica (HCG) que estimulará el cuerpo lúteo al inicio del embarazo para mantener la producción de progesterona, o la hormona lactógeno placentario (hPL), producida en grandes cantidades durante el tercer trimestre aparentemente para la regulación del metabolismo lipídico y de hidratos de carbono maternos. Además producirán glicoproteína específica del embarazo β 1, serina proteasas, activador del plasminógeno y sus inhibidores (PAI-1 y PAI-2), hormona de crecimiento (hGH-V), metaloproteasas, trombomodulina, y receptores de factores de crecimiento, entre otros.
- *Trofoblasto de anclaje*: formando columnas de células trofoblásticas extravilosas, críticas para la adhesión y el anclaje del embrión al útero, en las que intervienen las proteínas de la matriz extracelular.
- *Trofoblasto invasivo*: en humanos, a medida que progresa la gestación, algunas poblaciones de trofoblastos extravilosos se unen e interdigitan a través de los espacios extracelulares del endometrio y miometrio, logrando penetrar en las arterias espirales del útero. Este remodelado de la vasculatura mediado por trofoblastos incrementa el flujo sanguíneo dentro del lecho placentario. Deficiencias en este proceso invasivo se asocian a pérdidas tempranas del embarazo, retardos en el crecimiento intrauterino y pre-eclampsia, habiéndose observado en estos casos disfunción endotelial materna generalizada, fallos en las rutas de diferenciación del citotrofoblasto e incremento de la apoptosis de los mismos durante la invasión (Genbacev y col., 1999).

Por otra parte, dentro de las vellosidades de la placenta se mantendrá durante toda la gestación una población de citotrofoblastos indiferenciados.

1.4.1. El Coriocarcinoma

Al igual que las molas hidatiformes benignas o malignas y el tumor trofoblástico del lecho placentario, el coriocarcinoma es una enfermedad trofoblástica gestacional (Cheung, 2003; Altieri y col., 2003). Consiste en la proliferación atípica del trofoblasto en ausencia de estroma, comprendiendo tanto al trofoblasto como al sincitiotrofoblasto. El coriocarcinoma se puede producir después de un embarazo normal, de un aborto espontáneo o de una mola hidatiforme. Es un tumor que invade y produce metástasis tempranamente, por lo cual suele estar extendido en el momento del diagnóstico. En cuanto a sus funciones hormonales y su metabolismo celular, este tumor se asemeja mucho a la placenta, a excepción de la menor capacidad invasora que posee la placenta respecto a este tumor maligno al momento de la implantación. Dada su gran invasividad, el coriocarcinoma suele ocasionar la muerte de la paciente en un período menor a un año. Curiosamente, se puede observar una similitud morfológica entre las células trofoblásticas del blastocisto humano con menos de 92 horas desde la concepción, la placenta normal invasiva del primer trimestre y el coriocarcinoma altamente proliferativo (Patillo y col., 1971). Se han aislado diversas líneas celulares derivadas de coriocarcinoma, entre ellas JAR, JEG-3 y BeWo, siendo todas ellas ampliamente utilizadas como modelos de célula trofoblástica del primer trimestre por sus grandes similitudes en cuanto a invasividad y diferenciación (Hohn y col., 1998).

2. Modelos de Adhesión Embrión/Trofoblasto-Endometrio

Como se mencionó con anterioridad, los mecanismos relacionados con la implantación del embrión son aún poco conocidos. No obstante, está claro que el diálogo entre el embrión y el endometrio es crucial para la implantación, en especial durante la fase inicial de adhesión.

En los últimos años, las interacciones y mecanismos moleculares involucrados en la biología de la implantación en humanos han acaparado la atención de numerosos investigadores. Para ello, se han diseñado y descrito diversos modelos de adhesión embrión-endometrio destinados a abordar el estudio de esta fase de la implantación embrionaria. Estos ensayos los podemos agrupar en:

2.1. Modelos Basados en la Observación Visual

Inicialmente la evaluación de la adhesión de embriones al endometrio se realizó por adición de 2 a 5 embriones de ratón sobre monocapas de células epiteliales endometriales humanas (obtenidas de pacientes fértiles), evaluándose a las 48 horas de co-cultivo el porcentaje de adhesión. Para identificar aquellos embriones adheridos, se hacía fluir suavemente sobre cada embrión una pequeña cantidad de medio de cultivo, haciendo uso de una pipeta de vidrio. Bajo estas condiciones experimentales, se consideraba adherido a aquel embrión que no mostraba movimiento mientras era observado mediante un microscopio invertido de contraste de fases Olympus (Shiotani y *col.*, 1993; Simón y *col.*, 1997), dotando al ensayo de un grado de subjetividad elevado.

2.2. Modelos Basados en Fuerzas Centrifugas

En este sistema, las células epiteliales endometriales eran cultivadas hasta confluencia total sobre cubreobjetos de vidrio, para luego confrontarse con esferoides generados a partir de células de coriocarcinoma según la técnica descrita por Grümmer y *col.* en 1994 (**Figura 6.A**). Finalizado el co-cultivo, los cubreobjetos eran removidos con fórceps y se colocaban invertidos en tubos cónicos de 10 ml, con su superficie célula-esferoide hacia abajo, para ser centrifugados a baja fuerza *g* (12*g*). A continuación, el número de esferoides remanentes que permanecían adheridos a las monocapas era determinado haciendo recuento en un microscopio de disección (John y *col.*, 1993; Tinel y *col.*, 2000).

Posteriormente, el sistema fue modificado por adición sobre los esferoides (generados con células JAR) del colorante fluorescente CMFDA, permeable para la membrana celular, el cual permitía distinguir claramente las células JAR de las células endometriales por su fluorescencia (Heneweer y *col.*, 2002). Así, se obtenía una medida semi-cuantitativa de la adhesión en función de la intensidad de fluorescencia detectada por microscopía de fluorescencia.

Este tipo de ensayos basados en fuerzas centrífugas es mucho más objetivo, pues permite medir la resistencia a la separación de manera más controlada. Sin embargo, la transferencia de los cubreobjetos es muy difícil para los principiantes y suele introducir errores incontrolables.

Otro tipo de sistema desarrollado recientemente, cuyos principios se basan en los modelos descritos anteriormente, utiliza embriones de ratón (blastocistos) y esferoides formados por trofoblastos (Grümmer y *col.*, 1994), los cuales son transferidos sobre monocapas de células epiteliales endometriales contenidas en placas de 96 pocillos y co-cultivados durante 48-54 horas (Li y *col.*, 2002). Transcurrido

ese período, cada pocillo es observado bajo un microscopio invertido de contraste de fases y esquematizado manualmente en una gráfica. Finalmente, las placas se sellan con un film adhesivo y se centrifugan invertidas para separar los embriones de las células endometriales, examinando luego el fondo de cada pocillo al microscopio para determinar visualmente el número de embriones remanentes en función del mapa trazado para cada pocillo (**Figura 6.B**).

Este último modelo, si bien minimiza los errores relacionados con la manipulación de los cubreobjetos y permite controlar las fuerzas a las cuales se someten los co-cultivos embrión-endometrio, vuelve a introducir un importante componente subjetivo, dado que incluye nuevamente una etapa de observación visual, lo que sin duda alguna acarrea errores tales como la fatiga del observador y su habilidad para el recuento manual.

Por otra parte, todos los modelos de adhesión descritos anteriormente son estadísticamente poco representativos, puesto que el número de embriones/esferoides que deben ser transferidos debe ser escaso para facilitar el posterior recuento por microscopía.

2.3. Modelos Basados en Microscopía de Fuerza Atómica

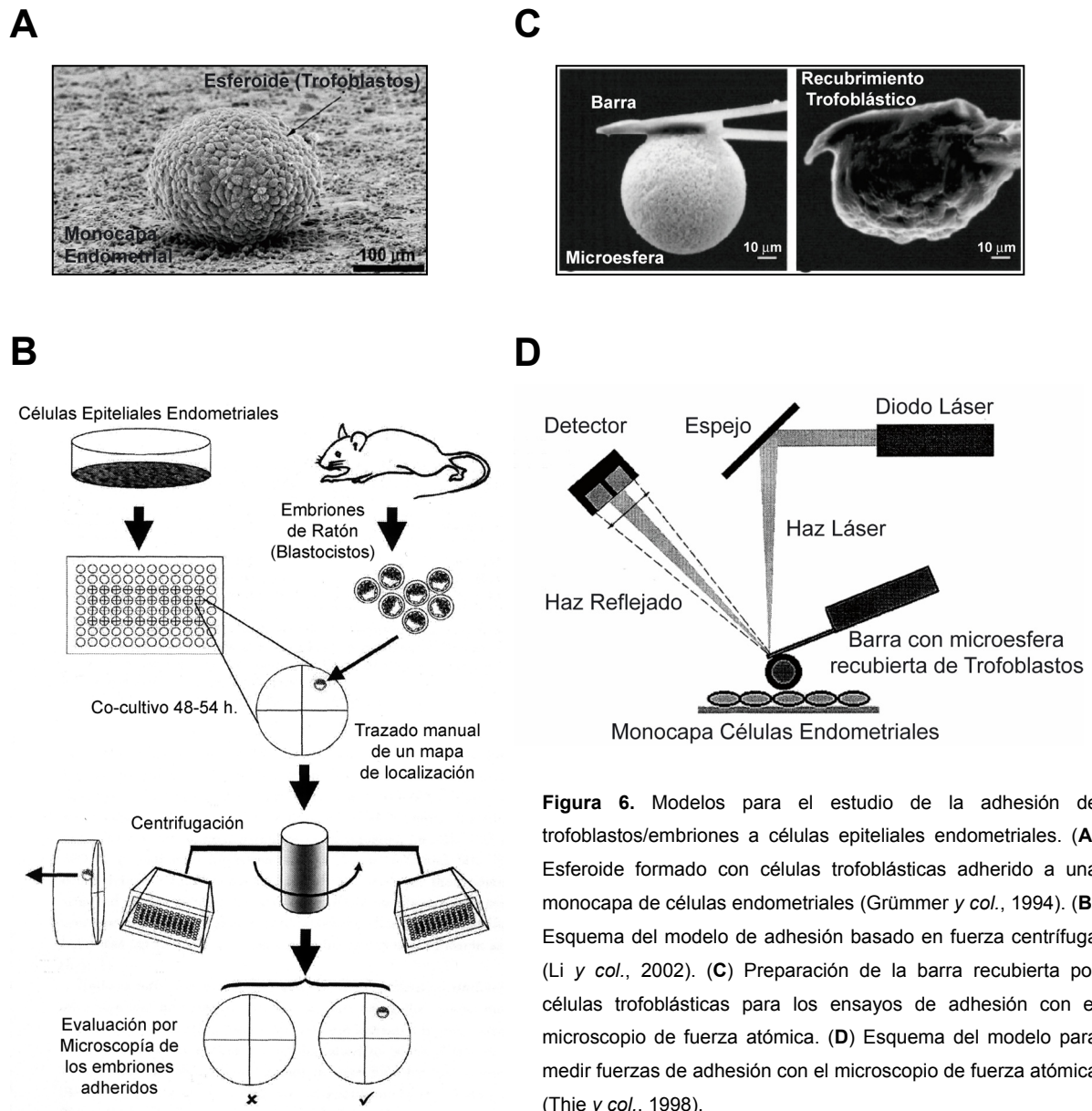
Este modelo, destinado a la medición de las fuerzas de adhesión célula trofoblástica-célula endometrial (Thie y *col.*, 1998), utiliza un microscopio de fuerza atómica (AFM, del inglés Atomic Force Microscope). Para ello emplea una pequeña barra metálica sobre la que se pegó una microesfera, la cual fue tratada con poli-lisina D y cultivada con una suspensión de células trofoblásticas durante 3-4 días hasta su recubrimiento con una capa confluyente de células (**Figura 6.C**). A continuación, las barras conteniendo las esferas recubiertas con células trofoblásticas fueron puestas en contacto sobre la superficie de monocapas de células endometriales durante tiempos variables. Se determinaron así las fuerzas de adhesión de cada tipo celular trofoblástico cuando las barras eran separadas de las células endometriales por aplicación de un gradiente de fuerza creciente, efectuándose la detección por incidencia de un haz de luz láser sobre la barra y medición de la deflexión producida (**Figura 6.D**).

Este tipo de estudio, sin embargo, no puede ser practicado en la mayoría de los laboratorios dado que requiere de un equipamiento específico y sofisticado.

2.4. Modelos Basados en Fluorimetría

Este ensayo utiliza un sistema de tinción o marcación de las células trofoblásticas, el cual se utilizará como herramienta para evaluar la adhesión trofoblasto-endometrio. Para ello, unas horas previas al ensayo de adhesión las células trofoblásticas son preincubadas durante 30 minutos con un fluorocromo (diacetato-succinimidil éster de carboxifluoresceína o CFDA-SE). En el momento del ensayo, las células trofoblásticas marcadas en suspensión se adicionan sobre monocapas confluentes de células endometriales para su co-cultivo durante 1 hora. Transcurrido ese período, las células no adheridas son removidas por aspiración y sucesivos lavado, para luego realizar una extracción alcalina del co-cultivo remanente. Finalmente, se realizará la medición de la fluorescencia de cada extracto haciendo uso de un fluorímetro, expresando los resultados porcentualmente en relación a las células trofoblásticas inicialmente añadidas (Chervenak e Illsley, 2000).

El modelo, disminuye considerablemente los errores relacionados con el operador y permite obtener resultados reproducibles, pero a pesar de ello tiene algunas limitaciones. Entre ellas podemos mencionar que se trata de un reactivo costoso, con efectos citotóxicos, aunque escasos, dado que debe ser solubilizado en dimetil sulfóxido (DMSO). Si bien la marcación persiste durante 24 horas, su intensidad de fluorescencia declina drásticamente durante las primeras 4 horas, lo que dificulta la realización de estudios durante períodos prolongados ya que el patrón de fluorescencia de la muestra varía considerablemente. Además, el reactivo no conjugado con las proteínas difunde hacia el exterior de la célula, restando precisión a la cuantificación final de la fluorescencia (Wang *et al.*, 2005).



Uno de los principales propósitos del presente trabajo fue el desarrollo de un nuevo modelo de adhesión trofoblasto-endometrio, simple, económico y fiable, que pueda ser desarrollado en la mayoría de los laboratorios con independencia de los posibles errores relacionados con el operador. Otro de los objetivos del diseño experimental fue que permita realizar co-cultivos durante períodos prolongados, optimizando para ello el sistema de marcación celular, de modo que durante ese lapso de co-cultivo no

existan variaciones en los niveles de marcación de las células, y que a su vez esta marcación no presente efectos nocivos que puedan afectar finalmente los mecanismos de adhesión. Un último propósito para este modelo de adhesión consistió en la selección y utilización de equipos que sean de uso masivo en todos los centros de investigación, y que a su vez ofrezcan diversas alternativas. Para este fin se seleccionó la citometría de flujo como técnica analítica, la cual permitirá tanto el análisis/cuantificación de la adhesión trofoblasto-endometrio como la separación de ambos tipos celulares luego de su interacción en co-cultivo.

3. Generalidades de la Expresión Génica Diferencial

La reciente secuenciación de los genomas de humano, de mamíferos y de otros organismos eucariotas ha permitido un análisis comparativo entre sus secuencias, revelando una sorprendente constancia en cuanto a sus contenidos genéticos. En este aspecto, se ha observado que el genoma de los vertebrados contiene solo el doble del número de genes que el presente en el genoma de los invertebrados, y que este incremento se debe fundamentalmente a la duplicación de genes existentes más que a la invención de genes nuevos. De este modo, un incremento en el número de genes no implica un aumento de la complejidad morfológica y de comportamiento de un organismo (Levine y Tjian, 2003). Ello implica la existencia de complejos mecanismos de regulación de la expresión génica que permitirán que un pequeño número de genes sean explotados a través de la evolución para generar organismos cada vez más complejos.

Si el producto de un gen no es necesario en un tipo celular particular, el gen no será transcrito y se mantendrá en un estado de configuración inaccesible en la cromatina. El inicio de la transcripción representa por lo tanto, el principal modo de regulación de la gran mayoría de los genes (Carey y Smale, 2000). Sin embargo, los genes también podrán ser regulados en diversas etapas a lo largo de su ruta de expresión. En este aspecto, existen diversos mecanismos a través de los cuales se regula la expresión génica en mamíferos, tanto en el aspecto temporal como espacial. Entre ellos, los dos mecanismos sugeridos como mayor fuente de complejidad son: en primer lugar las variantes de corte y empalme alternativas del RNA mensajero o "*splicing* alternativo" del pre-mRNA, que originan especies de RNAs diferentes a partir de un mismo gen; y en segundo lugar el reordenamiento del DNA, donde los genes se reordenan por si mismo durante la diferenciación celular, como ocurre para generar diversidad en el sistema inmune de los mamíferos (Baltimore, 2001; Agrawal y col., 1998). Otros mecanismos posibles de regulación incluyen el alargamiento de la transcripción, la estabilidad del mRNA, la poliadenilación y la traducción, los cuales conjuntamente con los mencionados anteriormente suelen participar de manera combinada para el mantenimiento de los niveles elevados de mRNA (Maniatis y Reed, 2002).

En general, el principio de la expresión génica diferencial establece que las células se desarrollan diferencialmente no porque contengan distinta información genética, sino porque expresan de manera desigual un conjunto o subconjunto de genes en tiempo y espacio. Simultáneamente, las diferentes células expresarán un grupo de genes comunes, posiblemente indispensables para el mantenimiento de sus metabolismos, conocidos como genes constitutivos o *housekeeping*. Así, la decisión de transcribir genes en cada célula dependerá de su etapa en el desarrollo, el tipo de tejido, la posición en el cuerpo y las condiciones fisiológicas.

3.1. Técnicas para el Estudio de la Expresión Génica Diferencial

Uno de los objetivos más frecuentes en la investigación biomédica actual es el estudio e identificación de los cambios de expresión génica. La identificación de las diferencias existentes entre los mRNAs de dos grupos celulares estrechamente relacionados es una información esencial para desvelar la complejidad bioquímica de los eventos metabólicos (Hubank y Schatz, 1994).

Históricamente, se puede considerar como el comienzo del análisis de expresión génica al desarrollo de métodos para examinar la expresión de genes individuales conocidos, como es el caso de la técnica de transferencia Northern (*Northern Blot*), introducida en 1977, que hibrida sondas marcadas de DNA o RNA con los RNAs transferidos a papel y permite comparar los patrones resultantes. Años más tarde, surgirían nuevas metodologías como los ensayos de protección a RNasa, las técnicas de hibridación substractiva para la construcción de genotecas de cDNA, análisis en serie de la expresión génica (*SAGE, serial analysis of gene expression*), análisis de representación diferencial (*RDA, representational difference analysis*) e hibridación sustractiva supresora (*SSH, suppressive subtractive hybridization*). También metodologías como secuencias expresadas-secuenciadas en un solo paso (*ESTs, expressed sequence tags*), representación diferencial de mRNAs acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa-reversotranscripción (*DD RT-PCR, Differential Display RT-PCR*) y más recientemente la tecnología de micromatrices de DNA o biochips (*DNA Microarrays*), siendo estas dos últimas tecnologías las principales herramientas para encontrar diferencias de expresión entre dos tipos celulares o condiciones experimentales (Castrillo y Ávila, 2004).

De los alrededor de 35.000 genes que se estiman tiene el genoma humano, sólo un porcentaje cercano al 15% de ellos se expresan como mRNAs. Así, una correcta interpretación de los niveles de expresión génica nos permitirá determinar cuándo y dónde se produce activación o represión de los genes durante los procesos de división, diferenciación, interacción o envejecimiento celular.

3.2. Micromatrices de DNA, Biochips o DNA Microarrays

Las micromatrices de DNA surgieron a finales de los 80 por la combinación de las técnicas microelectrónicas y el empleo de materiales biológicos. Se basan en la ultraminiaturización y paralelismo a alta densidad del material biológico. Al igual que ocurre con los microchips empleados en los ordenadores, donde se consigue una alta densidad de integración de circuitos electrónicos en una oblea de silicio, en las micromatrices de DNA o biochips se logra una alta densidad de integración de material genético en una oblea de silicio, cristal o plástico. Los dos tipos más comunes de micromatrices son las de fragmentos de cDNA y las de oligonucleótidos (Schena y col., 1995). Alrededor de diez años atrás, cuando las secuencias parciales o completas de numerosos genomas fueron depositadas en bases de datos de acceso público, Affymetrix (Santa Clara, California) ha empezado a comercializar este tipo de tecnologías (Gershon D, 2005), ofreciendo la posibilidad de analizar simultáneamente la expresión de miles de genes para obtener “visiones globales” de los procesos biológicos (Lander, 1999).

Básicamente, las micromatrices están divididas en pequeños compartimientos o casillas altamente organizados, que actúan cada uno a modo de un tubo de ensayo en el que se producirá una reacción. El número de estas casillas es muy elevado, llegando incluso a los centenares de miles. Cada casilla posee

una serie de cadenas de oligonucleótidos (juego de sondas), que pueden corresponder a una región específica del gen de estudio (transcrito), a una región génica común a varios genes (familia génica) o bien sondas que son compartidas por dos o más secuencias (formas de *splicing* alternativo de un transcrito o transcritos con un alto grado de homología). El ácido nucleico diana que será detectado con esta tecnología es RNA, el cual previamente a la hibridación deberá ser transformado en cRNA (RNA complementario) marcado con una sustancia fluorescente. Solo aquellos fragmentos de cRNA marcado que hibriden con las sondas ancladas a la micromatriz permanecerán unidos tras realizar los lavados y el revelado. A continuación, cada micromatriz es analizada con un escáner óptico, determinándose la intensidad relativa de las diferentes señales de fluorescencia. Dado que se conocen las secuencias y posiciones de los oligonucleótidos en cada matriz, el análisis mediante ordenador permite procesar la información procedente del escáner y comparar dos micromatrices obtenidas en diferentes condiciones experimentales. La intensidad de fluorescencia indicará cuando un gen está sobreexpresado, reprimido o sin cambio respecto a la muestra pre-establecida como control (Schena y col., 1995).

Este tipo de diseño experimental permite la cuantificación de la expresión de múltiples genes simultáneamente. La potencia de estos sistemas trae consigo la obtención, en tiempos muy breves, de grandes volúmenes de información, que necesitan ser gestionados con técnicas bioinformáticas para extraer conocimientos de utilidad en la investigación biomédica.

3.2.1. Aplicaciones de las Micromatrices de DNA

A pesar de ser una tecnología muy reciente, que aún está en vías de experimentación, las micromatrices están siendo aplicadas actualmente en:

- **Monitorización de expresión génica:** permite determinar el patrón de expresión génica y cuantificar el nivel de expresión de manera simultánea para un elevado número de genes. De este modo se pueden realizar estudios comparativos de activación y represión de determinados genes en un mismo tejido bajo diferentes condiciones experimentales, indicando la posible función de los mismos.
- **Detección de mutaciones y polimorfismos:** facilita el estudio de todos los posibles polimorfismos y la detección de mutaciones en genes complejos.
- **Secuenciación:** se han diseñado algunas micromatrices para la secuenciación de fragmentos cortos de DNA, aunque aún no existe en el mercado ninguna que permita secuenciar de novo secuencias largas de DNA.
- **Diagnóstico clínico y detección de microorganismos:** posibilitan la identificación rápida al utilizar marcadores genéticos específicos de los patógenos.
- **Tamizaje o *screening* y toxicología de fármacos:** permite analizar de forma rápida los cambios de expresión génica que se producen como consecuencia de la administración de un fármaco, así como la localización de nuevas posibles dianas terapéuticas y los efectos toxicológicos asociados.
- **Seguimiento de terapia:** destinados a valorar rasgos genéticos que pueden tener incidencia en la respuesta a una terapia.

▪ Medicina preventiva: dado que el conocimiento y posible diagnóstico de ciertos caracteres genéticos asociados a determinadas patologías permite una prevención de las mismas antes de que aparezcan los síntomas.

3.2.2. Ventajas y Desventajas

Las micromatrices de DNA son metodologías de análisis de expresión génica que, además de ser muy costosas, involucran numerosas etapas durante su procesamiento. Estas, sin duda alguna, son potenciales fuentes de variación que pueden comprometer el análisis e interpretación de los datos si no son controladas estrictamente. Por este motivo, cada etapa debe efectuarse bajo protocolos que incluyan controles de calidad, de modo que aseguren la consistencia y una alta calidad de los resultados (Burgoon *y col.*, 2005). Otras desventajas son el elevado coste del equipamiento, la baja reproducibilidad, la elevada sensibilidad a la contaminación de las muestras y la no correlación directa con los niveles de proteína. Además, el análisis simultáneo de numerosos genes trae aparejado otro tipo de limitaciones propias del diseño de la tecnología, tales como errores por hibridación inespecífica de genes cuyas secuencias están altamente conservadas, la imposibilidad para discriminar variantes alternativas de corte-empalme del RNA (*splicing*) o el descubrimiento de nuevos genes. A pesar de ello, es una tecnología muy rápida, que requiere poca experiencia del operador y que permite analizar simultáneamente miles de genes a partir de pequeñas cantidades de RNA (Castrillo y Avila, 2004).

Esta tecnología mide abundancia de RNA, pero tampoco contempla aspectos como el procesamiento y la degradación del RNA, o el hecho que no todos los transcritos son traducidos a proteína, ni mucho menos proporciona información sobre la modificación, localización o actividad de las proteínas (Zeng *y col.*, 2004). Por otra parte, los genes identificados por su expresión diferencial mediante esta tecnología deberán luego ser validados analíticamente y funcionalmente, dado que no porque un gen se encuentre sobreexpresado o reprimido en determinadas condiciones puntuales implica que sea esencial para un proceso dinámico como lo es la implantación de embriones en humanos.

Objetivos



4. Objetivo General

La implantación embrionaria humana representa un área de conocimiento en la que existen pocos estudios, y que aportan datos no contrastados. Por lo tanto, no disponemos de información fiable que pueda ser utilizada con fines diagnósticos y terapéuticos. Se conoce la existencia de diferentes factores y moléculas que intervienen en este proceso, pero sin embargo sus mecanismos de acción, funciones o la manera en que éstos interactúan es ampliamente desconocida. Además, gran parte de las observaciones proceden de investigaciones realizadas en modelos animales, y no todas las conclusiones se pueden extrapolar a la especie humana.

Por estos motivos, sería de gran utilidad para los tratamientos de reproducción asistida, conocer con precisión la función y mecanismo de los marcadores que intervienen durante la ventana de implantación, tanto los morfológicos (pinópodos), como los bioquímicos (integrinas y mucinas). Ello permitiría realizar la transferencia embrionaria en el momento de mayor receptividad y seleccionar aquellos embriones con mayores probabilidades de anidación, permitiendo así aumentar el porcentaje de embarazos, y al mismo tiempo disminuir el número de gestaciones múltiples. Los fallos de implantación constituyen, por tanto, un factor limitante fundamental en el éxito de las técnicas de reproducción asistida.

En resumen, el propósito de este trabajo consiste en el estudio de las interacciones trofoblasto-endometrio con el fin de contribuir al entendimiento de los mecanismos moleculares de este proceso, lo que permitirá no sólo mejorar las técnicas de reproducción asistida sino también tratar diversas patologías gestacionales o la pérdida temprana del embarazo.

4.1. Objetivos Particulares:

1. Desarrollar de un nuevo modelo de adhesión celular *in vitro* que permita el estudio de la adhesión de células trofoblásticas al endometrio humano.
2. Cuantificar la adhesión de distintas líneas celulares trofoblásticas (JAR y JEG-3) sobre monocapas de células epiteliales endometriales (RL95-2 y HEC-1A).
3. Validación del modelo desarrollado: tratamiento de las células trofoblásticas con agentes moduladores de la diferenciación y evaluación del efecto producido sobre la adhesión celular.
4. Analizar los niveles de expresión de un grupo de genes preseleccionados por su potencial implicación en las interacciones trofoblasto-endometrio. Cuantificación de los niveles de mRNA de los genes que se expresaron diferencialmente y correlación con sus respectivos niveles de proteína.
5. Identificación de nuevos genes expresados diferencialmente en células trofoblásticas y células epiteliales endometriales durante las etapas iniciales de la implantación embrionaria humana.

Materiales y Métodos



5. Cultivo de Células

5.1. Líneas Celulares

Las líneas celulares utilizadas para este trabajo, todas ellas de origen humano a excepción de la línea celular empaquetadora de retrovirus procedente de ratón, se obtuvieron de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, Maryland, USA).

| Línea Celular | Número ATCC | Origen | Morfología | Propiedades |
|---------------|-------------|--|-------------|-------------|
| RL95-2 | CRL-1671 | Útero; carcinoma endometrial | epitelial | adherente |
| HEC-1A | HTB-112 | Útero; adenocarcinoma endometrial | epitelial | adherente |
| JAR | HTB-144 | Placenta; coriocarcinoma | epitelial | adherente |
| JEG-3 | HTB-36 | Placenta; coriocarcinoma | epitelial | adherente |
| 293 | CRL-1573 | Riñón; embrionario transformadas con DNA de adenovirus tipo 5 | epitelial | adherente |
| PG13 | CRL-10686 | Embrionarias; derivadas de células NIH/3T3 (TK-); envuelta virus GaLV. | fibroblasto | adherente |

Tabla 1. Líneas celulares utilizadas

5.2. Condiciones de Cultivo

- Células RL95-2: se cultivaron en medio DMEM:F12 HAM'S (*Dulbecco's modified Eagle's medium Nutrient Mixture F-12 HAM*; Sigma, Missouri, USA); 10% de suero fetal bovino (Gibco, Eggenstein, Alemania); 6 mM de L-glutamina (Merck); 3,5 g/L de bicarbonato de sodio (Sigma); 4,5 g/L de glucosa (Merck); 1 mM de piruvato de sodio (Sigma); 5 µg/ml de insulina (Sigma); 0,1% de mezcla de antibióticos [Estreptomicina sulfato 100 mg/ml y Penicilina G (1580 U/mg) 10⁵ U/ml]; 0,1% de Gentamicina (50 mg/ml).

- Células HEC-1A: medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*; Sigma); 10% de suero fetal bovino (Gibco); 4 mM de L-glutamina; 0,1% de mezcla de antibióticos [Estreptomicina sulfato 100 mg/ml y Penicilina G (1580 U/mg) 10⁵ U/ml]; 0,1% de Gentamicina (50 mg/ml).

- Células JAR: medio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*; ICN Biomedicals Inc.) suplementado con 25 mM de HEPES (ácido N-2 hidroxietil primeracina-N'-2 etanosulfónico); 10% de suero fetal bovino (Gibco); 2 mM de L-glutamina; 18 mM de bicarbonato de sodio (Sigma); 4,5 g/L de glucosa (Merck); 1 mM de piruvato de sodio; 0,1% de mezcla de antibióticos [Estreptomicina sulfato 100 mg/ml y Penicilina G (1580 U/mg) 10⁵ U/ml]; 0,1% de Gentamicina (50 mg/ml).

- Células JEG-3: se empleó medio de cultivo MEM (*minimum essential medium Eagle*; Sigma); 10% de suero fetal bovino (Gibco); 2 mM de L-glutamina; 1 mM de piruvato de sodio; mezcla de aminoácidos no esenciales 0,1 mM de cada uno (L-Alanina, L-Ácido Aspártico, L-Glutámico, L-Prolina y L-Asparagina; Merck); 0,1% de mezcla de antibióticos [Estreptomicina sulfato 100 mg/ml y Penicilina G (1580 U/mg) 10⁵ U/ml]; 0,1% de Gentamicina (50 mg/ml).

- Células 293: medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*; Sigma); 10% de suero fetal bovino (Gibco); 2 mM de L-glutamina; 0,1% de mezcla de antibióticos [Estreptomicina sulfato 100 mg/ml y Penicilina G (1580 U/mg) 10⁵ U/ml]; 0,1% de Gentamicina (50 mg/ml).

▪ Células empaquetadoras PG13: medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*; Sigma); 10% de suero fetal bovino (Gibco); 2 mM de L-glutamina; 0,1% de mezcla de antibióticos [Estreptomicina sulfato 100 mg/ml y Penicilina G (1580 U/mg) 10⁵ U/ml]; 0,1% de Gentamicina (50 mg/ml).

5.3. Mantenimiento y Propagación

Todas las líneas celulares fueron cultivadas rutinariamente en incubador a 37°C (CO₂ incubator modelo 3039, Forma Scientific, Inc), en atmósfera conteniendo un 98% de humedad relativa y 5% de CO₂. El medio de cultivo fue renovado cada 48 horas, subcultivando las células cuando los cultivos alcanzaban confluencias cercanas al 80% de las placas utilizadas (placas de 10 ml P-100; Falcon™).

Para el pase y subcultivo de las células, cada placa P-100 se lavó con 10 ml de PBS 1X y luego con 5 ml de EDTA 0,02%, ambos precalentados en baño termostático a 37°C, agitando suavemente para mantener las células adheridas. El aspirado del medio y los líquidos de lavado se realizó empleando una bomba de vacío. Posteriormente se adicionó a cada placa 1,5 ml de tripsina 0,25% (Sigma) precalentada a 37°C. Transcurrido un minuto desde la adición de la tripsina, las células se disgregaron mecánicamente empleando una pipeta Pasteur, recogiendo luego las células íntegramente separadas en 5 ml del respectivo medio de cultivo fresco contenido en un tubo de fondo cónico de 15 ml (BLUE MAX™; polipropileno; Becton Dickinson). El tubo se centrifugó durante 5 minutos a 1250 rpm y 4°C (centrífuga Beckman-Coulter modelo Allegra 6R), eliminando luego el sobrenadante y resuspendiendo la pastilla de células en 3 ml de medio de cultivo precalentado a 37°C. Finalmente, se colocó 1 ml de la suspensión celular resultante en cada nueva placa P-100 conteniendo 10 ml de medio de cultivo, agitando para lograr una distribución homogénea e incubando a 37°C para su propagación.

5.4. Congelación

Para congelar las células, se realizaron lavados de placas P-100 al 75% de confluencia con PBS y EDTA, tratamiento con tripsina y centrifugación hasta la obtención de la pastilla de células, tal como se describió anteriormente. A continuación, las células se resuspendieron en 3 ml de medio de cultivo fresco libre de antibióticos, al cual se añadió suero fetal bovino a una concentración final del 20%. Se colocó 1 ml de suspensión celular en cada criotubo de 1,8 ml (Nunc CryoTubes™) y se le añadió 70 µl de DMSO (Sigma), mezclando suavemente con pipeta para su homogenización. Inmediatamente después se colocaron en hielo, para luego introducirlos en el ultra congelador a -70°C durante 24-48 horas y finalmente reubicarlas en nitrógeno líquido para su mantenimiento por tiempo indefinido.

Para el descongelado de las células, el criotubo procedente del nitrógeno líquido se colocó directamente en el baño termostático a 37°C hasta su descongelación, transfiriendo luego el contenido del mismo a una placa P-100 con 10 ml de medio de cultivo. Transcurridas 4 a 6 horas en el incubador y una vez adheridas las células, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco para eliminar el DMSO.

5.5. Determinación de la Viabilidad Celular

La viabilidad de las células en suspensión luego de la digestión con tripsina se determinó en función de la integridad de sus membranas, evaluando para ello la capacidad de exclusión de colorantes que muestran las mismas cuando se hallan intactas. Para este fin se utilizaron dos tipos de tinciones diferentes en función del tipo de análisis empleado:

▪ Tinción con colorante Trypan Blue: para determinaciones de rutina de las células no teñidas o “vivas” mediante recuento visual en cámara de Neubauer (Hausser Scientific). Se añadió 0,1 ml de Trypan Blue (400 mg de colorante vital trypan blue, 810 mg NaCl, 60 mg K₂HPO₄, 50 mg metil p-hidroxibenzoato en 100 ml H₂O; pH: 7,2-7,3) por cada 0,9 ml suspensión celular. Luego de 5 minutos, la mezcla se cargó en la cámara, contando el número de células teñidas de azul como no viables (Sawicki y col., 1967)

▪ Tinción con Ioduro de Propidio: para la determinación por citometría de flujo del porcentaje de células vivas. Se añadió una solución de ioduro de propidio (0,1 µg/µl) a cada tubo analizado (Tubo de fondo redondo de 5 ml; poliestireno; Falcon®; Becton Dickinson), a una concentración final de 1 µg/ml, discriminando las células “vivas” de aquellas no viables que habían incorporado el colorante. El análisis se efectuó por citometría de flujo (Citómetro de flujo FACSCalibur, Becton Dickinson) por excitación con el láser de argón (λ=488 nm) y detección con el filtro de paso largo FL3 (λ=LP670 nm).

5.6. Nivel de Seguridad Biológica

Todas las líneas celulares, tejidos y fluidos biológicos fueron manipulados según las especificaciones de bioseguridad establecidas en su página web por la Oficina de Salud y Seguridad del Centro de Control de Enfermedades (CDC, USA).

6. Transferencia Génica Retroviral

6.1. Construcción del Vector y la Línea Celular Empaquetadora

La construcción del vector fue realizada introduciendo la secuencia de 726-pb que codifica la síntesis de la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP, Clontech, Palo Alto, CA) “río abajo” del sitio interno de entrada de ribosomas (IRES) en el vector pBluescript-IRES (fragmento generado por digestión enzimática *NcoI/NotI*). Posteriormente, la secuencia completa IRES-EGFP de 1324-pb se ligó dentro del vector retroviral LZRS (**Figura 7**). La construcción así obtenida fue luego transfectada por precipitación con fosfato cálcico en células ecotrópicas GP+E-86 y anfotrópicas PA317 co-cultivadas en proporciones 3:1. Los sobrenadantes recogidos a las 48 horas de la transfección fueron luego empleados para la infección de la línea celular empaquetadora PG13 que expresa las proteínas de la envuelta del virus de la leucemia de mono de Gibbon (GaLV *env*). Las células PG13 transducidas con el vector LZRS-EGFP

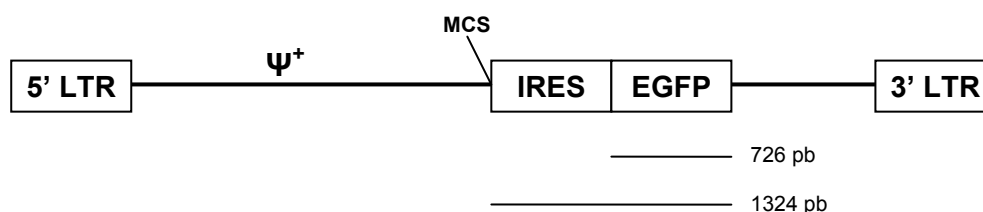


FIGURA 7. Representación esquemática del vector LZRS-EGFP. Se muestran la posición de la secuencia repetitiva terminal larga 5' (5' LTR), la señal de empaquetamiento viral (Ψ^+), un sitio múltiple de clonación (MCS), el sitio interno de entrada para ribosomas (IRES), la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) y la secuencia repetitiva terminal larga 3' (3' LTR).

fueron identificadas por su fluorescencia y separadas mediante citometría de flujo, para luego ser clonadas mediante la técnica de dilución límite en placas de 96 pocillos, generándose así el clon PG13/LZRS-EGFP (Dardalhon y col., 1999).

El clon de células empaquetadoras PG13/LZRS-EGFP fue gentilmente cedido por el grupo del Dr. Naomi Taylor del Instituto de Genética Molecular de la Universidad de Montpellier en Francia.

6.2. Producción de Sobrenadantes Retrovirales

Para la obtención de los sobrenadantes conteniendo las partículas retrovirales portadoras del transgen EGFP, se cultivó el clon de células empaquetadoras PG13/LZRS-EGFP en placas P-100 hasta una confluencia casi total de la monocapa. A continuación se removió el medio de cultivo por aspiración y se añadieron 5-6 ml de medio de cultivo fresco a cada placa. Tras una incubación de 12 horas a 37°C se recogieron los sobrenadantes retrovirales conteniendo un elevado número de partículas infectivas por unidad de volumen. Finalmente se eliminaron los posibles restos celulares por filtración, utilizando para ello filtros Millipore de 0,85 μm (Millex®), y se conservaron los sobrenadantes a -70°C hasta su utilización, fraccionados en alícuotas de 1,0 ml (tubos Eppendorf).

6.3. Transducción de Células con Retrovirus

La infección de las células diana JAR, JEG-3 y 293 se realizó cuando los cultivos se encontraban en la fase de crecimiento exponencial, es decir, cuando las células se hallaban mitóticamente activas con el fin de incrementar las probabilidades de inserción del transgen de la EGFP. Para ello se añadieron entre 50.000 y 100.000 células en cada uno de los 6 pocillos de una placa P-6 (Falcon™), en el medio de cultivo indicado para cada línea celular, y a continuación se colocaron en incubador durante 18-20 horas. Transcurrido ese período de tiempo, se aspiró el medio de cultivo y se añadió a cada pocillo 2,0 ml del sobrenadante retroviral (título viral $>10^7$ partículas/ml) y 1,0 ml del medio de cultivo correspondiente a cada tipo celular. Las infecciones se llevaron a cabo en presencia de 0, 4 y 8 $\mu\text{g/ml}$ de Polibreno (Bromuro de Hexadimetrina 10 mg/ml en H₂O, filtrado 0,22 μm ; Sigma) durante períodos de 6 horas. A continuación se cambió el medio de infección por medio de cultivo nuevo y se incubaron las células a 37°C. A las 48 horas post infección se analizó la expresión del marcador EGFP en cada línea celular transducida por microscopía de fluorescencia y por citometría de flujo.

6.4. Determinación de la Eficiencia de la Infección Retroviral

6.4.1. Análisis de Expresión por Microscopía de Fluorescencia

La comprobación de la eficiencia de infección retroviral se realizó mediante el uso del sistema in vivo compuesto por microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara CCD monocroma y color, empleando las ópticas para campo claro y fluorescencia con los respectivos filtros de fluorescencia para FITC y DAPI. Para determinar las condiciones óptimas de transducción, las células a infectar se sembraron sobre cubres estériles de 18 mm x 18 mm a una densidad celular de 80.000 células por cubre. Se cultivaron a 37°C en atmósfera humidificada al 5% de CO₂ durante 18 horas y luego se realizó la infección retroviral como se describió previamente en presencia de concentraciones variables de polibreno. A las 48 horas se procedió al lavado de los cubres con 2 ml de PBS 1X (2 veces) y fijación de las células por

incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente en 2,0 ml de PBS/Paraformaldehído al 4% (pH=7,4-7,6; filtrado; Sigma). A continuación se lavaron dos veces con 2,0 ml de PBS 1X, se añadieron 10 μ L de solución DAPI de concentración 10 μ g/ μ l (Sigma) sobre cada cubre y se incubaron 3 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron por inmersión primero en H₂O milliQ y luego en etanol 70% (Merck) durante 5 segundos. Una vez secas, se montaron invertidas sobre un portaobjeto, al que se había añadido previamente una gota de medio de montaje Mowiol (Aldrich), se dejaron secar durante 30 minutos en estufa a 37°C y se conservaron a 4°C hasta su visualización por microscopía. Las fotografías se hicieron con filtro FITC (λ =488 nm) para las células EGFP positivas, filtro DAPI (λ =360 nm) para las positivas y negativas, y en campo claro para los controles negativos.

6.4.2. Análisis de Expresión por Citometría de Flujo

A las 48 horas post-transducción se determinó el porcentaje de células que expresaban la proteína verde fluorescente EGFP utilizando los citómetros de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson) y COULTER EPICS XL-MCL (Coulter). Los niveles de expresión de proteína verde fluorescente así como también el porcentaje de células EGFP positivas fueron analizados periódicamente luego de cada subcultivo durante los 11 meses posteriores a la infección. Durante ese período de tiempo, las células transducidas se sometieron a dos procesos de separación celular por citometría de flujo con el fin de enriquecer la fracción de células EGFP positivas, obteniéndose finalmente células que expresan establemente la proteína fluorescente.

Para la adquisición y análisis por citometría de flujo, las células se resuspendieron en volúmenes variables de *tampón para la adquisición de muestras*, comprendidos entre 0,1 y 2,0 ml, no superando en ningún caso el límite de detección sugerido por el fabricante de 500.000 células/500 μ l.

| Tampón para la adquisición de muestras | |
|--|---|
| ✓ | PBS 1X |
| ✓ | 5 mM EDTA |
| ✓ | 0,5% suero fetal bovino o seroalbúmina bovina |

Tabla 2. Composición del tampón utilizado para el análisis de células por citometría de flujo

6.5. Separación Diferencial de Células EGFP Positivas por Citometría de Flujo (Cell Sorting)

Las células JAR, JEG-3 y 293 transducidas con retrovirus que expresaban la proteína verde fluorescente EGFP, designadas a partir de ahora como JAR/G, JEG-3/G y 293/G respectivamente, se analizaron y separaron a los 7 días post infección mediante los sistemas de separación diferencial de células FACStar^{Plus} y FACSVantage SE (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Para ello, las células se suspendieron por tratamiento con Tripsina 0,25% luego de lavarse con PBS 1X y EDTA 0,02% tal como se describió en 5.3, se centrifugaron a 1250 rpm y se resuspendió la pastilla de células en 1-3 ml de *tampón para la separación de células* (5 millones de células/ml). En el instante previo a la separación, las células en suspensión se filtraron con filtro de 30 μ m (Filcon, 30 μ m Sterile, Cup-Type, Becton Dickinson)

para evitar que se tapone la boquilla por los agregados celulares. Finalmente las células se sometieron a separación por citometría de flujo en el modo de presión/velocidad *normal* (aprox. 3000 células/seg.) seleccionándolas por su fluorescencia verde a través del filtro de paso de banda FL1 ($\lambda=530\text{-nm}/30\text{-nm}$) cuando son excitadas por el láser de argón ($\lambda=488\text{ nm}$; azul).

Las poblaciones de células seleccionadas por su expresión del transgen EGFP, se mantuvieron en cultivo durante al menos dos meses. Posteriormente fueron sometidas a una segunda separación diferencial por citometría de flujo, escogiéndose aquellas células con el mayor nivel de expresión de proteína fluorescente. Las poblaciones de células EGFP positivas resultantes (JAR/G, JEG-3/G y 293/G) se mantuvieron en cultivo durante un período superior a los 8 meses con el fin de verificar la estabilidad y nivel de expresión del transgen EGFP.

| Tampón para la separación de células | |
|--------------------------------------|-------------|
| ✓ | PBS 1X |
| ✓ | 5 mM EDTA |
| ✓ | 25 mM HEPES |
| | pH=7,0 |

Tabla 3. Composición del tampón utilizado para la separación de células por citometría de flujo (Cell Sorting)

7. Ensayos de Adhesión Celular

7.1. Desarrollo de un Nuevo Modelo de Adhesión Celular *in vitro* Basado en la Citometría de Flujo para el Estudio de la Adhesión de Trofoblastos al Endometrio Humano

Para los ensayos de adhesión, las líneas celulares endometriales RL95-2 y HEC-1A se sembraron y crecieron hasta confluencia total en placas de seis pocillos P-6 (Falcon™, Becton Dickinson), utilizando sus respectivos medios de cultivo. El medio de cultivo fue renovado sistemáticamente cada 24 horas para asegurar el suministro de nutrientes, teniendo en cuenta el elevado nivel de confluencia celular que alcanzan las células hasta la formación de la monocapa. Asimismo, en el día del ensayo, el medio de cultivo fue renovado 1 hora antes de colocar las células en co-cultivo, utilizando para ello una mezcla 1:1 de los medios de cultivo de las células a co-cultivar.

La preparación de las células JAR/G, JEG-3/G y 293/G en suspensión se realizó según el procedimiento descrito por Chervenak e Illsley en 2000, en el cual la adhesión e interacción entre las células se minimiza mediante el tratamiento previo de las mismas con tripsina alrededor de 18 horas antes de efectuar el ensayo de adhesión.

Así, las placas P-100 de células EGFP positivas al 75% de confluencia fueron lavadas cuidadosamente con 10 ml de PBS 1X y luego con 5 ml de EDTA 0.02% durante 3 minutos, añadiéndose finalmente 2,0 ml de tripsina 0,25%. Tras una incubación de 1-2 minutos a temperatura ambiente, las células fueron disgregadas mecánicamente utilizando una pipeta automática acoplada a pipetas Pasteur de vidrio, hasta la obtención de una suspensión de células completamente separadas. A continuación, se recogieron en tubos de fondo cónico de 15 ml (Falcon™, BD) con 8 ml de medio de cultivo fresco y se centrifugaron durante 5 minutos a 1250 rpm y 4°C. Eliminado el sobrenadante, se resuspendieron en 30 ml del medio respectivo contenido en tubos de 50 ml (Falcon™, BD), homogeneizando por agitación para

luego colocar 10 ml en cada nueva placa P-100 (3 placas). Las células, completamente separadas en este proceso, fueron luego colocadas en incubador durante toda la noche (18 horas) permitiendo su recuperación y evitando el re-establecimiento de las interacciones célula-célula por encontrarse lo suficientemente dispersas a esa dilución (**Figura 8**, paso 1).

El día del ensayo, las placas de células EGFP positivas pre-acondicionadas se lavaron con 10 ml de PBS 1X, luego con 5 ml de EDTA 0,02%, y se sometieron a una tripsinización mínima durante 30 segundos inmediatamente antes del ensayo, obteniéndose así una suspensión de células simples (**Figura 8**, paso 2) con una viabilidad superior al 99% según los análisis de exclusión de Ioduro de Propidio realizado tal como se describió anteriormente en el apartado **5.5**. La pastilla de células se resuspendió en todos los casos en 1,5 ml de medio de cultivo mezcla.

En los ensayos de adhesión, volúmenes/cantidades idénticas (200 μ l) de éstas células JAR/G, JEG-3/G o 293/G en suspensión, aproximadamente entre 10.000-100.000 células/100 μ l, se añadieron a cada pocillo de la placa de cultivo P-6 (**Figura 8**, paso 3a) que contenían las monocapas de células endometriales RL95-2 o HEC-1A. Simultáneamente, otro volumen idéntico se añadió a un tubo de 5 ml de fondo redondo para citometría de flujo (FalconTM, BD) que contenía 0,8 ml de tampón para adquisición de muestras, el cual se utilizó como “*referencia*”, indicando el número de células totales inicialmente añadidas a cada pocillo (**Figura 8**, paso 3b).

Las placas de 6 pocillos se incubaron a 37°C en incubador durante periodos de tiempo variables de 30, 60, 90 ó 120 minutos, en medio de cultivo mezcla conteniendo 0%, 1% o 10% de SFB, siendo finalmente 60 minutos y 10% de SFB las condiciones que se utilizarían para cuantificar la adhesión célula-célula (**Figura 8**, paso 4).

Transcurrido el tiempo de co-cultivo, el medio de cada pocillo fue aspirado y colocado en un tubo de fondo cónico de 15 ml (FalconTM, BD). Inmediatamente después, cada pocillo fue lavado primero con 3 ml de PBS 1X y luego con 1,5 ml de EDTA 0,02% durante 1 minuto, ambos precalentados a 37°C, recogiendo los volúmenes de cada lavado en el mismo tubo cónico inicialmente asignado a cada pocillo. Los tubos resultantes, conteniendo las células “*no adheridas*”, se centrifugaron durante 5 minutos a 1250 rpm y 4°C (centrífuga Beckman-Coulter modelo Allegra 6R), aspirando luego los sobrenadantes y resuspendiendo las células en el mismo volumen final de tampón que el utilizado para el tubo de referencia, arbitrariamente fijado en 1,0 ml (**Figura 8**, paso 5).

Para lograr un procedimiento consistente y reproducible, los lavados se realizaron utilizando una pipeta automática programada para dispensar un volumen exacto de fluido con idéntica fuerza cada vez. Asimismo, los volúmenes de líquido de lavado se dirigieron contra las paredes laterales de cada pocillo con el fin de minimizar las fuerzas erosivas sobre las monocapas de células endometriales.

Las células EGFP positivas “*adheridas*” a la monocapa fueron luego colectadas por adición de 1,5 ml de tripsina 0,25% a cada pocillo, recogiendo en un nuevo tubo cónico de 15 ml que contenía 4 ml de medio de cultivo. Se centrifugaron y resuspendieron de forma análoga a la descrita para las células no adheridas (**Figura 8**, paso 6).

Finalmente, se determinó el número absoluto de células EGFP positivas en cada tubo mediante el

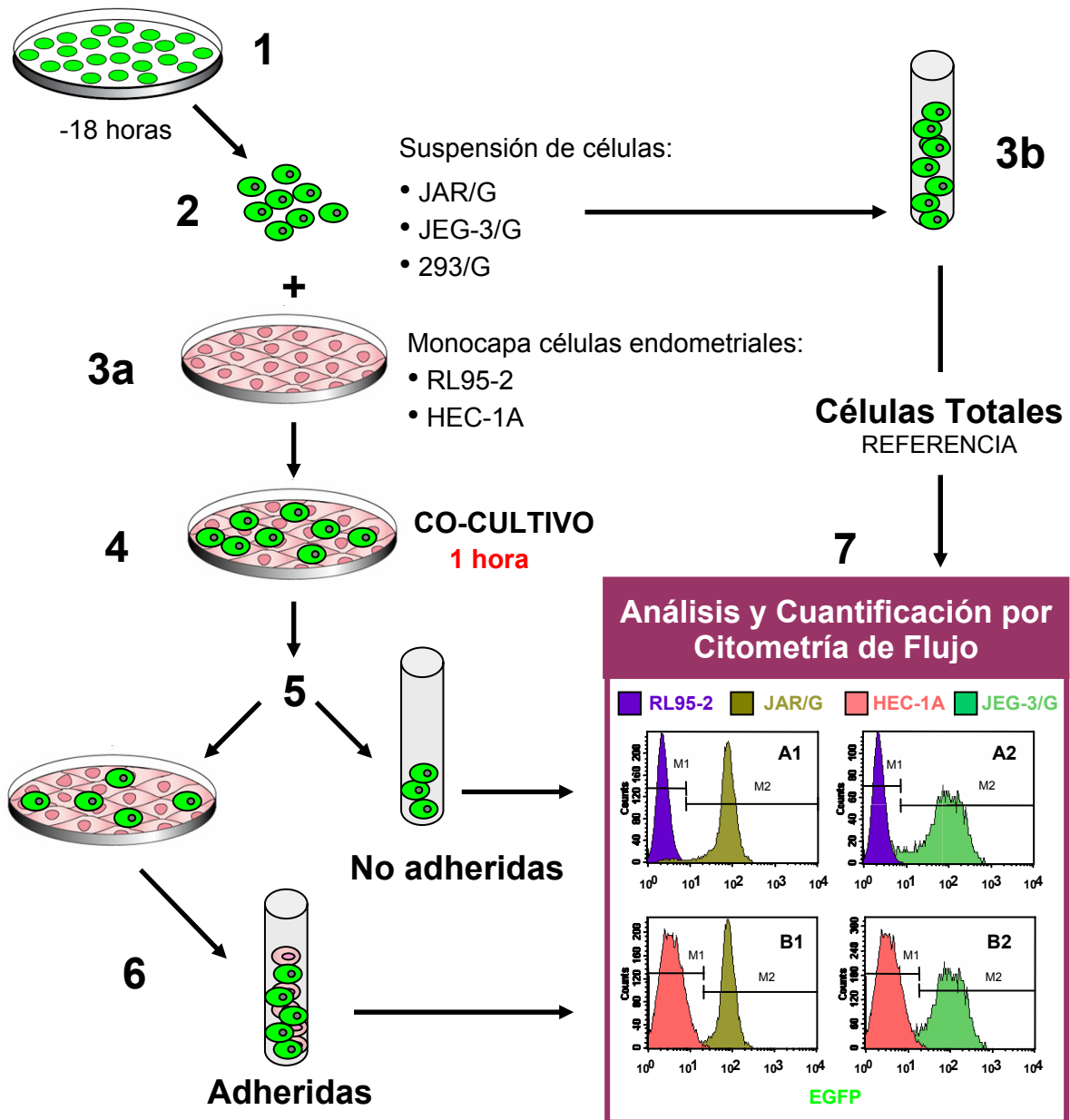


FIGURA 8. Representación esquemática del modelo de adhesión celular *in vitro* de Trofoblastos a Células Epiteliales Endometriales basado en la citometría de flujo. Las líneas celulares endometriales RL95-2 y HEC-1A se crecieron hasta confluencia total en placas de 6 pocillos. Luego las células JAR/G, JEG-3/G y 293/G se disgregaron 18 horas antes del co-cultivo y se subcultivaron a una densidad tal que permitió su recuperación e impidió el re-establecimiento de las interacciones célula-célula (1). En el momento del ensayo, una leve tripsinización de estas células permitió obtener una suspensión de células simples con una viabilidad superior al 99% (2), las cuales se añadieron en cada pocillo sobre las monocapas endometriales confluentes (3a) y paralelamente en un tubo con tampón para el análisis de células por citometría de flujo, el cual se utilizará como referencia del total de células inicialmente añadidas (3b). Las células se co-cultivaron durante 1 hora en incubador a 37°C, empleando para el cultivo una mezcla 1:1 de los medios de crecimiento de ambos tipos celulares (4). Posteriormente se recogieron en sendos tubos las células no adheridas por aspiración, realizando lavados con PBS 1X y EDTA 0,02% (5) y las células adheridas se colectaron por tripsinización (6). Tras centrifugar todos los tubos durante 5 minutos a 1250 rpm y 4°C, se decantaron los sobrenadantes y se resuspendieron las pastillas de células en tampón para adquisición de muestras, realizando el análisis y cuantificación por citometría de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson), permitiendo así evaluar la adhesión de las distintas líneas celulares trofoblásticas sobre los dos tipos de células endometriales (7).

análisis realizado con el citómetro de flujo FACSCalibur, Becton Dickinson (**Figura 8**, paso 7), expresando el porcentaje de células *adheridas* y *no adheridas* en función de las *células totales* inicialmente añadidas a cada pocillo.

7.2. Recuento Absoluto de Células por Citometría de Flujo Utilizando Tubos *BD TruCOUNT™*

Las muestras celulares resultantes de los ensayos de adhesión que se realizaron siguiendo este nuevo modelo experimental, se sometieron al estudio por citometría de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson), utilizando para el recuento absoluto de células tubos *BD TruCOUNT™*. Estos tubos contienen una pastilla liofilizada en su fondo que se disuelve al entrar en contacto con el tampón, liberando un número conocido de microesferas fluorescentes que emiten simultáneamente en todos los canales (FL1, FL2 y FL3). Durante el análisis, se pudo determinar el número absoluto de células EGFP positivas (células/ μ l) en la muestra comparando los eventos celulares con los eventos de las microesferas. La fórmula para el cálculo del número absoluto de células en la muestra es:

$$\# \text{ Absoluto Células EGFP}^+ = \frac{\# \text{ eventos de la región de células EGFP}^+ \text{ [R3]}}{\# \text{ eventos absolutos región microesferas [R2]}} \times \frac{\# \text{ Microesferas del Tubo TruCOUNT}^a}{\text{Volumen ensayo Tubo TruCOUNT}^b}$$

^a número absoluto de microesferas fluorescentes liofilizadas en cada tubo; valor predeterminado para cada lote

^b volumen del ensayo

Para estos ensayos, se añadió a cada tubo *TruCOUNT™* un volumen exacto de 500 μ l de las células resuspendidas en tampón de muestras, y se fijó el tiempo de adquisición en 50 segundos con el citómetro en la modalidad de *flujo alto*, siendo la precisión en la medición del volumen el parámetro crítico para la obtención de resultados fiables.

El análisis de las muestras correspondientes a los tubos de *células adheridas*, *no adheridas* y *células totales*, se realizó en un gráfico de dispersión celular, es decir, analizando Tamaño (FSC-H) vs. Complejidad Celular (SSC-H). En este gráfico (**Figura 9.A**) se delimitó una región R1, que abarca tanto la población de microesferas, ubicadas sobre la izquierda, como la de células a la derecha, la cual fue identificada a su vez como región R4 para un posterior análisis. Para el cálculo del número de eventos correspondiente a microesferas y células presentes en dicha región R1, se efectuó un análisis multiparamétrico de fluorescencias en una gráfica de dispersión celular FL1 vs. FL3 (**Figura 9.B**), permitiendo así discriminar en el eje x las células EGFP positivas en función de su fluorescencia verde a través del filtro FL1 (región R3), y simultáneamente en el eje y las microesferas por su fluorescencia roja mediante la selección del filtro FL3 (región R2). Un tercer histograma FL1 vs. N° células fue utilizado para analizar las células de la región R4 en base a su expresión de EGFP (**Figura 9.C**).

Las diferencias existentes entre las células EGFP positivas adheridas y no adheridas respecto a las células inicialmente añadidas constituyen medidas directa e indirecta respectivamente de la adhesión celular, existiendo de este modo dos valores de adhesión celular por un mismo pocillo, lo cual proporciona mayor consistencia a los valores obtenidos.

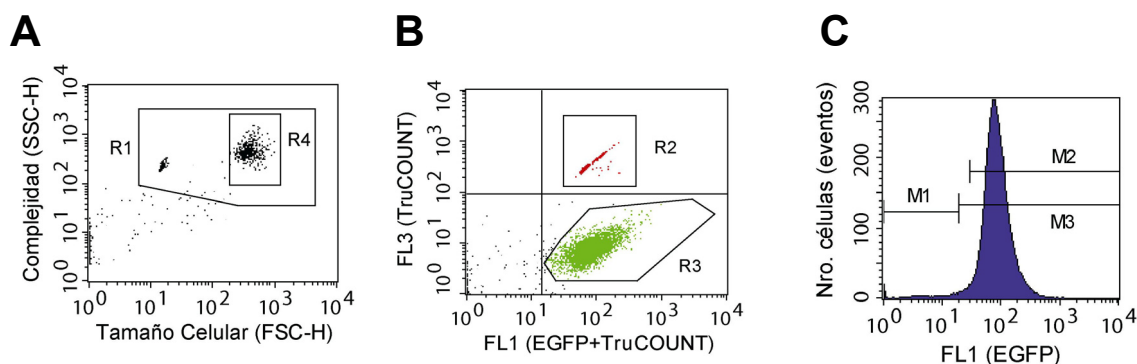


FIGURA 9. Determinación del número absoluto de células EGFP positivas en cada tubo (células *adheridas*, *no adheridas* y *células totales*) mediante la utilización de tubos BD TruCOUNT™ que contienen un liofilizado de microesferas fluorescentes. Se analizaron las poblaciones en una gráfica de Tamaño (FSC-H) vs. Complejidad Celular (SSC-H), delimitando una región R1 que abarca tanto a las microesferas como a las células, y otra R4 para analizar sólo las células en función a su expresión de EGFP (A). El número absoluto de eventos correspondientes a microesferas y células se determinó mediante una gráfica de densidad de puntos FL1 vs. FL3 de la región R1 (B), discriminando las células por su fluorescencia verde con el filtro FL1 (región R3) de las microesferas cuya fluorescencia roja se analizó con el filtro FL3 (región R2). El tercer histograma FL1 vs. N° Células se utilizó para analizar las células de cada fracción (región R4) en base a su expresión de la proteína EGFP (C).

7.3. Modulación de la Diferenciación Celular

Para inducir la diferenciación de las células de coriocarcinoma placentario JAR/G y JEG-3/G, así como también las de epitelio de riñón 293/G, se añadieron a los respectivos medios de cultivo Foskolina (FSK, Sigma) y Forbol 12-Miristato 13-Acetato (PMA, Sigma), a concentraciones finales de 80 μ M y 400 nM respectivamente. Estas concentraciones no presentaron efectos nocivos ni tóxicos sobre las células, de manera acorde con lo descrito previamente en la literatura, y demostraron ser las más efectivas en la inducción de la diferenciación (Uehara *et al.*, 2001; Ahmet *et al.*, 1991; Ritvos *et al.*, 1988).

Estas moléculas, insolubles en agua, se prepararon como soluciones stock en DMSO (Sigma), a concentraciones de 10 mM para FSK y 100 μ M para PMA, resultando en concentraciones finales de DMSO en el medio de cultivo de 0,8 y 0,2 % respectivamente, no tóxicas para las células.

La diferenciación se realizó añadiendo los agentes moduladores al medio de cultivo cuando la confluencia celular alcanzaba un 50-60% de las placas P-100. El tratamiento se prolongó durante 3 días, adicionando los agentes moduladores de la diferenciación cada 24 horas con cada renovación del medio. Finalmente, las células pre-tratadas fueron utilizadas para los ensayos de adhesión, obteniéndose células en suspensión que se co-cultivaron con monocapas de células endometriales RL95-2 o HEC-1A, siguiendo el modelo de adhesión diseñado en este trabajo tal como se describió en 7.1.

7.4. Análisis Estadístico de los Datos

Los valores de adhesión porcentual se calcularon como valores promedio con desvío estándar para los diversos ensayos realizados un mínimo de cinco veces (n=5) con tres a seis repeticiones paralelas (6 pocillos) en cada experimento. Los resultados se expresaron como número de células EGFP positivas adheridas respecto al número de células EGFP positivas totales inicialmente añadidas a cada pocillo. La significancia estadística, es decir, que la diferencia encontrada entre los grupos sea verdadera y no

producto del azar, fue determinada mediante el análisis de la varianza (ANOVA-Analysis of Variance) con la aplicación disponible en línea en la página Web <http://www.physics.csbsju.edu/stats/anova.html>, seguido de la prueba de Fischer, siendo estadísticamente significativa una $P < 0,05$. Este tipo de análisis de varianza utiliza una sola variable numérica medida de los elementos de la muestra para probar la hipótesis nula de igualdad de medias poblacionales.

8. Genómica Funcional: Técnicas de Análisis de RNA, DNA y Proteínas

8.1. Aplicación del Modelo de Adhesión Celular Trofoblasto-Epitelio Endometrial Desarrollado para el Análisis de la Expresión Génica

Una vez comprobada la elevada reproducibilidad de este nuevo modelo *in vitro* basado en la citometría de flujo para la cuantificación de la adhesión de trofoblastos a células epiteliales endometriales, se utilizó una modificación del mismo para realizar estudios de expresión génica en las células co-cultivadas. Para efectuar estas determinaciones, las células EGFP positivas (JAR/G, JEG-3/G y 293/G) fueron co-cultivadas con monocapas de células endometriales RL95-2 o HEC-1A durante períodos de 16 y 42 horas. Posteriormente, las células fueron sometidas a separación por citometría de flujo utilizando como marcador de selección la proteína verde fluorescente EGFP.

Básicamente, las suspensiones de células pre-acondicionadas (**Figura 10**, paso 1) y disgregadas al momento de realizar el ensayo tal como se describió anteriormente (**Figura 10**, paso 2), fueron añadidas sobre monocapas de células endometriales (**Figura 10**, paso 3) crecidas hasta confluencia total en placas P-60 (FalconTM, Becton Dickinson), incubándolas luego a 37°C en atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ durante tiempos de 16 y 42 horas (**Figura 10**, paso 4). Como medio de incubación se utilizaron mezclas en proporciones 1:1 de los medios de cultivo de las líneas celulares involucradas, renovando el mismo a las 24 horas para las incubaciones más prolongadas. Transcurrido el período de interacción, las células en co-cultivo fueron lavadas primero con 6 ml de PBS 1X durante 1 minuto, luego con 6 ml de EDTA 0,02% durante 5 minutos y finalmente se disgregaron por tratamiento con 2,0 ml de tripsina 0,25% durante 2-3 minutos con la ayuda de una pipeta mecánica acoplada a una pipeta Pasteur de vidrio. Para detener la reacción, las células en suspensión se recogieron luego en un tubo de fondo cónico de 15 ml que contenía 8 ml de medio de cultivo fresco y se centrifugaron a 1250 rpm y 4°C durante 5 minutos, eliminando a continuación el sobrenadante por aspiración y resuspendiendo las células en 5 ml de tampón para la separación de muestras (**Figura 10**, paso 5).

En el instante previo a la separación, las células en suspensión se filtraron con filtro de 30 µm (Falcon, 30 µm Sterile, Cup-Type, Becton Dickinson) y se sometieron a separación por citometría de flujo (FACSVantage SE, Becton Dickinson) en el modo de presión/velocidad *normal* (aprox. 3000 células/seg.) seleccionándolas por su fluorescencia verde a través del filtro de paso de banda FL1 ($\lambda = 530\text{-nm}/30\text{-nm}$) cuando son excitadas por el láser de argón ($\lambda = 488\text{ nm}$; azul), obteniéndose finalmente las fracciones de células trofoblásticas y endometriales por separado luego de su interacción (**Figura 10**, paso 6).

Las células EGFP positivas y negativas así separadas fueron recogidas en tubos que luego se centrifugaron durante 5 minutos a 1250 rpm y 4°C para eliminar sus sobrenadantes. Cada pastilla de células se resuspendió en el volumen remanente y luego se adicionó el reactivo correspondiente para la

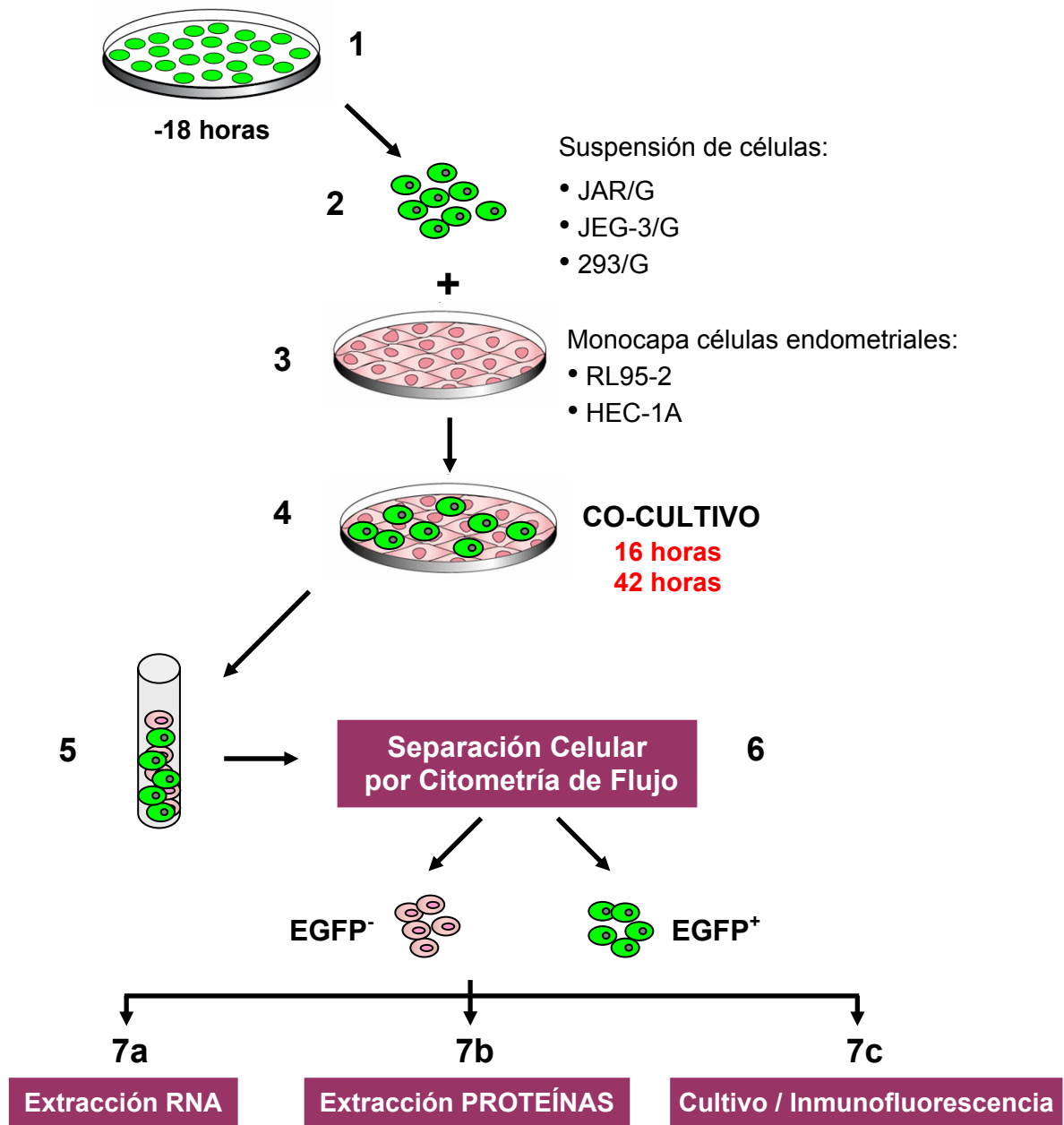


FIGURA 10. Aplicación del modelo de adhesión celular Trofoblasto-Epitelio Endometrial desarrollado para el análisis de la expresión génica. Las células se pre-acondicionaron 18 horas antes del ensayo por tripsinización y subcultivo a una densidad que permitió su recuperación e impidió el reestablecimiento de las interacciones célula-célula (1), permitiendo obtener luego una suspensión de células completamente disgregadas mediante una leve tripsinización en el momento del ensayo (2), la cual se añadió sobre las monocapas confluentes de células endometriales (3). El co-cultivo resultante se incubó durante 16 o 42 horas a 37°C en una mezcla de proporción 1:1 de los respectivos medios de cultivo (4). Transcurrido ese período de tiempo, las células en co-cultivo se recogieron por tratamiento con tripsina luego se ser lavadas con PBS y EDTA, se centrifugaron y se resuspendieron en el tampón para la separación de muestras (5). Inmediatamente antes de la separación, las células se filtraron empleando filtros de 30 µm y se separaron por citometría de flujo (FASCVantage SE, Becton Dickinson) utilizando como marcador de selección la EGFP (6). Las fracciones aisladas de células EGFP positivas y negativas recuperadas durante los 30 minutos posteriores a la tripsinización, se trataron finalmente con los reactivos correspondientes para la obtención de RNA y/o proteínas (7a y 7b), mientras que otras fracciones se regresaron a cultivo para su posterior fijación y análisis por inmunofluorescencia (7c).

extracción de RNA o bien para extracción de proteínas (**Figura 10**, paso 7a y 7b). El experimento se repitió también para obtener células post 42 horas de interacción, las cuales esta vez se volvieron a cultivar en incubador para su posterior fijación y análisis por inmunofluorescencia (**Figura 10**, paso 7c). Las células control o sin interacción, que se utilizarán como referencia o condición basal para las comparaciones de los patrones de expresión, se crecieron, cultivaron y sometieron a las mismas condiciones de cultivo y procedimientos separativos recientemente descritos para los co-cultivos.

En ningún caso la separación de células se dejó progresar más allá del minuto 30, contado a partir del tratamiento con tripsina del co-cultivo, de modo de evitar en la medida de lo posible la degradación de los RNAs y/o las proteínas más lábiles durante el proceso de separación.

| Monocapa | | Células en suspensión añadidas | Tiempo co-cultivo |
|----------|-----|--------------------------------|-------------------|
| RL95-2 | vs. | JAR/G | 16 y 42 hs. |
| HEC-1A | | JAR/G | 42 hs. |
| 293/G | | JAR | 42 hs. |
| HEC-1A | | 293/G | 42 hs. |

Tabla 4. Tipos de co-cultivos de células trofoblásticas y endometriales realizados. Las células 293/G se utilizaron como control de interacción. Todos ellos fueron separados por citometría de flujo (FACSVantage SE, BD)

8.2. Obtención de Tejido Placentario a Término

El tejido fue obtenido por la Dra. Angelina Rodríguez Torres en la Clínica Montepíncipe de Madrid, en el momento del parto de una mujer cuyo embarazo transcurrió con total normalidad y sin ningún tipo de tratamiento, con el consentimiento expreso de la Comisión de Ética. El tejido fue lavado sucesivamente con una solución salina estéril de cloruro sódico al 0,8% y cortado en trozos pequeños de aproximadamente 1 cm³. Los fragmentos se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido, se colocaron en tubos de fondo cónico de 50 ml (Falcon™) para su transporte en nieve carbónica y su conservación final en ultracongelador a -70°C hasta su procesamiento para extracción de RNA o proteínas.

Siempre que se trabaje con este tipo de muestras, ha de evitarse de forma absoluta la congelación lenta mediante inserción del tejido en frigorífico, arcón congelador o criostato, ya que en determinadas muestras ocurren procesos de degradación del RNA.

8.3. Extracción de RNA total de Líneas Celulares y de Tejidos

Para las extracciones de RNA total se utilizaron dos metodologías diferentes. La primera de ellas es un método análogo al descrito por Chomczynsky y Sacchi (1987), utilizando el reactivo TRIzol™ (Gibco BRL, Life Technologies) y la segunda utilizando el equipo comercial NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel) para el aislamiento de RNA total de células o tejidos.

Todos los procesos de extracción se desarrollaron en ambientes libres de ribonucleasas, utilizando soluciones preparadas con H₂O pre-tratada con dietil pirocarbonato al 0,2% (DEPC, Sigma), a excepción de aquellas soluciones que llevaban Tris. Asimismo, todas las muestras se manipularon utilizando puntas

con filtro libres de RNAsas, DNAsas y pirógenos (1, 2, 200 y 1000 μ l; Small Micron First Class Filter Tip, Quality Scientific Plastics).

▪ **Tejidos:** la muestra de tejido a extraer se descongeló a la vez que se homogeneizó en 1 ml de TRIzol (volumen por cada 50-100 mg de tejido) utilizando un homogeneizador eléctrico de aspap (Polytron). El volumen de muestra no excedió en ningún caso el 10% del volumen de TRIzol utilizado para su homogeneización. Opcionalmente, en el caso de muestras con un alto contenido en proteínas, grasa, polisacáridos o material extracelular (como músculos, tejidos grasos, etc), puede ser necesario un paso adicional. Tras la homogeneización, se deberá eliminar el material insoluble mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 10 min a 4° C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio para proseguir con la separación de fases.

▪ **Células Crecidas en Monocapa:** se aspiró cuidadosamente el sobrenadante de las placas P-100 y P-60 donde se estaban cultivando las células y se lavaron 2 veces con 6 y 10 ml de PBS 1X respectivamente. Las células se lisaron directamente en la placa de cultivo cuando alcanzaron confluencias cercanas al 75%, añadiendo 1 ml de TRIzol por cada 10 cm² de superficie de cultivo y pasando el lisado varias veces a través de la pipeta. La cantidad de TRIzol a añadir depende de la superficie del pocillo o frasco y no de la cantidad de células presentes. Una cantidad insuficiente de TRIzol puede resultar en contaminación del RNA aislado con DNA.

▪ **Células en Suspensión:** las células trofoblásticas y endometriales adherentes, cuyo crecimiento origina monocapas, que se emplearon para los ensayos de co-cultivo según el modelo previamente descrito, fueron luego tratadas con tripsina para su resuspensión, separación por citometría de flujo y extracción del RNA. Las células en suspensión recogidas directamente del citómetro de flujo se centrifugaron a 1250 rpm durante 5 min y 4°C, desechando el sobrenadante por decantación. A continuación, cada pastilla de células se resuspendió en el volumen residual, se añadió el TRIzol necesario (1 ml por cada 5-10x10⁶ células) y se pipeteó repetidas veces.

8.3.1. Método de Extracción de RNA Total con el Reactivo TRIzol™

El TRIzol es un reactivo listo para usar constituido por una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Durante la homogenización o lisis de la muestra, el reactivo mantiene la integridad del RNA al mismo tiempo que rompe las células y disuelve sus componentes.

▪ Homogenización: las soluciones de TRIzol con células provenientes de tejidos, células crecidas en monocapas o células en suspensión, se homogeneizaron pasándolas repetidamente a través de la pipeta, transfiriendo luego los homogenizados celulares a tubos limpios de polipropileno de 1,5 ml (Eppendorf) para continuar con la separación de fases. Cuando las muestras no se procesaron inmediatamente, se las congeló en hielo seco y conservó a -70°C hasta su procesamiento.

▪ Separación de fases: las muestras homogeneizadas se incubaron 5 min a temperatura ambiente (TA) para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. Se añadió luego 0,3 ml de cloroformo (Merck) por cada 1 ml de TRIzol utilizado, cerrando los tubos con cuidado y agitando a mano vigorosamente durante 15 seg para luego incubarlos 2-3 min a TA. Las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 min a 4°C (Centrífuga de ángulo de rotor fijo 5417R, Eppendorf).

Tras la centrifugación, la mezcla se separó en una fase inferior roja de fenol-cloroformo, una interfase y una fase acuosa superior incolora. El RNA permaneció exclusivamente en la fase acuosa superior cuyo volumen fué de aproximadamente el 60% del volumen de TRIzol utilizado en la homogeneización.

Para la separación de fases de aquellas muestras de células a las que se añadió TRIzol una vez separadas por citometría de flujo, y cuyo número era bajo (menor a 500.000 células), se utilizaron tubos *Eppendorf Phase Lock Gel™* (PLG). Estos tubos contienen un gel inerte y termoestable que es compatible con las reacciones enzimáticas de los ácidos nucleicos, de modo que luego de la centrifugación, las fases acuosa y orgánica quedan separadas por una barrera sólida que favorece la recuperación, facilita la manipulación, disminuye la contaminación con DNA o proteínas y minimiza la exposición del usuario a los agentes tóxicos orgánicos.

▪ Precipitación del RNA: se transfirió la fase acuosa superior a un tubo limpio y se precipitó el RNA mezclándola con 0,5 ml de isopropanol (Merck) por cada 1 ml de TRIzol utilizado en la homogeneización inicial. Se incubaron las muestras durante 10 min a TA y se centrifugaron 10 min a 12.000 rpm y 4°C.

▪ Lavado: tras aspirar el sobrenadante con cuidado, se lavaron las pastillas de RNA una vez con etanol al 75% (Merck), añadiendo al menos 1 ml de etanol 75% por cada 1 ml de TRIzol usado en la homogeneización inicial. Se agitaron por inversión del tubo al menos 5 veces y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 min a 4°C.

▪ Redisolución del RNA: Tras la centrifugación se aspiraron los sobrenadantes y dejaron secar los RNAs al aire durante unos 10 minutos. Se disolvieron los RNAs con agua libre de RNAsas en el mínimo volumen posible, pipeteando e incubando durante 10 min para lograr una resuspensión total de las pastillas de RNA. Finalmente se guardaron a – 70° C hasta su utilización.

8.3.2. Aislamiento de RNA Total con el Equipo NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel)

Este equipo comercial permite el aislamiento de RNA total a partir de células, tejidos o fluidos biológicos. Para ello, emplea como método de lisis la incubación de las células en una solución que contiene grandes cantidades de iones caotrópicos. Este tampón de lisis inactiva inmediatamente las RNAsas, que se hallan virtualmente presentes en todos los materiales biológicos, y crea unas condiciones de unión apropiadas que favorecen la adsorción del RNA a las membranas de sílice. El DNA contaminante, que también se une a la membrana, es eliminado mediante digestión con DNasa I por aplicación de una solución de DNasa I directamente sobre la superficie de la membrana. Las sales, metabolitos y los componentes macromoleculares celulares son removidos con dos tampones diferentes en dos simples pasos de lavado. Finalmente, el RNA puro es eluído en condiciones de fuerza iónica baja con H₂O libre de RNAsas, conservándose inmediatamente a -70°C para evitar contaminaciones que afecten el RNA dada su elevada sensibilidad a las RNAsas.

Todo el procedimiento de aislamiento de RNA fue realizado a temperatura ambiente, aplicándose a alícuotas de las muestras de células en suspensión (mínimo 300.000 células; hasta 2,5x10⁶) provenientes de la separación por citometría de flujo, las cuales se seleccionaron y separaron en función a la expresión de la proteína verde fluorescente EGFP (Apartado 8.1 y Figura 10, paso 7a).

8.4. Cuantificación de Ácidos Nucleicos

La cuantificación del RNA se realiza por espectrofotometría, teniendo en cuenta que 1 OD (Unidad de absorbancia) equivale a 40 µg de RNA por mililitro, a una longitud de onda de 260 nm en base al coeficiente de extinción del RNA en H₂O. Todas las muestras de RNA total extraídas por ambos métodos se cuantificaron en una solución de Tris-HCl 10 mM de pH 8,0 utilizando el espectrofotómetro **GeneQuant II** (RNA/DNA calculador, Pharmacia Biotech) a la longitud de onda señalada de 260 nm. Los criterios que cumplieron para ser consideradas una buena muestra en base a su pureza fueron:

- La relación de absorbancias A_{260}/A_{280} cercana a 2,0 para el RNA puro (relaciones entre 1,9 y 2,1 son aceptables) al disolver el RNA en soluciones tampón tal como el Tris 10 mM pH 8,0, puesto que esta relación es influenciada por los cambios de pH.
- Comprobación de la integridad del RNA por electroforesis de aproximadamente 0,5 µg de RNA en un gel de agarosa al 1%, con el fin de verificar que la relación de intensidad de los RNAs ribosomales 28S y 18S es de 2:1.

El RNA total cuantificado se diluyó en H₂O libre de RNAsas a concentraciones de 100 ng/µl y se separó en alícuotas que se congelaron a -70°C hasta su utilización. Cada RNA diluido a esa concentración fue nuevamente cuantificado utilizando el espectrofotómetro **NanoDrop®** (ND-1000 Spectrophotometer) que mide a través de una fibra óptica los volúmenes de muestra de 1,5 µl sostenidos por tensión superficial entre el soporte y el brazo del equipo, con un paso de luz de 1 mm, proporcionando una gran precisión y reproducibilidad. De este modo, se elimina la necesidad de soportes o contenedores para las muestras, posibles fuentes de error.

Las muestras de RNA diluidas y re-cuantificadas mediante el uso del NanoDrop®, permitieron obtener nuevos valores que indicaron con mayor precisión la pureza y concentración de los RNAs. Estos valores fueron:

- A_{260}/A_{280} : utilizados para valorar la pureza del RNA o DNA. Relaciones cercanas a 2,0 para RNA puro y a 1,8 para DNA puro. Relaciones apreciablemente menores indican la presencia de restos de proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben fuertemente a 280 nm.
- A_{260}/A_{230} : medición secundaria de pureza de los ácidos nucleicos, comprendida en el rango de 1,8 a 2,2. Valores inferiores indican la presencia de contaminantes co-purificados.
- $ng/\mu l$: concentración basada en la absorbancia a 260 nm, con un límite inferior de detección de 1,5 ng/µl. Permite la cuantificación de muestras con concentraciones inferiores a los 50 ng/µl para las cuales el espectrofotómetro GeneQuant II no es sensible.
- *Espectro*: el instrumento proporciona un espectro de absorción de cada muestra (Absorbancia vs. Longitud de Onda) que permite a simple vista evaluar la pureza de la muestra de RNA o DNA en base a una curva control de RNA puro.

8.5. Análisis de Integridad de los RNAs

La comprobación de la integridad de los RNAs se efectuó mediante dos técnicas en función de la cantidad de RNA a analizar y sus aplicaciones posteriores: la primera por separación electroforética en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes para eliminar las abundantes estructuras secundarias del RNA, empleando la técnica descrita por Goda y Minton (1995); la segunda utilizando el Bioanalizador (Bioanalyzer 2100 expert, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), un ensayo basado en los principios de la separación electroforética tradicional que ha sido adaptado a un formato de chip.

8.5.1. Electroforesis en Geles de Agarosa en Condiciones Desnaturalizantes

Todas las piezas de la cámara de electroforesis se limpiaron previamente con una solución al 0,1% de SDS en H₂O-DEPC para asegurarnos que todos los componentes se hallaban libres de RNAsas.

Para la separación electroforética del RNA se preparó en el momento una solución en H₂O de isotiocianato de guanidina 1M (Sigma). Se pesó la agarosa para preparar un gel al 1% (Sigma) en tampón TBE 1X (90 mM Tris; 90 mM ácido bórico; 2 mM EDTA; pH 8,0), y se disolvió por calentamiento en horno microondas, añadiendo la solución de isotiocianato de guanidina a una concentración final de 20 mM en el momento en que la agarosa fundida estuviese templada al tacto. La agarosa conteniendo el agente desnaturalizante se mezcló y vertió en la cámara de electroforesis, dejándose polimerizar para luego añadir el tampón TBE 1X necesario para el desarrollo de la electroforesis. Las muestras se prepararon mezclando 0,5-1,0 µg de RNA total con 1 µl de tampón de carga para RNA 10X (0,72 ml de formamida; 0,16 ml de MOPS; 0,26 ml de formaldehído; 0,18 ml H₂O-DEPC; 0,10 ml glicerol 80%; 0,08 ml de solución saturada de Azul de Bromofenol al 0,5% en H₂O) en un volumen final de 7 µl, ajustado con H₂O-DEPC. Las muestras de RNA con el tampón de carga se calentaron a 65°C durante 10 minutos para eliminar las estructuras secundarias, se cargaron en el gel y se corrieron a 60 voltios durante 1,5 horas. Finalmente, para visualizar las bandas de RNA se tiñó el gel con una solución de bromuro de etidio 1 µg/ml (Sigma), realizándose las fotos en papel térmico (UPP-110S; Sony) por transiluminación con luz ultravioleta (UVIDOC with floppy; DOC-008-XD Versión 99).

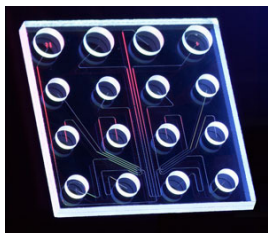
La integridad de los RNAs se verificó por la relación de intensidad de los RNAs ribosomales de mamífero 28S y 18S, de 4718 y 1874 bases respectivamente, comprobando la proporción 28S:18S de 2:1 para los RNAs intactos (Lewin, 1994).

8.5.2. Análisis de RNA por Bioanalizador (Bioanalyzer 2100 expert, Agilent Technologies)

Estos ensayos electroforéticos se basan en los principios tradicionales de electroforesis en gel, transferidos ahora al formato de chip o tarjeta (Imagen **A**). Este formato reduce drásticamente los tiempos de separación y el consumo del RNA. Las muestras y el marcador de RNA se cargan en pequeños pocillos fabricados sobre un soporte de vidrio, que se hallan interconectados por micro canales que forman redes de trabajo, los cuales se llenan de un polímero tamizador y una colorante fluorescente (Imagen **B**). Una vez llenos los pocillos y los micro canales, el chip se transforma en un circuito eléctrico integrado. Cada pocillo está conectado a un



A. Tarjeta para el análisis de RNA total



B. Pocillos y Microcanales sobre el soporte de vidrio

electrodo con su fuente energética independiente que proporciona el máximo control y flexibilidad.

Las biomoléculas cargadas como RNA o DNA son conducidas electroforéticamente por un gradiente de voltaje y separadas por tamaño en presencia del polímero tamizador en función de la relación carga/masa, migrando más lejos los fragmentos más pequeños. Las moléculas de colorante se intercalan en las cadenas de RNA o DNA formando complejos cuya fluorescencia es detectada por un láser inductor, traduciendo luego estos datos en imágenes de tipo gel (bandas) y en electroferogramas (picos). Con la ayuda del marcador, cuyos fragmentos son de tamaño y concentración conocida, creará una curva estándar de Tamaño de Fragmentos vs. Tiempo de Migración.

Toda muestra de RNA ya diluida a una concentración final de 100 ng/ μ l, cuyo destino final fue su utilización para estudios de expresión génica, fue analizada con el Bioanalizador para verificar su integridad, habiéndose recomprobado previamente su concentración y demás parámetros de pureza por espectrofotometría con el sistema NanoDrop® tal como se describió en el apartado **8.4**.

8.6. Digestión Enzimática de DNA Genómico en Muestras de RNA Total

Las muestras de RNA que se utilizaron para los análisis de expresión génica mediante las técnicas de RT-PCR semi-cuantitativa, cuantitativa y microarrays fueron tratadas previamente para eliminar posibles restos de DNA genómico contaminante, utilizando el protocolo descrito por Ausubel y *col.* en 1988. Para ello se realizaron reacciones de 40 μ l de volumen final en tubos eppendorf de 1,5 ml, en los que se adicionó 10 μ l de cada RNA disuelto en agua libre de nucleasas (entre 5 y 50 μ g de RNA total), 4 μ l del tampón de reacción 10X (RQ1 DNase 10 X Reaction Buffer: 400 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM MgSO₄ y 10 mM CaCl₂; Promega), 15 μ l de DNasa I libre de RNasas (RQ1 RNase-Free DNase 1U/ μ l; Promega), 1 μ l de inhibidor de RNasas (RNasin® Ribonuclease Inhibitor 40U/ μ l; Promega) y 10 μ l de H₂O libre de nucleasas. Las reacciones se incubaron en estufa durante 30 minutos a 37°C. A continuación se añadió a cada tubo 110 μ l de H₂O-DEPC para incrementar los volúmenes finales de digestión hasta 150 μ l, lo que favoreció la manipulación y la recuperación de los RNAs tratados con DNasa I durante la posterior extracción con Fenol/Cloroformo:Alcohol Isoamílico (125:24:1).

Las extracciones se llevaron a cabo añadiendo 150 μ l (un volumen) de Fenol/Cloroformo:Isoamílico (Sigma; Cat # P1944), mezclando 15 seg por inversión y centrifugando las muestras durante 5 min a 12.000 rpm y 4°C. La fase acuosa (superior) de cada tubo se transfirió a un tubo eppendorf nuevo de 1,5 ml al que se le añadió 150 μ l de Cloroformo:Alcohol Isoamílico (24:1), mezclando nuevamente por inversión y centrifugando en las mismas condiciones. La fase acuosa superior se transfirió nuevamente a otro tubo nuevo de 1,5 ml al que se añadió 20 μ l de acetato de amonio 5 M (NH₄CH₃COO; Merck) y 400 μ l de etanol absoluto (Merck). Se mezcló durante 10 seg por inversión y se enfrió durante 2 horas o bien O/N a -20°C para favorecer la precipitación del RNA, centrifugando luego a 12.000 rpm y 4°C durante 30 minutos. Las pastillas de RNA así obtenidas se lavaron con 500 μ l de etanol al 75% en H₂O-DEPC, y se dejaron secar al aire para finalmente resuspenderlas en 12 μ l de H₂O libre de nucleasas. La integridad de los RNAs se verificó mediante análisis con el Bioanalizador tal como se describió en **8.5.2**.

8.7. Técnicas de Amplificación de Ácidos Nucleicos

La técnica de amplificación de ácidos nucleicos utilizando polimerasas termoestables (PCR) es una técnica relativamente simple por la que un DNA o cDNA molde es amplificado millones de veces en forma rápida y fiable, permitiendo así aislar el gen de interés del resto de secuencias génicas y generando suficiente cantidad de material para poder realizar análisis experimentales posteriores (Mullis, 1990).

Con el fin de aplicar la metodología de PCR al estudio de RNA, la muestra de RNA ha de ser “retro-transcrita” a cDNA, proporcionando así el molde o sustrato para la polimerasa termoestable, procedimiento que se denomina Transcripción Reversa (RT).

En este trabajo, las reacciones se prepararon en tubos para PCR de 0,2 ml (AXYGEN® Scientific), utilizando puntas con filtro libres de RNasas, DNasas y pirógenos (1, 2, 200 µl; Small Micron First Class Filter Tip, Quality Scientific Plastics)

8.7.1. RT-PCR en Dos Pasos

Se utilizó este procedimiento para aquellos casos en los que se sospechaba o se tenía pruebas de la existencia de transcripción en ambas cadenas del DNA. Se logró diferenciar así los distintos RNAs transcritos dentro de una misma región del gen, utilizando en la reacción de transcripción en reverso (RT) únicamente el oligonucleótido antisentido específico para el RNA mensajero a estudiar.

▪ Primer paso: *Transcripción Reversa* (RT).

Las reacciones para la obtención de la primera cadena de cDNA molde a partir de los RNAs totales se realizaron con la enzima AMV-RT (Avian Mieloblastosys Virus-Reverse Transcriptase; Promega) de acuerdo a las siguientes proporciones:

| Componente | Volumen | Concentración Final |
|--|--------------|---------------------|
| H ₂ O libre de nucleasas | 16.75 µl | --- |
| Tampón de Reacción 5X AMV-RT | 5 µl | 1X |
| Mezcla de dNTPs (1:1:1:1) 10 mM cada uno | 1 µl | 0,4 mM c/u |
| Oligo antisentido (10 µM) | 1 µl | 0,4 µM |
| RNA molde (100 ng/µl) | 1 µl | 100 ng/reacción |
| Enzima AMV-RT (10 U/µl) | 0,25 µl | 0,1 U/µl |
| Volumen Final..... | 25 µl | |

Tabla 5. Mezcla de reacción para la transcripción reversa (RT) del RNA, utilizando la enzima AMV-RT de Promega

Una vez mezclados los reactivos, los tubos se colocaron en el termociclador de tapa caliente (GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer Cetus) programado para realizar la RT (*) y la inactivación AMV-desnaturalización híbridos RNA/cDNA/oligo (#) en las siguientes condiciones:

| | | |
|----------|--------|------|
| 1 ciclo* | 45 min | 48°C |
| 1 ciclo# | 2 min | 94°C |

▪ Segundo paso: *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).*

Para la síntesis de la segunda cadena de cDNA y la posterior amplificación del DNA se utilizó la enzima *AmpliTaq®* (Perkin Elmer). Las proporciones de cDNA molde (mezcla de RT) utilizadas fue inferior al 10% del volumen final de PCR para evitar posibles inhibiciones. Los componentes se mezclaron en tubos nuevos tal como se indica en la siguiente tabla:

| Componente | Volumen | Concentración Final |
|--|--------------|---------------------|
| H ₂ O libre de nucleasas | 26 µl | --- |
| Tampón PCR <i>AmpliTaq</i> 10X | 4 µl | 1X |
| Mezcla de dNTPs (1:1:1:1) 10 mM cada uno | 0,8 µl | 0,2 mM c/u |
| MgCl ₂ 25 mM | 2,4 µl | 1,5 mM |
| Oligo sentido (s) [10 µM] | 1 µl | 0,25 µM |
| Oligo antisentido (as) [10 µM] | 1 µl | 0,25 µM |
| cDNA molde | 4 µl | --- |
| Enzima <i>AmpliTaq®</i> (5 U/µl) | 0,8 µl | 0,1 U/ µl |
| Volumen Final..... | 40 µl | |

Tabla 6. Mezcla de reacción para la amplificación (PCR), utilizando la enzima *AmpliTaq®* DNA polimerasa de Perkin Elmer

Los tubos con la mezcla se colocaron en el mismo termociclador, programado ahora con las condiciones de desnaturalización inicial (⁺), de amplificación (^o) [constituido por tres segmentos: desnaturalización; anillamiento; extensión] y de elongación final (^{oo}):

| | | |
|-------------------------|--------|-------------------|
| 1 ciclo ⁺ | 2 min | 95°C |
| ~35 ciclos ^o | 30 seg | 94°C |
| | 1 min | T _A °C |
| | 2 min | 72°C |
| 1 ciclo ^{oo} | 7 min | 72°C |
| 1 ciclo | ∞ | 4°C |

La temperatura de anillamiento (T_A o *annealing*) se ajustó para cada fragmento a amplificar en base a la temperatura de disociación (T_M o *melting*) de cada oligonucleótido a utilizar. El número de ciclos se fijó en función a los niveles de expresión de cada mensajero.

8.7.2. RT-PCR en Un Solo Paso

Las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos llevadas a cabo en un único tubo tienen como ventaja la reducción en los tiempos necesarios para cada experimento, y fundamentalmente la eliminación de errores de pipeteo. En el caso de reacciones que emplean muestras de RNA, resulta idónea su utilización pues reduce significativamente el riesgo de contaminación al no tener que trasvasar la mezcla de reacción entre tubos.

Las reacciones de RT-PCR en un solo paso se realizaron con el *kit* comercial *AccessQuick™ RT-PCR System* (Promega), diseñado para facilitar la ejecución de las reacciones de RT-PCR al combinar todos los componentes de la reacción de amplificación (PCR) en un único tubo. La enzima AMV-RT se provee en un tubo separado para permitir la inclusión de controles negativos de RT. Este sistema monotubo de dos enzimas permite la síntesis de la primera cadena de cDNA mediante la enzima AMV-RT (Avian Myeloblastosis Virus) y la síntesis de la segunda cadena y amplificación del DNA por la enzima termoestable *Tfl* DNA polimerasa (*Thermus flavus*). La especificidad y reproducibilidad se mejoran notablemente ya que trabaja a temperaturas elevadas, minimizando a su vez problemas relacionados con las estructuras secundarias del RNA.

De esta manera, simplemente se le adicionó a la mezcla maestra de reacción (*AccessQuick™ Master Mix*) el RNA molde, la enzima AMV y los cebadores (oligonucleótidos sentido y antisentido), mejorando así parámetros como la sensibilidad, rendimiento y eficiencia de las reacciones, a la vez que reduce drásticamente el tiempo de configuración de cada experimento.

La mezcla para cada reacción se preparó de acuerdo a la siguiente tabla:

| Componente | Volumen | Concentración Final |
|---------------------------------------|--------------|---------------------|
| H ₂ O libre de nucleasas | 21 µl | --- |
| Mezcla Maestra <i>AccessQuick™</i> 2X | 25 µl | 1X |
| Oligo sentido (s) [10 µM] | 1 µl | 0,2 µM |
| Oligo antisentido (as) [10 µM] | 1 µl | 0,2 µM |
| RNA molde (100 ng/µl) | 1 µl | 100 ng/reacción |
| Enzima AMV-RT (5 U/µl) | 1 µl | 0,1 U/µl |
| Volumen Final..... | 50 µl | |

Tabla 7. Mezcla de reacción para la amplificación en un solo paso (RT-PCR), utilizando el *kit AccessQuick™ RT-PCR System* de Promega.

Estas reacciones monotubo se llevaron a cabo en tubos de PCR de 0,2 ml (AXYGEN® Scientific), introducidos en el termociclador de tapa caliente GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer Cetus) siguiendo las instrucciones y sugerencias del fabricante. Las condiciones de programación se detallan a continuación:

| | | |
|------------|--------|-------------------|
| 1 ciclo | 45 min | 48°C |
| 1 ciclo | 2 min | 94°C |
| ~35 ciclos | 30 seg | 94°C |
| | 1 min | T _A °C |
| | 2 min | 68°C |
| 1 ciclo | 7 min | 68°C |
| 1 ciclo | ∞ | 4°C |

8.7.3. Diseño de Oligonucleótidos

Para diseñar las secuencias nucleotídicas cebadoras se utilizaron herramientas disponibles en internet: *Gene Fisher Interactive PCR Primer Design* (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/>) para el diseño y *Oligocalculator* (<http://www.lab314.com/genmol/oligocalc.htm>) para calcular la temperatura de anillamiento (T_A) más adecuada para la reacción de amplificación. Las secuencias cebadoras teóricas así obtenidas fueron luego analizadas y comprobadas mediante el programa *Amplify* (soporte: Macintosh) frente a las secuencias completa para el gen en cuestión obtenidas de las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information; GenBank, LocusLink, UniGene, etc; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). De este modo se verificó el correcto anillamiento de los oligonucleótidos a su secuencia diana, obteniéndose también el tamaño teórico del amplicón generado por PCR.

Los oligonucleótidos empleados en esta tesis se fabricaron por las compañías Genset (Paris, Francia, <http://www.gensetoligos.com>) e Isogen Life Science (Amsterdam, Holanda, <http://www.isogen.nl>).

8.7.4. RT-PCR Semicuantitativa

Esta metodología permite cuantificar con bastante precisión los niveles de RNA, obteniéndose valores relativos de las cantidades de cada RNA analizado, que pueden posteriormente compararse entre las diferentes muestras. Las variaciones en las calidades de los RNA pueden ser un problema cuando se comparan diferentes muestras. Por este motivo, las condiciones de extracción y preparación de las muestras de RNA total debieron ser estrictamente controladas como se describió anteriormente para garantizar su pureza e integridad y lograr una reproducibilidad elevada.

Para un correcto análisis y posterior interpretación de los resultados, nos aseguramos de medir la cantidad de productos de PCR en la fase de amplificación exponencial, interrumpiendo las reacciones de amplificación para retirar alícuotas de producto de PCR, las que finalmente se cuantificaron por la intensidad de las bandas en un gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio.

Se analizó por esta metodología los niveles de expresión de RNAs mensajeros de genes previamente seleccionados bien porque se expresan diferencialmente en tejido endometrial, en tejido placentario, en células trofoblásticas, en células endometriales, por su expresión diferencial en las distintas etapas del ciclo menstrual o bien por su posible importancia biológica en el proceso adhesión e implantación de embriones humanos (**Tabla 8**). Las muestras de RNA así analizadas fueron las obtenidas luego de co-cultivar y separar por citometría de flujo las células endometriales y trofoblásticas, tal como se describió en **8.1**:

- | | |
|-----------------------------|----------------------------|
| ▪ RL95-2 0 hs (Control) | ▪ JAR/G 0 hs (Control) |
| ▪ RL95-2 16 hs (Co-cultivo) | ▪ JAR/G 16 hs (Co-cultivo) |
| ▪ RL95-2 42 hs (Co-cultivo) | ▪ JAR/G 42 hs (Co-cultivo) |

Las reacciones de RT-PCR semicuantitativa se realizaron en un solo paso con el equipo *AccessQuick™ RT-PCR System* (Promega) para todos los RNA mensajeros cuyos niveles de expresión queríamos estudiar, preparando para ello mezclas de reacción de 60 μ l de volumen final (**Tabla 9**). Los

tubos se colocaron en el termociclador de tapa caliente GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer) programado como se describió en 8.7.2, interrumpiendo las reacciones durante la fase exponencial de la PCR en los ciclos 19 y 25 para tomar alícuotas de 20 µl de cada una, quedando un volumen remanente de 20 µl hasta el ciclo final, fijado en 35, a excepción de algunos genes estudiados donde se fijó en el ciclo 40 debido a su escasa abundancia. Como controles positivos de reacción se utilizaron RNAs de placenta y de útero (Human Total RNA Master Panel II, Clontech, Palo Alto, CA). Para ambos controles, positivos y negativos, se prepararon reacciones cuyo volumen final fue de 20 µl (**Tabla 9**).

Para el análisis de expresión del mRNA que codifica la síntesis de la proteína plasmática placentaria PAPP-A, se utilizó como metodología de estudio RT-PCR en dos pasos descrita en 8.7.1, debido a que se conoce que en la región cromosómica 9q32 se expresa más de un gen, lo que indica que posiblemente las dos cadenas se estén transcribiendo (García y Castrillo, 2005). La especificidad para el estudio de este gen se determinó en la reacción de transcripción reversa (primer paso) al utilizar el oligonucleótido antisentido OL/771 correspondiente.

| Gen | Código | Secuencia Oligonucleótido | T _M | T _A |
|------------------------------|---------------------------|---|----------------|----------------|
| PAPP-A PAPP-A | OL/772 (s) OL/771 (as) | 5' TGTGAAGACAGTGATGCCTCCCAGGGACTTG 3' 5' CTTCTTGTCCCTTCCCTTAGCCATGGCTGTATCC 3' | 71°C 67°C | 62°C |
| UBA-2 UBA-2 | OL/781 (s) OL/782 (as) | 5' GATCAACATCCTTCATAGTGAAGACC 3' 5' GCTATGACATCATCAAGCTCTTCC 3' | 54°C 54°C | 58°C |
| PAI-2 PAI-2 | OL/783 (s) OL/784 (as) | 5' GGATGTCGGAGAGGAATGACC 3' 5' CAGCACGCTTAGTTTTAGGGTGAG 3' | 55°C 56°C | 54°C |
| PLA-1 PLA-1 | OL/234 (s) OL/235 (as) | 5' GCCTCAGTGAAGTATTTGGTAGG 3' 5' TAGACAGGTGGTTTGATGGGTG 3' | 52°C 54°C | 58°C |
| BSG BSG | OL/673 (s) OL/674 (as) | 5' AATCATGGCGGCTGCGCTGTTCCG 3' 5' GGGCCACCTGCCTCAGGAAGAGT 3' | 68°C 63°C | 62°C |
| PP14 PP14 | OL/607 (s) OL/608 (as) | 5' AGCCATGCTGTGCCTCCTGCTC 3' 5' GGTGGGAGTCTGGTCTTCCTGG 3' | 60°C 60°C | 60°C |
| IGFBP7/MAC25 IGFBP7/MAC25 | OL/613 (s) OL/614 (as) | 5' CATCTGGAATGTCACTGGTGCCAG 3' 5' GAGGTTTATAGCTCGGCACCTTCACC 3' | 61°C 61°C | 60°C |
| MUC-1 MUC-1 | OL/619 (s) OL/620 (as) | 5' CACTTCTCCCCAGTTGTCTAC 3' 5' GGGTACTCGCTCATAGGATG 3' | 54°C 54°C | 54°C |
| HCGβ5 HCGβ5 | OL/77 (s) OL/79 (as) | 5' GTCAACACCACCATCTGTGCCGGCTAC 3' 5' AGCCTTTATTGTGGGAGGATCGGGGTG 3' | 64°C 63°C | 58°C |
| TEF-5 TEF-5 | OL/266 (s) OL/267 (as) | 5' AGCCTGGACCCTCTCAGG 3' 5' TCTCGGGGAATTTGTTCATAG 3' | 60°C 58°C | 60°C |
| β-actina β-actina | OL/195 (s) OL/196 (as) | 5' GCATGGAGTCCTGTGGCATCCACG 3' 5' GGTGTAACGCAACTAAGTCATAG 3' | 66°C 48°C | 58°C |

Tabla 8. Listado de oligonucleótidos específicos para cada gen utilizados como cebadores para las reacciones de RT-PCR semicuantitativas. En la tabla se indica el gen objeto de análisis, el código interno asignado por nuestro laboratorio (OL/...) para cada oligonucleótido sentido (s) y antisentido (as), la secuencia de nucleótidos específica en sentido 5'→3' y la temperatura de disociación de cada oligo (T_M). En la última columna se indica la temperatura de anillamiento (T_A) utilizada para cada gen en el segundo segmento de la amplificación (*annealing*) de la reacción de RT-PCR semicuantitativa.

La temperatura de anillamiento utilizada (T_A) para cada gen fue la más elevada posible, ya que mejora la especificidad por reducción de las uniones erróneas de los oligos cebadores. Como gen control se utilizó la β -actina para la normalización de los datos de expresión génica, contemplando así las posibles variaciones que pudiesen existir entre una muestra y otra.

| Componente | Volumen | Volumen | Concentración Final |
|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|
| H ₂ O libre de nucleasas | 25,2 μ l | 8,4 μ l | --- |
| Mezcla Maestra AccessQuick™ 2X | 30 μ l | 10 μ l | 1X |
| Oligo sentido (s) [10 μ M] | 1,2 μ l | 0,4 μ l | 0,2 μ M |
| Oligo antisentido (as) [10 μ M] | 1,2 μ l | 0,4 μ l | 0,2 μ M |
| RNA molde (100 ng/ μ l) | 1,2 μ l | 0,4 μ l | 100 ng/reacción |
| Enzima AMV-RT (5 U/ μ l) | 1,2 μ l | 0,4 μ l | 0,1 U/ μ l |
| Volumen Final..... | 60 μl | 20 μl | |

Tabla 9. Mezcla para las reacciones de RT-PCR semicuantitativa utilizando el kit *AccessQuick™ RT-PCR System* de Promega. Volúmenes de reacción para las RT-PCR semicuantitativas de los distintos RNAs (60 μ l) y de los controles negativos y positivos (20 μ l)

La cuantificación relativa se realizó en geles de agarosa al 1,5%, cargando cuidadosamente 8 μ l por pocillo del producto de RT-PCR separado a distintos ciclos, cada uno mezclado previamente con 1 μ l de tampón de carga para DNA. Cada gel se resolvió a 75-80 voltios durante 1 ½ horas en tampón TAE 1X y se tiñó con bromuro de etidio para su visualización en transiluminador, cuantificándose las intensidades de las bandas por densitometría mediante el programa *ImageJ 1.33u* (NIH, USA; Soporte: PC).

8.7.5. Electroforesis de DNA en Geles de Agarosa

Para la separación electroforética de las muestras de DNA se prepararon geles al 1 y 1,5% fundiendo la agarosa (Sigma) en tampón TAE 1X (40 mM de TRIZMA® BASE, Sigma; 40 mM ácido acético glacial, Panreac; 1 mM EDTA, Sigma) por calentamiento en microondas. Una vez templada, se vertió en la cámara de electroforesis y se dejó solidificar. Se añadió tampón TAE 1X para el desarrollo de la electroforesis y se cargaron las muestras. Para la preparación de las muestras se mezclaron 5 a 8 μ l de DNA (producto de PCR, plásmidos, muestras de DNA digeridas, etc) y 1 μ l de tampón de carga para DNA 10X (50% glicerol, Merck; 25 mM EDTA, Sigma; 0,05% azul de bromofenol, Sigma). Una vez cargadas, el gel se corrió a 70-80 voltios durante 1 ½ horas y se tiñó con una solución de bromuro de etidio 1 μ g/ml (Sigma). La visualización se realizó en el transiluminador con luz ultravioleta (UVIDOC con disco, modelo DOC-008-XD), tomando las fotografías en papel térmico (UPP-110S; Sony).

Para determinar el tamaño de los amplicones se cargó en los carriles laterales de cada gel 5 μ l de marcador de peso molecular para DNA (1 Kb DNA Ladder, GIBCO BRL®) preparado a una concentración de 0,1 μ g/ μ l (100 μ l 1 Kb DNA Ladder stock 1 μ g/ μ l, 100 μ l tampón de carga para DNA 10X y 800 μ l de H₂O libre de nucleasas).

8.7.6. RT-PCR Cuantitativa: Análisis en Tiempo Real con el Sistema LightCycler

El sistema LightCycler (Roche Molecular Biomedicals), diseñado para realizar PCR cuantitativa y cualitativa, combina tecnologías de fluorescencia y amplificación mediante ciclos rápidos de PCR lo que permite el análisis en tiempo real del proceso de amplificación de las muestras. La precisión del proceso se logra por cuantificación de los productos en la fase exponencial de amplificación. Para ello utiliza un colorante específico denominado SYBR Green I que emite su máximo de fluorescencia cuando se encuentra unido a DNA de doble cadena (dsDNA). Este colorante se une al surco menor del DNA a medida que éste se incrementa durante la amplificación por PCR, acrecentando a su vez la intensidad de fluorescencia.

La fluorescencia es cuantificada por el sistema LightCycler al final de la fase de elongación de cada uno de los ciclos, lo que permite detectar las cantidades crecientes de producto de PCR y efectuar un seguimiento ciclo a ciclo del proceso. El inicio de esta “fase logarítmica lineal” está determinado por el incremento de la fluorescencia sobre el fondo inicial presente en cada reacción (*background*), lo que identifica a su vez a este ciclo como el *punto de cruce* o C_p (*crossing point*) que nos va a proporcionar información precisa sobre la concentración inicial de la molécula que queremos analizar.

El sistema LightCycler permite a su vez diferenciar la fluorescencia inespecífica producida por subproductos de la reacción de PCR (dímeros de oligonucleótidos cebadores) mediante el análisis de la Curva de Desnaturalización de Producto. Este programa adicional permite confirmar la identidad del producto tras completar los ciclos de amplificación. Para ello realiza un incremento controlado de la temperatura detectando continuamente la fluorescencia, lo que permite observar la cinética de desnaturalización del DNA de doble cadena por liberación del SYBR Green I. Este análisis permite conocer la homogeneidad del producto de PCR formado y determinar su *temperatura de disociación* T_m (*melting temperature*), específica para cada producto.

Las reacciones de RT-PCR cuantitativa utilizando este sistema se realizaron en un solo paso o tubo para aquellos genes que presentaron variaciones en sus niveles de expresión de mRNA en el análisis o tamizaje (*screening*) realizado por RT-PCR semicuantitativa. En las células epiteliales endometriales RL95-2 se cuantificaron los mRNAs de los genes IGFBP7/MAC-25, UBA-2 y MUC-1, y en las células trofoblásticas JAR/G los mRNAs correspondientes a los genes PLA-1, TEF-5, UBA-2 y MUC-1. Para la cuantificación y confirmación final de estos genes se utilizaron dos equipos o *kits* de casas comerciales diferentes, obteniéndose en ambos casos idénticos resultados:

- LightCycler RNA Amplification Kit SYBR Green I (Roche Applied Science)
- QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR (QIAGEN)

El equipo de Roche se utilizó para los genes β -ACTINA, IGFBP7/MAC-25, UBA-2, PLA-1 y TEF-5, mientras que el equipo de QIAGEN se utilizó para β -ACTINA, UBA-2, PLA-1, TEF-5 y MUC-1.

Para optimizar las reacciones se rediseñaron los oligonucleótidos cebadores para obtener amplicones que no excedan los 500 pb de longitud y evitar que se formen dímeros de cebadores o productos inespecíficos. Las secuencias nucleotídicas empleadas se enumeran en la **tabla 10**.

| Gen | Código | Secuencia Oligonucleótido | T _M | Amplicón |
|--------------|-------------|----------------------------------|----------------|---------------|
| UBA-2 | OL/781 (s) | 5' GATCAACATCCTTCATAGTGAAGACC 3' | 54°C | 329 pb |
| UBA-2 | OL/782 (as) | 5' GCTATGACATCATCAAGCTCTTCC 3' | 54°C | |
| hPLA | OL/234 (s) | 5' GCCTCAGTGAAGTATTTGGTAGG 3' | 52°C | 240 pb |
| hPLA | OL/235 (as) | 5' TAGACAGGTGGTTTGATGGGTG 3' | 54°C | |
| IGFBP7/MAC25 | OL/613 (s) | 5' CATCTGGAATGTCACCTGGTCCCCAG 3' | 61°C | 354 pb |
| IGFBP7/MAC25 | OL/614 (as) | 5' GAGGTTTATAGCTCGGCACCTTCACC 3' | 61°C | |
| MUC1 | OL/920 (s) | 5' TGATGTGCCATTTCTTTCTCT 3' | 56°C | 206 pb |
| MUC1 | OL/620 (as) | 5' GGGTACTCGCTCATAGGATG 3' | 54°C | |
| TEF-5 | OL/268 (s) | 5' GACGCTCAGCAGTTATGAGC 3' | 59°C | 253 pb |
| TEF-5 | OL/267 (as) | 5' TCTCGGGGAATTTGTCATAG 3' | 58°C | |
| β-actina | OL/195 (s) | 5' GCATGGAGTCCTGTGGCATCCACG 3' | 66°C | 356 pb |
| β-actina | OL/196 (as) | 5' GGTGTAACGCAACTAAGTCATAG 3' | 48°C | |

Tabla 10. Listado de oligonucleótidos específicos para cada gen utilizados como cebadores para las reacciones de RT-PCR cuantitativa empleando el sistema LightCycler. En la tabla se indica el gen objeto de análisis, el código interno asignado por nuestro laboratorio para cada oligo sentido (s) y antisentido (as), la secuencia de nucleótidos específica en sentido 5'→3' y la temperatura de disociación de cada oligo. En la última columna se indica la longitud en pares de bases (pb) del amplicón generado.

| LightCycler RNA Amplification Kit SYBR Green I (Roche) | Componente | Volumen | Concentración Final |
|--|---|--------------|------------------------------|
| | H ₂ O estéril-grado PCR | Variable | --- |
| | Mezcla de reacción RT-PCR SYBR Green I [5X] | 4 µl | 1X |
| | Solución MgCl ₂ [25 mM] | 0,8-1,6 µl | 4-5 mM [♠] |
| | Mezcla de Oligonucleótidos [5 µM de cada uno] | 1-2 µl | 0,25-0,5 µM [‡] c/u |
| | RNA molde (100 ng/µl) | 0,5 µl | 50 ng/reacción |
| | Mezcla enzimas RT-PCR | 0,4 µl | --- |
| | Volumen Final..... | 20 µl | |

[♠] se utilizaron concentraciones finales de MgCl₂ 4 mM para TEF-5 y 5 mM para MAC-25, PLA-1, UBA-2 y β-ACTINA.

[‡] se emplearon concentraciones de oligos 0,25 µM para MAC-25, PLA-1, β-ACTINA y 0,5 µM para TEF-5 y UBA-2.

| QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR (QIAGEN) | Componente | Volumen | Concentración Final |
|--|---|--------------|-----------------------------|
| | H ₂ O libre de RNasas | Variable | --- |
| | Mezcla QuantiTect SYBR Green RT-PCR* [2X] | 10 µl | 1X |
| | Oligo sentido (s) [10 µM] | 0,5-1,5-2 µl | 0,25-0,75-1 µM [§] |
| | Oligo antisentido (as) [10 µM] | 0,5-1,5-2 µl | 0,25-0,75-1 µM [§] |
| | RNA molde (100 ng/µl) | 0,5 µl | 50 ng/reacción |
| | Mezcla Enzima QuantiTect RT | 0,2 µl | 0,2 µl/reacción |
| Volumen Final..... | 20 µl | | |

* la mezcla maestra QuantiTect SYBR Green RT-PCR 2X provee una concentración final de 2,5 mM de MgCl₂.

[§] se utilizaron concentraciones finales de oligos 0,25 µM para PLA-1; 0,75 µM para MUC-1 y TEF-5 y 1 µM para UBA-2.

Tabla 11. Mezclas de reacción para la cuantificación en tiempo real de los RNAs mensajeros (qRT-PCR), utilizando el sistema LightCycler (Roche Molecular Biomedicals). Kits comerciales LightCycler RNA Amplification Kit SYBR Green I (Roche Applied Science) y QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR (QIAGEN).

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 μ l, siguiendo las indicaciones recomendadas por los fabricantes. Las mezclas de reacción preparadas según cada equipo comercial se detallan en la **tabla 11**.

El sistema LightCycler (Roche Molecular Biosciences) se programó de acuerdo con las especificaciones indicadas en la **tabla 12** cada vez que se utilizó para las reacciones de amplificación el equipo comercial LightCycler RNA Amplification Kit SYBR Green I (Roche Applied Science). En cambio, se programó con las condiciones listadas en la **tabla 13** cuando las mezclas de reacción se prepararon con el equipo QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR (QIAGEN). En ambos casos el programa incluyó una etapa de transcripción reversa para la síntesis de la cadena de cDNA, seguida por un calentamiento a 95°C para desnaturalizar los híbridos cDNA/RNA. En el caso del equipo de QIAGEN, esta etapa se prolongó durante 15 minutos para lograr simultáneamente la activación de la enzima HotStarTaq DNA Polimerasa. La tercera etapa de amplificación incluyó tres segmentos: a) desnaturalización, b) anillamiento y c) elongación, seguida por otra etapa de análisis de productos formados mediante una Curva de Desnaturalización y una última etapa de refrigeración.

| Protocolo para el Sistema LightCycler al utilizar <i>LightCycler RNA Amplification Kit SYBR Green I</i> | | | | | | |
|--|-----------------------|--------------------|-----------------------|-------------------|---------------------|---------------------------------|
| Programa | Tipo | Ciclos N° | Temperatura °C | Tiempo seg | Rampa °C/seg | Lectura de Fluorescencia |
| Transcripción Reversa | <i>None</i> | 1 | 55 | 600 ^δ | 20 | No |
| Desnaturalización | <i>None</i> | 1 | 95 | 30 | 20 | No |
| Amplificación | <i>Quantification</i> | 35-60 ^φ | 95 | 0 | 20 | No |
| | | | T_A* | 10 | 20 | No |
| | | | 72 | 20 [#] | 2 | Puntual |
| Curva de Desnaturalización | <i>Melting Curves</i> | 1 | 95 | 0 | 20 | No |
| | | | 70 | 10 | 20 | No |
| | | | 95 | 0 | 0,1 | Continua |
| Refrigeración | <i>None</i> | 1 | 40 | 30 | 20 | No |

Tabla 12. Condiciones de programación del Sistema LightCycler para las cuantificaciones efectuadas utilizando el equipo comercial LightCycler RNA Amplification Kit SYBR Green I (Roche Applied Sciences). El tiempo de elongación ([#]) para cada gen se calculó dividiendo el número de bases del amplicón por 25 (pb amplicón/25), siendo valores específicos para cada gen, al igual que su temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos **T_A*** y el número de ciclos necesarios para la amplificación (^φ).

Condiciones particulares utilizadas para cada gen con este equipo (Roche):

▪ PLA-1: 15 minutos de RT (^δ); **T_A*** de 60°C; elongación ([#]) de 12 seg; 60 ciclos (^φ). Adición de un cuarto segmento en el que se realizó la lectura de fluorescencia para eliminar los errores introducidos por la formación de dímeros de oligonucleótidos cebadores (83°C durante 7 segundos; rampa 2°C/seg).

- MAC-25: T_A^* de 60°C; elongación ($^\#$) de 15 seg; 45 ciclos ($^\phi$).
- UBA-2: T_A^* de 60°C; elongación ($^\#$) de 13 seg; 45 ciclos ($^\phi$).
- TEF-5: 30 minutos de RT ($^\delta$); T_A^* de 53°C; elongación ($^\#$) de 13 seg; 50 ciclos ($^\phi$).

| Protocolo para el Sistema LightCycler al utilizar <i>QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR (QIAGEN)</i> | | | | | | |
|--|-----------------------|--------------|----------------|-------------------|--------------|--------------------------|
| Programa | Tipo | Ciclos N° | Temperatura °C | Tiempo seg | Rampa °C/seg | Lectura de Fluorescencia |
| Transcripción Reversa | <i>None</i> | 1 | 50 | 1200 | 20 | No |
| Desnaturalización | <i>None</i> | 1 | 95 | 900 | 20 | No |
| Amplificación | <i>Quantification</i> | 35-50 $^\pm$ | 94 | 15 | 20 | No |
| | | | $T_A^{\&}$ | 20 | 20 | No |
| | | | 72 | 20-30 $^\epsilon$ | 2 | Puntual |
| Curva de Desnaturalización | <i>Melting Curves</i> | 1 | 95 | 0 | 20 | No |
| | | | 70 | 10 | 20 | No |
| | | | 95 | 0 | 0,1 | Continua |
| Refrigeración | <i>None</i> | 1 | 40 | 30 | 20 | No |

Tabla 13. Condiciones de programación del Sistema LightCycler para las cuantificaciones efectuadas utilizando el equipo comercial QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR (QIAGEN). Las temperaturas de anillamiento utilizadas $T_A^{\&}$ y el número de ciclos ($^\pm$) son específicos para cada gen. El tiempo de elongación ($^\epsilon$) se determina asignando 5 seg por cada 100 pb de longitud del amplicón.

Condiciones particulares utilizadas para cada gen con este equipo (QIAGEN):

- PLA-1: $T_A^{\&}$ de 60°C; elongación ($^\epsilon$) de 25 segundos; 50 ciclos ($^\pm$).
- MUC-1: $T_A^{\&}$ de 55°C; elongación ($^\epsilon$) de 30 segundos; 40 ciclos ($^\pm$).
- UBA-2: $T_A^{\&}$ de 60°C; elongación ($^\epsilon$) de 25 segundos; 35 ciclos ($^\pm$). Adición de un cuarto segmento en el que se realizó la lectura de fluorescencia para eliminar los errores introducidos por la formación de dímeros de oligonucleótidos cebadores (80°C durante 7 segundos; rampa 10°C/seg).
- TEF-5: $T_A^{\&}$ de 53°C; elongación ($^\epsilon$) de 22 segundos; 43 ciclos ($^\pm$).

Los parámetros de fluorescencia y de análisis de resultados utilizados en el LightCycler fueron:

| | |
|---------------------------------------|--|
| Canal de Detección Fluorescencia | Canal 1 [F1] |
| Tipo de Análisis de Datos (Algoritmo) | Automático (Cálculo de Máximos/Segunda Derivada) |
| Ajuste de la Línea Basal | Aritmético |

Todas las cuantificaciones se llevaron a cabo para las células control (sin interacción) y para las células co-cultivadas 16 o 42 horas y separadas por citometría de flujo tal como se describió en **8.1**.

Además de los co-cultivos de células RL95-2 con JAR/G, se realizaron otros co-cultivos adicionales utilizando las líneas celulares HEC-1A, JAR, 293 y 293/G con el fin de poder caracterizar y determinar la especificidad de las variaciones observadas según el tipo de interacción célula-célula establecido durante el co-cultivo. Los co-cultivos realizados y separados por citometría de flujo se enumeran en la **tabla 14**. En la totalidad de los casos, tanto las células utilizadas como control (*sin interacción*) como las células co-cultivadas (*con interacción*) se incubaron en una mezcla 1:1 de los medios de cultivo específicos de cada línea celular implicada, renovándolo a las 24 horas durante las incubaciones más prolongadas.

| Monocapa | | Células en suspensión añadidas | Tiempo co-cultivo |
|----------|-----|--------------------------------|-------------------|
| RL95-2 | vs. | JAR/G | 16 y 42 hs. |
| HEC-1A | | JAR/G | 42 hs. |
| 293/G | | JAR | 42 hs. |
| HEC-1A | | 293/G | 42 hs. |
| RL95-2 | | --- | 0 hs. (Control) |
| JAR/G | | --- | 0 hs. (Control) |
| HEC-1A | | --- | 0 hs. (Control) |
| 293/G | | --- | 0 hs. (Control) |

Tabla 14. Listado de co-cultivos de células trofoblásticas y endometriales realizados. Las células 293 y 293/G se utilizaron como control de interacción. Todos ellos fueron separados por citometría de flujo (FACSVantage SE, BD).

8.7.7. Normalización de los Datos de Expresión Génica

El análisis cuantitativo y cualitativo se realizó utilizando el programa LightCycler3 Data Analysis versión 3.5.28 (Idaho Technology Inc.) incluido en el Sistema LightCycler. El programa construye gráficas de “Fluorescencia vs. Ciclo de Amplificación” en función de la señal de SYBR Green I detectada, determinando el *punto de cruce* C_p que indica el paso de la señal fluorescente lineal a la fase logarítmica, proporcionado a su vez con la concentración inicial de RNA mensajero en esa muestra.

La normalización de los datos de expresión génica se realizó para cada una de las muestras cuantificadas por RT-PCR en tiempo real con el fin de corregir las posibles variaciones de cantidad e integridad entre las muestras. Para ello se seleccionó como gen control al gen constitutivo β -ACTINA cuyos niveles de expresión se mantienen constantes, constituyendo a su vez un control positivo de reacción. De este modo, cada punto de cruce C_{p1} obtenido para un gen en particular (PLA-1, TEF-5, MAC-25, MUC-1 y UBA-2) fue normalizado frente al punto de cruce C_{p2} correspondiente a β -ACTINA de esa misma muestra de RNA. En general, a modo de fórmula, la amplificación se describe como:

$$N = N_0 \times E^n$$

siendo **N**: número de moléculas amplificadas; **N₀**: número inicial de moléculas; **E**: eficiencia de amplificación (constante); **n**: número de ciclos, es decir, el valor obtenido de C_p .

Puesto que la eficiencia de reacción es constante ($E=2$ para una reacción de PCR ideal, ya que transcurrido un ciclo el número de moléculas se duplica), la cantidad de moléculas de RNA mensajero N en un determinado ciclo será proporcional al número inicial de moléculas N_0 . Como el número inicial de moléculas es un valor desconocido, en este caso la cuantificación absoluta no fue posible. Por este motivo se realizó la normalización de los datos respecto a un valor control inalterable (β -ACTINA) lo que permitió calcular la cantidad relativa (C_R) de mensajero en cada muestra, respondiendo a la siguiente ecuación matemática derivada de la anterior:

$$C_R = 2^{(C_{p2}-C_{p1})}$$

Para graficar los niveles de expresión de los RNAs mensajeros y comparar así su expresión diferencial, se asignó arbitrariamente el valor de 100% a los RNAs de Placenta y Útero utilizados como controles positivos. El cálculo porcentual de cada muestra se realizó en relación a estos controles.

8.8. Técnicas de Análisis de DNA

Todos los productos de las reacciones de RT-PCR cuantitativa realizadas con el sistema LightCycler fueron luego secuenciados para confirmar la identidad de cada gen estudiado. Asimismo, otras bandas visualizadas en los geles de agarosa cargados con los productos de RT-PCR semicuantitativa, cuyos tamaños fueron diferentes a los tamaños de amplicón teórico esperado (obtenido por ordenador), fueron también procesadas y secuenciadas.

Si bien se utilizaron oligonucleótidos específicos para las reacciones de amplificación, el objetivo de este análisis complementario fue descifrar si se trataba de productos inespecíficos de reacción producidos por hibridaciones erróneas de los oligonucleótidos cebadores o bien si estas bandas correspondían a alguna variante de corte-empalme del RNA (*splicing* alternativo) desconocida hasta el momento. Para el estudio de estos productos de amplificación fue necesario recurrir a técnicas que permiten su introducción en vectores o plásmidos de clonación para su posterior manipulación y análisis.

8.8.1. Preparación de Vector T

Este vector llamado "T" constituye un sistema que nos permite optimizar la inserción de fragmentos de DNA obtenidos por reacciones de PCR en plásmidos de clonación. El procedimiento implica la digestión del vector con una enzima de restricción que genera extremos romos, para luego añadir una timidina (T) adicional en el extremo 3'. Esto permitirá insertar fácilmente moléculas de DNA amplificadas por la enzima *Taq* polimerasa (u otras polimerasas) que presentan una adenina (A) adicional en su extremo 3'. La inserción de bandas aisladas de PCR dentro del Vector T, también llamado ligación A→T, es un método altamente eficiente para la clonación de fragmentos de DNA.

El proceso de preparación implica la digestión del vector comercial pBluescript® II KS (+) de Stratagene (**Figura 11**) con la enzima de restricción *EcoRV* (sitio único de corte) para generar los extremos romos. La primera etapa del procedimiento fue la digestión enzimática de 10 μ g de este vector según la mezcla de reacción detallada en la **tabla 15**. La reacción se llevó a cabo en tubos eppendorf de 0,5 ml, incubando las reacciones en estufa seca a 37°C durante 16 horas. Transcurrido ese tiempo, se

comprobó la linearización del vector digerido (1 µl de producto del digestión mezclado con 1 µl de tampón de carga para DNA) mediante un gel de agarosa al 1% ultradelgado (Tensión Superficial) teñido con bromuro de etidio. La enzima *EcoRV* es resistente a la inactivación por calentamiento durante 15 minutos a 65°C y mantiene una actividad relativa del 10% en las mezclas de PCR, motivo por el cual se procedió inmediatamente a la adición de las timidinas (T) por PCR.

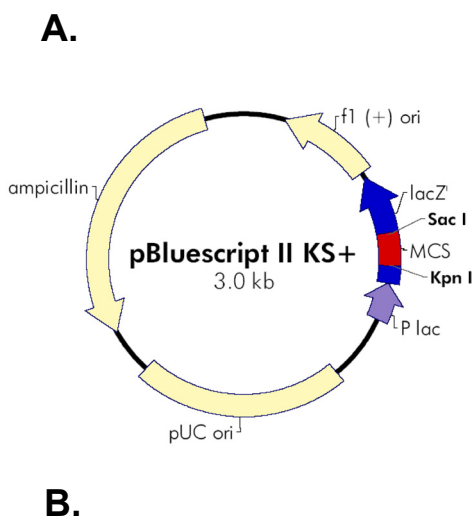
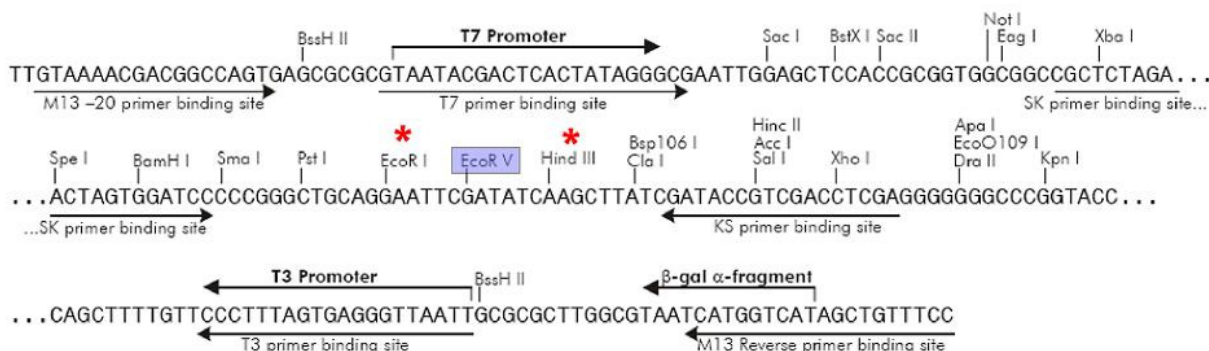


FIGURA 11. A. Representación esquemática del vector pBluescript® II KS (+) de Stratagene. Contiene un sitio f1 (+) origen de replicación de DNA de cadena simple (ssDNA), un gen de selección a antibióticos, de resistencia a ampicilina y un origen de replicación plasmídico pUC. **B.** Secuencias de reconocimiento únicas para las enzimas de restricción que conforman el Sitio Múltiple de Clonación (MCS) (mostrada la secuencia 598-826 pares de bases; 21 sitios únicos). Flanqueando esta región se encuentran los promotores T3 y T7 de la RNA polimerasa, lo que permite determinar el sentido de la transcripción y consecuentemente la cadena del inserto clonado. Esta secuencia Múltiple de Clonación (MCS) a su vez forma parte del gen *LacZ*, de modo que los insertos clonados interrumpen la codificación y síntesis de la β-galactosidasa (131 aminoácidos), lo que produce colonias blancas en las correspondientes líneas de bacterias, siendo azules cuando no hay insertos.



| Componente | Volumen | Concentración Final |
|---------------------------------------|---------------|------------------------|
| H ₂ O libre de nucleasas | 75 µl | --- |
| Tampón SuRE/Cut B (Roche) 10X | 10 µl | 1X |
| Plásmido pKS II [1 µg/µl] | 10 µl | 10 µg totales/reacción |
| Enzima <i>EcoRV</i> (Roche) [10 U/µl] | 5 µl | 0,5 U/µl |
| Volumen Final..... | 100 µl | |

Tabla 15. Mezcla de reacción para la digestión enzimática del vector pBluescript® II KS (+) de Stratagene con la enzima de restricción *EcoRV* durante el proceso de preparación del Vector T. Composición del Tampón SuRE/Cut B (Roche): 10 mM Tris-Hcl, 5 mM MgCl₂, 1 mM β-mercaptoetanol, 100 mM NaCl, pH 7,5.

La adición de las timidinas en el extremo 3' se realizó sobre alícuotas de 10 µl de plásmido digerido, mediante reacción de PCR y utilizando únicamente desoxitimidina tri fosfato (dTTP; Invitrogen

Life Technologies), en mezclas de reacción preparadas según la **tabla 16**. Los tubos se colocaron luego en una máquina termocicladora de tapa caliente (GeneAmp PCR System 9600; Perkin Elmer) programada a 72°C durante 2 horas.

| Componente | Volumen | Concentración Final |
|--|---------------|---------------------|
| H ₂ O libre de nucleasas | 68 µl | --- |
| Tampón AmpliTaq 10X (Perkin Elmer) | 10 µl | 1X |
| Digestión pKS II/ <i>EcoRV</i> [0,1 µg/µl] | 10 µl | 1 µg total/reacción |
| MgCl ₂ 25 mM (Perkin Elmer) | 6 µl | 1,5 mM |
| dTTP (Invitrogen) [100 mM] | 1 µl | 1 mM |
| Enzima <i>EcoRV</i> (Roche) [10 U/µl] | 5 µl | 0,5 U/µl |
| Volumen Final..... | 100 µl | |

Tabla 16. Mezcla de reacción para la adición de las timidinas (T) por reacción de PCR al plásmido previamente digerido con la enzima *EcoRV* durante el proceso de preparación del Vector T.

A continuación se eliminaron los restos de enzima *EcoRV* y sales, el dTTP remanente y la enzima *Taq* polimerasa mediante extracción con fenol/cloroformo, para evitar que interfieran luego en las reacciones de ligación. Los tubos se agruparon de a pares en tubos eppendorf de 0,5 ml y se añadió a cada mezcla un volumen igual de 200 µl (1:1) de fenol/cloroformo:isoamílico (125:24:1; Sigma; Cat # P1944). Se mezclaron vigorosamente y se centrifugaron durante 2 minutos a 12.000 rpm (microcentrífuga Eppendorf). La fase acuosa superior de cada tubo se transfirió a un tubo nuevo al que se le adicionó 200 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1; Merck), se mezcló y centrifugó en idénticas condiciones. Nuevamente, la fase acuosa superior, de alrededor de 200 µl, se colocó en un tubo nuevo al que se le añadió medio volumen (100 µl) de acetato de amonio 5 M (NH₄CH₃COO; Merck) más 2,5 volúmenes de etanol absoluto (500 µl; Merck). Los tubos se mezclaron bien y se dejaron a -20°C durante toda la noche (16 horas). Luego se centrifugaron durante 30 minutos a 12.000 rpm y 4°C, desechando los sobrenadantes y lavando las pastillas con 500 µl de etanol 70%. Tras dejar secar las pastillas limpias al aire, se conservaron a 4°C hasta el momento de su utilización donde se resuspendieron en 15 µl de H₂O libre de nucleasas.

El análisis para comprobar y estimar la concentración se realizó mediante un gel ultradelgado de agarosa al 1% (gel de "Tensión Superficial") en el que se cargaron 1 µl del Vector T mezclado con 1 µl de tampón de carga para DNA por carril y 5 µl de marcador de peso molecular para DNA de 1 Kb (Gibco BRL) en el carril último. Luego de la separación electroforética durante 1 ½ horas a 75 voltios en TAE-1X el gel se tiñó con bromuro de etidio. La cuantificación aproximada se realizó comparando la intensidad de la banda del vector con la banda de 1636 pb del marcador (~50 ng), cuya masa corresponde al 10% de la masa total del marcador de 1Kb cargado (500 ng totales).

El vector T así preparado es estable durante varios meses a 4°C, aunque a medida que transcurre el tiempo se van perdiendo las T terminales y por ende su capacidad de ligación.

8.8.2. Ligación de Bandas de PCR

Para ligar los fragmentos de DNA al Vector T preparado a partir del vector pBluescript® II KS (+) se siguió el protocolo descrito por Sambrook y *col.* (1989). Las ligaciones se realizaron con los productos de RT-PCR cuantitativa, para confirmar la correcta amplificación de los oligonucleótidos cebadores y descartar la hibridación errónea de los oligos con otros genes de la misma familia que presentaban una elevada homología de secuencia, así como también se ligaron otras bandas aisladas de los geles de agarosa correspondientes a las reacciones de RT-PCR semicuantitativa. En este último caso, el criterio seguido fue la clonación en el Vector T de todo producto de RT-PCR que pudiese corresponder a una variante de corte-empalme del RNA (*splicing* alternativo) no descrita hasta el momento y cuyo tamaño del amplicón no coincidiera con los productos teóricos esperados de acuerdo al análisis realizado previamente por ordenador utilizando el programa *Amplify* (Soporte Macintosh).

Todos los insertos a clonar fueron previamente purificados. Para los productos de RT-PCR se utilizó el equipo comercial QIAquik® PCR Purification Kit (QIAGEN) y para las bandas cortadas de los geles de agarosa el equipo QIAquik® Gel Extraction Kit (QIAGEN). Básicamente, el DNA obtenido de la reacción de PCR o bien del gel solubilizado es añadido sobre pequeñas columnas conteniendo membranas de sílice, sobre las que se adsorbe en presencia de concentraciones salinas elevadas, mientras que los contaminantes pasan a través de ella. Las impurezas son eficazmente eliminadas por lavado y el DNA es finalmente eluído en H₂O libre de nucleasas. Las ligaciones se prepararon según la **Tabla 17** utilizando el equipo Quick Ligation™ Kit (New England Biolabs, Inc.), se centrifugaron a 3000 rpm durante 1 minuto y se incubaron a temperatura ambiente (25°C) durante 5 minutos. Luego, se colocaron en hielo o se guardaron a -20°C hasta realizar la transformación.

| Componente | Volumen | Concentración Final |
|--|--------------|---------------------|
| H ₂ O libre de nucleasas | 7,0 µl | --- |
| Tampón 2X Quick Ligation (NEBL) [#] | 10 µl | 1X |
| Vector T [~ 40-50 ng] | 1 µl | 40-50 ng/reacción |
| DNA (banda PCR) | 2 µl | * |
| Enzima Quick T4 DNA ligasa [Recombinante] | 1 µl | |
| Volumen Final..... | 21 µl | |

Tabla 17. Mezcla de reacción para la ligación en el Vector T de productos de RT-PCR purificados o bandas extraídas de geles de agarosa utilizando el equipo Quick Ligation™ Kit (New England Biolabs, Inc.). * Cada ligación se realizó con un exceso molar 3:1 de inserto respecto al vector. [#] Composición del tampón Quick Ligation 2X: 132 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 2 mM ditiotretol, 2 mM ATP, 15% polietilen glicol, pH 7,6.

8.8.3. Obtención y Análisis de DNA Plasmídico

Para obtener suficiente cantidad de DNA del plásmido que permita un posterior análisis y/o utilización, los plásmidos recombinantes y los plásmidos comerciales se introdujeron en cepas bacterianas DH5-alfa-E (Invitrogen Life Sciences) o XL1-Blue (Stratagene) mediante protocolos de transformación estándares, como por ejemplo el choque térmico, creciendo posteriormente las bacterias

en placas de Petri en presencia del antibiótico de selección. Las colonias así obtenidas fueron luego crecidas aisladamente (mini preparaciones). Se purificó el DNA plasmídico y en el caso de plásmidos recombinantes (Vector T) se comprobó la presencia del inserto mediante digestión con las dos enzimas de restricción que flanquean en sitio *EcoRV* en el Sitio Múltiple de Clonación (MCS), indicadas con un asterisco rojo en la **Figura 11.B** (*EcoRI-HindIII*, u otras adyacentes). Los fragmentos de DNA generados se resolvieron en geles de agarosa, analizando sus tamaños mediante marcadores de peso molecular.

8.8.3.1 Preparación de Bacterias Competentes

Las soluciones utilizadas para la preparación de bacterias competentes se indican en la **tabla 18**. Se creció durante toda la noche y con agitación un inóculo de bacterias *E.coli* DH5- α (Invitrogen) en 4-5 ml de medio de cultivo LB líquido sin antibióticos. A continuación, se inocularon 100 μ l de este cultivo en 10 ml de medio PHI-BROTH precalentado a 37°C y se dejó en agitación a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 660 nm (DO_{660}) de aproximadamente 0,24 (~2 horas). El inóculo obtenido fue añadido directamente a 200 ml de medio PHI-BROTH precalentado y se colocó nuevamente en incubador a 37°C con agitación hasta que el cultivo alcanzó una DO_{660} de aproximadamente 0,35 (~2 horas). En ese instante, las bacterias se colocaron en hielo durante 10 minutos. Se repartieron en tubos de vidrio de 50 ml preenfriados (Corex™) o en botellas de plástico Nalgene® y se centrifugaron a 5000 rpm y 4°C durante 5 minutos utilizando la centrifuga Sorvall® RC5B con el rotor de ángulo fijo SS-34. Tras eliminar los sobrenadantes, las bacterias se resuspendieron en 60 ml totales de solución preenfriada TfBI. Se centrifugaron nuevamente a 5000 rpm y 4°C durante 5 minutos, se decantaron los sobrenadantes y se resuspendieron cuidadosamente en 8 ml totales de solución TfBII preenfriada. Finalmente, se prepararon alícuotas

| Medio LB (Luria-Bertani) | Medio PHI-BROTH |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Bactotriptona 10 gr ▪ Extracto de Levadura 5 gr ▪ NaCl 10 gr ▪ H₂O desionizada hasta 1 litro | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Bactotriptona 10 gr ▪ Extracto de Levadura 2,5 gr ▪ KCl 0,372 gr ▪ MgSO₄·7H₂O [500mM] filtrado 0,22μm 15 ml ▪ H₂O desionizada hasta 500 ml |
| Ajustar a pH 7,0 con NaOH 10 N. Autoclavar y conservar a RT. | Ajustar a pH 7,0 con NaOH 1 N. Autoclavar y conservar a 4°C. |

| TfBI | TfBII |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ RbCl 100 mM ▪ MnCl₂ 50 mM ▪ KAc 30 mM ▪ CaCl₂ 10 mM ▪ Glicerol [87%] 15% | <ul style="list-style-type: none"> ▪ MOPS [0,1 M] pH 7,0 10 mM ▪ RbCl 10 mM ▪ CaCl₂ 75 mM ▪ Glicerol [87%] 15 % |
| Preparar 100 ml con H ₂ O desionizada. Ajustar a pH 5,8 con ácido acético 0,2 M. Filtrar 0,22 μ m y conservar a 4°C. | Preparar 10 ml en H ₂ O desionizada. Ajustar a pH 6,8 con KOH 1 N. Esterilizar por filtrado a 0,22 μ m y conservar a 4°C. |

Tabla 18. Composición de las soluciones utilizadas para preparar bacterias competentes.

de 100-200 μ l en tubos eppendorf de 1,5 ml que se congelaron rápidamente llevándolas a nieve carbónica y conservándolas a -80°C .

8.8.3.2 Transformación

Para la transformación de bacterias competentes con los plásmidos recombinantes obtenidos según se describió en **8.8.2**, se descongelaron las bacterias competentes en hielo y se transfirieron 5 μ l de cada reacción de ligación a 100 μ l de bacterias competentes en tubos eppendorf de 1,5 ml pre-enfriados, mezclando cuidadosamente con la pipeta. Se incubaron en hielo durante 20 minutos y luego se sometieron a un choque térmico por incubación de los tubos en baño termostático a 42°C durante sólo 90 segundos, retornándolos a hielo inmediatamente después. Luego se adicionó a cada tubo 1,0 ml de medio LB a temperatura ambiente, incubándose durante 60 minutos en estufa a 37°C sin agitación. Tras centrifugar durante 5 minutos a 3.000 rpm, se desecharon los sobrenadantes y se resuspendieron las bacterias transformadas en el volumen residual (~ 100 μ l) para luego ser plaqueadas e incubadas en estufa a 37°C durante toda la noche en presencia del antibiótico de selección.

Para ello se utilizaron placas de Petri (Bibby Sterilin Ltd., Stone, Staffs, U.K.) conteniendo LB preparado con agar al 1,5% y antibiótico ampicilina a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$ (Stock a 100 mg/ml en medio LB; filtrado 0,22 μm). Unos 30 minutos antes de plaquear, se añadió a cada placa LB-agar-antibiótico 100 μ l de IPTG 100 mM (Calbiochem) y 40 μ l de X-Gal 2% (Roche; 20 mg/ml en N,N'-dimetil formamida de Merck), lo que permite distinguir las colonias blancas que presentan el inserto de aquellas de color azul que contienen el vector vacío.

8.8.3.3 Mini Lisados de DNA

Se siguió un protocolo análogo al descrito por Sambrook *et al.* en 1989 (lisis alcalina). Las colonias blancas se aislaron de las placas de LB-agar utilizando puntas estériles, añadiéndose cada colonia en un tubo de 12 ml de tapa roja que contenía 3 ml de medio LB con ampicilina a 100 $\mu\text{g/ml}$. Los tubos se colocaron en un incubador con agitación (~ 200 rpm) a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se transfirió 1,5 ml de cada cultivo a un tubo eppendorf, se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos (microcentrífuga Eppendorf), se decantaron los sobrenadantes y se resuspendieron las pastillas de bacterias en su volumen residual (~ 100 μ l). Se adicionó 300 μ l de Solución TENS a cada tubo para provocar la lisis alcalina de las bacterias, agitando por inversión (4-5 veces) para mezclar bien. Luego de no más de 2-3 minutos desde su adición se añadió a cada tubo 150 μ l de la Solución III neutralizante, volviendo a agitar para homogeneizar. Se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos para separar por precipitación los restos celulares, transfiriendo todo el sobrenadante que contiene el DNA a un tubo nuevo al que se le adicionó 900 μ l de etanol absoluto (Merck) frío para precipitarlo. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 12.000 rpm y 4°C . Las pastillas de DNA se lavaron con 1 ml de etanol al 70% frío, los precipitados se dejaron secar al aire y se resuspendieron en 20 μ l de H_2O libre de nucleasas a la que se adicionó 1 μ l de RNasa I (10 mg/ml) para eliminar el RNA contaminante.

Para las reacciones de secuenciación, donde la pureza del DNA aislado debe ser elevada, se utilizó el equipo comercial Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega) cuyo principio es similar al utilizado para las midi y maxi preparaciones de DNA.

El DNA así purificado fue luego analizado mediante cortes por enzimas de restricción. Las soluciones utilizadas para los mini lisados de DNA plasmídico se detallan a continuación:

| Sol. TENS | Componentes | Volumen | Sol. III | Componentes | Volumen |
|-------------------------|-----------------------|-------------------------|--------------|------------------------|---------|
| | Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 | 5,0 ml | | Acetato de Potasio 5 M | 24 ml |
| EDTA 100 mM pH 8,0 | 0,5 ml | Ácido acético glacial | 4,6 ml | | |
| NaOH (en lentejas) | 0,2 gr | H ₂ O milliQ | 11,4 ml | | |
| SDS 10% | 2,5 ml | | | | |
| H ₂ O milliQ | ~42 ml | | | | |
| Volumen Final..... | 50 ml | Volumen Final..... | 40 ml | | |

Tabla 19. Soluciones utilizadas para la purificación de DNA plasmídico mediante mini lisados.

8.8.3.4 Midi y Maxi Preparaciones de DNA

La obtención de DNA plasmídico a gran escala, comercial o recombinante, para otras aplicaciones como la preparación de Vector T o secuenciación de DNA, se llevó a cabo utilizando el equipo comercial QIAGEN® Plasmid Purification Kit (QIAGEN), basados en una modificación del principio de lisis alcalina. En este caso las bacterias transformadas se crecieron en un volumen mayor de medio LB-antibiótico y se purificó el DNA plasmídico realizando una lisis alcalina seguida de la unión del DNA a una resina de intercambio aniónico en condiciones adecuadas de pH y concentración salina. Las impurezas son removidas por lavado con un tampón de concentración salina media, eluyendo luego el DNA en tampón de concentración salina elevada y finalmente eliminando las sales por precipitación en isopropanol.

La cuantificación del DNA plasmídico se realizó en tampón Tris-HCl 10 mM de pH 8,0 mediante espectrofotometría (GeneQuant II, RNA/DNA calculator, Pharmacia Biotech o bien NanoDrop® ND-1000) a la longitud de onda de 260 nm, determinando su pureza en base a la relación A_{260}/A_{280} y otros parámetros descritos anteriormente en 8.4.

▪ Preparación de Glicerolados: los plásmidos comerciales y aquellos con insertos de interés que ya han sido confirmados por secuenciación, fueron conservados en glicerolados preparados a partir de los cultivos bacterianos en LB-ampicilina procedentes de las transformaciones. Esto se llevó a cabo mezclando partes iguales (1:1) del cultivo bacteriano con glicerol para congelación (38 ml glicerol 87%; 5 ml de MgSO₄ 1 M; 1,25 ml de Tris-HCl 1 M pH 8.0 y 5,75 ml de H₂O milliQ) y colocando inmediatamente la mezcla en nieve carbónica y luego a -70°C.

8.8.3.5 Análisis de DNA por Digestión con Enzimas de Restricción

Para analizar si los plásmidos recombinantes contenían el inserto de interés, se realizaron cortes por enzimas de restricción, utilizando las enzimas *EcoRI* y *HindIII* (Roche) flanqueantes al

sitio de reconocimiento de la enzima *EcoRV*, utilizada para la linearización del plásmido pBluescript® II KS (+) [Stratagene] durante la preparación del Vector T. Ambas dianas de reconocimiento son únicas y se encuentran señaladas con un asterisco rojo en la **figura 11.B**, donde se enseña la secuencia correspondiente al Sitio Múltiple de Clonación (MCS) del vector.

Las reacciones se prepararon en 30 µl de volumen final en las proporciones indicadas en la **tabla 20**, incubándose 2 horas en estufa a 37°C. Finalmente, los fragmentos de DNA generados por digestión enzimática fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa al 1 o 1,5% dependiendo del tamaño de inserto esperado, siguiendo las condiciones detalladas en **8.7.5**. Tras la tinción con bromuro de etidio, se determinó el tamaño de inserto liberado por comparación con los marcadores de DNA cargados en los carriles laterales (Marcador para DNA de 1 Kb, Gibco BRL).

| Componentes | Volumen |
|-------------------------------------|--------------|
| H ₂ O libre de nucleasas | 21 µl |
| Tampón SuRE/Cut B* 10 X | 3 µl |
| DNA plásmidico | 5 µl |
| Enzima <i>EcoRI</i> | 0,5 µl |
| Enzima <i>HindIII</i> | 0,5 µl |
| Volumen Final..... | 30 ml |

Tabla 20. Mezcla de reacción para la digestión con enzimas de restricción y liberación de los insertos clonados en Vector T. * SuRE/Cut B 10X (Roche): 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM β-mercaptoetanol, pH 8,0 a 37°C.

8.8.3.6 Secuenciación de DNA

Las reacciones de secuenciación de fragmentos insertados en el Vector T o productos de PCR purificados fueron realizadas por la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid en la Universidad Autónoma de Madrid, utilizando secuenciadores multicapilares ABI Prism 3730, 3100 y 3700 (Applied Biosystems). Se utilizaron oligonucleótidos universales para los promotores de T3 y T7, obteniéndose las secuencias de las dos cadenas para mejorar la precisión y fiabilidad de los resultados.

| | |
|--------------------|------------------------------|
| Oligonucleótido T3 | 5' AATTAACCCTCACTAAAGGG 3' |
| Oligonucleótido T7 | 5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3' |

8.8.3.7 Análisis Informático de las Secuencias y Búsquedas en Bases de Datos

Los programas informáticos utilizados para analizar las secuencias fueron *SeqManTM II*, *EditSeqTM* y *DNA StriderTM*, todos ellos en soporte Macintosh. Inicialmente se buscaron en las secuencias obtenidas del secuenciador las dianas para las enzimas *EcoRI* y *HindIII*, con el fin de seleccionar la secuencia nucleotídica comprendida entre ambas que corresponde al inserto clonado. Mediante el alineamiento antisentido de las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos T3 y T7 para cada clon, se reconstruyeron las secuencias finales de cada inserto.

Una vez conocida la secuencia de DNA de cada banda, se procedió a la comparación con el llamado "banco de genes" o GenBank, una serie de bases de datos disponibles para su acceso

libre a través de Internet. GenBank es un depósito completo y actualizado de datos de secuencias e información vinculada a ellas, construido y mantenido en servicio por el *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI, Bethesda, Maryland, Estados Unidos), que a su vez vincula bases de datos de otros centros como Data Library del *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) o el DNA Database of Japan (DDBJ).

El acceso a estas bases de datos se realizó a través de un acceso único y universal denominado *Entrez* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>). La búsqueda de la identidad de las secuencias o el análisis de similitud entre secuencias se realizó con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) en el cual se introdujo la secuencia en formato FASTA (formato de nucleótidos o aminoácidos) haciéndose la búsqueda en la respectiva base de datos. El resultado es una lista de secuencias alineadas de mayor o menor homología y una serie de valores estadísticos que proporcionan una idea de probabilidad.

Las páginas Web mencionadas y otras muchas bases de datos más, se encuentran íntegramente relacionadas a través de vínculos que permiten pasar de una a otra manteniendo el criterio de búsqueda escogido (por ej: LocusLink, UniGene, HomoloGene, OMIMTM-Online Mendelian Inheritance in ManTM, etc), proporcionando una información muy amplia sobre cada gen analizado.

Asimismo, en este trabajo se utilizó otra página Web denominada *Genome Browser* perteneciente a la Universidad de California en Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) que ofrece una visualización completa de los resultados para la búsqueda realizada. El programa utilizado en este caso se denomina BLAT y permite búsquedas de secuencias de DNA con una similitud del 95% o superior de fragmentos cuya longitud supere las 40 pares de bases.

8.9. Técnicas para el Análisis de Proteínas

Para complementar el estudio de aquellos genes que presentaron variaciones en sus niveles de expresión de RNA mensajero, se procedió al estudio de las correspondientes proteínas, cada una de ellas sintetizada en función del código establecido por la secuencia nucleotídica del RNA. El objetivo principal fue identificar variaciones a nivel de transducción y correlacionarlas con las observadas previamente a nivel transcripcional. Ello nos permitirá conocer un poco más sobre el funcionamiento y regulación de determinados genes humanos durante este proceso de adhesión de células trofoblásticas a células epiteliales endometriales, y asignar una utilidad práctica a estas proteínas, en su caso, en aspectos básicos o aplicados dentro del área de la biomedicina.

8.9.1. Extracción de Proteínas Celulares

La extracción de proteínas celulares requiere de una lisis eficiente de las células con una solubilización de las proteínas, evitando a su vez la degradación de las mismas o la interferencia en la actividad biológica o la inmuno reactividad de las proteínas. Para la obtención de extractos proteicos totales seguimos una modificación del método descrito por Dignam y *col.* en 1983. Los extractos

proteicos purificados en este trabajo fueron los correspondientes a los controles de células sin interacción JAR/G y RL95-2, y a las células JAR/G_42hs y RL95-2_42hs, es decir, luego de ser co-cultivadas durante 42 horas y separadas por citometría de flujo según se describió en 8.1. También se realizaron extractos proteicos de tejido placentario que fueron utilizados como control durante el análisis de proteínas de escasa abundancia.

Tampón de Lisis Celular RIPA

- 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
- 150 mM NaCl
- 1,0% Igepal® CA-630 (NP-40)*
- 0,5% Desoxicolato de Sodio
- 0,1% SDS

Tabla 21. Composición del Tampón de Lisis Celular RIPA (Sigma) para la extracción de proteínas a partir de cultivos celulares y tejidos. *Octil-feni-poli-etilén glicol.

Para realizar la extracción de proteínas a partir de células en cultivo o de muestras de tejido, se utilizó el tampón de lisis RIPA (**R**adio-**I**mmunoprecipitation **A**ssay, Sigma), una solución lista para usar cuya composición se detalla en la **tabla 21**, que permite una rápida y eficiente lisis celular y solubilización de las proteínas. A su vez minimiza interacciones de unión no específicas de proteínas, los que permite que tengan lugar las interacciones más específicas, permitiendo un análisis relevante de interacciones proteína-proteína.

▪ **Células en Suspensión:** tanto las células en suspensión procedentes de la separación por citometría de flujo de los co-cultivos, como las células utilizadas como control sin interacción resuspendidas por tripsinización según se describió en el apartado 8.1, fueron recogidas en tubos de fondo cónico de 15 ml (Falcon™, BD). Los tubos se centrifugaron a 1250 rpm y 4°C durante 5 minutos (centrífuga Beckman-Coulter modelo Allegra 6R), eliminando luego los sobrenadantes por decantación o aspiración y añadiendo a cada tubo 8 ml de tampón fosfato salino PBS 1X para lavar las células y eliminar el medio de cultivo remanente. Las células se centrifugaron en iguales condiciones y se eliminaron los sobrenadantes por aspiración, resuspendiendo las pastillas de células en el volumen residual (~30 µl). Se añadieron luego 100 µl de tampón de lisis RIPA por cada 2x10⁶ células presentes en cada tubo, más 2 µl de una mezcla de inhibidores de proteasas (500 µg/ml Aprotinina, 50 µg/ml Leupeptina, 50 µg/ml Pepstatina). Las muestras se incubaron 20 minutos en hielo y luego se clarificaron por centrifugación a 12.000 rpm y 4°C durante 15 minutos (Microcentrífuga Eppendorf) para precipitar los restos celulares. Los sobrenadantes clarificados conteniendo las proteínas solubles se transfirieron a tubos nuevos pre-enfriados de 1,5 ml (Eppendorf) y se congelaron a -80°C hasta su utilización.

▪ **Tejido Placentario:** la obtención de extractos proteicos de tejido placentario se realizó colocando trozos de 1 cm³ de placenta a término en un mortero esterilizado y pulverizando el tejido en presencia de nitrógeno líquido. Se le adicionó luego 2 ml de tampón de lisis RIPA y 40 µl de mezcla de inhibidores de proteasas. Se incubaron en hielo durante 20 minutos y se prosiguió con el protocolo de igual manera que para las células en suspensión.

8.9.2. Cuantificación de los Extractos Proteicos

La determinación de la concentración de proteína soluble presente en cada muestra se realizó utilizando el Método de Bradford (Bradford M.M., 1976). Este método se basa en el cambio de color del

reactivo de Bradford (BIO-RAD) en presencia de la proteína. Se realizó una curva patrón estándar con diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA, Promega; concentraciones: 0, 2, 4, 6, 8 y 10 µg/µl) en función de la cual se interpolaron los valores obtenidos para las muestras de proteínas extraídas con el tampón de lisis RIPA. Las lecturas de las muestras se realizaron por espectrofotometría a 595 nm.

8.9.3. Electroforesis de Proteínas en Geles de Poliacrilamida/SDS

Una vez cuantificadas las proteínas por el método de Bradford, se comprobó su integridad por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida/SDS resueltos en Tris/Glicina, siguiendo el método descrito por Schagger y von Jagow en 1987. En este sistema discontinuo de alta resolución se colocaron las proteínas sobre un gel de poro amplio o de apilamiento, el cual había sido polimerizado sobre un gel de poro más pequeño o de resolución, ambos preparados según se detalla en la **tabla 22**. Las muestras de proteínas se desnaturalizaron previamente por calentamiento a 100°C en presencia de SDS y un agente reductor (β-mercaptoetanol o DTT). En estas condiciones la mayoría de polipéptidos unen SDS en una relación molar constante, lo que confiere idéntica densidad de carga y permite la migración de las proteínas en los geles de poliacrilamida de acuerdo a su peso molecular.

| GEL DE RESOLUCIÓN [10%] | | GEL DE APILAMIENTO [5%] | |
|---------------------------------------|---------------|---------------------------------------|-------------|
| ▪ H ₂ O milliQ | 3,26 ml | ▪ H ₂ O milliQ | 2,06 ml |
| ▪ Mezcla Acrilamidas [#] 30% | 2,66 ml | ▪ Mezcla Acrilamidas [#] 30% | 500 µl |
| ▪ Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 | 1,92 ml | ▪ Tris-HCl 1,0 M pH 6,8 | 380 µl |
| ▪ SDS 10% | 80 µl | ▪ SDS 10% | 30 µl |
| ▪ APS 10%* | 77 µl | ▪ APS 10%* | 30 µl |
| ▪ TEMED [±] | 3 µl | ▪ TEMED [±] | 3 µl |
| Volumen final..... | 8,0 ml | Volumen final..... | 3 ml |

Tabla 22. Composición de los geles de resolución y apilamiento para la separación electroforética de proteínas en geles de poliacrilamida/SDS. [#] Solución filtrada 0,22 µm al 30% Acrilamida y 0,8% Bisacrilamida en H₂O milliQ. * Persulfato de Amonio (APS; Bio-Rad) preparado a una concentración de 100 mg/ml. [±] TEMED (N N N' N' Tetrametil-etilen-diamino; Sigma).

Se cargaron 50 µg por carril de cada extracto proteico total obtenido de células RL95-2 y JAR/G control (sin interacción), células RL95-2 y JAR/G co-cultivadas 42 horas y separadas por citometría de flujo según se describió anteriormente en **8.1 (Figura 10, etapa 7b)** y, además, extractos proteicos totales de tejido placentario (control) para el análisis de los factores transcripcionales PLA-1 y TEF-5.

Las muestras se prepararon en 25 µl de volumen final, utilizando tampón de carga para proteínas 5X (0,225 M Tris-HCl pH 6.8; 50% glicerol; 5% SDS; 0,05% azul de bromofenol; 0,25 M DTT o 15% β-mercaptoetanol). Se desnaturalizaron por calentamiento a 100°C durante 5 minutos en el bloque térmico (MULTI-BLOK® HEATER LAB LINE) y se sometieron a electroforesis vertical de tipo SDS-PAGE estándares a 120 voltios (Fuente de Alimentación 200/2.0 de Bio-Rad) en Tris-Glicina 1X (25 mM Tris-HCl, 250 mM glicina y 0,1% SDS), dejándose correr hasta que el frente de azul de bromofenol saliera del gel. En ambos carriles laterales se cargaron marcadores de peso molecular pre-teñidos (Pre Stained

SDS-PAGE Standards-Low Range, Bio-Rad; Prestained Protein Marker, Broad Range, New England Biolabs) para estimar el peso molecular de las proteínas separadas.

Para visualizar las proteínas resueltas en el gel, se tñieron durante 10-15 minutos en una solución de Coomassie (45% metanol; 10% ácido acético glacial; 45% H₂O milliQ; 0,25% Azul Brillante de Coomassie R-250, Sigma) y secaron al vacío durante 2 horas a 80°C (GELDRYER MODEL 583, Bio-Rad acoplado a aspirador EYELA A-35), o bien se destñieron en una solución (40% metanol; 10% ácido acético glacial; 50% H₂O milliQ) para su posterior transferencia a membranas de nitrocelulosa e inmunodetección por Western Blot.

8.9.4. Análisis de Proteínas por Western Blot

Se empleó esta técnica para la cuantificación de los niveles de síntesis (transducción) de las proteínas PLA-1, TEF-5, IGFBP7/MAC-25 y MUC-1, según el código establecido por cada secuencia de nucleótidos del RNA mensajero. El objetivo fue buscar una correlación entre los niveles de RNAs y de proteínas en las células trofoblásticas JAR/G y/o endometriales RL95-2, antes y después de su interacción en los ensayos de co-cultivo.

Para cuantificar los niveles de cada proteína en las diferentes condiciones experimentales, se cargaron en los geles exactamente la misma cantidad de cada extracto proteico por carril (50 µg totales), lo que permitió comparar las intensidades de las bandas y cuantificar por densitometría las variaciones observadas.

8.9.4.1. Transferencia de Proteínas a Membranas de Nitrocelulosa: Sistema Húmedo

Las proteínas separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida/SDS fueron luego transferidas a membranas de nitrocelulosa (TransBlot® Transfer Medium; Pure Nitrocellulose 0,45 µm; Bio-Rad) utilizando el equipo Mini Trans Blot (Bio-Rad), ubicado sobre un agitador magnético (IKAMAG® RH; Janke & Kunkel Ika®-Labortechnik), lo que permitió la homogenización del tampón de transferencia y evitó el calentamiento localizado, permitiendo así una transferencia eficiente. Las membranas, cortadas del tamaño del gel, se hidrataron previamente en el tampón de transferencia. El “sandwich” se preparó colocando entre las láminas de fibra ubicadas sobre ambas caras del cassette: dos trozos de papel Whatman® 3MM, el gel que se transfiere, la membrana hidratada y otros dos trozos de papel Whatman® 3MM, eliminando las burbujas.

Las transferencias se llevaron a cabo durante 30-45 minutos a 100 voltios, en tampón de transferencia (25 mM Tris-Base, Sigma; 150 mM glicina, Merck; 20% v/v metanol, Merck; pH debe ser 8,3 sin ajustar), con refrigeración a 4°C y agitación. A continuación las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución al 2% p/v de ECL Advance Blocking Agent (Amersham Biosciences) preparada en tampón TBS-T (0,1% v/v de Tween® 20, Bio-Rad añadido a la solución TBS 1X: 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl). Este reactivo de bloqueo es provisto con el equipo comercial ECL Advance® Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences) que fue utilizado para la inmunodetección de las proteínas.

8.9.4.2. Inmunodetección

Las membranas de nitrocelulosa que contenían los antígenos proteicos inmovilizados, fueron bloqueadas como se describió en el apartado anterior, incubadas en presencia del anticuerpo primario correspondiente y luego incubadas con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa el cual fue revelado por quimioluminiscencia utilizando el sistema de alta sensibilidad ECL Advance® Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences).

- *Obtención de Anticuerpos Policlonales:* los anticuerpos policlonales α PLA-1 y α TEF-5 fueron generados en conejos New Zealand White machos por los Doctores Oscar Jiménez-Mateo (código A-354) y Angelina Rodríguez-Torres respectivamente. Para ello se clonaron las secuencias de PLA-1 y TEF-5 en el vector de expresión pET 28a y se transformaron en la cepa BL21 (DE3) de *E.coli*. El vector contiene una secuencia promotora para la RNA polimerasa de T7 que fue inducida por IPTG. Cada proteína recombinante así obtenida, que incorpora una cola de 6 histidinas en su extremo amino terminal, se purificó por cromatografía de afinidad en columnas de níquel (Ni^{2+}). Las proteínas recombinantes recuperadas de geles de acrilamida se emulsionaron en presencia del adyuvante de Freund y se inocularon subcutáneamente a los conejos para generar los anticuerpos.

- *Purificación de Anticuerpos:* para este trabajo, los anticuerpos α PLA-1 y α TEF-5 se purificaron del resto de las proteínas presentes en el suero mediante columnas de proteína A (Vivapure Protein A Mini spin Columns for antibody purification, VivaScience, Sartorius Group). Esta proteína tiene la capacidad de unirse específicamente a la región Fc de diversas inmunoglobulinas en condiciones de pH elevado o neutro (Solución I: 0,5 M NaCl; 10 mM fosfato de potasio; pH 7,4). Los anticuerpos son eluidos a bajo pH (Solución II: 0,1 M glicina-HCl pH 2,8), seguidos de una neutralización (Solución III: 1 M Tris pH 9,0).

- *Anticuerpos Comerciales:* tanto para inmunofluorescencia como para Western Blots se utilizaron los anticuerpos policlonales comerciales generados en conejo contra IGFBP-7 (H-102; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y contra MUC-1 (ab14690; Abcam Inc., Cambridge). Para la detección de las integrinas α 1, α 4 y α 5 se utilizaron los anticuerpos monoclonales TS 2/7, HP 1/7 (o HP 2/4) y P1D6 respectivamente, cedidos gentilmente por el Dr. Francisco Sanchez-Madrid (Servicio Inmunología del Hospital Universitario de La Princesa, Madrid).

Las incubaciones de las membranas con los anticuerpos se llevaron a cabo de acuerdo al siguiente protocolo, ajustando las condiciones a las sugeridas por el fabricante del equipo comercial:

- *Incubación con el Anticuerpo Primario:* las membranas bloqueadas se lavaron tres veces con 10 ml de TBS-T durante 5 minutos cada vez, y luego se incubaron con 10 ml del anticuerpo purificado α PLA-1, α TEF-5 u otro a una dilución 1/20.000 en TBS-T (0,1% v/v de Tween® 20, Bio-Rad añadido a la solución TBS 1X: 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl). Las incubaciones se realizaron en tubos de hibridación (Amersham Life Science) durante 1 hora a TA, con agitación en horno de hibridación, o bien durante toda la noche a 4°C con agitación. Transcurrido ese tiempo las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos a TA con 10 ml de TBS-T por membrana.

▪ *Incubación con el Anticuerpo Secundario*: luego de los lavados, cada membrana se incubó con 10 ml de una dilución 1/10.000 del anticuerpo secundario contra conejo marcado con peroxidasa (Anti Rabbit IgG Horseradish Peroxidase linked whole antibody – from donkey; Amersham Biosciences; NA934V) o contra ratón (Anti mouse IgG Horseradish Peroxidase linked whole antibody – from sheep; Amersham Biosciences; NA931). Las incubaciones se realizaron en el mismo tubo de hibridación durante 1 hora a TA y con agitación. Luego, se lavaron las membranas con 10 ml de TBS-T cada una durante 5 minutos a TA, repitiendo los lavados dos veces más y realizando un lavado final con abundante TBS sin Tween 20 durante 5 minutos.

▪ *Revelado con el Equipo ECL Advance® Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences)*: la detección de los complejos antígeno-anticuerpo se realizó por quimioluminiscencia mediante este equipo comercial de alta sensibilidad. Los dos reactivos que lo componen se mezclaron en partes iguales (1:1) y se adicionaron cuidadosamente sobre las membranas, incubando durante 5 minutos a TA en la oscuridad. La detección se realizó exponiendo la cara de la membrana que contenía las proteínas hacia las películas autoradiográficas (X-Ray Films, AGFA) durante períodos de tiempo variables (desde 5 seg hasta 30 min).

▪ *Reutilización de las Membranas (Stripping)*: esta metodología se utilizó para remover los anticuerpos primario y secundario de las membranas y reutilizarlas varias veces. Para ello cada membrana se incubó con 5 ml de la solución de reciclado (20,05 ml de H₂O_{mQ}, más 3,75 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6,7 y 6 ml de SDS 10%) a la que se añadió 35 µl de β-mercaptoetanol. El tratamiento se llevó a cabo en tubos de hibridación (Amersham Life Science) que se incubaron durante 30 minutos a 55°C en un horno de hibridación/agitación (Amersham Life Science). A continuación se realizaron tres lavados con 20 ml de TBS-T, cada uno durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las membranas recicladas se conservaron a 4°C y se reutilizaron iniciando el proceso desde la etapa de bloqueo de la membrana.

8.9.5. Inmunofluorescencia

La comprobación de los distintos niveles de expresión de las proteínas PLA-1 y TEF-5 en células trofoblásticas JAR/G, antes y después de su interacción con las células endometriales RL95-2, se realizó por microscopía de fluorescencia. De igual manera se realizó el estudio para las proteínas MUC-1 e IGFBP7/MAC-25 en células endometriales RL95-2 antes y después de interaccionar con células JAR/G.

Para ello, las células RL95-2 y JAR/G separadas por citometría de flujo luego de ser co-cultivadas durante 42 horas, tal como se describió en **8.1 (Figura 10, etapa 7c)**, fueron recogidas directamente desde el citómetro de flujo en tubos conteniendo medio de cultivo fresco. Una vez recuperadas alrededor de 1×10^6 células JAR/G_42hs y RL95-2_42hs, las células se centrifugaron a 1250 rpm y 4°C durante 5 minutos, se decantaron los sobrenadantes y se resuspendió cada pastilla celular en 5 ml del respectivo medio de cultivo. Se adicionaron 200 µl de estas células en suspensión en cada pocillo de una placa P-24 (Falcon™, Becton Dickinson) que contenía cubreobjetos de vidrio circulares esterilizados. Las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C en atmósfera humidificada al 5% de CO₂. Inmediatamente después, los cubres con las células adheridas fueron cuidadosamente lavados con 1 ml

de PBS 1X por pocillo durante 5 minutos y fijados durante 30 minutos con PBS/Paraformaldehído 4%. Luego se lavaron durante 5 minutos con 1 ml de PBS 1X por pocillo y se conservaron en PBS/0,01% Azida Sódica (Merck) a 4°C hasta su utilización.

Para las células JAR/G y RL95-2 utilizadas como control sin interacción se procedió de manera similar a partir de la resuspensión de las mismas por tripsinización.

Las inmunofluorescencias se realizaron lavando los cubres con PBS 1X e incubándolos durante 10 minutos en solución de bloqueo (PBS 1X; 0,1% Tritón X100; 1% SFB) a temperatura ambiente. Las células se incubaron durante 1 hora a TA con el anticuerpo primario diluido 1/100 en solución de bloqueo. Los cubres se lavaron 3 veces con PBS 1X y se incubaron durante 45 min en diluciones 1/100 o 1/500 del anticuerpo secundario anti conejo Alexa Fluor 546 o anti ratón Alexa Fluor 488 (Invitrogen) que a su vez era 1/1.000 en To-pro-3 (Molecular Probes). Tras realizar 3 lavados con PBS 1X los cubres se sumergieron brevemente una vez en agua destilada y otra vez en etanol, secando el exceso con papel y montando invertido en un portaobjeto que contenía una gota de medio de montaje Mowiol (DABCO).

Las imágenes se tomaron en el microscopio de barrido láser Confocal LSM510 Meta acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss), excitando con los láseres de Argón y Helio-Neón, utilizando las ópticas de contraste de fases y fluorescencia, con los filtros de fluorescencia verde (FITC/GFP), rojo (Rodamina) y azul (Texas Red), el objetivo 40X y un aumento interno de 2X.

8.9.6. Microscopía Óptica y Confocal *in vivo*

Las células JAR/G, JEG-3/G y 293/G, que expresaban establemente la proteína verde fluorescente EGFP, fueron visualizadas en co-cultivo sobre monocapas de células endometriales RL95-2 y HEC-1A utilizando el Sistema *in Vivo* (Cell Observer-Zeiss) acoplado al microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta, que incluye una platina termostatazada, un controlador de temperatura, un controlador CO₂, un controlador de humedad y un incubador asociado.

Para estos experimentos las células endometriales fueron crecidas en monocapas sobre placas de fondo de vidrio (WillCo-dish™; Willco Wells) en sus respectivos medios de cultivo, preparados al 5% de suero fetal bovino y sin rojo de fenol para disminuir la autofluorescencia, sobre las que se añadieron las células en suspensión EGFP positivas. El procedimiento seguido es el detallado para los ensayos de adhesión celular, descrito en 7.1 (Figura 8, etapas 1 a 4), tomando las imágenes de las células adheridas luego de los lavados con PBS 1X y EDTA 0.02% en ensayos de co-cultivo de 1 hora.

Asimismo, se utilizaron estas placas y este sistema *in vivo* para la visualización de las células EGFP positivas antes y después del tratamiento con los agentes inductores de la diferenciación celular FSK y PMA, descrito en 7.3, evitando los cambios en la permeabilidad de la membrana nuclear que se producen cuando se fijan las células trofoblásticas con paraformaldehído.

9. Micromatrices de DNA (DNA *Microarrays*)

Las micromatrices de DNA, tal como su nombre lo indica, consisten en matrices o soportes sólidos, en general vidrio, que contienen miles de secuencias diferentes de DNA estrictamente ordenadas, que se pueden utilizar para medir variaciones de DNA y RNA en aplicaciones tales como estudios de

expresión génica, de genómica comparativa o genotipificación. Esta tecnología, ampliamente desarrollada durante los últimos años, proporciona una nueva herramienta que permite la medición simultánea de los niveles de expresión de miles de genes en un único ensayo de hibridación (Lander, 1999).

Cada RNA o DNA marcado con fluorescencia durante su preparación a partir del RNA mensajero, es hibridado con su respectivo DNA complementario presente en la micromatriz y detectado mediante un escáner láser (Case-Green y col., 1998; Lipshutz y col., 1999). La intensidad de hibridación para cada secuencia de la micromatriz es convertida en una medida cuantitativa de los niveles de expresión génica relativa, permitiendo identificar patrones de expresión y analizar variaciones, para luego correlacionarlas con el desarrollo, fisiología y función celular (Christina Harrington y col., 2000).

9.1. Análisis de Expresión Génica con la Plataforma GeneChip® de Affymetrix®

Para este trabajo se utilizaron seis micromatrices de DNA o microarrays (oligonucleótidos) de la plataforma GeneChip® (Affymetrix®, Inc, Santa Clara, California) con la colaboración con la empresa Progenika Biopharma S.A. (Parque Tecnológico de Zamudio, Derio). Se emplearon las micromatrices del genoma humano completo *Human Genome U133 Plus 2.0* (HG-U133 Plus 2.0) que contienen más de 54.000 juegos de sondas para analizar la expresión de alrededor de 47.000 transcritos y variantes. La hibridación en estas micromatrices se llevó a cabo con cRNA marcado con biotina sintetizado a partir de cDNA obtenido, a su vez, de RNA total purificado.

Se utilizó RNA total y no mRNA poly(A)⁺ dado que durante la purificación de este último se puede perder parte de la información. El proceso completo se realizó siguiendo el protocolo indicado en el Manual Técnico de Análisis de Expresión (*Expression Analysis Technical Manual*) de Affymetrix:

▪ Aislamiento del RNA total: las muestras de RNA total a comparar se obtuvieron por extracción con el reactivo del TRIzol™ (Gibco BRL) de acuerdo al protocolo descrito en **8.3.1**. Como condiciones experimentales (co-cultivo y separación celular por citometría de flujo) se siguieron estrictamente las condiciones descritas en **8.1 (Figura 10, pasos 1 a 7a)**, comprobando la concentración y calidad de los RNAs por espectrofotometría con el NanoDrop® (ND-1000 Spectrophotometer) y su integridad mediante geles de agarosa en condiciones desnaturizantes o bien con el Bioanalizador (Bioanalyzer 2100 expert, Agilent Technologies), procedimientos descritos anteriormente en los apartados **8.4** y **8.5**.

| Muestra de RNA total hibridada | |
|--------------------------------|-------------|
| 1. | RL95-2 |
| 2. | JAR/G |
| 3. | RL95-2-42hs |
| 4. | JAR/G-42hs |
| 5. | HEC-1A |
| 6. | JAR |

Tabla 23. Muestras de RNA total utilizadas para la hibridación con micromatrices de DNA de la plataforma GeneChip® de Affymetrix®.

Los RNAs totales aislados que se utilizaron para hibridar las micromatrices de DNA (una matriz para cada RNA) se detallan en la **tabla 23**. Corresponden a las células endometriales RL95-2 y trofoblásticas JAR/G antes y después de ser co-cultivadas durante 42 horas (1, 2, 3 y 4). También se incluyeron otras dos matrices para células endometriales HEC-1A (5) y trofoblásticas JAR (6). La primera para comparar epitelio endometrial receptivo (RL95-2) para la implantación de embriones versus epitelio no receptivo (HEC-1A), y detectar nuevos genes esenciales para la implantación.

Además, esta comparativa permitirá analizar y determinar qué genes de los que están presentes o ausentes durante la ventana de implantación, experimentan variaciones considerables en sus niveles de expresión luego del co-cultivo e interacción con células trofoblásticas (1 y 3). El segundo control JAR, utilizado para evaluar el grado de modificación cromosómica de las células JAR/G (establemente transducidas con la proteína fluorescente EGFP) producido durante el proceso de transferencia génica retroviral.

El procesamiento posterior de los RNAs y la hibridación con las micromatrices de DNA se continuó en la empresa Progénika Biopharma S.A., ubicada en el Parque Tecnológico de Zamudio en Derio, Comunidad Autónoma del País Vasco. Para ello se siguieron las etapas que se detallan a continuación:

▪ Limpeza del RNA: las muestras de RNA total aisladas con el reactivo del TRIzol, entre 8 y 100 μg totales, se purificaron utilizando el *kit RNeasy de Qiagen* (RNeasy Total RNA Isolation Kit, QIAGEN, Cat # 74104) siguiendo las indicaciones del fabricante, recuperándose cada muestra en un volumen de 35 μl de agua. La calidad y cantidad de los RNAs purificados se estimaron mediante chequeo de una alícuota en un gel de agarosa y medida espectrofotométrica.

▪ Síntesis de cRNA biotinilado: a partir de 4.5 μg de cada una de las 6 muestras, se sintetizó cDNA empleando el equipo *One-Cycle cDNA Synthesis kit* de Affymetrix. La síntesis de la primera cadena de cDNA ocurre por transcripción reversa, empleando el oligonucleótido para el promotor T7-Oligo(dT), seguida por la síntesis de la segunda cadena de cDNA mediada por RNasa-H.

El cDNA doble cadena fue purificado y se utilizó como molde para la reacción de transcripción *in vitro* siguiendo el protocolo de marcación del equipo *IVT Labeling kit* de Affymetrix. La reacción se lleva a cabo en presencia de T7 RNA polimerasa y una mezcla de nucleótidos biotinilados, aprovechando la inclusión de la secuencia del promotor de T7 realizada durante la síntesis de la primera cadena. El cRNA biotinilado sintetizado, se purificó con el equipo sugerido *GeneChip Sample Cleanup Module* de Affymetrix para eliminar los NTPs no incorporados, recuperándose en un volumen de 22 μl de agua y comprobándose su concentración, pureza e integridad en un gel de agarosa y por espectrofotometría.

Una vez sintetizado y purificado, se fragmentó el cRNA (15 μg de cada muestra) para preparar las mezclas de hibridación. Este paso es crítico para lograr una sensibilidad de ensayo óptima. Se realizó luego una comprobación por electroforesis en gel de agarosa de los cRNAs fragmentados.

▪ Hibridación de las Micromatrices Human Genome U133 Plus 2.0: con el cRNA fragmentado se preparó la mezcla de hibridación, en la que se incluyeron los dos controles provistos por el equipo comercial GeneChip® Expression 3'-Amplification Reagents Hybridization Control Kit:

1. *spike controls* o *controles parásitos* (BioB, BioC, BioD y Cre): son sondas control para secuencias que se incluyen en la mezcla de hibridación. Utilizados como control de un correcto procedimiento de hibridación, lavado, revelado y escaneado de la micromatriz.
2. *housekeeping controls* o *controles constitutivos* (GAPDH y β -ACTINA): son sondas para genes expresados constitutivamente en todo tipo de tejidos. Se encuentran en la micromatriz sondas correspondientes a las zonas 3', central y 5' de estos genes. La relación entre las señales de hibridación para las sondas 3' respecto a la de las 5' indica la

integridad de los cRNAs sintetizados, siendo ésta reflejo de la calidad del RNA original utilizado para la síntesis.

La mezcla se incubó durante 16 horas para cada micromatriz.

▪ Lavado, Revelado y Escaneado: trascurridas las 16 horas de hibridación, la mezcla fue removida y se realizaron los lavados y el revelado de cada array en la estación de lavado Fluidics Station 400 operada por el programa de Affymetrix GCOS 1.2 (Affymetrix GeneChip® Operating Software). Se siguieron las indicaciones señaladas en el equipo *IVT Labeling kit* de Affymetrix para la preparación de las dos soluciones, una de SAPE (estreptavidina conjugada con ficoeritrina) y otra de anticuerpo (anti estreptavidina marcado con biotina). Una vez completos los lavados se analizaron con el escáner Affymetrix® GeneChip® Scanner 3000 operado por el mismo programa GCOS 1.2 que el utilizado en la estación de lavado.

El proceso completo se representa esquemáticamente en la **Figura 12** de la siguiente página.

9.2. Comparación de la Expresión Génica entre las Distintas Muestras

Observadas las imágenes de cada uno de los arrays hibridados en el presente estudio y teniendo en cuenta los criterios de calidad (presencia de *spike controls* y relaciones 3'/5' de los genes *housekeeping*), se determinó que los seis micromatrices hibridadas superaron los criterios de calidad establecidos.

Como paso previo a la comparación de los arrays se llevó a cabo el escalado de los datos de cada array, con el fin de minimizar las discrepancias debidas a variables tales como la preparación de la muestra, la hibridación, etc. Usando el software de Affymetrix GCOS 1.2, todas las micromatrices se escalaron definiendo como la intensidad media el valor arbitrario de 100. GCOS calcula la intensidad media de todo el array promediando los valores de intensidad de todos los sets de sondas a excepción del 2% de los valores con mayor y menor intensidad. Esa intensidad media es multiplicada por un factor de escalado que la convertirá en el valor definido por el usuario (en este caso 100). El factor de escalado de los arrays del mismo experimento debe ser próximo entre ellos y cercano a 1 en la medida de lo posible.

Las comparaciones realizadas se indican en la **tabla 24**, señalándose también el código asignado para cada RNA durante el proceso:

| Comparaciones realizadas con el software GCOS 1.2 |
|---|
| RL95-2_42hs [05SE872] vs RL95-2 [05SE868] |
| JAR/G_42hs [05SE875] vs JAR/G [05SE871] |
| JAR/G [05SE871] vs JAR [05SE870] |
| HEC-1A [05SE869] vs RL95-2 [05SE868] |

Tabla 24. Comparaciones de la Expresión Génica realizadas entre las distintas muestras con el programa Affymetrix GeneChip® Operating Software 1.2 (GCOS). Para cada muestra de RNA se indica el código asignado durante su procesamiento.

Asimismo se realizó el análisis de la forma de las gráficas de dispersión (*Scatter Graphs*) con todos los puntos para corroborar la consistencia de los datos obtenidos. En este tipo de gráficas se representa

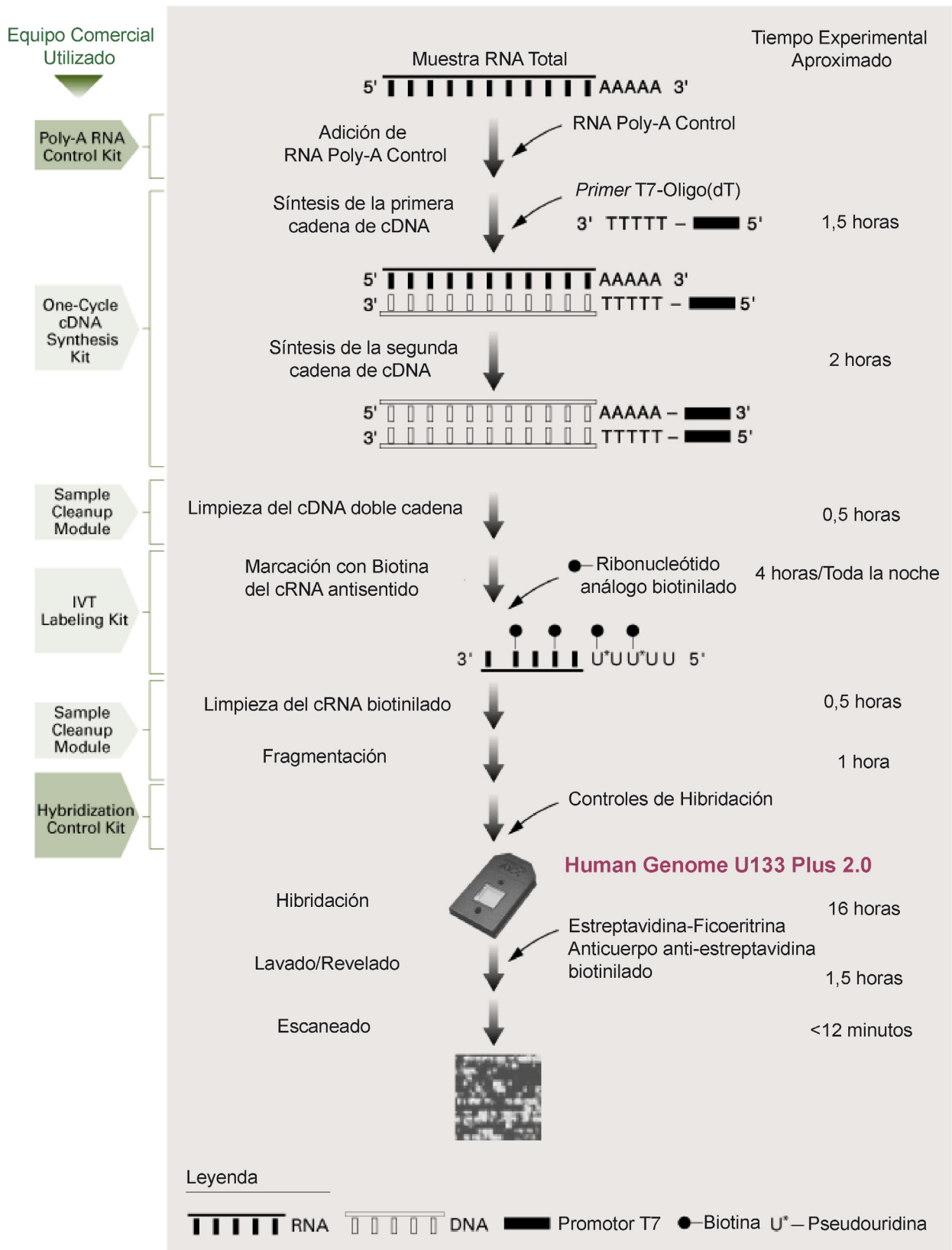


Figura 12. Representación esquemática del proceso completo para el Análisis de Expresión Génica con la Plataforma GeneChip® de Affymetrix®. Protocolo indicado en el Manual Técnico de Análisis de Expresión (Expression Analysis Technical Manual) de Affymetrix.

en escala logarítmica los valores de señal para cada una de las muestras comparadas: en el eje de abscisas la muestra tomada como línea base y en el eje de ordenadas la muestra problema.

El análisis de la forma de las gráficas de dispersión con todos los puntos (“*Completo*”) permite corroborar la consistencia de los datos obtenidos. La distribución de los puntos en las gráficas de dispersión denominadas “*Selección*” da una idea general del número de secuencias sobreexpresadas y reprimidas, así como de la tasa de cambio de éstas. Cuanto más alejado esté el punto de la diagonal, mayor será la tasa de cambio.

9.3. Criterios para el Análisis de los Resultados y Selección de Genes Candidatos

En los estudios de expresión génica los genes más interesantes son los que se sobreexpresan o reprimen en una muestra respecto a otra muestra que se elige como línea base y que normalmente corresponde a la muestra control. Para elegir los mejores candidatos se han de tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- El tipo cualitativo de cambio (expresado como *increase*, *decrease*, etc) viene determinado por el algoritmo *change p-value* en función de los siguientes valores cualitativos:

| Valor <i>p</i> (Change <i>p-value</i> *) | Cambio (Change) |
|---|--------------------------------|
| $1 > \text{change } p\text{-value} > 0.9955$ | D =Decrease |
| $0.9955 > \text{change } p\text{-value} > 0.9940$ | MD =Marginally decrease |
| $0.9940 > \text{change } p\text{-value} > 0.006$ | NC =No change |
| $0.006 > \text{change } p\text{-value} > 0.0045$ | MI =Marginally increase |
| $0.0045 > \text{change } p\text{-value} > 0$ | I =Increase |

* Los valores cambian según el número de sondas incluidas en el set de sondas, es decir del tipo de chip. Estos valores son válidos para chips con 11 sondas, como el set humano U133 (*HG-U133_Plus_2*).

Por tanto en las sondas que tengan un valor extremo de *change p-value*, más próximo a **1** para los reprimidos y a **0** para los sobreexpresados, más significativo será el cambio.

- El segundo parámetro más importante es el *signal log ratio* (SLR). Este valor corresponde al \log_2 del *Fold change* (tasa de cambio utilizada en la versión anterior del software de Affymetrix). Las listas de secuencias sobreexpresadas y reprimidas se han ordenado en orden decreciente del valor absoluto del SLR ya que a mayor valor absoluto de SLR (con signo negativo para las secuencias reprimidas y positivo para las sobreexpresadas) la tasa de cambio será mayor.

- De forma general, se considera significativo un valor de cambio de SLR (valor absoluto) mayor de 1. Al trabajar con \log_2 equivale a una sobreexpresión o represión de dos veces. A partir de ahí, en función del número total de secuencias que cumplan este requisito, del modelo estudiado y de las restricciones que se quieran poner al estudio, pueden considerarse significativos valores mayores o menores de SLR.

- La significación del valor absoluto de SLR viene determinada por los valores SLR *low* y SLR *high* que corresponden a los límites de confianza al 95% del SLR. Un intervalo de confianza del 95% indica el

rango de valores que contiene el verdadero valor en un 95% de las veces. Un rango estrecho en el intervalo de confianza indica mayor precisión en el cálculo de SLR, ya que denota una menor dispersión de los datos.

▪ Las secuencias más interesantes serán aquellas que i) aparezcan presentes en los dos chips, ii) presentes en el array A y ausentes en el B para los *Increase*, iii) presentes en el array B y ausentes en el A para los *Decrease*. Cabe señalar que pueden aparecer secuencias con cambio significativo (increase o decrease) pero que no se detectan en ninguna de las dos muestras comparadas (ausentes en ambas). En este sentido hay que tener en cuenta que se utilizan diferentes algoritmos para calcular el detection (ausente, presente o marginal) y el *change* o cambio (increase, decrease, no change). La significación de las secuencias ausentes calificadas como sobreexpresadas o reprimidas debe ser considerada en función del tipo de estudio que se esté realizando o del modelo utilizado.

En resumen, para la selección de los mejores candidatos se siguieron como criterios:

| Secuencias Sobreexpresadas | Secuencias Reprimidas |
|--|--|
| 1. Presentes en el chip A | 1. Presentes en chip B |
| 2. Aparecen como "I" en la columna <i>Change</i> | 2. Aparecen como "D" en la columna <i>Change</i> |
| 3. SLR superior a 3.0 | 3. SLR inferior a -3.0 |

9.4. Búsqueda de Información en las Bases de Datos

Los genes seleccionados en base a los criterios anteriormente descritos fueron luego analizados en las bases de datos. Se utilizó la aplicación NetAffx™ Analysis Center, diseñada para este fin, que se encuentra disponible en la página Web de Affymetrix (<http://www.affymetrix.com/index.affx>) y que recoge la información actualizada sobre cada gen, extraída de numerosas bases de datos.

La aplicación permite correlacionar los resultados obtenidos de las micromatrices con la información y bibliografía existente para cada gen, secuencias de las sondas, el diseño y contenido de los chips.

Los resultados de este análisis se volcaron en dos tablas diferentes para cada comparativa. La primera conteniendo los genes sobreexpresados y la segunda con los genes reprimidos. Las primeras sondas/genes de cada tabla se encuentran impresas en el apartado Resultados III, hallándose la totalidad de su contenido de cada una en el soporte CD (disco compacto) anexo a este trabajo.

9.5. Confirmación de la Expresión Diferencial de los Genes Seleccionados

Un número reducido de genes fueron seleccionados y estudiados por inmunofluorescencia y por western blot para confirmar y complementar el análisis de las variaciones detectadas mediante las micromatrices. Los genes seleccionados fueron las integrinas alfa 1 (ITGA1), alfa 4 (ITGA4) y alfa 5 (ITGA5), cuyos niveles de RNA mensajero se sobreexpresaron marcadamente según se pudo determinar en la comparativa RL95-2_42hs [05SE872] vs. RL95-2 [05SE868].

Resultados



Sección 1

10. Diseño de un Nuevo Modelo de Adhesión Celular *in vitro* Basado en la Citometría de Flujo para el Estudio de la Adhesión de Células Trofoblásticas a Células Epiteliales Endometriales

10.1. Diseño Experimental

El objetivo inicial de este trabajo fue el diseño de un modelo experimental *in vitro* que nos permita el estudio de las interacciones que tienen lugar entre las células trofoblásticas, que conforman la cubierta externa del embrión humano, y las células del epitelio luminal endometrial durante el proceso de implantación de embriones en humanos.

Con este fin, el diseño experimental se basó en la utilización de líneas celulares de morfología epitelial derivadas de útero (adenocarcinoma endometrial) y placenta (coriocarcinoma), debido a los impedimentos ético-morales y legales existentes para la utilización de embriones humanos en investigación médica y/o experimentación.

Para estudiar las interacciones moleculares embrión-endometrio que tienen lugar durante esta fase inicial de adhesión, se utilizaron dos líneas celulares trofoblásticas, JAR (Pattillo y *col.*, 1971) y JEG-3 (Kohler y Bridson, 1971), y dos líneas celulares derivadas de epitelio endometrial (RL95-2 y HEC-1A).

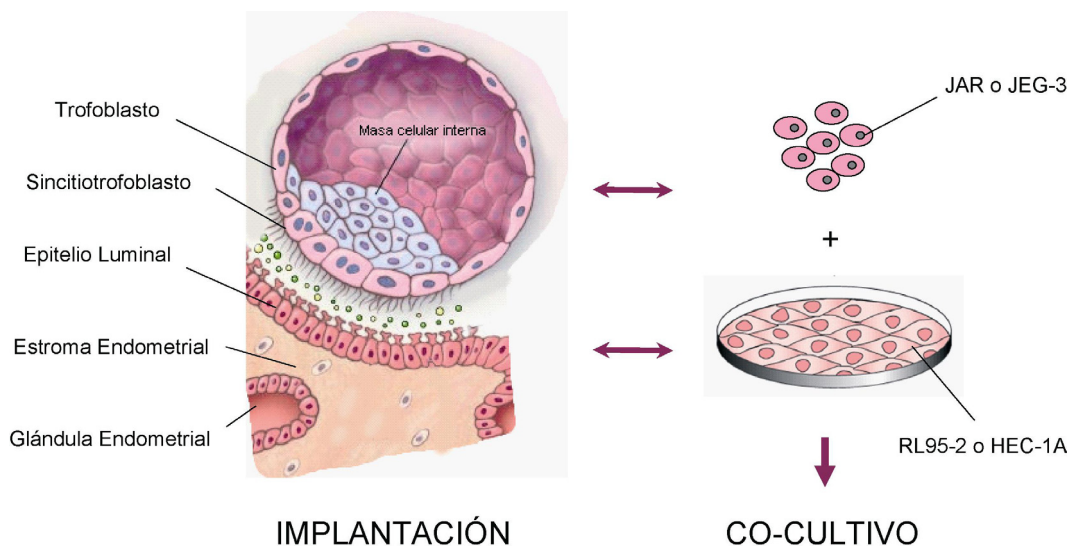


FIGURA 13. Diseño experimental utilizado para mimetizar las interacciones trofoblasto-endometrio durante la implantación.

Se seleccionaron las células RL95-2 (Way y *col.*, 1983) como modelo de epitelio uterino “receptivo”, puesto que representan claramente un fenotipo epitelial no polarizado que permite la adhesión de células de coriocarcinoma (células trofoblásticas) a su polo apical (John y *col.*, 1993a; Thie y *col.*, 1997 y 1998).

Como modelo de epitelio uterino “no receptivo” se seleccionaron las células HEC-1A (Kuramoto, 1972a), que muestran una menor capacidad de adhesión de células de coriocarcinoma, debida posiblemente a los mayores niveles de expresión de episialina (comparados con los de las células RL95-2), una molécula encontrada en la superficie apical de las células epiteliales endometriales que actúa como un factor anti-adherente, probablemente al inducir impedimentos estéricos por su estructura ampliamente glicosilada (Chervenak e Illsley, 2000).

Como control para evaluar la especificidad en la adhesión y reconocimiento entre las células en este modelo trofoblasto-endometrio, se emplearon células epiteliales de riñón 293 (Graham y col., 1977).

En la **Figura 13** se enseña el diseño experimental sobre el que se fundamentó el modelo de adhesión celular, ideado con el fin de simular las interacciones trofoblasto-endometrio ocurridas durante las primeras etapas del proceso de implantación de embriones humanos.

10.2. Estudios Preliminares de Adhesión

Los co-cultivos de células JAR o JEG-3 con monocapas de células endometriales RL95-2 o HEC-1A, que se realizaron en presencia de 0%, 1% y 10% de suero fetal bovino y con incubaciones durante tiempos variables de 1, 2 o 16 horas, determinaron que las condiciones óptimas de co-cultivo sean: 1 hora en presencia de 10% de SFB. En esas condiciones experimentales, las diferencias de adhesión existentes entre las distintas líneas celulares fueron las más acentuadas según se pudo observar visualmente al microscopio óptico. No se detectaron variaciones significativas en la adhesión por efecto de las distintas concentraciones de suero. En las incubaciones prolongadas las diferencias de adhesión entre las distintas líneas celulares no fueron tan marcadas.

No obstante, el análisis por citometría de flujo de muestras procedentes de co-cultivos no permitió la identificación de las poblaciones celulares en función de su tamaño (FS-log) y complejidad celular (SS-log). Como se puede observar en la **Figura 14.A**, las células RL95-2 son considerablemente más pequeñas que las JAR y JEG-3, pudiéndose observar claramente dos poblaciones en una gráfica de dispersión celular, pero no así las HEC-1A cuya morfología es similar a la de las células trofoblásticas (**Figura 14.B**).

Con el fin de poder realizar el análisis simultáneo de dos poblaciones celulares en una misma muestra se debió recurrir a la introducción del gen reportero o marcador EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) haciendo uso de metodologías de transferencia génica. La gran eficiencia de infección que poseen los retrovirus, la variedad de células de mamíferos mitóticamente activas que infectan, la simpleza como técnica experimental de laboratorio y la posibilidad de lograr estabilidad genética por integración, fueron determinantes para la elección del sistema de transducción retroviral como método de transferencia génica.

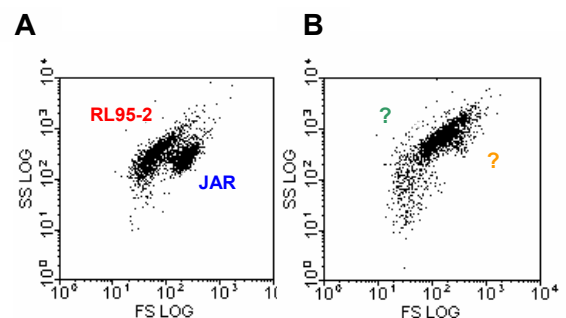


FIGURA 14. Gráficos de Tamaño [FS] vs Complejidad Celular [SS] obtenidos del análisis de co-cultivos de células RL95-2 con JAR o JEG-3 (**A**) y co-cultivos de HEC-1A con JAR o JEG-3 (**B**). Se visualiza la dispersión celular de las muestras que contienen mezclas de células trofoblásticas y endometriales.

10.3. Transducción *in vitro* de las Líneas Celulares JAR, JEG-3 y 293 con el Vector Retroviral

Para la producción de partículas retrovirales infectivas incompetentes para la replicación, pero conteniendo el transgen de la proteína verde fluorescente potenciada EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*), se utilizó el clon de células empaquetadoras PG13 establemente transducido con el vector retroviral LZRS-EGFP (**Figura 15**), cedido gentilmente por los Dres. Hergen Spits y Naomi Taylor (Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, Université Montpellier II, Montpellier. France).

Los sobrenadantes retrovirales libres de células, obtenidos de este clon según se describió en 6.2, fueron utilizados para transducir células JAR, JEG-3 y 293 (**Figura 16.A**) en presencia de concentraciones variables del polication Polibreno (0, 4 y 8 $\mu\text{g/ml}$), según se describió en 6.3. Este catión permite la introducción estable y eficiente de moléculas de DNA de bajo peso molecular por disminución de la repulsión electrostática existente entre las superficies negativamente cargadas de la célula y el virión (Kawai y Nishizawa, 1984).

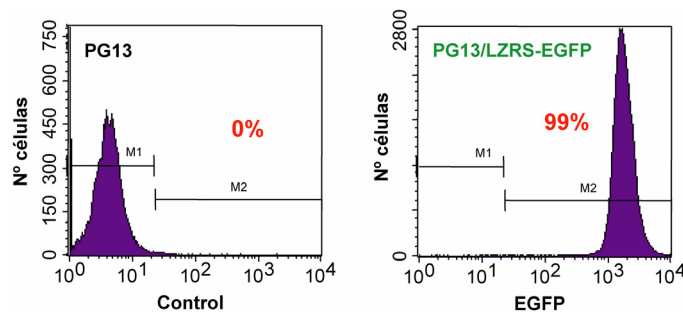


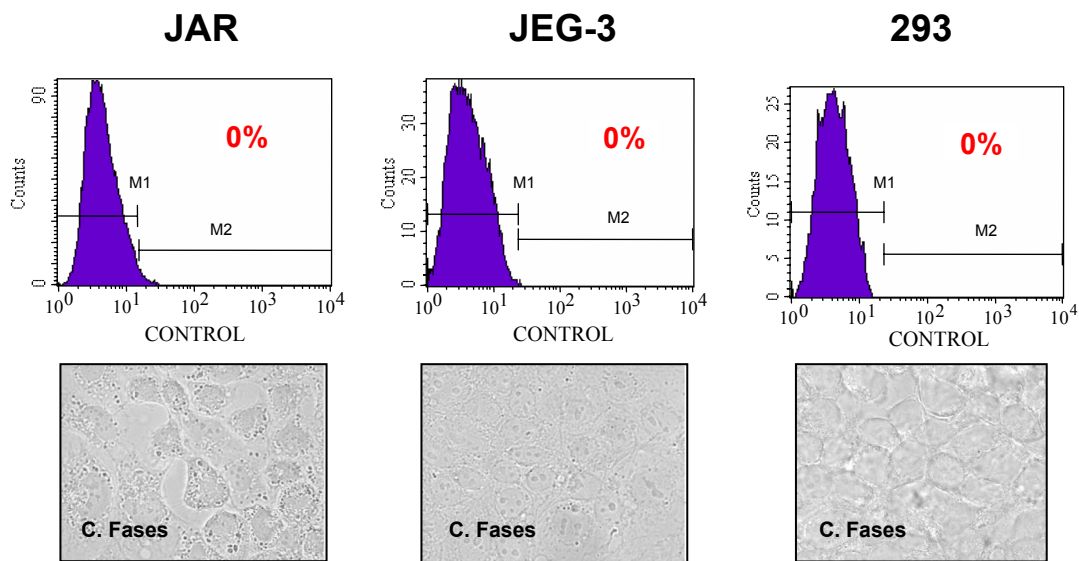
FIGURA 15. Análisis por Citometría de Flujo del clon de células empaquetadoras PG13/LZRS-EGFP, productor estable de partículas retrovirales que contienen el transgen de la proteína verde fluorescente potenciada EGFP.

La eficiencia de infección más elevada se logró con una concentración de 8 $\mu\text{g/ml}$ de Polibreno en el medio durante la transfección retroviral. La eficacia de transfección se analizó en las tres líneas celulares a las 48 horas, contadas desde el inicio de la infección, mediante microscopía de fluorescencia y por citometría de flujo tal como se describió en el apartado 6.4. El análisis de los patrones de fluorescencia verde realizado con esta última metodología, demostró porcentajes de células EGFP-positivas variables desde el 12% para células JAR, el 35% para JEG-3 y hasta un 79% para células 293 (**Figura 16.B**). El análisis de expresión de los productos génicos virales se realizó aproximadamente tres ciclos celulares posteriores a la infección, bautizándose a estas nuevas células que expresan la EGFP como JAR/G, JEG-3/G y 293/G.

10.4. Separación Diferencial de Células JAR/G, JEG-3/G y 293/G por Citometría de Flujo

Siete días después de la infección retroviral las células transducidas se analizaron y separaron por citometría de flujo (FACStar^{Plus} y FACSVantage SE cell sorters -Fluorescence-Activated Cell Sorting-, Becton Dickinson, Mountain View, CA) siguiendo el procedimiento descrito en 6.5. Ello permitió un enriquecimiento de las fracciones de células EGFP-positivas del 12 al 82% para células JAR/G, del 35 al 64% para células JEG-3/G y del 79 al 95% para células 293/G, el cual fue determinado por citometría de flujo y comprobado por microscopía de fluorescencia (**Figura 17.A**).

A. Células Control



B. Post Infección Retroviral

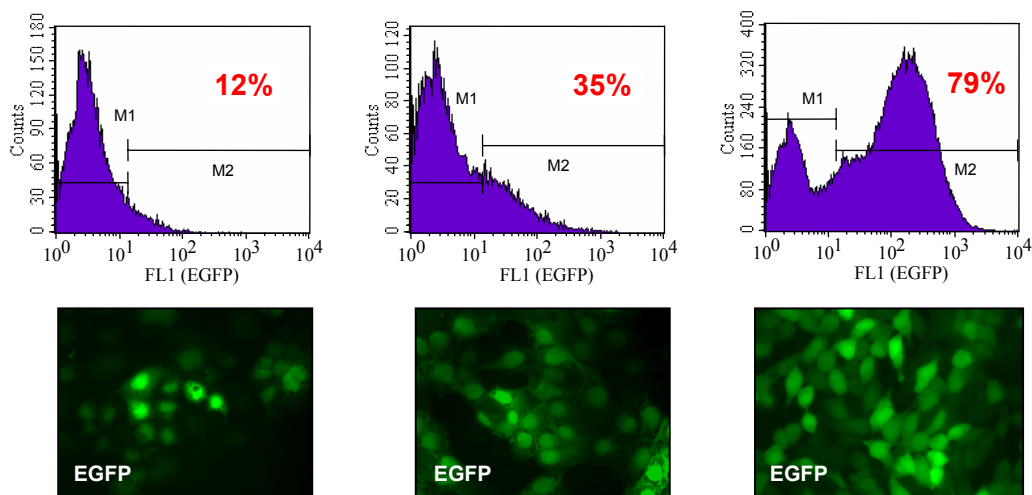


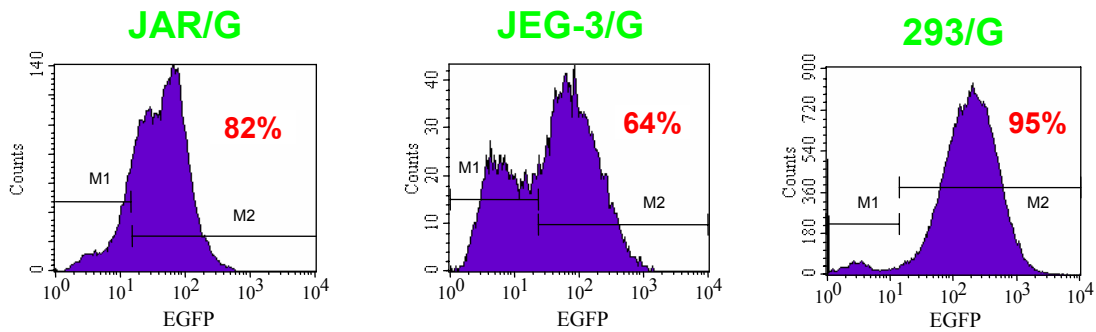
FIGURA 16. Análisis por Citometría de Flujo y Microscopía de Fluorescencia de las poblaciones de células JAR (columna 1), JEG-3 (columna 2) y 293 (columna 3) realizados antes (A) y después (B) de la transducción con los sobrenadantes retrovirales obtenidos del clon de células empaquetadoras PG13/LZRS-EGFP. Imágenes para las condiciones que permitieron que la eficiencia de infección sea máxima.

Las poblaciones de células resultantes, enriquecidas en células que expresan la proteína EGFP, se mantuvieron en cultivo durante al menos dos meses, evaluando los niveles de expresión de proteína periódicamente por citometría de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson) con el fin de verificar que el transgen fuera establemente heredado sin variabilidad ni pérdida de expresión.

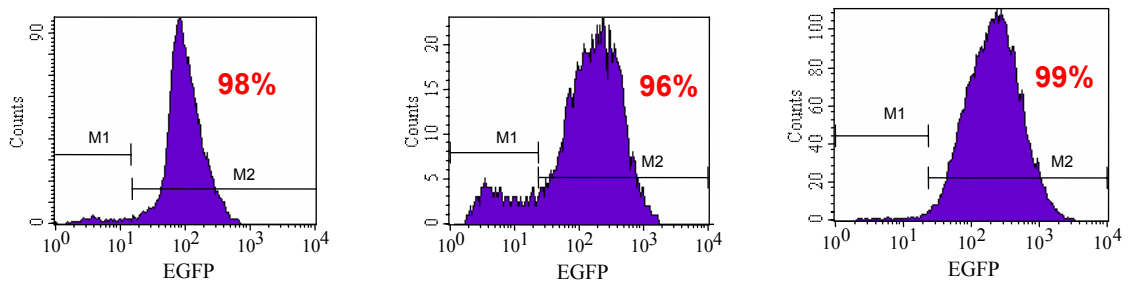
Transcurridos los dos meses, alrededor de 65-70 días después de la infección, las fracciones enriquecidas fueron sometidas nuevamente a una segunda separación diferencial por citometría de flujo, seleccionándose aquellas células con el mayor nivel de expresión de proteína fluorescente. Esto permitió el enriquecimiento de las poblaciones de células JAR/G hasta un 98%, JEG-3/G hasta 96% y de células 293 hasta 99% (Figura 17.B).

El patrón de expresión de proteína verde fluorescente en estas células permaneció estable durante el mantenimiento de las células en cultivo, más allá del mes 8, a juzgar por los ensayos realizados periódicamente en cada pase por citometría de flujo. La visualización de estas células EGFP-positivas realizada en esta instancia se llevó a cabo por microscopía confocal de fluorescencia *in vivo* (Zeiss LSM 510 Meta Microscope), habiéndose cultivado previamente las células en placas de fondo de vidrio (Figura 17.C).

A. Separación Diferencial 1



B. Separación Diferencial 2



C. Microscopía Confocal “in vivo”

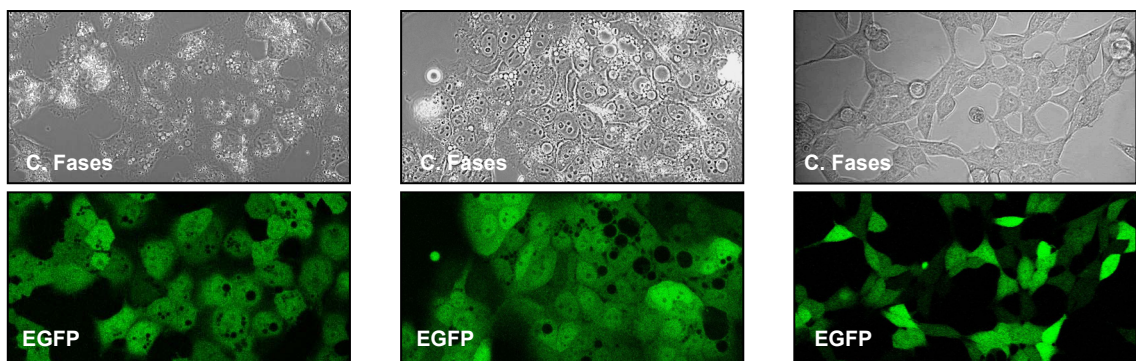


FIGURA 17. Análisis por Citometría de Flujo y Microscopía de Fluorescencia de las poblaciones de células JAR/G, JEG-3/G y 293/G después de la primera (A) y segunda (B) separación diferencial por citometría de flujo (FACStar^{Plus} y FACSVantage SE cell sorters, Becton Dickinson). En C, visualización por microscopía confocal *in vivo* (Zeiss LSM 510 Meta Microscope).

Finalmente, las células JAR/G, JEG-3/G o 293/G así obtenidas pudieron diferenciarse claramente por su patrón de fluorescencia verde de las células endometriales RL95-2 o HEC-1A cuando se

analizaron conjuntamente en una muestra por citometría de flujo (**Figura 18**). La intensidad o brillo de fluorescencia fue lo suficientemente intenso como para permitir cuantificar las células endometriales (EGFP-negativas; región M1) y trofoblásticas (EGFP-positivas; región M2) presentes en cada muestra.

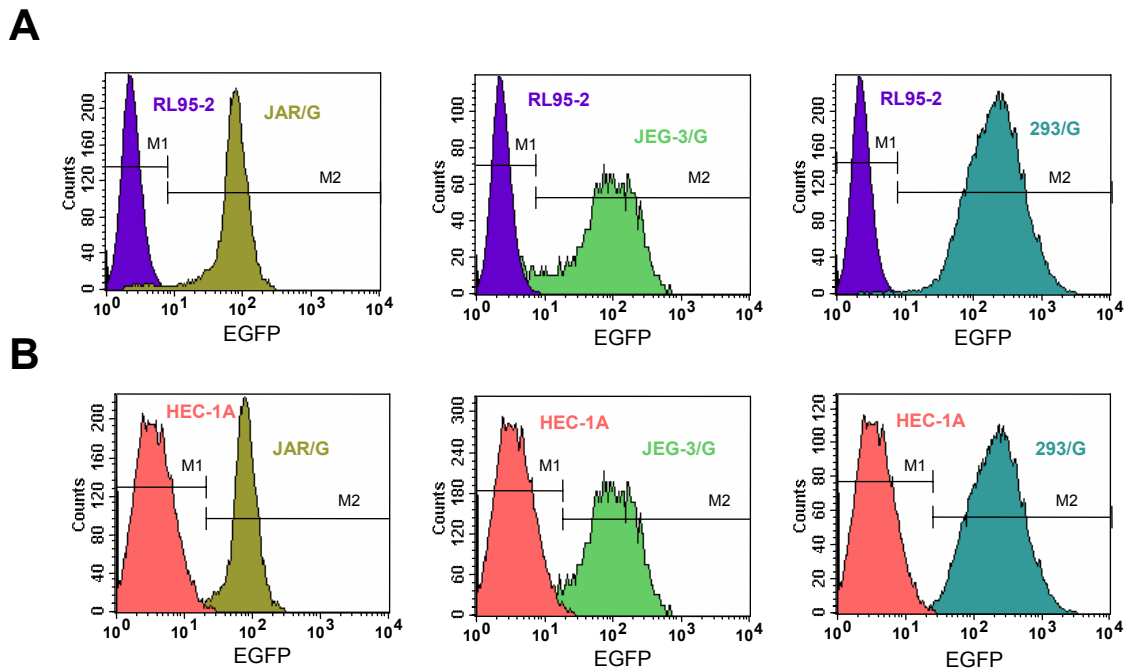


FIGURA 18. Patrón de fluorescencia de células JAR/G, JEG-3/G o 293/G en muestras que contienen células epiteliales endometriales no fluorescentes RL95-2 (A) o bien HEC-1A (B) durante el análisis por citometría de flujo.

10.5. Cuantificación de la Adhesión de Células Trofoblásticas a Monocapas de Células Epiteliales Endometriales por Citometría de Flujo Empleando el Modelo Desarrollado

La cuantificación de la adhesión de células trofoblásticas a células epiteliales endometriales se realizó utilizando el Modelo de Adhesión *in vitro* desarrollado en este trabajo de investigación. Brevemente, una cantidad conocida de células EGFP-positivas en suspensión (JAR/G, JEG-3/G o 293/G), preparadas siguiendo estrictamente el procedimiento descrito en 7.1, fue añadida sobre monocapas confluentes de células epiteliales endometriales (RL95-2 o HEC-1A) crecidas en placas de seis pocillos P-6. La viabilidad lograda para las células EGFP-positivas en suspensión al momento de ser añadidas siguiendo este protocolo, determinada por tinción con yoduro de propidio, fue superior al 99% (**Figura 19**). Tras el co-cultivo por incubación durante 60 minutos a 37°C en atmósfera al 98% de humedad y 5% de CO₂, las células no adheridas fueron recolectadas por aspiración y lavado en condiciones estandarizadas, mientras que las células adheridas fueron recogidas por tripsinización, colocándose luego en tubos TruCOUNT™ (BD) para su recuento por citometría de flujo.

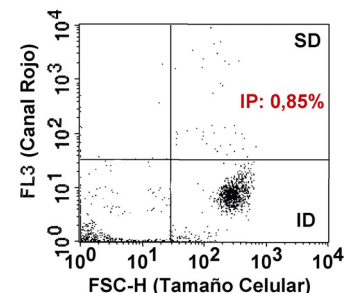


FIGURA 19. Determinación de la viabilidad celular (JAR/G) por tinción con yoduro de propidio (IP). Cuadrante superior derecho (SD) con las células teñidas (apoptóticas) e inferior derecho (ID) con las células viables.

El número absoluto de células EGFP-positivas en cada fracción (500 µl transferidos a cada tubo) fue determinado por citometría de flujo según se muestra en el ejemplo de la **Figura 20**, siguiendo las recomendaciones detalladas en **7.2**. Se compararon los eventos de la región R3 predeterminada para las células EGFP-positivas con los eventos de la región R2 delimitada para las microesferas fluorescentes que contiene como liofilizado cada tubo TruCOUNT™. La adquisición en el citómetro de todas las muestras se realizó durante 50 segundos en la modalidad de flujo alto, detectando las células EGFP-positivas por su fluorescencia verde en el canal FL1 y las microesferas por su fluorescencia roja en el canal FL3.

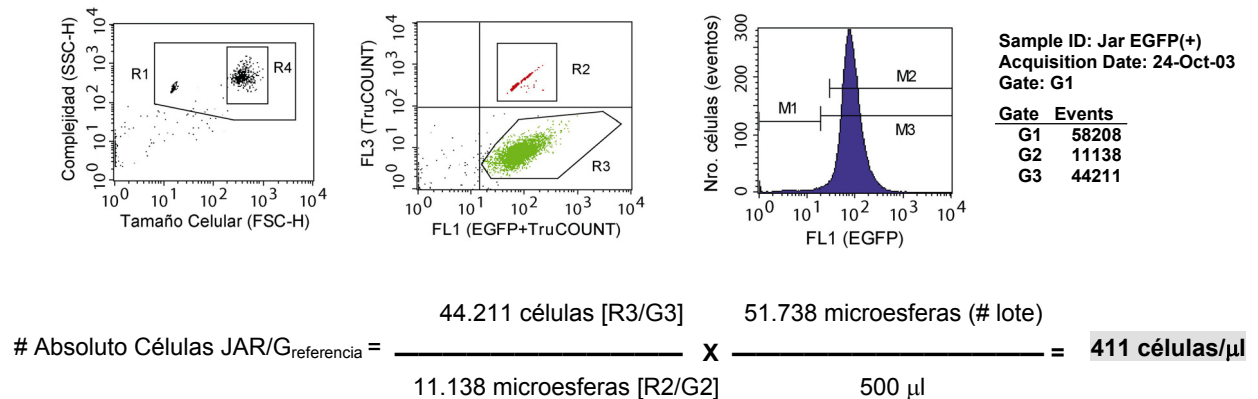


FIGURA 20. Recuento absoluto de células por citometría de flujo utilizando tubos TruCOUNT™ (BD). En el ejemplo se enseña el cálculo realizado para determinar el número de células JAR/G inicialmente añadidas (*referencia*) sobre cada monocapa endometrial. De igual manera se determinó en valor absoluto para los tubos conteniendo las células *adheridas* y *no adheridas*, siendo éstas una medida directa e indirecta de adhesión respectivamente.

Para cada experimento se calculó en número de células EGFP-positivas *adheridas* y *no adheridas* a las células endometriales, expresándose los resultados como porcentajes respecto a las células añadidas inicialmente a cada pocillo.

En los experimentos control, alrededor del 84% de las células JAR/G, 72% de las células JEG-3/G y 85 % de las células 293/G se adhirieron a las monocapas de células endometriales RL95-2 dentro del período de incubación y co-cultivo de 60 minutos (**Figura 21.A**). A diferencia, las células HEC-1A mostraron menor adherencia a los 60 minutos para las tres líneas celulares, alcanzando porcentajes de adhesión de alrededor del 46% para las células JAR/G, 35% para las células JEG-3/G y 40% para las células 293/G (**Figura 21.B**).

En estas condiciones experimentales las células endometriales RL95-2 mostraron ser más adherentes hacia células de tipo trofoblástico que las HEC-1A, confirmando así la correlación existente entre la línea celular RL95-2 y el epitelio uterino receptivo presente durante la ventana de implantación. De manera análoga, podemos decir que las células HEC-1A presentan características de adhesión que se corresponderían con un epitelio endometrial no receptivo, o lo que es lo mismo, fuera de la ventana de implantación.

Por otra parte, en estos ensayos de adhesión a células endometriales se utilizaron también las células 293/G, derivadas de riñón humano, como una especie de control para intentar evaluar la

especificidad de la adhesión trofoblasto-endometrio. Los resultados obtenidos fueron similares a los mostrados por las células JAR/G, confirmando las diferencias de fenotipo de adhesión de las células RL95-2 en comparación con las HEC-1A, pero sugiriendo un reconocimiento célula-célula no específico durante el establecimiento de las interacciones trofoblasto-endometrio que tienen lugar en las etapas iniciales de la implantación.

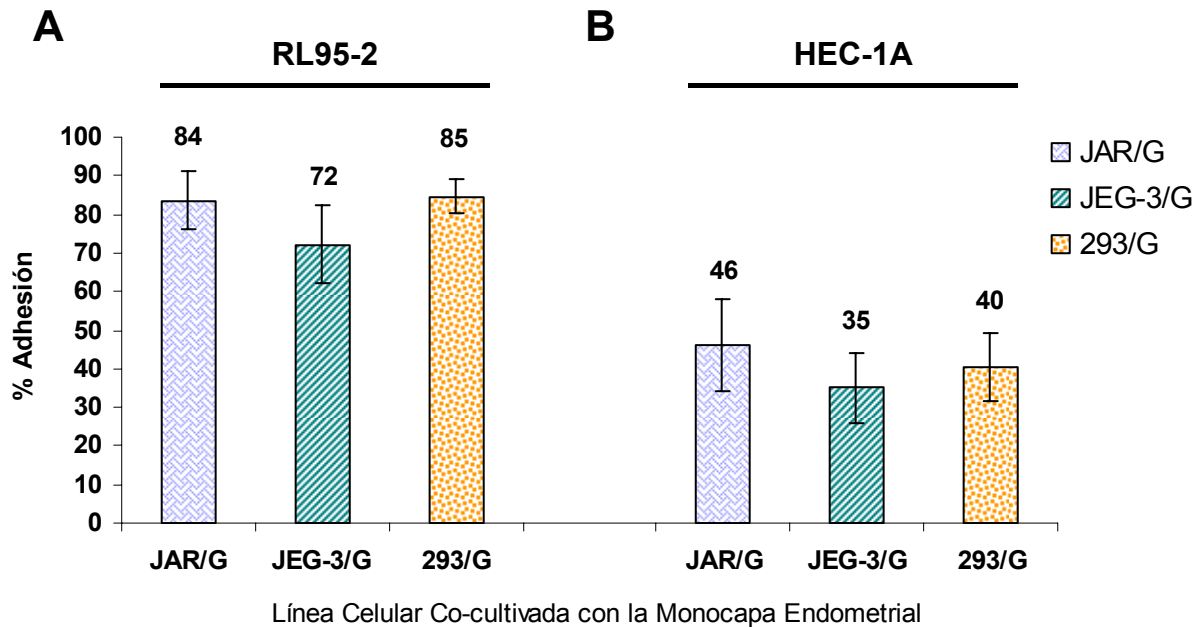


FIGURA 21. Cuantificación de la adhesión de células trofoblásticas a monocapas de células epiteliales endometriales utilizando el modelo de adhesión celular *in vitro* diseñado en este trabajo. En **A** se enseñan los valores porcentuales promedio de adhesión y sus desvíos estándares de células trofoblásticas JAR/G y JEG-3/G añadidas sobre la monocapa endometrial RL95-2. En **B** se representan los valores de adhesión de las mismas células sobre monocapas de células endometriales HEC-1A. En ambos casos las células de epitelio de riñón humano 293/G se utilizaron para evaluar la especificidad en la interacción trofoblasto-endometrio.

Una vez comprobadas las diferencias para la adhesión que imponen las líneas celulares endometriales RL95-2 y HEC-1A frente a las células trofoblásticas, se estudió si existían diferencias propias entre las células trofoblásticas JAR/G y JEG-3/G. Para ello se realizaron a continuación co-cultivos de las células JAR/G y JEG-3/G sobre monocapas de células epiteliales de riñón 293 (células que no contenían el transgen de la proteína fluorescente EGFP), utilizando el mismo modelo de adhesión celular. Se observó así un patrón de adhesión similar al mostrado frente a las células RL95-2, con porcentajes de adhesión elevados, del 94% para las células JAR/G y del 83% para JEG-3/G (**Figura 22.A**), donde las células JEG-3/G mostraron, al igual que antes, menor adhesividad que las JAR/G.

Por otra parte, los co-cultivos realizados por adición de células 293 sobre monocapas confluentes de células JAR/G (**Figura 22.B**) y sobre monocapas de células JEG-3/G (**Figura 22.C**) arrojaron valores de adhesión del 97% y 93% respectivamente. En este caso no se apreciaron diferencias en la adhesión de los dos tipos celulares, indicando de alguna manera que podría existir una mayor sensibilidad de las células JEG-3/G al procedimiento de tripsinización (aunque este sea mínimo) que se traduce en una leve disminución en su adhesividad durante el co-cultivo. Asimismo, debemos considerar la posibilidad de que

estas células se comporten de manera diferente no por los efectos de la tripsinización sino más bien por cambios en la expresión y/o en la distribución de moléculas de adhesión presentes en su superficie apical, producidos tal vez como consecuencia del crecimiento hasta confluencia total de las células, momento en el cual comienzan a tener un rol más activo e importante otro tipo de moléculas y/o factores de contacto.

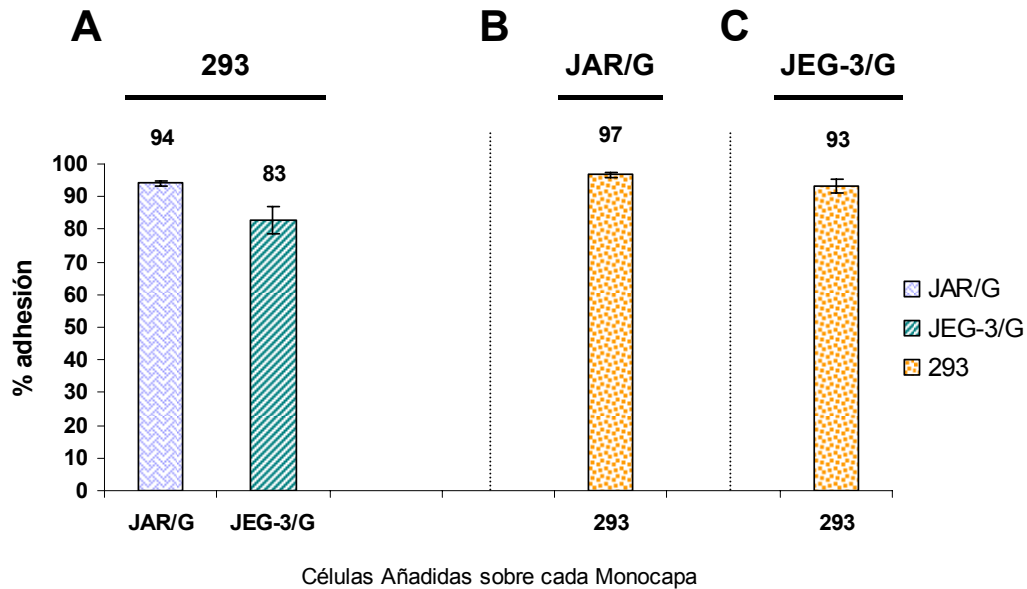


FIGURA 22. Experimentos de cuantificación de la adhesión de células trofoblásticas JAR/G o JEG-3/G a monocapas de células de epitelio renal humano 293 (EGFP-negativas) utilizando el modelo de adhesión (A). Cuantificación de la adhesión de células 293 a monocapas confluentes de células JAR/G (B) y JEG-3/G (C) para analizar la sensibilidad de las células trofoblásticas a la tripsinización y manipulación en las etapas iniciales del modelo de adhesión diseñado.

Los valores de adhesión porcentual obtenidos mediante cuantificación por citometría de flujo fueron luego confirmados por Microscopía Confocal *in vivo* en las condiciones descritas en el apartado 8.9.6. Durante estos experimentos, se visualizaron las células JAR/G, JEG-3/G o 293/G que permanecieron adheridas sobre las monocapas de células RL95-2 o HEC-1A una vez que habían transcurrido los 60 minutos de co-cultivo y las placas habían sido lavadas para eliminar las células no adheridas. Se verificó así la adhesión diferencial de las células trofoblásticas a las distintas líneas endometriales.

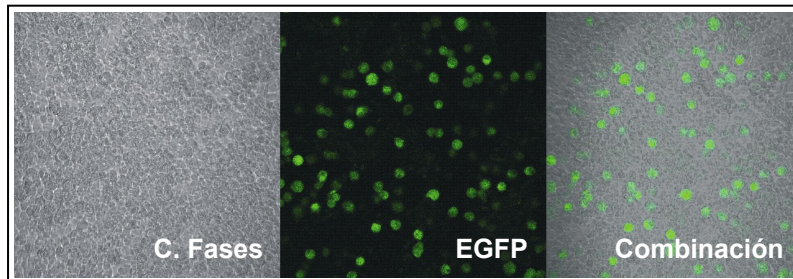
En la siguiente página se enseñan dos ejemplos con las imágenes obtenidas para el co-cultivo de las células JAR/G con monocapas de células RL95-2 (Figura 23.A) y con monocapas de células HEC-1A (Figura 23.B), pudiéndose observar claramente el porcentaje inferior de células fluorescentes que permanecieron adheridas a la monocapa de células HEC-1A comparado con RL95-2, si consideramos que se añadió inicialmente la misma cantidad de células en ambas placas.

10.6. Validación del Modelo *in vitro* de Adhesión Trofoblasto-Endometrio Diseñado

Haciendo uso de este modelo para cuantificar la adhesión trofoblasto-endometrio, se observó también que la adhesión de las células trofoblásticas (JAR/G o JEG-3/G) sobre las monocapas confluentes de células epiteliales endometriales (RL95-2 o HEC-1A) ocurre de una forma dependiente

del tiempo (**Figura 24**), en concordancia con observaciones realizadas previamente en la literatura por otros autores (Hohn y *col.*, 2000; Chervenak e Illsley, 2000; Thie y *col.*, 1998).

A. Co-cultivo JAR/G con RL95-2



B. Co-cultivo JAR/G con HEC-1A

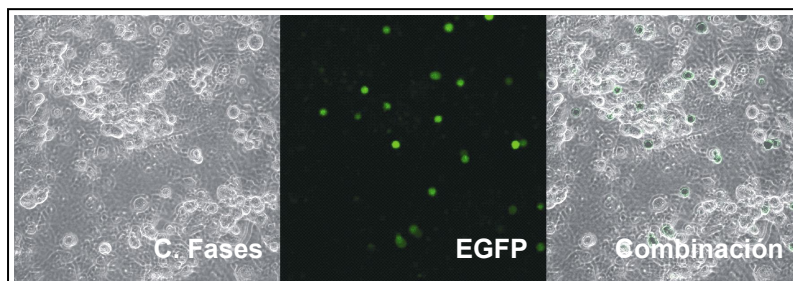


FIGURA 23. Cuantificación de la adhesión de células trofoblásticas a monocapas de células epiteliales endometriales por Microscopía Confocal de Fluorescencia *in vivo* (25X). Ejemplo de la adhesión diferencial mostrada por las células JAR/G (60 min co-cultivo) con monocapas de células RL95-2 (**A**) y células HEC-1A (**B**). Se enseñan las imágenes por contraste de fases (izquierda), fluorescencia (FITC; centro) y combinación de ambas (derecha) de las células adheridas a la monocapa.

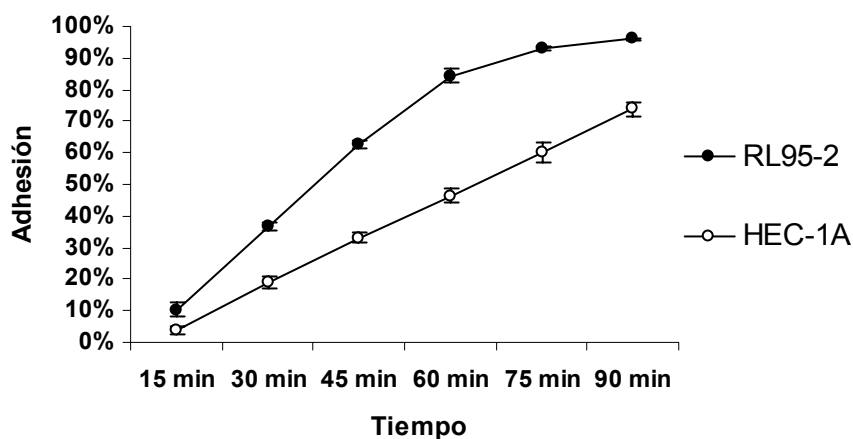


FIGURA 24. Ejemplo de la cinética de adhesión diferencial mostrada por las células JAR/G sobre las monocapas de células RL95-2 y HEC-1A. Resultados similares se obtuvieron para las células JEG-3/G y 293/G (Datos no mostrados).

10.6.1. Modificación de la Adhesión de Trofoblastos a Células Epiteliales Endometriales por Agentes Inductores de la Diferenciación Celular

Estudios precedentes han demostrado una compleja correlación respecto a la invasividad del trofoblasto en la matriz extracelular y el programa de diferenciación celular (Hohn y *col.*, 1994, 2000).

Además, la fase de iniciación de la implantación por adhesión al epitelio y el proceso de invasión al estroma que tiene lugar a continuación parecen ser etapas que dependen de subtipos de células trofoblásticas con ciertas propiedades diferentes. De este modo, la capacidad del trofoblasto para iniciar una interacción con el epitelio uterino puede ser reducida por sustancias capaces de incrementar las características de diferenciación de líneas celulares de coriocarcinoma placentario.

Para validar el modelo *in vitro* de adhesión trofoblasto-endometrio diseñado en este trabajo, se sometieron las células trofoblásticas JAR/G y JEG-3/G a un tratamiento previo con agentes inductores de la diferenciación celular y luego se examinó su capacidad de adhesión sobre las monocapas de células epiteliales endometriales RL95-2 y HEC-1A en co-cultivos de 1 hora. Brevemente, las células trofoblásticas mencionadas, así como también las de epitelio de riñón humano 293/G (utilizadas como control), se pre-incubaron durante las 72 horas precedentes a los ensayos de adhesión con dos agentes inductores de la diferenciación, foskolina (FSK) y forbol-miristato-acetato (PMA), empleando concentraciones de 80 μ M y 400 nM respectivamente en el medio de cultivo. En ambos casos se siguieron las indicaciones detalladas en el apartado 7.3.

En estas condiciones, el tratamiento con foskolina redujo la adhesión de las células JAR/G sobre monocapas de células endometriales RL95-2 desde el 84% (células control sin tratamiento) hasta un 42%, la adhesión de las células JEG-3/G del 72% al 56% y también una reducción considerable desde el 85% hasta un 42% para las células 293/G diferenciadas. De manera análoga, el tratamiento con forbol-miristato-acetato produjo la reducción de los valores de adhesión, siendo más pronunciados en el caso de las células JEG-3/G, con tasas cercanas al 46% para las células JAR/G, 35% para las células JEG-3/G y del 54% para las 293/G, comparadas con las obtenidas en ensayos de adhesión normal realizados paralelamente para cada determinación (**Figura 25**, columna izquierda).

Paralelamente se analizó el grado de influencia de los mismos agentes inductores de diferenciación celular en la adhesión de las mismas células EGFP-positivas sobre las células endometriales HEC-1A. En este caso, el tratamiento con FSK produjo un descenso más o menos pronunciado en las tasas de adhesión de las células JAR/G, desde el 46% hasta el 26% y desde el 40% al 26% para 293/G, no observándose variaciones en los valores de adhesión de JEG-3/G. Finalmente, la diferenciación celular por tratamiento con PMA redujo la adhesión hasta el 28% y 24% para células JAR/G y JEG-3/G respectivamente, y hasta el 13% para las células 293/G (**Figura 25**, columna derecha).

Algunos de los resultados aquí obtenidos, en particular aquellos en los que se ha utilizado PMA como agente inductor de la diferenciación de células trofoblásticas, mostraron una estrecha correlación con resultados publicados anteriormente por otros autores (Hohn y *col.*, 2000), demostrando así la eficiencia del modelo de adhesión diseñado en nuestro laboratorio para la cuantificación de la adhesión de trofoblastos a monocapas de células endometriales. Este grupo de investigación analizó la adhesión de células trofoblásticas JAR, JEG-3 y BeWo frente a las células endometriales RL95-2, en co-cultivos realizados durante 30 minutos, removiendo las células no adheridas por centrifugación y contando las células remanentes por microscopía.

Los efectos producidos por estas drogas sobre las líneas celulares JAR/G, JEG-3/G y 293/G se enseñan en la **figura 26**. La observación de las células, tras ser diferenciadas durante 72 horas, se

realizó por microscopía de fluorescencia *in vivo*, detectándose cambios morfológicos tales como el aumento del tamaño de las células mononucleadas, verificado en las tres líneas celulares, y en algunos casos la formación de células multinucleadas de tipo sincitiotrofoblástico, como ocurrió especialmente

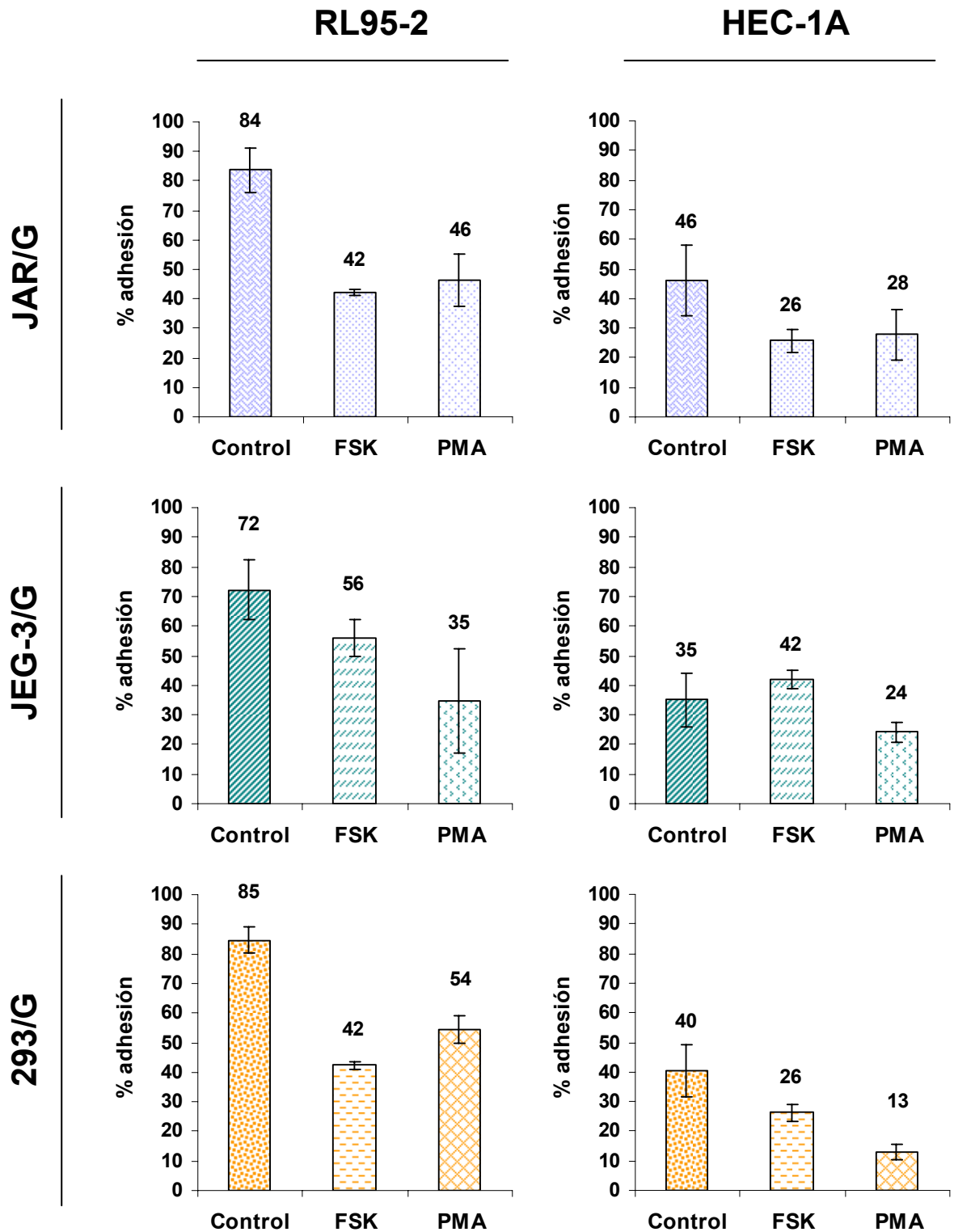


FIGURA 25. Efecto de los agentes inductores de la diferenciación celular foskolina (80 μM FSK) y forbol-miristato-acetato (400 nM PMA) sobre la adhesión trofoblasto-endometrio. Pre-tratamiento durante 72 horas de las células trofoblásticas JAR/G (fila 1), JEG-3/G (fila 2) y de epitelio renal 293/G (fila 3) y co-cultivo durante 60 min sobre células endometriales RL95-2 (columna 1) y HEC-1A (columna 2) empleando el modelo de adhesión diseñado, basado en la citometría de flujo.

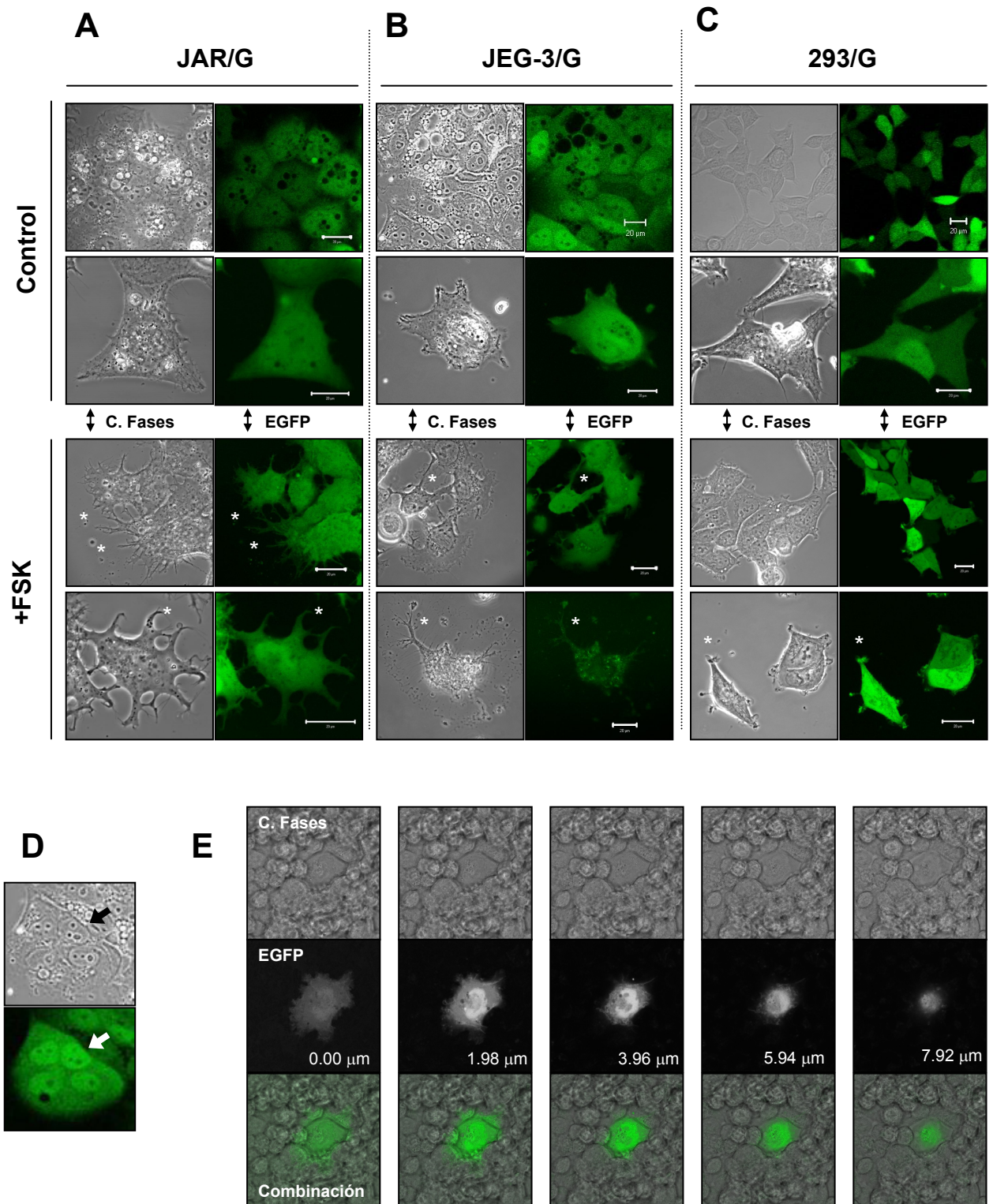


FIGURA 26. Análisis por Microscopía Confocal *in vivo* del efecto producido por tratamiento de las células con foskolina (FSK). En la columna **A** se enseñan las imágenes por contraste de fases y fluorescencia de las células JAR/G control y tratadas. En la columna **B** las correspondientes a JEG-3/G y en la columna **C** las pertenecientes a células 293/G con y sin tratamiento. Imágenes capturadas utilizando en cada caso aumentos entre 45X y 100X (—| 20 μ m). Se aprecian cambios morfológicos, principalmente un aumento de tamaño y volumen celular, mostrando gran irregularidad en la forma de las mismas (* se señalan con asteriscos las irregularidades de membrana). Los efectos producidos por tratamiento con forbol-miristato-acetato (PMA) fueron similares (imágenes no mostradas). En **D** se enseña un sincitiotrofoblasto formado por tratamiento de las células JEG-3/G con PMA. En **E** se muestran las imágenes por microscopía confocal de 5 cortes (plano Z) de una célula JEG-3/G anidando en la monocapa de células endometriales RL95-2 luego de haberla invadido durante el período de co-cultivo 1 hora.

con las células JEG-3/G al ser diferenciadas con el agente modulador PMA (**Figura 26.D**). Asimismo, se pudo apreciar la influencia de estas drogas en la proliferación celular, llegándose en el caso de las células JAR/G y JEG-3/G cultivadas con PMA hasta arrestar la división celular, con efectos mucho menores sobre las células 293/G. En el caso de las células tratadas con FSK la proliferación celular se vio levemente reducida.

Por otra parte, los efectos descritos en este trabajo respecto a la disminución de la adhesión de las células trofoblásticas, contrastan con las características de invasividad mostrada por las mismas. Se observó que a pesar de haber una disminución considerable en la adhesión como consecuencia de la diferenciación de las células JAR/G o JEG-3/G, las mismas conservaron sus propiedades para invadir la matriz endometrial (**Figura 26.E**).

De este modo, en concordancia con observaciones realizadas por otros autores (Aplin JD, 1991), podemos concluir que la diferenciación *in vivo* de células trofoblásticas es un proceso muy complejo que origina sub-poblaciones de células trofoblásticas con diversas propiedades y funciones, verificándose además que la modificación de la adhesión de las células por diferenciación es independiente del programa que regula la invasividad celular.

Sección 2

11. Genómica Funcional

El segundo objetivo de este trabajo, consistió en el análisis de la expresión génica de un grupo reducido de genes posiblemente implicados en las fases iniciales de la implantación de embriones humanos. Se utilizó para ello el modelo de adhesión trofoblasto-endometrio diseñado, descrito en la Sección I de resultados, y a continuación otras metodologías experimentales que permitieron la recolección de información sobre expresión génica con el fin de desvelar el comportamiento de estos genes en nuestro sistema biológico y su posible función.

11.1. Preselección de los Genes Candidatos para el Análisis de Expresión Génica

Los genes, listados en la Tabla 8, cuya expresión se estudiaría en el sistema de adhesión trofoblasto-endometrio diseñado, fueron preseleccionados en base a diversos criterios. Gran parte de ellos fueron identificados y aislados previamente en nuestro laboratorio empleando técnicas de expresión diferencial (DD) como DD RT-PCR (Differential Display RT-PCR) o macromatrices de cDNA en membranas (cDNA arrays). Otros se seleccionaron a partir de búsquedas bibliográficas.

Los genes UBA-2, PAPP-A, PP14 y PAI-2 se seleccionaron por su expresión diferencial entre células de coriocarcinoma (JAR, JEG-3 o BeWo) y tejido placentario a término (García y Castrillo, 2004). Algunos de ellos ya habían sido caracterizados en células placentarias, mientras que otros no como es el caso del gen UBA-2. El gen IGFBP7/MAC-25 se seleccionó por su expresión diferencial en endometrio humano receptivo vs. endometrio pre-receptivo, resultados contrastados con los de la línea celular adherente (para la adhesión de células JAR o blastocistos de ratón) RL95-2 versus las células no adherentes HEC-1A (Domínguez y col., 2003).

El gen PLA-1/SKN-1A, codifica la síntesis de un factor transcripcional identificado en nuestro laboratorio, el cual se expresa específicamente en placenta (Jiménez-Mateo y col., 2005) y regula la transcripción del gen hPL-3 (hormona lactógeno placentario) a nivel del promotor, conjuntamente con el factor transcripcional TEF-5 cuya acción trans-activadora es ejercida sobre la región 3' del mismo promotor (*enhancer*) según estudios realizados por otros autores (Jiang y col., 1999; Jacquemin y col., 1999).

La hormona HCG β 5 (gonadotropina coriónica humana), secretada en concentraciones muy bajas por las células trofoblásticas JAR y JEG-3, se seleccionó por ser un buen indicador de la diferenciación celular, con una producción elevada durante la transición de trofoblasto a sincitiotrofoblasto (Sibley y col., 1991) y por su potencial importancia en los estadios tempranos del desarrollo embrionario. Finalmente, los genes MUC-1 y BSG. El primero, ampliamente expresado en células epiteliales, cuyo producto es

una glicoproteína de superficie celular (transmembrana) con un dominio extracelular muy largo, lo que confiere un grado elevado de participación e influencia en procesos de adhesión celular. El segundo gen, productor de 4 variantes de Basiginina, con una importancia directa en la interacción célula-célula por estimular la producción de colagenasas extracelulares, tales como la metalo-proteasa de matriz MMP-2 (Suzuki y col., 2004), condicionando finalmente los procesos de proliferación, invasión y metástasis en el caso de células tumorales.

11.2. Análisis de Expresión Génica

11.2.1. Obtención de RNA total a Partir de Células JAR/G y RL95-2 Co-cultivadas y Separadas Diferencialmente por Citometría de Flujo

El análisis de los niveles de expresión de todos estos genes se realizó tanto en células trofoblásticas como en células endometriales. Se seleccionó la línea celular JAR/G frente a la JEG-3/G por ser de fenotipo menos diferenciado, correspondiéndose así con las células que conforman la cubierta externa del blastocisto, células que interaccionan con el epitelio endometrial en la fase de adhesión. Asimismo, se seleccionaron las células RL95-2 dado que constituyen un buen modelo de epitelio endometrial adherente, que se correlaciona con el endometrio receptivo existente durante la ventana de implantación.

Haciendo uso del modelo de adhesión diseñado, se añadieron células JAR/G sobre monocapas de células epiteliales endometriales RL95-2 y se co-cultivaron durante tiempos de 16 y 42 horas, seleccionándose y separándose las células posteriormente por citometría de flujo, utilizando para ello el gen marcador de la proteína verde fluorescente EGFP insertado (**Figura 27**, panel **A**). El procedimiento completo se describió en el apartado **8.1**. Las separaciones celulares se prolongaron hasta un máximo de 25-30 minutos, contados a partir del momento de resuspensión de los co-cultivos por tripsinización, con el fin de minimizar los cambios en los niveles de expresión de los mRNAs que se pudiesen producir como consecuencia del procedimiento de separación. La pureza de las fracciones obtenidas fue del 100% para los tubos conteniendo las células RL95-2* (EGFP-negativas) y superiores al 99% para las JAR/G* (EGFP-positivas). La viabilidad de estas mismas fracciones separadas se verificó por tinción con yoduro de propidio, siendo en todos los casos superior al 95% (**Figura 27**, panel **B**). Los datos confirmaron la integridad de las células en el momento de extraer sus RNAs y garantizaron unas condiciones experimentales óptimas para los sucesivos análisis de expresión génica. La separación celular se realizó seleccionando simultáneamente como parámetros de selección “fluorescencia” y “células vivas”, lo que determinó que en ningún caso se observara contaminación de las fracciones.

Las células así separadas fueron luego centrifugadas, eliminando el sobrenadante por decantación y añadiendo luego el reactivo del TRIzol™ a las pastillas de células (resuspendidas en el volumen residual) para la extracción del RNA total, siguiendo en cada caso el protocolo descrito en **8.3.1**.

11.2.2. Determinación de la Pureza e Integridad de los RNAs Obtenidos

Los RNAs totales obtenidos a partir de las células JAR/G* y RL95-2* (co-cultivadas 16 o 42 horas), y de las células JAR/G y RL95-2 control (sin interacción), fueron tratados enzimáticamente con DNasa I para eliminar el DNA genómico contaminante siguiendo el protocolo descrito en **8.6**. Una vez

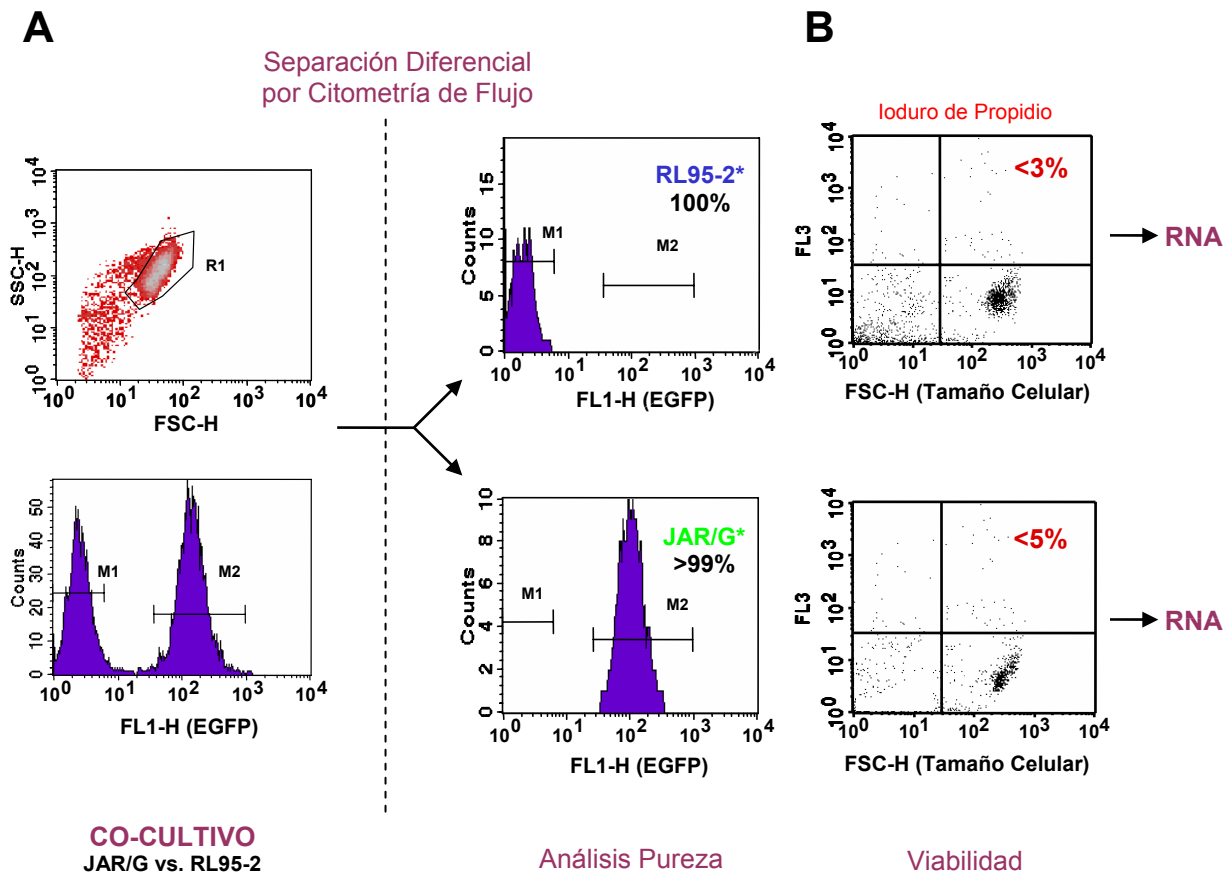


FIGURA 27. Separación diferencial por citometría de flujo (FACSVantage SE, Becton Dickinson) de células JAR/G y RL95-2 luego de ser co-cultivadas durante 42 horas. En **A** se enseñan los histogramas (canal FL1) de las células antes y después de la separación, alcanzándose una pureza del 100% para las células RL95-2* y cercana al 99% para la fracción JAR/G* (el asterisco indica que existió interacción de 16 o 42 horas), determinada por la fluorescencia de la proteína verde EGFP. En **B** se enseñan las gráficas de “tamaño vs. fluorescencia-FL3” (canal rojo) para la determinación de la viabilidad de cada fracción celular recogida (Tinción con Ioduro de Propidio).

purificados fueron cuantificados por espectrofotometría empleando el equipo GeneQuant II (RNA/DNA calculator; Pharmacia Biotech), luego diluidos a una concentración preestablecida de 100 ng/μl y re-cuantificados en el espectrofotómetro NanoDrop® (ND-1000) con el fin de obtener el espectro de absorción completo de cada muestra. La pureza de las muestras de RNA total extraídas se determinó en función de las relaciones de absorbancia A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} , obteniéndose valores mayores a 1,9 y 2,0 respectivamente para todos los RNAs. Estos datos, conjuntamente con el pico único de absorción visualizado en cada espectro, indicaron la ausencia de contaminantes co-purificados tales como DNA, proteínas o restos de fenol (**Figura 28.A**).

La integridad de los RNAs se comprobó inmediatamente después de la extracción con el reactivo TRIzol™ utilizando geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes, según se describió en **8.5.1** (**Figura 28.B**). Una vez tratados con DNasa I, purificados y diluidos a 100 ng/μl se re-analizaron con el equipo Bioanalizador (Bioanalyzer 2100 expert, Agilent Technologies), obteniéndose la imagen de tipo gel y los electroferogramas de cada muestra (**Figura 28.C y D**). La relación entre los RNAs ribosomales 28S y 18S fue $\geq 2:1$ para todas las muestras de RNA analizadas, indicando que se encontraban intactos.

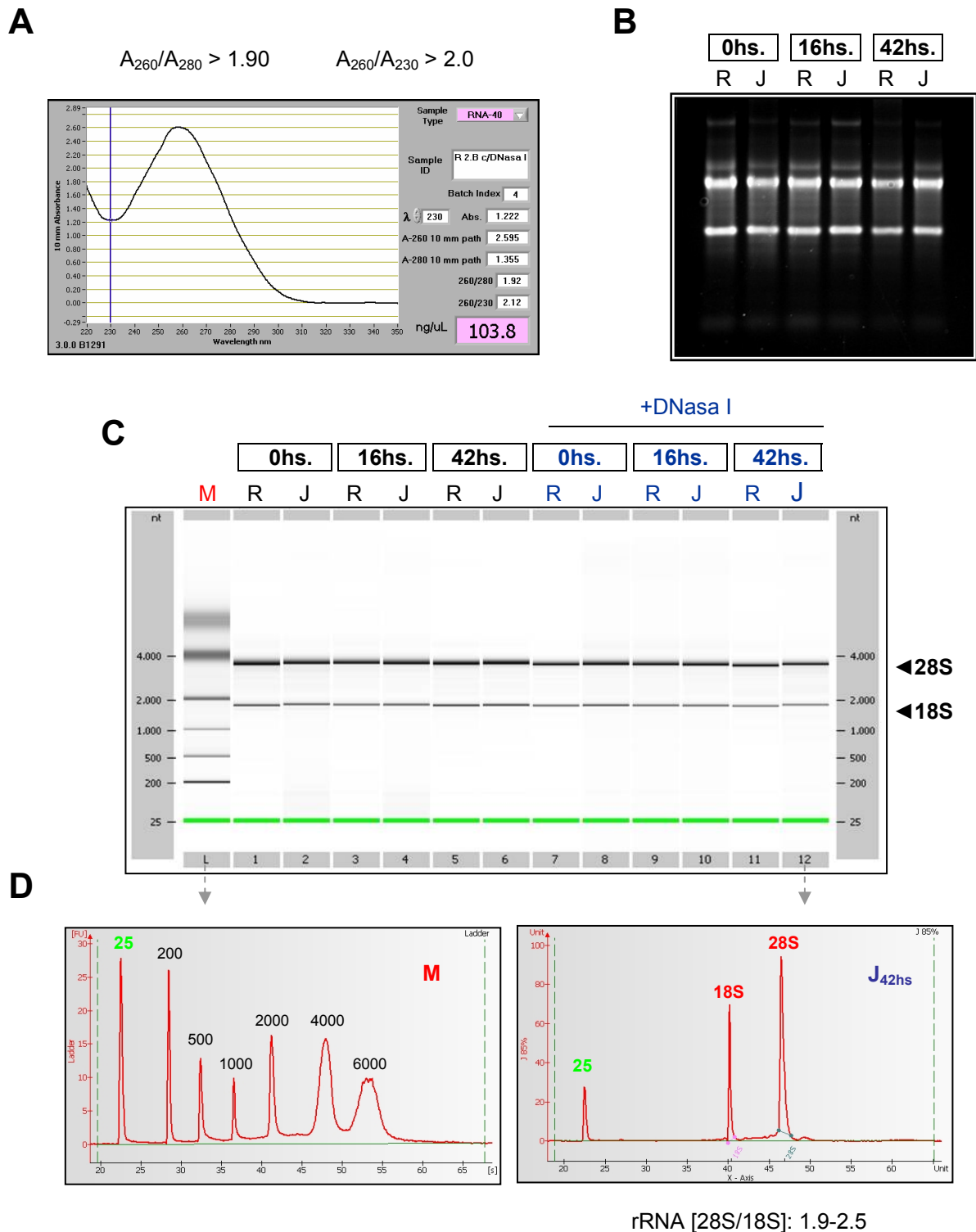


FIGURA 28. Análisis de pureza e integridad de los RNAs totales obtenidos. En **A** se enseña un ejemplo con los parámetros obtenidos para el RNA de células RL95-2 tratado con DNasa I [concentración; relaciones de absorbancias A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} ; espectro de absorción “Absorbancia vs. Longitud de Onda”]. En **B** se muestra un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes teñido con bromuro de etidio conteniendo los RNAs totales de células RL95-2 (R) y JAR/G (J) control (0 hs) y post co-cultivo (16 y 42 hs). **C**, imagen de tipo gel obtenida con el Bioanalizador (Bioanalyzer 2100 expert, Agilent Technologies) durante el análisis de los RNAs totales de células RL95-2 (R) y JAR/G (J) control (0 hs) y co-cultivadas (16 y 42 hs), antes y después del tratamiento con DNasa I. En **D** se aprecian ejemplos de los electroferogramas para el marcador de peso molecular (M) y un RNA celular (J_{42hs}), contruidos por el equipo a partir de las lecturas densitométricas del gel y alineadas según el marcador de 25 nt (verde). El área bajo cada pico permite determinar con exactitud la relación entre los RNAs ribosomales 28S y 18S.

11.2.3. Análisis de Expresión Génica: Tamizaje por RT-PCR semicuantitativa

Los niveles de expresión de los genes candidato que habían sido preseleccionados por su potencial importancia en el proceso de implantación de embriones fueron estudiados en el modelo de adhesión de trofoblastos sobre células epiteliales endometriales diseñado.

Para ello se prepararon reacciones de RT-PCR en un solo paso con los RNAs obtenidos en **11.2.1**, utilizando el equipo comercial *AccessQuick™ RT-PCR System* (Promega), a excepción del gen PAPP-A en donde la reacción de RT-PCR se realizó en dos pasos por la existencia de otros RNAs mensajeros que se transcriben en dirección opuesta en la misma región cromosómica 9q33.1 (García y Castrillo, 2005). Cada reacción se preparó en un volumen final de 60 μ l, según las proporciones indicadas en la **Tabla 9** del apartado **8.7.4**, empleando los oligonucleótidos y las temperaturas de anillamiento (T_A) detalladas en la **Tabla 8**. Estas reacciones monotubo se llevaron a cabo en tubos de PCR de 0,2 ml (AXYGEN® Scientific), introducidos en el termociclador de tapa caliente GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer). La cantidad de producto de PCR se midió en la fase de amplificación exponencial, interrumpiendo las reacciones alrededor de los ciclos 19 y 25 para retirar alícuotas de 20 μ l. El volumen remanente se retiró alrededor del ciclo 35. La cuantificación relativa se realizó en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio, cargado cuidadosamente con 8 μ l por carril de producto de RT-PCR en cada ciclo, determinando la intensidad de las bandas por densitometría con el programa *ImageJ 1.33u* (NIH, USA). Se utilizó el gen β -ACTINA como control de reacción en cada ciclo, añadiendo también un control extra para evaluar posible DNA genómico contaminante (mezcla de reacción sin la enzima AMV-RT).

En las células endometriales RL95-2, luego de co-cultivos de 16 y 42 horas con células trofoblásticas JAR/G, se observaron variaciones en los niveles de expresión de los genes UBA-2, MUC-1 e IGFBP7/MAC-25 (**Figura 29.A**), mientras que en las células JAR/G se observaron variaciones en las cantidades de mRNA de los genes PLA-1, TEF-5, UBA-2 y MUC-1 (**Figura 29.B**). Otros genes como PAI-2, PAPP-A, BSG, PP14 o HCG β 5 no mostraron variaciones detectables mediante esta metodología experimental. La variación de intensidad de las bandas para cada gen fue analizada por densitometría, recogiendo los datos en la **Figura 30**.

Todas aquellas bandas visualizadas en los geles de agarosa cuyos tamaños de amplicón no coincidieron con los tamaños teóricos esperados, según las predicciones realizadas previamente por ordenador con el programa *Amplify* (Macintosh), fueron clonadas en Vector T para su posterior análisis. El objetivo principal fue determinar si se trataba de contaminantes y/o productos inespecíficos de las reacciones de amplificación, o bien se trataba de variantes de corte y empalme alternativas del RNA mensajero (*splicing*) desconocidas en la actualidad o no reportadas en las líneas celulares trofoblásticas y endometriales empleadas. Un ejemplo de ello se enseña en el gel correspondiente a la amplificación de MUC-1 (**Figura 29.A**), donde se aprecia una banda de aproximadamente 400 pb (indicada en azul) por debajo de la banda esperada, cuya presencia no coincide con las predicciones efectuadas por ordenador, y que curiosamente parece disminuir según se puede apreciar en el ciclo 35.

Brevemente, el producto final de la reacción de RT-PCR o bien las bandas cortadas de los geles de agarosa fueron purificadas, ligadas en el Vector T, transformadas y crecidas en bacterias

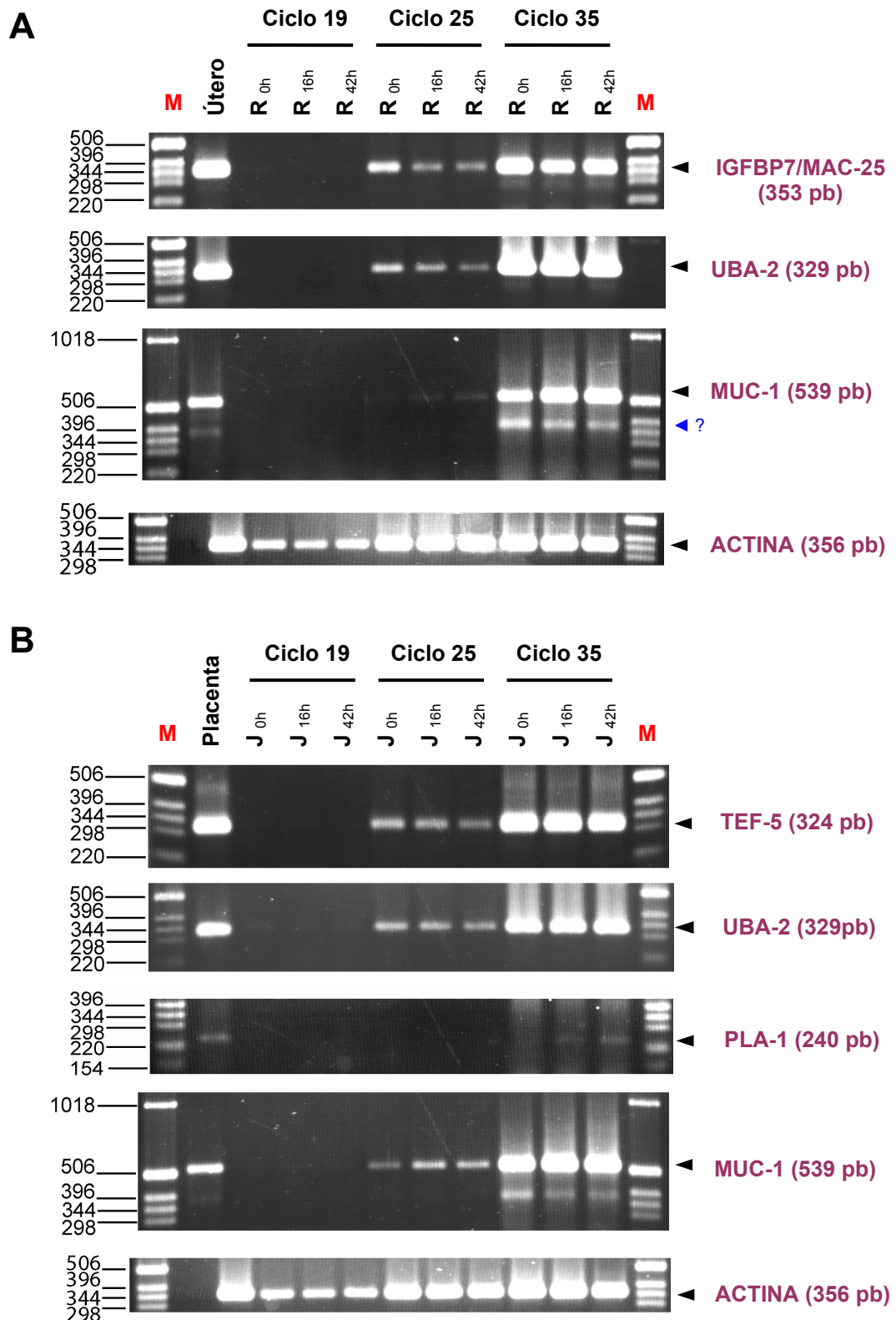


FIGURA 29. Análisis de expresión génica por RT-PCR semicuantitativa. En **A** se enseñan los geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio con los productos de RT-PCR tomados en los ciclos 19, 25 y 35 para los genes que se expresaron diferencialmente en células RL95-2 (R) luego de la interacción por co-cultivo (16 y 42 hs) con las células JAR/G. En **B** se aprecian los genes de las células trofoblásticas JAR/G (J) cuyos niveles de expresión variaron por interacción con las células RL95-2. Las diferencias se visualizan en el ciclo 25 (fase de amplificación exponencial) a excepción del factor transcripcional PLA-1 cuyos niveles de expresión son mínimos. Todas las muestras fueron cargadas en el mismo orden arriba indicado, exceptuando los controles de β -ACTINA que incluyen un carril extra a la izquierda con el control sin AMV-RT

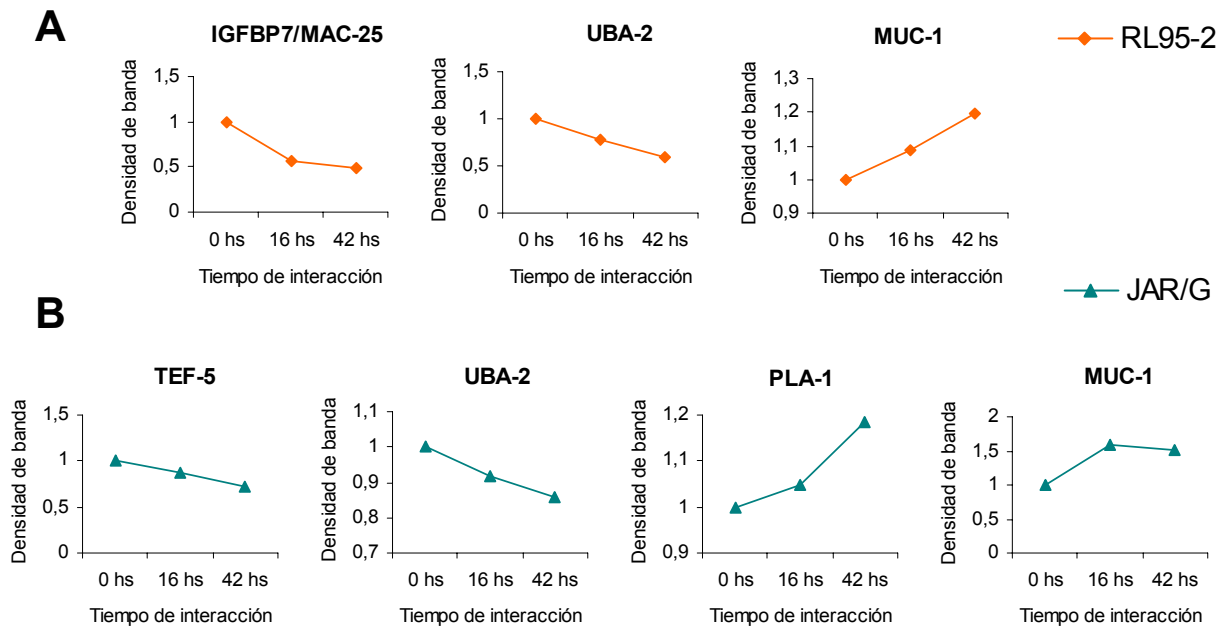


FIGURA 30. Cuantificación relativa por densitometría de los niveles de expresión de mRNA para cada gen analizado. En **A** se enseñan las mediciones de las intensidades de banda, determinadas por densitometría con el programa *ImageJ* 1.33u (NIH, USA), para los genes que se expresaron diferencialmente en las células RL95-2 luego de los co-cultivos. En **B** se grafican las densidades de banda para los genes expresados diferencialmente en las células JAR/G co-cultivadas.

competentes. Cada DNA plasmídico recombinante así clonado fue purificado en minipreparaciones individuales para ser luego analizado por doble digestión enzimática (utilizando las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*) con el fin de verificar la presencia de inserto y su tamaño en un nuevo gel de agarosa. Los clones positivos, es decir aquellos que contenían un inserto, fueron re-purificados y enviados a secuenciar. Las secuencias fueron editadas y comparadas con las bases de datos (GenBank). Se comprobó que en la mayoría de los casos se trataba de productos de amplificación inespecíficos, como ocurrió en el caso mencionado anteriormente para el gel con los productos de RT-PCR de MUC-1 en células RL95-2, donde se vio que la banda de 371 pb clonada correspondía al gen EST1B, una telomerasa que participa en la regulación del telómero y en prevención de la inestabilidad genómica. También se identificó una variante alternativa de corte-empalme del RNA para el gen PAPP-A en células trofoblásticas JAR, no descrita hasta el momento en la literatura.

El procedimiento completo realizado para el análisis de estas bandas se describió en los apartados 8.8.1 a 8.8.3 del capítulo “Materiales y Métodos”.

11.2.4. Cuantificación de los Niveles de Expresión de mRNAs por RT-PCR en Tiempo Real

Los genes cuyos niveles de expresión de mRNA mostraron variaciones en los estudios de tamizaje realizados por RT-PCR semicuantitativa fueron posteriormente cuantificados por RT-PCR en tiempo real utilizando el sistema LightCycler de Roche. El objetivo fue confirmar las observaciones previas y cuantificar el grado de variación en los niveles de expresión de los genes identificados. Paralelamente se analizó si las variaciones observadas eran o no específicas de la interacción entre las células trofoblásticas JAR/G y endometriales RL95-2. Para este último fin se incluyeron nuevas muestras

de RNA obtenidas siguiendo el mismo procedimiento experimental, provenientes de co-cultivos de células JAR/G sobre HEC-1A, JAR sobre 293/G y 293/G sobre HEC-1A (**Tabla 14** del apartado **8.7.6**), cuyos resultados se utilizaron para intentar descifrar y caracterizar la interacción JAR/G vs. RL95-2.

Las reacciones se prepararon por duplicado para cada RNA, en un volumen final de 20 μ l según las proporciones indicadas en la **tabla 11** (apartado **8.7.6**) en función del equipo comercial utilizado, repitiendo cada experimento al menos tres veces. Los oligonucleótidos empleados, listados en la **tabla 10**, fueron diseñados específicamente para estas determinaciones de modo que el tamaño de amplicón no exceda en ningún caso las 400 pb y simultáneamente garantice la amplificación específica del gen de interés, evitando la formación de productos secundarios y/o de dímeros de oligonucleótidos cebadores.

A partir de las gráficas de “Fluorescencia vs. Número de Ciclo” resultantes, se determinaron los puntos de corte C_{p1} y C_{p2} , correspondientes respectivamente al inicio de la fase logarítmica de amplificación del gen analizado (UBA-2, PLA-1, TEF-5, IGFBP7/MAC-25 o MUC-1) y del gen constitutivo β -ACTINA utilizado para la normalización. Ambos valores permitieron calcular la cantidad relativa del RNA mensajero estudiado en cada muestra, aplicando la ecuación $C_R = 2^{-(C_{p2}-C_{p1})}$.

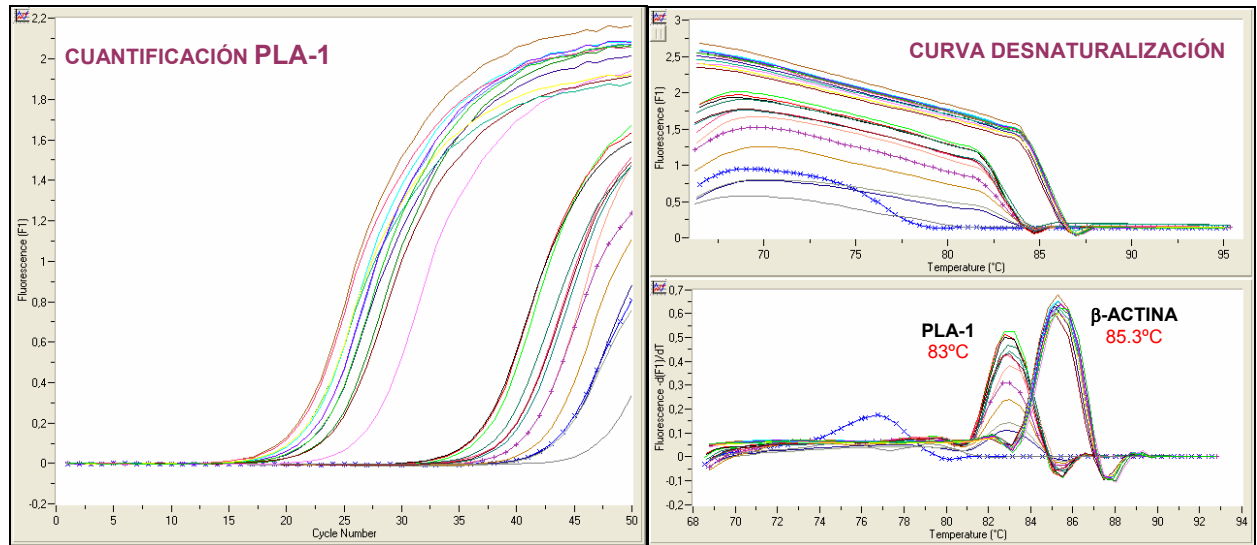
11.2.4.1. Cuantificación del mRNA de PLA-1 en células JAR/G Co-cultivadas

Las variaciones en la expresión del gen PLA-1, previamente observadas durante los co-cultivos de células JAR/G con RL95-2, se confirmaron y caracterizaron por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizaron para ello los equipos comerciales de QIAGEN y Roche, siendo el primero el que mejor resultados arrojó al eliminar la formación de dímeros de oligonucleótidos cebadores por utilizar la enzima *HotStarTaq DNA polimerasa* para la amplificación. La enzima se encuentra inicialmente inactiva y se activa por calentamiento durante 15 minutos. Así se incrementó la especificidad y precisión de la reacción de PCR al prevenir la formación de dímeros y productos inespecíficos, asegurando unas condiciones óptimas, más aún cuando se trabaja con un fluorocromo inespecífico de secuencia como es el SYBR-Green. La eficiencia en la amplificación y la homogeneidad de los productos formados se pudo evaluar respectivamente en las curvas de amplificación y desnaturalización (**Figura 31.A**).

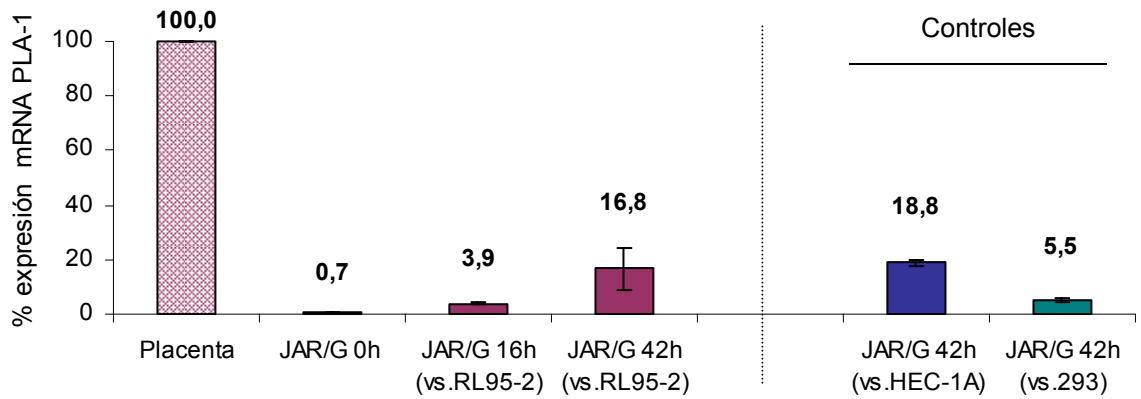
Inicialmente se comprobó la existencia de un incremento gradual y notable de los niveles de mRNA de este factor transcripcional PLA-1 (aproximadamente 24 veces) como consecuencia de su interacción con células endometriales RL95-2 (**Figura 31.B**). Por otra parte, tal aumento pareció ser específico de la interacción de células JAR/G con células de tipo endometriales, dado que se obtuvo un nivel semejante de mensajero cuando las células JAR/G se co-cultivaron durante 42 horas con las células HEC-1A, mientras que su co-cultivo sobre monocapas de células de riñón 293 produjo un aumento mucho menos pronunciado. En todos los casos los niveles de RNA mensajero de PLA-1 se expresaron como porcentaje de la cantidad existente en “placenta” (control), al cual se asignó arbitrariamente el valor 100% para la construcción del gráfico.

A pesar de la gran reproducibilidad de los resultados, obtenidos a partir de una misma muestra de RNA, se observó una elevada variabilidad entre los niveles finales de activación génica alcanzados en las diferentes réplicas del co-cultivo JAR/G vs. RL95-2. Puesto que las condiciones de co-cultivo y separación se mantuvieron inalteradas en todos los casos, se analizó la influencia de otros

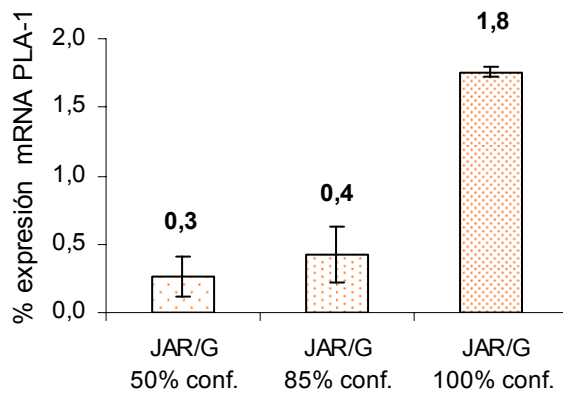
A



B



C



D

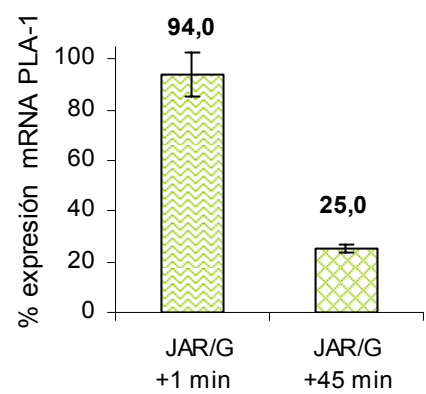


FIGURA 31. Cuantificación de los niveles de expresión del gen PLA-1 en células JAR/G co-cultivadas mediante RT-PCR en tiempo real empleando el sistema LightCycler (Roche). En **A** se enseña un ejemplo de las curvas de amplificación (izquierda) y de desnaturalización de producto (derecha) obtenidas para reacciones con el equipo comercial QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR (QIAGEN). Se puede observar la homogeneidad de los productos formados y su temperatura de disociación. Los niveles de expresión del factor transcripcional PLA-1 en células JAR/G fueron cuantificados a distintos tiempos de co-cultivo con células endometriales RL95-2, células HEC-1A y 293 (estas últimas utilizadas como controles de interacción), como se muestra en la figura **B**. En la figura **C** se enseña el efecto de la confluencia celular sobre los niveles de RNA mensajero, y en **D** la estabilidad de este mismo RNA, evaluada durante un tiempo similar al que dura el proceso de separación de las células por citometría de flujo.

factores menos controlables que pudiesen condicionar la expresión de PLA-1 entre un co-cultivo y otro. Se analizó en primer lugar la influencia sobre la expresión de PLA-1 del grado de confluencia de las células JAR/G. Para ello, se cultivaron estas células en tres placas P-60 a densidades celulares crecientes, extrayéndose el RNA simultáneamente a las 48 horas cuando las placas alcanzaron densidades de 50%, 85% y 100%. La cuantificación de los niveles del mRNA PLA-1 indicó que el factor incrementa su expresión a medida que las células aumentan su grado de confluencia (**Figura 31.C**), resultado que en cierto modo justifica las grandes diferencias encontradas entre un co-cultivo y otro. En segundo lugar se evaluó la estabilidad del transcrito. En este caso, células JAR/G a una confluencia del 100% durante 42 hs fueron tripsinizadas, siguiendo el mismo procedimiento experimental, y separadas en dos tubos. Inmediatamente después se extrajo el RNA total de una de las fracciones (JAR/G+1 min), incubándose la otra en hielo durante 45 minutos y agitando cada 5 minutos, procedimiento análogo al que se someten las células suspendidas durante la separación por citometría de flujo, para luego extraerle el RNA (JAR/G+45 min). La cuantificación de PLA-1 en sendas fracciones demostró una disminución drástica de los niveles de mensajero con el transcurso del tiempo (**Figura 31.D**), señalando la elevada labilidad y degradación del transcrito.

Podemos concluir finalmente que la transcripción del gen PLA-1 se incrementa cuando las células adquieren un grado de confluencia elevado más que por una interacción específica con las células endometriales RL95-2, siendo los niveles de expresión iniciales considerablemente bajos en comparación con los niveles existentes en la placenta a término.

11.2.4.2. Cuantificación de la Proteína PLA-1 por Western Blot

El análisis de los niveles de proteína se realizó por Western Blot con el fin de correlacionarlos con las variaciones detectadas a nivel del mRNA. Para ello se cargó 50 µg (en cada carril del gel de poliacrilamida/SDS) de los extractos proteicos totales de células JAR/G control y post 42 horas de interacción con células RL95-2, células JAR/G confluentes, células RL95-2 (no expresan este factor), y 5 µg de extractos proteicos de placenta. Las técnicas empleadas durante este análisis fueron las descritas en el apartado 8.9, utilizando para la detección el anticuerpo primario policlonal α-PLA-1 a una dilución 1/20.000, un anticuerpo secundario contra conejo marcado con peroxidasa (Anti Rabbit IgG Horseradish Peroxidase linked whole antibody; Amersham Biosciences) a una dilución 1/10.000 y revelando con el *Equipo ECL Advance® Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences)*.

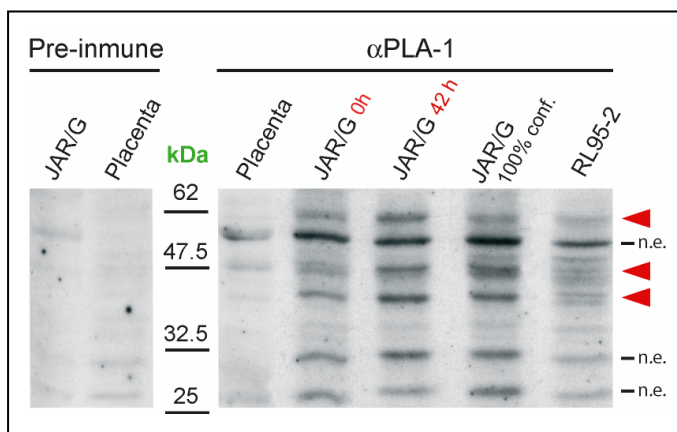


Figura 32. Análisis por Western Blot de los niveles de proteína PLA-1 en células JAR/G co-cultivadas con células RL95-2. Se señalan con flechas rojas las distintas isoformas de proteína PLA-1 (55, 47 y 43 kDa), detectadas en 5 µg de extractos proteicos de placenta (carril 1) y 50 µg de extractos de células JAR/G control (carril 2), JAR/G co-cultivadas durante 42 horas con células RL95-2 (carril 3), JAR/G incubadas 42 horas al 100% de confluencia (carril 4) y células RL95-2 (carril 5). A la izquierda, se enseñan controles de extractos de células JAR/G y placenta con suero pre-inmune. Se señalan como -n.e. las bandas no específicas.

Se observó un incremento en los niveles de proteína PLA-1 en las células JAR/G luego de ser co-cultivadas con células RL95-2 durante 42 hs (**Figura 32**). Se detectaron 3 bandas correspondientes a procesamientos alternativos (*splicing*) de PLA-1, alguno de ellos no caracterizados en placenta pero sí en líneas celulares, semejantes a los ya observados para otros factores transcripcionales de la misma familia tales como Oct-1 y Pit-1. Sin embargo, este aumento no pareció ser originado específicamente por la interacción JAR/G vs. RL95-2, sino mas bien una consecuencia de la elevada confluencia celular alcanzada por las células JAR/G durante el co-cultivo, ya que una incubación realizada únicamente con estas células durante 42 horas a una confluencia celular máxima (100%) produjo un incremento similar de PLA-1.

11.2.4.3. Detección de PLA-1 por Inmunofluorescencia

La visualización de la proteína PLA-1 y el análisis de sus niveles de expresión diferencial se realizaron por microscopía confocal de fluorescencia siguiendo el protocolo descrito en 8.9.5. Las células JAR/G co-cultivadas durante 42 horas con células RL95-2 fueron separadas por citometría de flujo, sembradas y cultivadas sobre cubreobjetos durante 2 horas. Tras ser fijadas, fueron incubadas con el anticuerpo primario α -PLA-1 y el secundario anti conejo Alexa Fluor 546 (Molecular Probes), tiñendo el DNA con To-pro-3 (Molecular Probes).

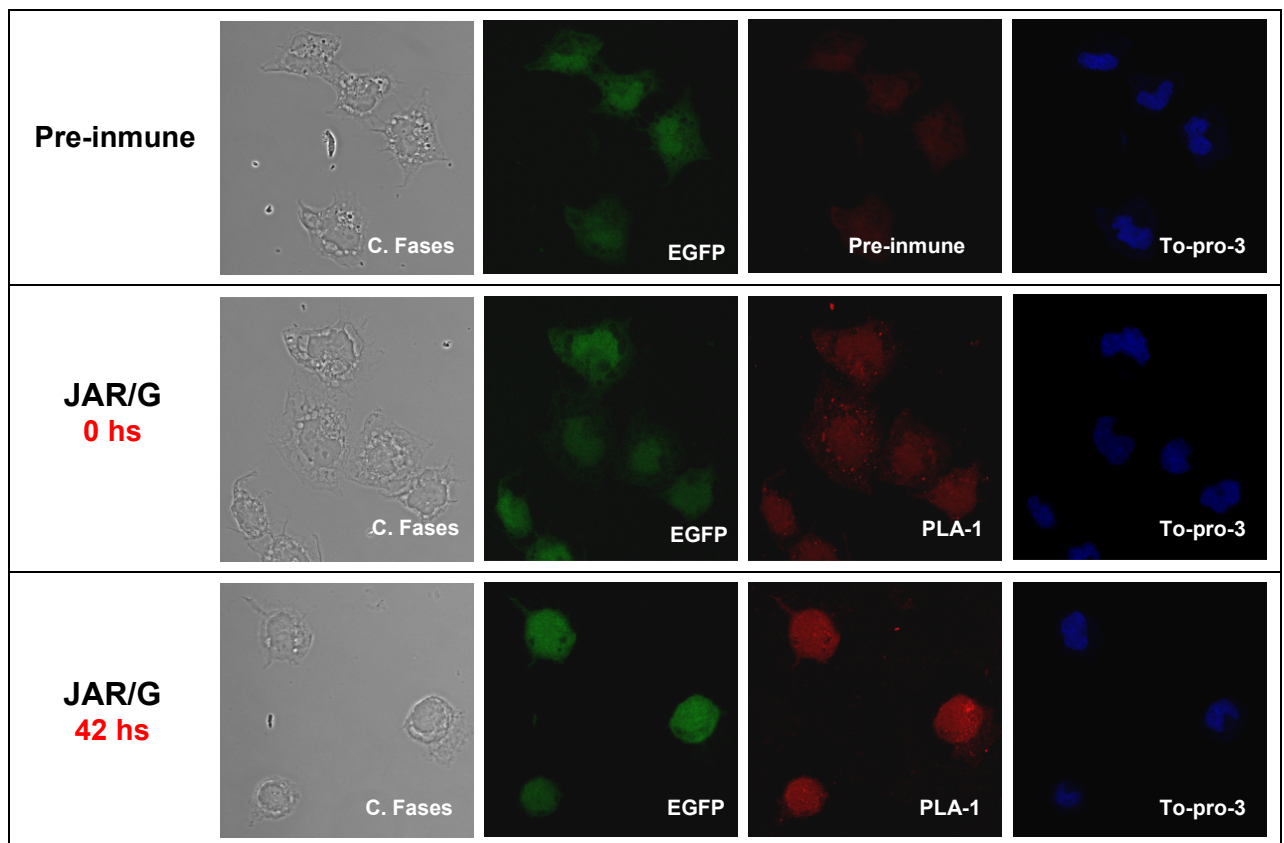


FIGURA 33. Análisis de expresión por Inmunofluorescencia de la proteína PLA-1 en células trofoblásticas JAR/G antes y después del co-cultivo durante 42 horas con células endometriales RL95-2. Microscopía óptica confocal (LSM510 Meta, Zeiss) de las células JAR/G incubadas con suero pre-inmune y con anticuerpo α -PLA-1 purificados (dil. 1/100), utilizando anticuerpo secundario anti conejo Alexa Fluor 546 (dil. 1/500) y To-pro-3 (dil. 1/1.000). Se enseñan las imágenes en contraste de fases, la proteína verde fluorescente EGFP (expresión estable), el factor trascricional PLA-1 en rojo y el DNA teñido con To-pro-3 (Aumento 80X).

Se observó un incremento de la intensidad de fluorescencia roja del factor de transcripción PLA-1 en el núcleo de las células JAR/G luego de su interacción con células endometriales RL95-2. La medición densitométrica de las intensidades de fluorescencia en el núcleo indicó un incremento de la proteína PLA-1 de al menos tres veces.

11.2.4.4. Cuantificación del mRNA de TEF-5 en células JAR/G Co-cultivadas

La cuantificación de este gen se realizó indistintamente con los equipos comerciales de Roche y QIAGEN, obteniéndose en ambos casos el mismo patrón de curvas de amplificación y desnaturalización, con productos homogéneos libres de contaminantes y dímeros de oligonucleótidos, tal como se aprecia en la **Figura 34.A**. En este caso se observó una leve disminución en los niveles de expresión del RNA mensajero de TEF-5 en las células JAR/G como consecuencia de su co-cultivo durante 16 y 42 horas con células endometriales RL95-2. Tal reducción, hasta alcanzar valores cercanos al 40% de la cantidad inicial, parece ser inespecífica de la interacción JAR/G vs. RL95-2, puesto que el co-cultivo de células JAR/G sobre células endometriales HEC-1A y sobre células de riñón 293 produjo resultados inhibitorios similares (**Figura 34.B**). Por otra parte, el estudio de los niveles de expresión en células JAR/G a distintos grados de confluencia celular arrojó resultados contrapuestos que indican que la transcripción se incrementa a medida que aumenta el contacto entre las células (**Figura 34.C**). Esto sugiere que la transcripción de este factor transcripcional TEF-5 es levemente inhibida por la interacción con células distintas al trofoblasto, posiblemente por la presencia de factores reguladores, o bien que una vez alcanzado el grado de confluencia celular máximo (condiciones iniciales para los co-cultivos, donde la expresión de TEF-5 sería la máxima) los niveles de mensajero disminuirían levemente como consecuencia del estado estacionario alcanzado. La similitud en los resultados para células co-cultivadas durante 16 y 42 horas explicaría en cierta forma la estabilización en determinados niveles de expresión, aunque sin embargo, son represiones demasiado leves como para poder atribuir funciones y regulaciones de este factor transcripcional durante el proceso de adhesión celular.

Finalmente, el estudio de la estabilidad del RNA mensajero del gen TEF-5 fue confirmada empleando muestras de RNA extraídas de células JAR/G a tiempos de 1 y 45 minutos (incubadas en hielo, con agitación cada 5 minutos), contados desde la tripsinización, verificándose la ausencia de degradación del mismo (**Figura 34.D**).

11.2.4.5. Cuantificación de la Proteína TEF-5 por Western Blot

Al igual que para el factor transcripcional PLA-1, se analizaron los niveles de expresión de proteína del factor transcripcional TEF-5 por Western Blot, cargando en cada carril del gel la misma cantidad de extractos proteicos totales (50 μ g) de células JAR/G control, células JAR/G co-cultivadas 42 horas con células RL95-2, placenta a término y células RL95-2. Se siguieron los protocolos para análisis de proteínas indicados en el apartado **8.9**, utilizando el anticuerpo policlonal α -TEF-5 a dilución 1/20.000 y el secundario contra conejo marcado con peroxidasa a una dilución 1/10.000.

En la **Figura 35** se enseña la imagen del gel de poliacrilamida/SDS, en donde se puede observar la disminución de los niveles de proteína TEF-5 en las células JAR/G como consecuencia del co-cultivo durante 42 horas con células RL95-2, así como los menores niveles de expresión de este

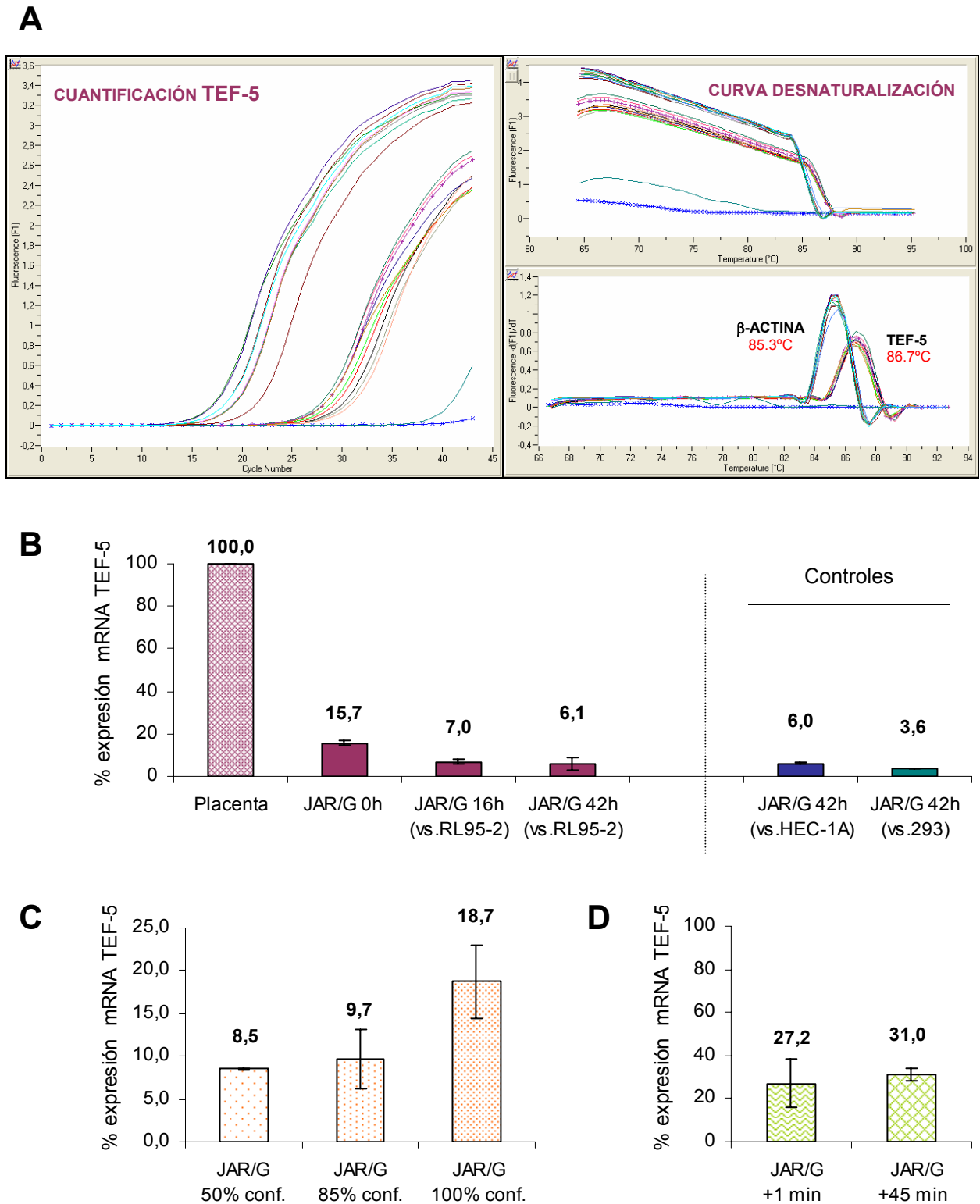


FIGURA 34. Cuantificación de los niveles de expresión del gen TEF-5 en células JAR/G co-cultivadas mediante RT-PCR en tiempo real empleando el sistema LightCycler (Roche). En **A** se enseña un ejemplo de las curvas de amplificación (izquierda) y de desnaturalización de producto (derecha) obtenidas para reacciones con los equipos comerciales de QIAGEN o Roche. Se puede observar la homogeneidad de los productos formados y su temperatura de disociación. Los niveles de expresión del factor transcripcional TEF-5 en células JAR/G fueron cuantificados a distintos tiempos de co-cultivo con células endometriales RL95-2, células HEC-1A y 293 (estas últimas utilizadas como controles de interacción), como se muestra en la figura **B**. En la figura **C** se enseña el efecto de la confluencia celular sobre los niveles de RNA mensajero, y en **D** la estabilidad de este mismo RNA, evaluada durante un tiempo similar al que dura el proceso de separación de las células co-cultivadas por citometría de flujo (1 y 45 min).

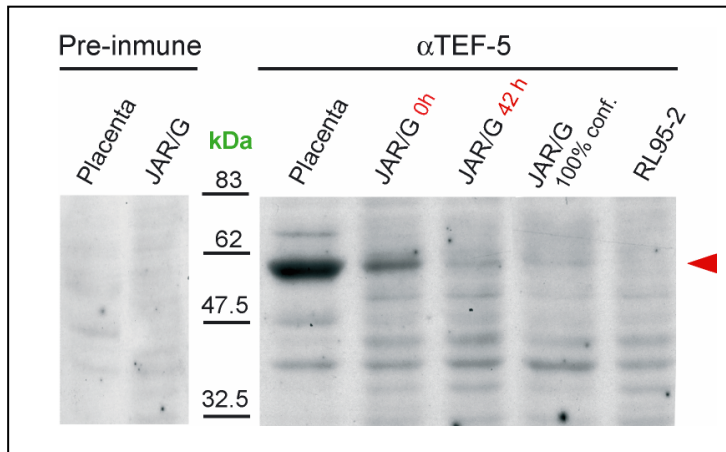


Figura 35. Análisis por Western Blot de los niveles de proteína TEF-5 en células JAR/G co-cultivadas con células RL95-2. Se señala con una flecha roja la proteína TEF-5 de 53 kDa, detectada en 50 µg de extractos proteicos de placenta (carril 1), de células JAR/G control (carril 2), JAR/G co-cultivadas durante 42 horas con células RL95-2 (carril 3), JAR/G incubadas al 100% de confluencia durante 42 hs (carril 4) y células RL95-2 (carril 5). A la izquierda, se enseñan controles de extractos de placenta y de células JAR/G incubados con suero pre-inmune.

factor transcripcional específico de tejido en relación a la placenta a término, su menor expresión en células JAR/G cultivadas durante 42 horas a una confluencia elevada (densidad del 100%) y su ausencia en extractos proteicos de células RL95-2.

11.2.4.6. Detección de TEF-5 por Inmunofluorescencia

La proteína TEF-5 se detectó por microscopía de fluorescencia en las células JAR/G con y sin interacción con células RL95-2, de acuerdo al protocolo descrito en 8.9.5. En este caso, pareciera ser

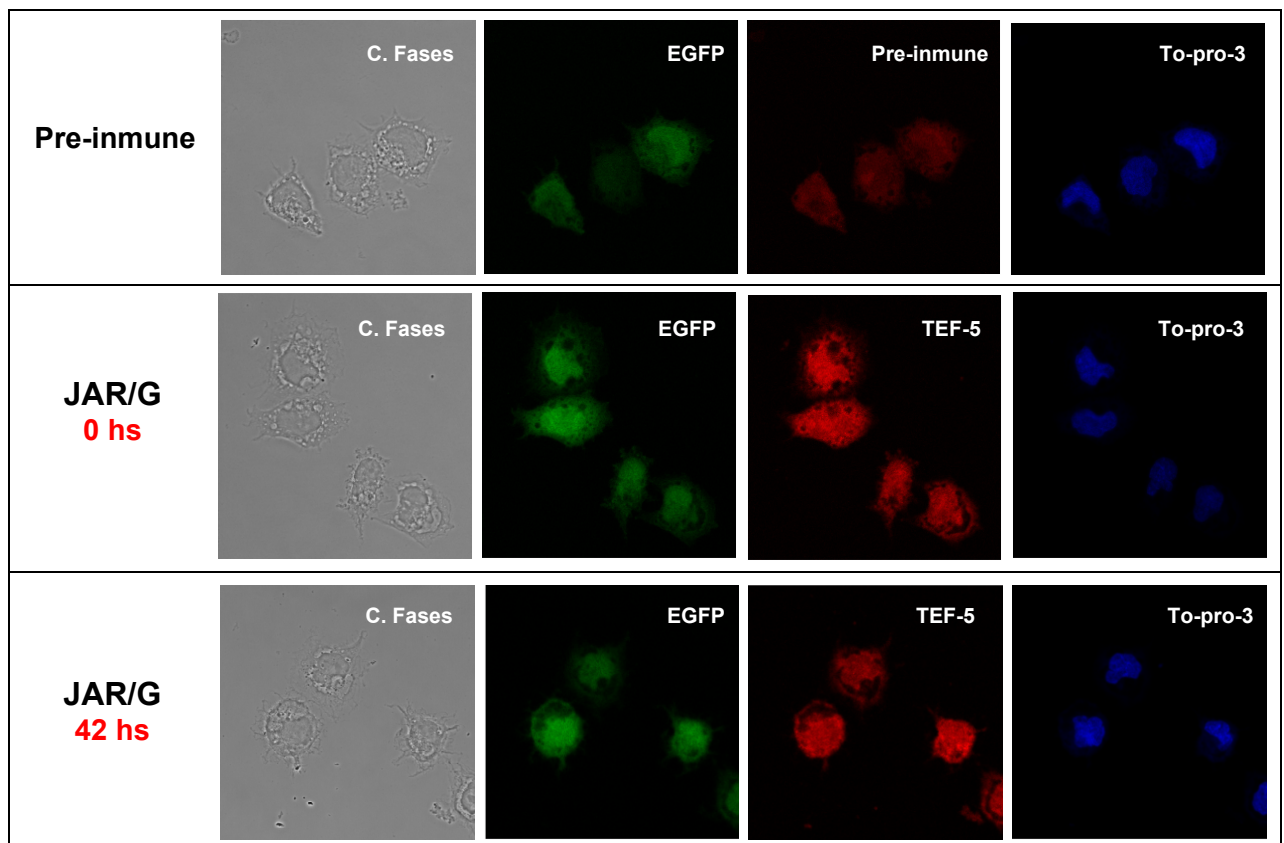


FIGURA 36. Análisis de expresión por Inmunofluorescencia de la proteína TEF-5 en células trofoblásticas JAR/G antes y después del co-cultivo durante 42 horas con células endometriales RL95-2. Microscopía óptica confocal de las células JAR/G incubadas con suero pre-inmune y con anticuerpo α-TEF-5 purificados (dil. 1/100), utilizando anticuerpo secundario anti conejo Alexa Fluor 546 (dil. 1/500) y To-pro-3 (dil. 1/1.000). Se enseñan las imágenes en contraste de fases, la proteína verde fluorescente EGFP, el factor transcripcional TEF-5 en rojo y el DNA teñido con To-pro-3 (Aumento 80X).

que la intensidad de fluorescencia en las imágenes de las células JAR/G tras el co-cultivo disminuyó levemente. No obstante, estas variaciones no fueron claramente visibles, posiblemente debido a que se trata de un anticuerpo policlonal generado con la proteína recombinante que reconoce bien a la proteína desnaturalizada en los ensayos de Western Blot, pero no reconoce la proteína en su estado nativo *in vivo*. No podemos descartar, sin embargo, otros factores igualmente importantes, como por ejemplo que el anticuerpo reconozca inespecíficamente a los otros miembros de la misma familia génica (TEF-1, TEF-4 o las variantes 1, 2 y 3 de TEF-3) con elevada homología de secuencia, enmascarando así las diferencias de expresión, o también que estas diferencias se hubiesen perdido en la preparación, durante las dos horas de incubación para la adhesión de las células JAR/G separadas sobre los cubreobjetos.

11.2.4.7. Cuantificación del mRNA de IGFBP7/MAC-25 en células RL95-2 Co-cultivadas

La cuantificación de la expresión de este mRNA se realizó en células endometriales RL95-2 y HEC-1A, empleando únicamente el equipo comercial LightCycler RNA Amplification Kit SYBR Green I (Roche Applied Science), obteniéndose productos únicos y homogéneos tal como se aprecia en la **Figura 37.A**. Se cuantificaron así las variaciones detectadas por RT-PCR semicuantitativa en la fracción de células endometriales RL95-2, derivadas de la interacción durante 16 y 42 horas con células JAR/G. Se añadieron además otros experimentos control para caracterizar la especificidad de esta interacción. En primer lugar se cultivaron durante 42 horas las monocapas de células RL95-2 con células de tipo no trofoblástico (células de riñón 293/G), continuando con la separación por citometría de flujo y extracción del RNA en las condiciones preestablecidas. El segundo control consistió en el análisis de este mismo gen en células endometriales “no adherentes” HEC-1A crecidas en monocapas y co-cultivadas durante 42 horas con células trofoblásticas JAR/G, las cuales a continuación fueron separadas y procesadas siguiendo el mismo protocolo. La inclusión de este segundo control se realizó por la existencia previa de ensayos que demostraban la expresión diferencial de este gen entre las células RL95-2 y HEC-1A (Domínguez y *col.*, 2003), diferencias que a su vez se correspondieron con los niveles de expresión observados en biopsias de endometrio de los días LH+2 y LH+7 respectivamente (LH: nivel sérico máximo o pico de hormona luteinizante durante el ciclo menstrual; LH+2: endometrio “no receptivo” existente fuera de la ventana de implantación; LH+7: endometrio “receptivo” correspondiente a la ventana de implantación).

Los valores obtenidos confirmaron la disminución de los niveles de expresión de mRNA del gen IGFBP7/MAC-25 en las células endometriales RL95-2 como resultado de la interacción con células trofoblásticas JAR/G (**Figura 37.B**). Asimismo, se comprobó que tal represión de la transcripción es específica de la interacción RL95-2 vs. JAR/G, dado que el co-cultivo durante 42 horas con las células no trofoblásticas 293/G no produjo descensos significativos en los niveles de RNA mensajero. Por otra parte, en las células HEC-1A que habían sido co-cultivadas en iguales condiciones con células JAR/G tampoco se encontró inhibición de la transcripción, sino que, por lo contrario, se produjo un incremento poco significativo de los niveles de mRNA.

Finalmente, se realizó el estudio de la estabilidad del mRNA con el fin de evaluar la posible degradación del mismo durante el proceso de separación por citometría de flujo. El análisis fue efectuado a partir de dos fracciones de células RL95-2 procedentes del mismo cultivo, cuyos RNAs se extrajeron al

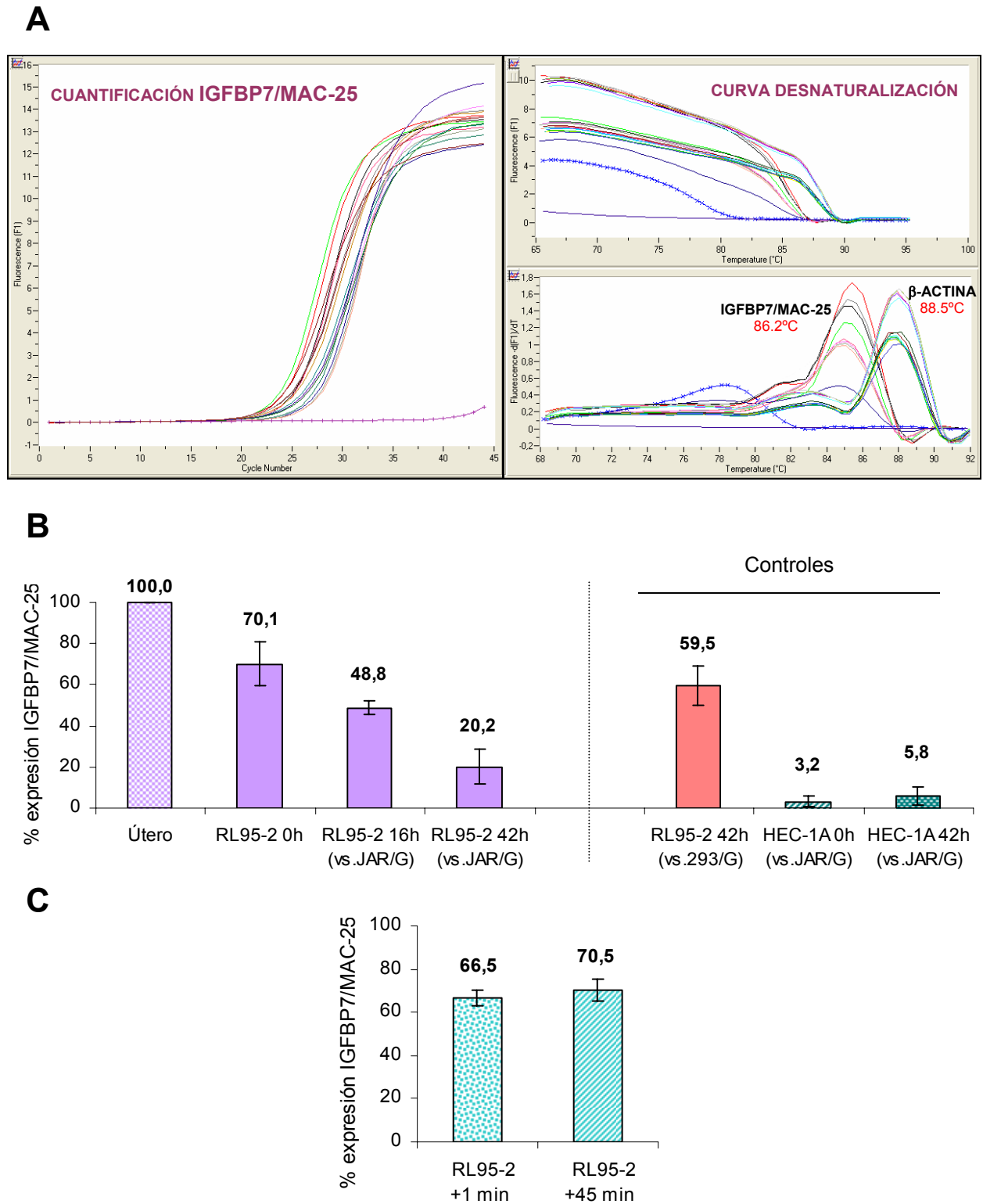
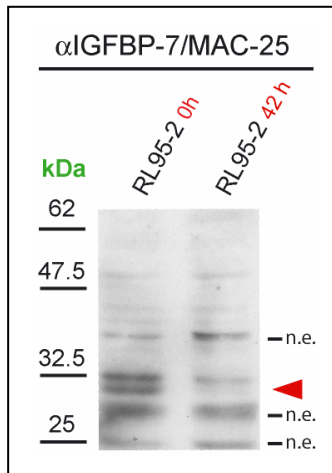


FIGURA 37. Cuantificación de los niveles de expresión del gen IGFBP7/MAC-25 en células RL95-2 co-cultivadas mediante RT-PCR en tiempo real empleando el sistema LightCycler (Roche). En **A** se enseña un ejemplo de las curvas de amplificación (izquierda) y de desnaturalización de producto (derecha) obtenidas para reacciones con el equipo LightCycler RNA Amplification Kit SYBR Green I (Roche). Se puede observar la homogeneidad de los productos formados y su temperatura de disociación. Los niveles de expresión de IGFBP7/MAC-25 en células RL95-2 y HEC-1A fueron cuantificados a distintos tiempos de co-cultivo con células trofoblásticas JAR/G, células 293/G (utilizadas como controles de interacción junto a HEC-1A), como se muestra en la figura **B**. En la figura **C** se enseña la estabilidad de este RNA mensajero, evaluada durante un período de tiempo igual o superior al que dura el proceso de separación de las células co-cultivadas por citometría de flujo (1 y 45 min post tripsinización).

minuto 1 y 45 post tripsinización. Los resultados de la cuantificación demostraron la estabilidad del mRNA de IGFBP7/MAC-25 (**Figura 37.C**) con el tiempo, indicando así que el efecto de represión transcripcional observado es específico de la interacción de células RL95-2 con JAR/G.

11.2.4.8. Cuantificación de la Proteína IGFBP7/MAC-25 por Western Blot

El análisis de los niveles de proteína se realizó según el protocolo descrito en **8.9**, cargando



en cada carril de un gel de poliacrilamida/SDS exactamente 40 µg de los extractos proteicos de células endometriales RL95-2 control y co-cultivadas durante 42 horas con las células trofoblásticas JAR/G. La inmunodetección se llevó a cabo con una dilución 1/10.000 del anticuerpo comercial anti IGFBP-7 (H-102; Santa Cruz Biotechnologies) y anticuerpo contra conejo marcado con peroxidasa a la dilución 1/10.000, comprobándose la disminución de los niveles de proteína como respuesta a la interacción.

Figura 38. Análisis por Western Blot de los niveles de proteína IGFBP-7/MAC-25 en células endometriales RL95-2 pre (0 horas; carril 1) y post interacción (42 horas; carril 2) con células trofoblásticas JAR/G. Se señala con una flecha roja la proteína de 31 kDa, detectada en 40 µg de extractos proteicos cargados en cada carril. (n.e.: no específico).

11.2.4.9. Detección de IGFBP7/MAC-25 por Inmunofluorescencia

La inmunodetección de esta proteína en células RL95-2 control y células co-cultivadas con células trofoblásticas JAR/G se realizó según el protocolo descrito en **8.9.5**. Las imágenes indicaron la disminución de los niveles de proteína como consecuencia del co-cultivo, verificándose así la correlación existente con las variaciones en los niveles de RNA mensajero previamente observadas.

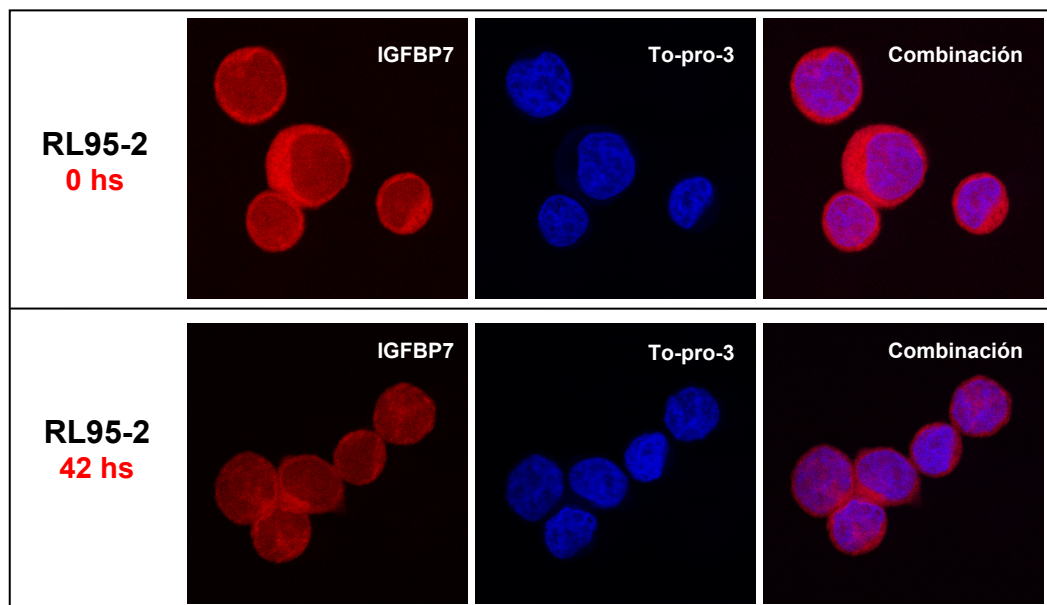


FIGURA 39. Análisis de expresión por Inmunofluorescencia de la proteína IGFBP7/MAC-25 en células endometriales RL95-2 antes y después del co-cultivo durante 42 horas con células trofoblásticas JAR/G. Microscopía óptica confocal de las células RL95-2 incubadas con una dilución 1/100 de anticuerpo α-IGFBP7 (H-102; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), utilizando anticuerpo secundario anti conejo Alexa Fluor 546 (dil. 1/100) y To-pro-3 (dil. 1/1.000). Imágenes con Objetivo 63X y zoom 2X.

11.2.4.10. Cuantificación del mRNA de MUC-1 en células RL95-2 Co-cultivadas

Las reacciones de RT-PCR cuantitativa para este gen se llevaron a cabo en las fracciones de células RL95-2 y JAR/G, co-cultivadas durante 16 y 42 horas y separadas por citometría de flujo, utilizando el equipo comercial QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR (QIAGEN). Dada la compleja regulación de este gen y la gran variedad de transcritos producidos por modificaciones post-transcripcionales, se debieron diseñar y utilizar nuevos oligonucleótidos para estas determinaciones, obteniéndose finalmente curvas de amplificación logarítmicas y productos únicos de amplificación, libres de contaminantes y dímeros de oligonucleótidos (**Figura 40.A**). En el caso de las células JAR/G las variaciones en los niveles de expresión de este gen no fueron significativas, por lo cual se decidió continuar el estudio de este gen únicamente en la fracción de células RL95-2.

Los resultados mostraron un incremento gradual de los niveles de expresión del gen MUC-1 en las células endometriales RL95-2 como respuesta a la interacción con las células trofoblásticas JAR/G (**Figura 40.B**). Además, como se puede apreciar en la misma gráfica (Control 1), este aumento parece ser relativamente específico de la interacción RL95-2 vs. JAR/G, puesto que el co-cultivo de las mismas células endometriales con células de tipo no trofoblástico, como son las células de riñón 293/G, produjo un incremento menor de los niveles de expresión de MUC-1. El análisis de este mismo gen en células “no adherentes” HEC-1A, antes y después de la interacción durante 42 horas con células JAR/G, arrojó resultados sorprendentes puesto que se produjo un notable incremento en los niveles de expresión de este mRNA (**Figura 40.C**, Control 2). Finalmente se realizó el análisis de la estabilidad de este mRNA mediante RT-PCR cuantitativa de muestras de RNA total, extraídas de un mismo cultivo de células RL95-2, HEC-1A o JAR/G al minuto 1 y 45 post tripsinización. Como se puede observar en la **Figura 40.D**, no se observaron variaciones en los niveles de este mensajero, resultados que garantizan la correcta comparación de los patrones de expresión.

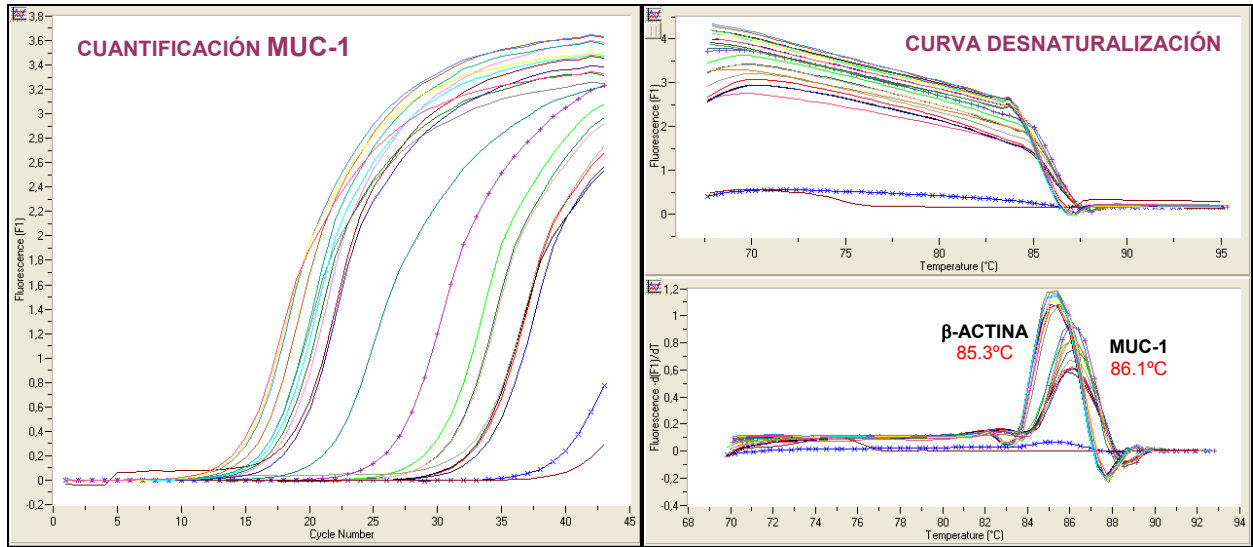
Si comparamos los niveles de expresión de mucina MUC-1 en células RL95-2 y HEC-1A (**Figura 40**, gráficos **B** y **C**), podemos observar que estas últimas expresan inicialmente una cantidad mucho mayor de mRNA y que además responden frente a las células trofoblásticas JAR/G con un incremento mucho más pronunciado. Si relacionamos estos valores de expresión con la desigual adhesividad de estos dos tipos celulares frente a la unión de trofoblastos, podemos concluir que estos resultados avalan la hipótesis que sostiene que la mucina MUC-1, una glicoproteína voluminosa altamente glicosilada de la membrana celular (componente principal del moco), actúa como una molécula anti-adherente al inhibir la unión celular trofoblasto-endometrio (Chervenak e Illsley, 2000).

11.2.4.11. Cuantificación de la Proteína MUC-1 por Western Blot

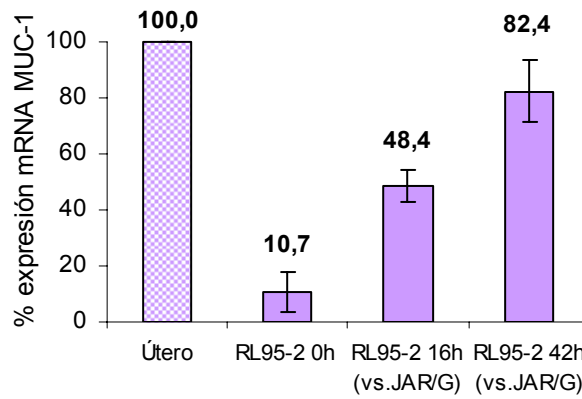
El análisis de los niveles de proteína se realizó sobre 35 µg de cada uno de los extractos proteicos totales obtenidos de células endometriales RL95-2 control sin interacción (0 horas) y de células co-cultivadas (42 horas) con células trofoblásticas JAR/G y separadas por citometría de flujo.

Para la detección se siguió el procedimiento descrito en **8.9**, utilizando una dilución 1/10.000 del anticuerpo policlonal comercial anti MUC-1 (ab14690; Abcam Inc., Cambridge) y anticuerpo secundario contra conejo marcado con peroxidasa a una dilución 1/10.000 (**Figura 41**).

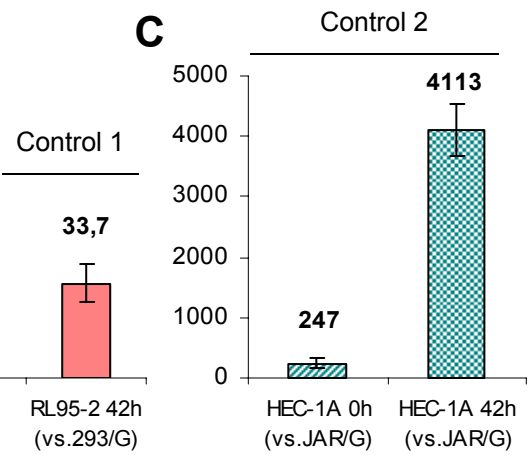
A



B



C



D

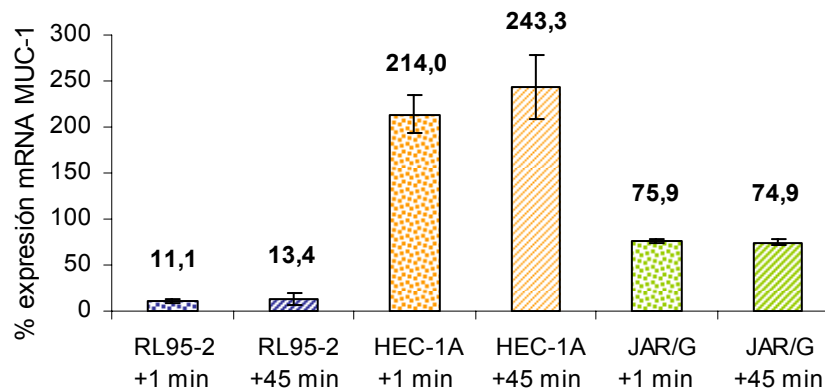
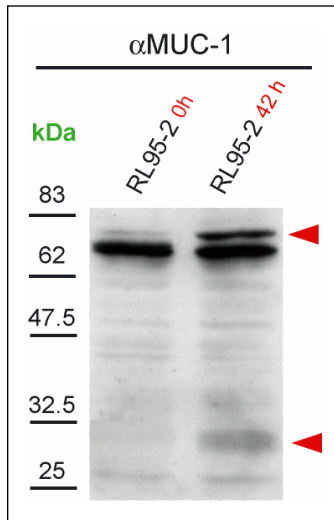


FIGURA 40. Cuantificación de los niveles expresión del gen MUC-1 en células RL95-2 co-cultivadas mediante RT-PCR en tiempo real con el sistema LightCycler (Roche). En **A** se enseña un ejemplo de las curvas de amplificación (izquierda) y de desnaturalización de producto (derecha) obtenidas al utilizar el *kit* QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR (QIAGEN). Se puede observar la homogeneidad de los productos formados y su temperatura de disociación. Los niveles de expresión de mRNA de MUC-1 en células RL95-2 fueron cuantificados a distintos tiempos de co-cultivo con células endometriales JAR/G y células 293/G (estas últimas utilizadas como control de interacción), como se muestra en **B**. En la gráfica **C** se enseñan los niveles de expresión en células endometriales “no adherentes” HEC-1A antes y después del co-cultivo (42 hs) con células JAR/G y en **D** la estabilidad del mRNA, evaluada durante un tiempo similar al que dura el proceso de separación de las células por citometría de flujo.



Se observó un incremento de los niveles de proteína MUC-1 en las células endometriales RL95-2 como consecuencia de la interacción con las células trofoblásticas JAR/G, verificándose la aparición de una banda más intensa de 30 kDa correspondiente a la proteína recientemente sintetizada y otras de 67 y 75 kDa que corresponden a estructuras altamente glicosiladas. Este grado de modificación postransduccional ha sido descrito con anterioridad para esta proteína por Hey y *col.*, en 1994.

Figura 41. Análisis por Western Blot de los niveles de proteína MUC-1 en células endometriales RL95-2 sin interacción (control 0 hs; carril 1) y luego del co-cultivo con células trofoblásticas JAR/G (42 horas; carril 2). Se señalan con una flecha roja las bandas de aproximadamente 30, 67 y 75 kDa correspondientes a la proteína MUC-1 nativa y glicosilada respectivamente, detectada en 35 μ g de extractos proteicos cargados por carril.

11.2.4.12. Detección de MUC-1 por Inmunofluorescencia

Para la visualización de la proteína por microscopía confocal de fluorescencia se utilizó una dilución 1/100 del anticuerpo policlonal comercial anti MUC-1 (ab14690; Abcam Inc., Cambridge) y anticuerpo secundario contra conejo Alexa 546 (Molecular Porbes), observándose un leve incremento de la intensidad de fluorescencia en la zona de la membrana citoplasmática (**Figura 42**), correspondiente a la proteína transmembrana. Este resultado podría sugerir la no existencia de una relación lineal entre las variaciones observadas a nivel mRNA y su proteína, o bien indicar que el incremento que se produce correspondería a la variante de la proteína que es secretada por estas células, componente principal del moco.

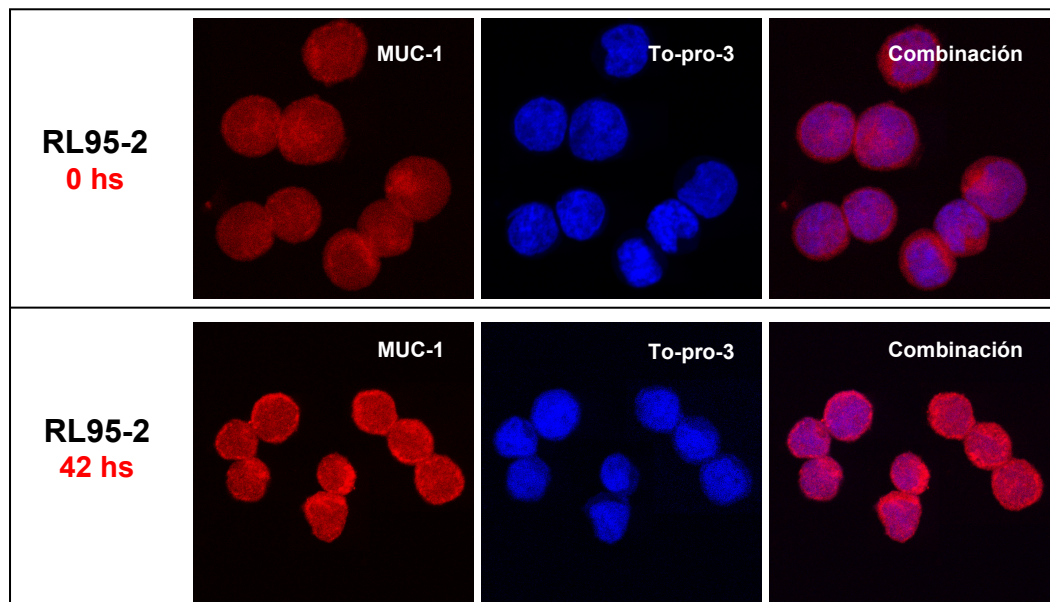


FIGURA 42. Análisis de expresión por Inmunofluorescencia de la proteína MUC-1 en células endometriales RL95-2 antes y después del co-cultivo durante 42 horas con células trofoblásticas JAR/G. Microscopía óptica confocal de las células RL95-2 incubadas con una dilución 1/100 de anticuerpo α -MUC-1 (ab14690; Abcam Inc.), utilizando anticuerpo secundario anti conejo Alexa Fluor 546 (dil. 1/100) y To-pro-3 (dil. 1/1.000). Imágenes con Objetivo 63X y zoom 2X.

11.2.4.13. Cuantificación del mRNA de UBA-2 en células RL95-2 Co-cultivadas

Los niveles de expresión de RNA mensajero del gen UBA-2 fueron estudiados en las fracciones de células RL95-2 y JAR/G, co-cultivadas y separadas por citometría de flujo, y fueron luego comparados con los correspondientes a los controles sin interacción. Para estas reacciones se utilizaron indistintamente los equipos comerciales de Roche y QIAGEN, añadiéndose un segmento extra al final de cada ciclo de amplificación para la medición de la fluorescencia (80°C), eliminándose así la fluorescencia inespecífica producida por los dímeros de oligonucleótidos (**Figura 43.A**). En las células RL95-2 se observó un incremento notable en los niveles de expresión del mRNA de UBA-2 a las 16 horas de interacción, los cuales ya de por sí eran inicialmente elevados en comparación con el control de útero utilizado, disminuyendo luego a las 42 horas hasta valores inferiores a los mostrados por las células sin interacción (**Figura 43.B**). El control de interacción, realizado co-cultivando (42 horas) sobre las monocapas de células RL95-2 a células no trofoblásticas 293/G, arrojó valores de expresión superiores a los de las células RL95-2 control, no habiendo en este caso inhibición de la transcripción. Los niveles de expresión en las células JAR/G, representados porcentualmente respecto al control (útero), mostraron una disminución algo más marcada a las 42 horas (**Figura 43.C**).

Asimismo, se analizó la expresión de este mismo gen en células endometriales HEC-1A tras su co-cultivo durante 42 horas con células trofoblásticas JAR/G, con el fin de determinar si las variaciones observadas eran específicas de la interacción de células RL95-2 vs. JAR/G. Nuevamente se verificó una disminución en los niveles de RNA mensajero de este gen en ese período de co-cultivo (**Figura 43.D**). No obstante, el análisis de la estabilidad de mensajero, realizado manteniendo una parte de las células tripsinizadas durante 45 minutos en hielo y con agitación (período similar el empleado durante la separación por citometría de flujo), sugirió cierta labilidad y degradación del mRNA durante el proceso de separación (**Figura 43.E**).

Si bien cada proceso de separación celular nunca se prolongó más allá del minuto 30-35 contado a partir de la tripsinización de las células, no podemos concluir terminantemente que los menores niveles de mRNA detectados se correspondan exactamente con los niveles de inhibición de la transcripción. A pesar de ello, está claro que existe una activación de la transcripción del gen UBA-2 en las células endometriales RL95-2 a las 16 horas de co-cultivo con células JAR/G, para luego disminuir hasta alcanzarse un nivel determinado, posiblemente como consecuencia del estado estacionario final que se alcanza una vez que las células JAR/G han invadido la monocapa endometrial.

Estudios realizados por Okuma y *col.* (1999) en humanos, basados en las observaciones realizadas en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, sugirieron la participación conjunta, formando un complejo, de las proteínas UBA-2 y SUA-1 (SUMO-1 activating enzyme) en la conjugación de SUMO-1 con otras proteínas. SUMO-1 es una proteína con elevada similitud a la ubiquitina, pero a diferencia de ésta, la conjugación de proteínas con SUMO-1 estaría relacionada con mecanismos distintos a la ruta de degradación de proteínas por el proteosoma. Los resultados aquí obtenidos, aportan nuevos indicios sobre la participación activa de esta proteína con actividad enzimática durante el proceso de adhesión de células trofoblásticas y endometriales. No obstante, se requerirá un estudio más exhaustivo para determinar si este gen condiciona la estabilidad o degradación de las proteínas.

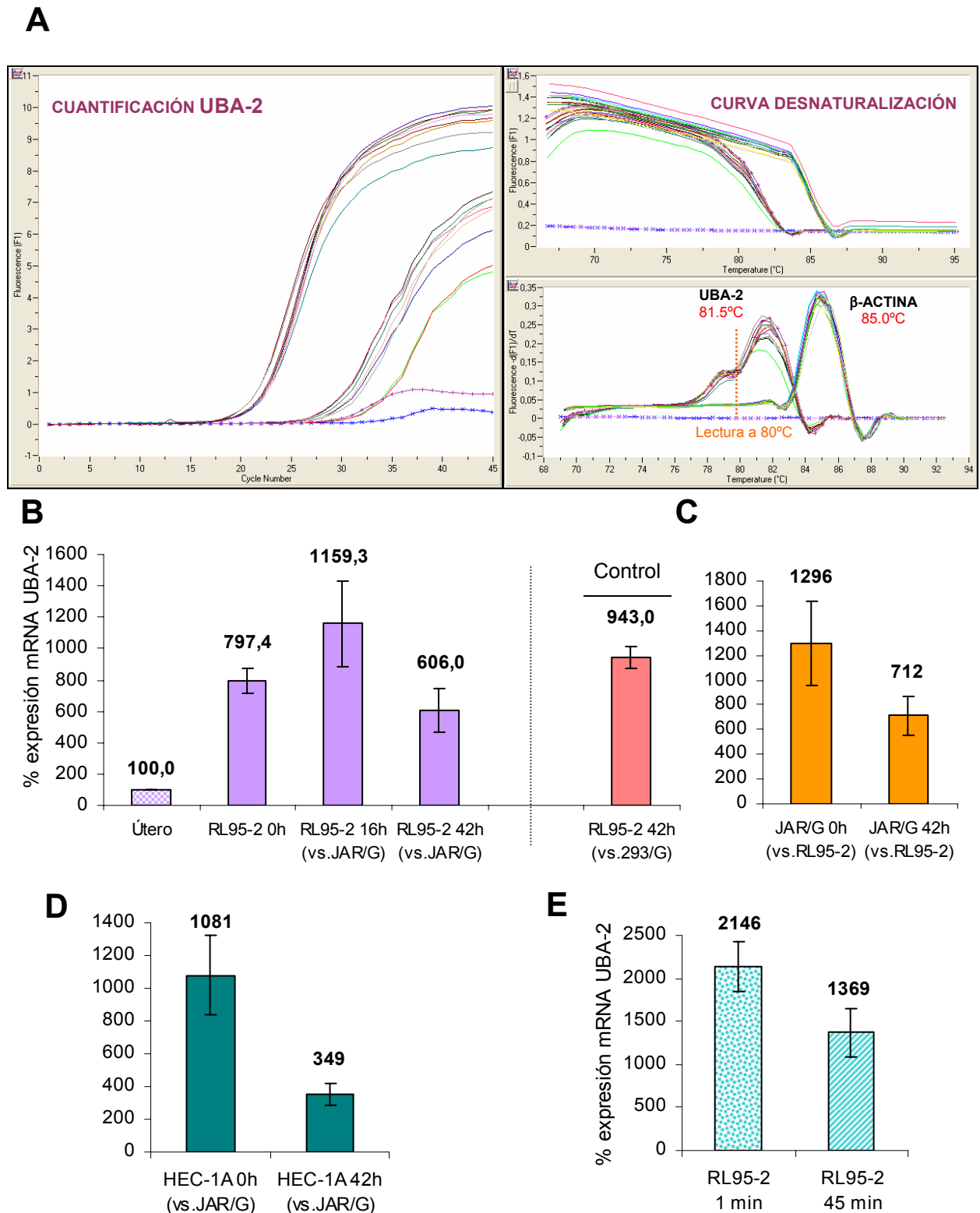


FIGURA 43. Cuantificación de los niveles expresión del gen UBA-2 en células RL95-2, HEC-1A y JAR/G co-cultivadas. RT-PCR en tiempo real empleando el sistema LightCycler (Roche). En **A** se enseña un ejemplo de las curvas de amplificación (izquierda) y de desnaturalización de producto (derecha) obtenidas con el equipo comercial QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR (QIAGEN), observándose los productos formados y su temperatura de disociación. Niveles de expresión de UBA-2 en células RL95-2 cuantificados a distintos tiempos de co-cultivo con células JAR/G y 293 (utilizadas como control de interacción), como se muestra en la figura **B**. En la figura **C** se enseñan los niveles de RNA mensajero en la fracción de células trofoblásticas JAR/G co-cultivadas con RL95-2. En **D** los niveles de UBA-2 en células endometriales HEC-1A antes y después del co-cultivo con JAR/G y en **E** la estabilidad del mRNA, evaluada durante un tiempo similar al que dura el proceso de separación de células por citometría de flujo.

Sección 3

12. Identificación de Nuevos Genes Humanos Expresados Durante la Fase de Adhesión de Células Trofoblásticas a Células Epiteliales Endometriales

El tercer objetivo de este trabajo consistió en el estudio global del transcriptoma humano en el sistema de adhesión trofoblasto-endometrio desarrollado. El fin fue identificar nuevos genes y analizar el comportamiento de aquellos genes conocidos que están implicados en este proceso, lo que permitirá a continuación realizar estudios complementarios para descifrar la naturaleza de la interacción y establecer asociaciones tiempo-espacio para la expresión de cada gen. Se utilizó para tal fin la tecnología de micromatrices o chips de DNA GeneChip® de Affymetrix® (Microarray), lo que permitió estudiar los niveles de expresión de un número elevado de genes en un solo experimento y compararlos entre las diferentes condiciones experimentales, obteniéndose grandes volúmenes de información en tiempos muy breves. Los detalles del procesamiento de las muestras y el análisis de las micromatrices realizado se detallan en el apartado 9.1 de la sección Materiales y Métodos.

12.1. Resultados del Protocolo de Procesamiento de las Muestras

Las muestras de RNA total utilizadas para estos estudios de expresión génica fueron aisladas con el reactivo del TRIZOL™ (Gibco BRL). Se obtuvieron así al menos 12 µg totales de cada uno de los seis RNAs, correspondientes a las células control RL95-2, JAR/G, JAR, HEC-1A y a las células co-cultivadas RL95-2_42hs y JAR/G_42hs. El análisis de pureza de las muestras extraídas se determinó por espectrofotometría con el equipo NanoDrop® (ND-1000 Spectrophotometer) y su integridad mediante el Bioanalizador (Bioanalyzer 2100 expert, Agilent Technologies), ambos en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, obteniéndose resultados similares a los enseñados en la **Figura 28** (Sección II de Resultados), con relaciones A_{260}/A_{280} superiores a 1,9.

El procesamiento posterior de las muestras se realizó en colaboración con la empresa Progenika Biopharma S.A. en Parque Tecnológico de Zamudio, Derio. La purificación se realizó con el equipo RNeasy Total RNA Isolation Kit (QIAGEN), recuperándose cada muestra en un volumen de 35 µl de agua. La calidad y cantidad de los RNAs purificados se estimaron mediante chequeo de una alícuota en un gel de agarosa y medida espectrofotométrica (**Figura 44.A** y **Tabla 25**).

A partir de 4,5 µg de cada una de las 6 muestras purificadas, se sintetizó cDNA con el equipo recomendado *One-Cycle cDNA Synthesis kit* (Affymetrix), siguiendo el protocolo del *Expression Analysis Technical Manual* de Affymetrix. A partir de este cDNA se sintetizó cRNA según el protocolo indicado en el equipo *IVT Labeling kit* (Affymetrix). El cRNA así sintetizado, se purificó con el *GeneChip Sample*

Cleanup Module (Affymetrix), recuperándose en un volumen de 22 µl de agua y verificándose a continuación su concentración, pureza e integridad (**Tabla 26** y **Figura 44.B**).

Una vez sintetizado y purificado, se fragmentó el cRNA (15 µg de cada preparación) para preparar las mezclas de hibridación, comprobándose nuevamente mediante un gel de agarosa (**Figura 44.C**). Con el cRNA fragmentado se preparó la mezcla de hibridación, en la que se incluyeron los dos controles provistos por el equipo comercial GeneChip® Expression 3'-Amplification Reagents Hybridization Control Kit: *spike controls* o *controles parásitos* (BioB, BioC, BioD y Cre) y *housekeeping controls* o *controles constitutivos* (GAPDH y β-ACTINA). La mezcla obtenida con cada cRNA se incubó durante 16 horas con una micromatriz Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix), procediéndose luego al lavado y revelado tal como se describió en el apartado 9.1.

| Muestra RNA total (Código Asignado) | Concentración (µg/µl) | Pureza (A _{260/280}) |
|--|--------------------------|-----------------------------------|
| RL95-2 [05SE868] | 1,518 | 2,08 |
| HEC-1A [05SE869] | 1,985 | 2,07 |
| JAR [05SE870] | 1,623 | 2,07 |
| JAR/G [05SE871] | 0,442 | 2,05 |
| RL95-2-42hs [05SE872] | 0,146 | 2,15 |
| JAR/G-42hs [05SE875] | 0,175 | 2,12 |

Tabla 25. Medida espectrofotométrica de la concentración y pureza de los RNAs totales purificados con el equipo comercial RNeasy Total RNA Isolation Kit (QIAGEN).

| Muestra cRNA | Concentración (µg/µl) | Pureza (A _{260/280}) |
|--------------|--------------------------|-----------------------------------|
| RL95-2 | 4,132 | 1,98 |
| HEC-1A | 2,718 | 1,98 |
| JAR | 3,431 | 1,99 |
| JAR/G | 3,640 | 2,03 |
| RL95-2-42hs | 3,556 | 2,05 |
| JAR/G-42hs | 4,133 | 2,02 |

Tabla 26. Medidas de concentración y pureza de los cRNAs purificados con el equipo *GeneChip Sample Cleanup Module* (Affymetrix).

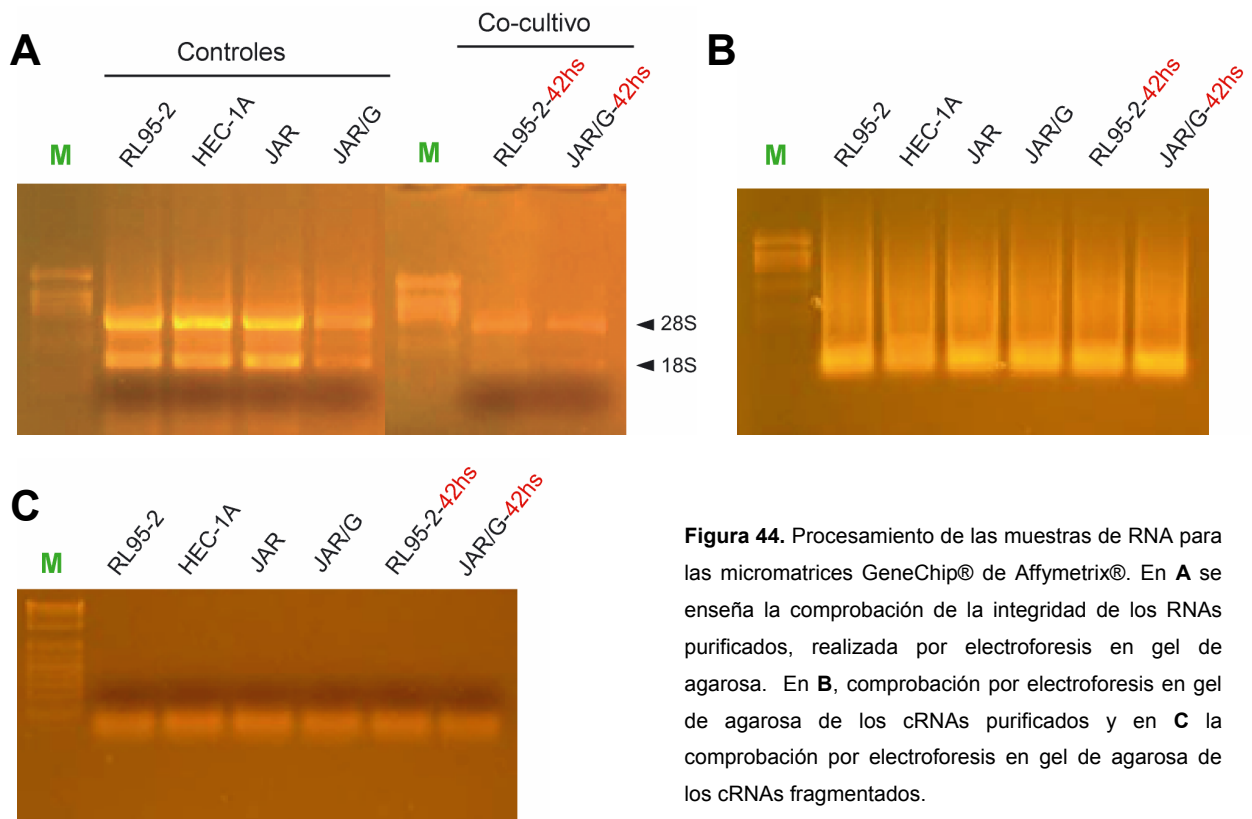


Figura 44. Procesamiento de las muestras de RNA para las micromatrices GeneChip® de Affymetrix®. En **A** se enseña la comprobación de la integridad de los RNAs purificados, realizada por electroforesis en gel de agarosa. En **B**, comprobación por electroforesis en gel de agarosa de los cRNAs purificados y en **C** la comprobación por electroforesis en gel de agarosa de los cRNAs fragmentados.

12.2. Análisis de los Controles

La inspección visual de los arrays proporcionó una idea general de la calidad del experimento. Se consideraron como válidas las imágenes con fondos oscuros y señales de hibridación brillantes, puesto que una muestra problemática, mala hibridación o incorrecta adquisición por el escáner, podría resultar en elevadas señales de fondo y de ruido que ocultarían la señal real. Una vez observadas las imágenes de cada chip, se analizaron los dos parámetros fundamentales para valorar la calidad de las mezclas de hibridación: la presencia de los controles parásito (*spike controls*) y la relación 3'/5' de los genes constitutivos (*housekeeping controls*). Los *spike controls* son sondas control para secuencias que se incluyeron en la mezcla de hibridación. La presencia de estos controles indicó que los procesos de hibridación, lavados, revelado y escaneado han resultado correctos. Los *spike controls* utilizados fueron BioB, BioC, BioD y Cre. El BioB es el control menos representado en la mezcla, por lo cual fue el principalmente utilizado para valorar la sensibilidad del experimento, tal como se indica en la **Tabla 27**.

Los *housekeeping controls* son sondas para genes expresados constitutivamente en todo tipo de tejidos. Se encuentran en el array sondas correspondientes a las zonas 3', central y 5' de estos genes. La relación entre las señales de hibridación para las sondas 3' respecto a la de las 5' indica la integridad de los cRNAs sintetizados, siendo ésta reflejo de la calidad del RNA original utilizado para la síntesis, la eficiencia en la síntesis de la primera cadena de cDNA y/o la transcripción *in vitro* a cRNA. Así, una relación 3'/5' entre las señales de hibridación cercana a 1 indica integridad total del RNA de partida y cRNA sintetizado. En función del órgano de procedencia, tipo de muestra y del tratamiento aplicado, es difícil obtener un cRNA totalmente íntegro, por lo que el criterio para considerar un experimento como satisfactorio (siguiendo las recomendaciones de Affymetrix), es que la relación 3'/5' no debe superar el valor de 3. Por otra parte, el carácter constitutivo de los genes representados como housekeeping no siempre se cumple para todo tipo de tejidos o condiciones experimentales, tal y como está ampliamente reflejado en la literatura, existiendo diferentes isoformas y patrones de expresión en diversos tejidos u organismos. Así, entre los genes representados en el array, el que más frecuentemente se comporta como verdadero housekeeping es GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). En la **Tabla 27** se indican los valores de cada uno de los chips para el spike control BioB y la relación 3'/5' para la GAPDH.

| Muestra [Código] | Spike control BioB | Housekeeping GAPDH (3'/5') | Factor de escalado (TGT=100) |
|------------------------------|--------------------|----------------------------|------------------------------|
| RL95-2 [05SE868] | Presente | 0.93 | 0.952 |
| HEC-1A [05SE869] | Presente | 0.96 | 1.015 |
| JAR [05SE870] | Presente | 0.97 | 1.239 |
| JAR/G [05SE871] | Presente | 0.90 | 1.567 |
| RL95-2-42hs [05SE872] | Presente | 0.94 | 1.532 |
| JAR/G-42hs [05SE875] | Presente | 0.93 | 1.492 |

Tabla 27. Valores de los parámetros de calidad para cada uno de los chips analizados. Valores para el spike control BioB (columna 2) y la relación 3'/5' para la GAPDH (columna 3) de cada uno de los chips (columna 1). En la columna 4 se indican los valores del factor de escalado de cada array, realizado con el software de Affymetrix GCOS 1.2 con el fin de minimizar las discrepancias debidas a variables tales como la preparación de la muestra, la hibridación, etc.

Observadas las imágenes de cada uno de los arrays hibridados en el presente estudio y teniendo en cuenta los criterios de calidad (presencia de *spike controls* y relaciones 3'/5' de los genes *housekeeping*), los seis arrays superaron los criterios de calidad establecidos

12.3. Comparación de la Expresión Génica entre las Distintas Muestras

Como paso previo a la comparación de los arrays se llevó a cabo el escalado de los datos de cada uno de ellos, con el fin de minimizar las discrepancias debidas a variables tales como la preparación de la muestra, la hibridación, etc. Usando el software de Affymetrix GCOS 1.2, todos los arrays se escalaron definiendo como la intensidad media el valor arbitrario de 100. GCOS calcula la intensidad media de todo el array promediando los valores de intensidad de todos los sets de sondas a excepción del 2% de los valores con mayor y menor intensidad. Esa intensidad media es multiplicada por un factor de escalado que la convertirá en el valor definido por el usuario (en este caso 100). El factor de escalado de los arrays del mismo experimento debe ser próximo entre ellos (sin que el factor de escalado de un array sea superior a tres veces el de cualquiera de los otros) y cercano a 1 en la medida de lo posible.

Los factores de escalado aplicados a cada muestra de este experimento, indicados en la **Tabla 27**, estaban dentro de los límites establecidos por Affymetrix indicando la posibilidad de realizar comparaciones entre arrays y aportando fiabilidad a los resultados.

Se han realizado las comparaciones que se detallan a continuación utilizando el software GCOS, indicándose para cada caso en número de tabla donde se recogen los resultados (*ver CD adjunto...*):

| Comparaciones realizadas con el software GCOS 1.2 | Resultados recogidos en... |
|---|----------------------------|
| RL95-2-42hs [05SE872] vs RL95-2 [05SE868] | Tablas 28 A y B |
| JAR/G-42hs [05SE875] vs JAR/G [05SE871] | Tablas 29 A y B |
| HEC-1A [05SE869] vs RL95-2 [05SE868] | Tablas 30 A y B |
| JAR/G [05SE871] vs JAR [05SE870] | Tablas 31 A y B |

El análisis de la forma de las gráficas de dispersión con todos los puntos (gráficas denominadas *Completo*, ubicadas sobre la izquierda de la **Figura 45**) ha permitido corroborar la consistencia de los datos obtenidos ya que, en todos los casos se observa una distribución normal en forma de cohete (*rocket layout*) típica de los resultados de expresión génica, en los que un alto porcentaje de genes están expresándose a niveles muy bajos, apareciendo en el extremo inferior izquierdo de las gráficas, y a medida que la señal aumenta el número de transcritos baja de forma exponencial.

La distribución de los puntos en una segunda gráfica de dispersión (gráfica denominada *Selección*, ubicadas sobre la derecha en la **Figura 45**), en la que se han eliminado los puntos correspondientes a las sondas sin cambio, da una idea general del número de secuencias sobreexpresadas y reprimidas, así como de la tasa de cambio de éstas. En este sentido, cuanto más alejado esté el punto de la diagonal, mayor será la tasa de cambio.

Del análisis visual de estas gráficas de dispersión se desprende que las mayores diferencias de expresión se encontraron en las células RL95-2 co-cultivadas, siendo mucho menores para las células JAR/G co-cultivadas (puntos azules y rojos de las gráficas denominadas *Selección*).

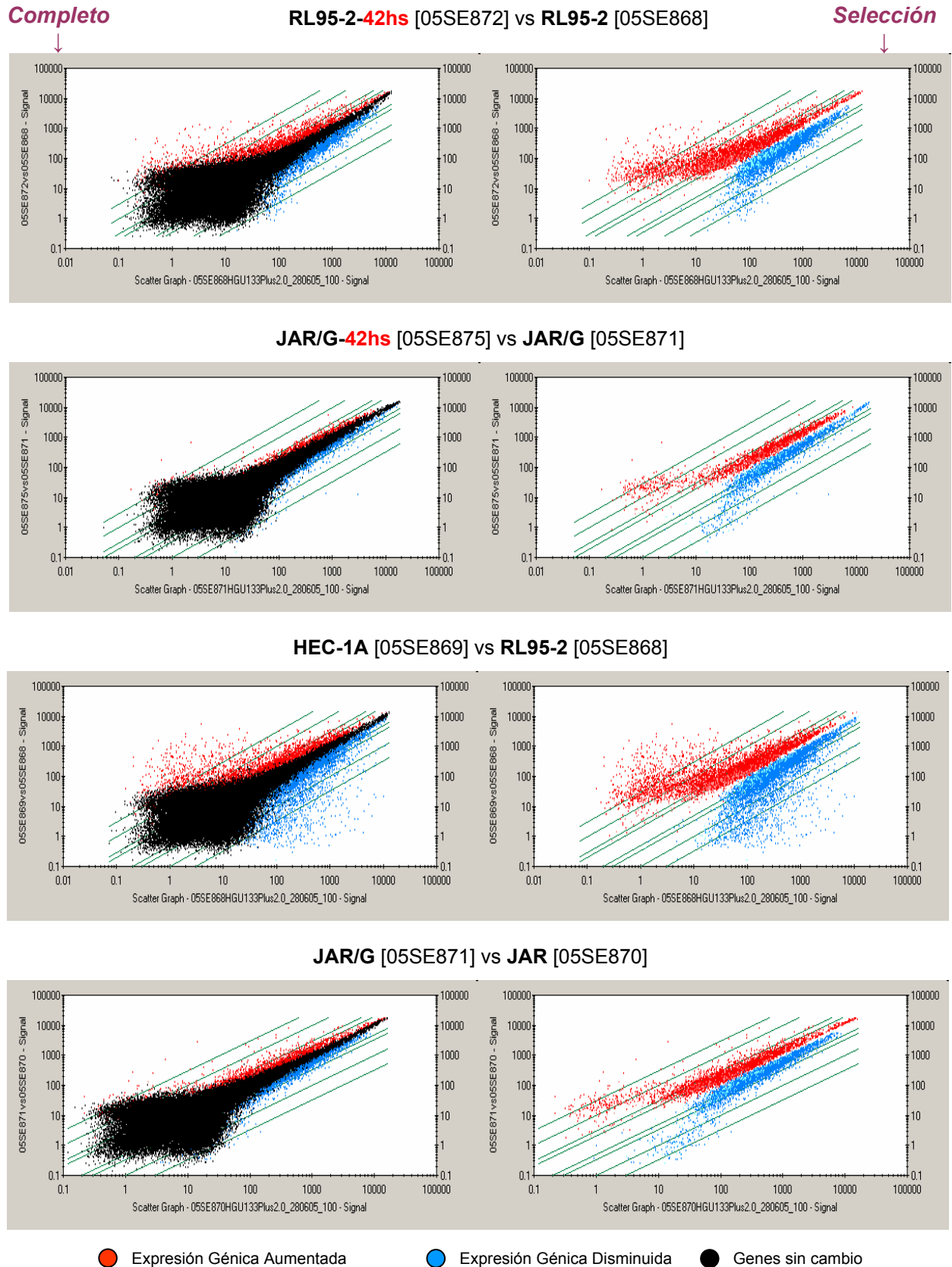


Figura 45. Análisis comparativo de la expresión génica global. A la izquierda se enseñan las gráficas de dispersión con todos los puntos (*Completo*) preparadas usando Affymetrix GCOS 1.2. A la derecha la distribución de los puntos pertenecientes a las secuencias sobreexpresadas y reprimidas (*Seleccionados*), en la que se han eliminado los puntos de las sondas sin cambio. Los genes representados en rojo indican sobreexpresión respecto a la línea base (*Increase* en rojo oscuro y *Marginal Increase* en rojo claro). Los genes representados en azul indican menor expresión respecto a la línea base (*Decrease* en azul oscuro y *Marginal Decrease* en azul claro). Las líneas verdes indican los valores de *fold change* para 2, 3, 10 y 30 veces de cambio.

De igual manera, el análisis de la dispersión de los puntos realizado al comparar los patrones de expresión de las células HEC-1A respecto a los de RL95-2 demostró las diferencias existentes entre estas dos líneas celulares endometriales cuyos comportamientos son diferentes frente a la adhesión de células trofoblásticas. Asimismo, la transducción de las células con el vector retroviral no afectó considerablemente el patrón de expresión de las células JAR, tal como se puede apreciar en la última grafica de dispersión (JAR/G vs JAR), donde los puntos se concentraron sobre la diagonal indicando una tasa de cambio muy baja.

Previo a la selección de los nuevos genes candidato, se analizó la correlación existente entre los datos de los niveles de expresión obtenidos con los microarrays y los obtenidos por RT-PCR cuantitativa para los genes que fueron pre-seleccionados y estudiados en la Sección II del capítulo de Resultados. Para ello se compararon las tasas de cambio determinadas con cada metodología y para cada gen. En la **Figura 46** se grafican para cada transcrito los valores correspondientes al cambio en los niveles de expresión producido a las 42 horas respecto al valor inicial medido a las 0 horas. Este cambio se expresó como el logaritmo en base dos (\log_2) de la relación muestra co-cultivada (RL95-2_42hs o JAR/G_42hs) respecto a la muestra control (RL95-2 o JAR/G).

Se comprobó una estrecha correlación entre los datos obtenidos por sendas metodologías, obteniéndose variaciones análogas de inhibición y sobreexpresión de los genes analizados, a excepción del gen PLA-1 cuyo patrón no se pudo verificar puesto que su secuencia no se encuentra recogida por ningún juego de sondas del array. En este último caso se comparó con Skn-1a, otro factor transcripcional de la misma familia POU2F3, con el propósito de intentar analizar y asignar un patrón hipotético similar.

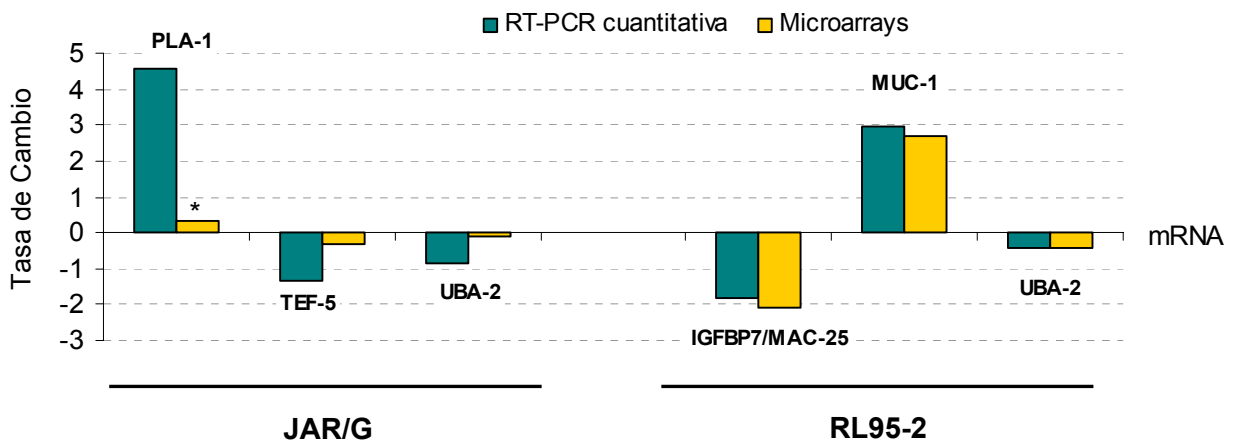


Figura 46. Comparación de las tasas de cambio de los genes PLA-1, TEF-5, UBA-2, IGFBP7/MAC-25 y MUC-1 a partir de los resultados obtenidos mediante el análisis por RT-PCR cuantitativa (Sistema LightCycler) y con los microarrays (Affymetrix). Tasa de cambio: \log_2 ($mRNA^{42hs}/mRNA^{0hs}$). * Sobreexpresión del factor transcripcional Skn-1a en el array.

La similitud o paralelismo establecido entre los resultados obtenidos para las reacciones de RT-PCR cuantitativas y los microarrays, en primer lugar confirmaron las variaciones en los niveles de expresión de mRNA descritas en la Sección II de Resultados y, en segundo lugar, indicaron la consistencia de los resultados obtenidos mediante los arrays, garantizando en cierto modo un correcto análisis posterior de los datos.

12.4. Selección de los Mejores Genes Candidatos

Para la elección de los genes candidatos que inicialmente se estudiarían se siguieron los criterios de análisis y selección detallados en el apartado 9.3 del capítulo Materiales y Métodos, basados fundamentalmente en que en los estudios de expresión génica los genes más interesantes son los que se sobreexpresan o reprimen en una muestra respecto a otra muestra que se elige como línea base y que normalmente corresponde a la muestra control.

12.4.1. Resultados de la Comparación RL95-2_42hs vs. RL95-2 Control

Como resultado de esta comparación se obtuvieron 721 juegos de sondas sobreexpresadas con una tasa de cambio ≥ 3 (incremento de 8 veces respecto al nivel control), seleccionándose sólo los 185 juegos de sondas cuya tasa de cambio fue ≥ 5 (incremento de 32 veces), las cuales correspondieron a 173 genes diferentes (■ **Tabla 28.A**). De igual manera, se seleccionaron aquellas sondas reprimidas con un valor absoluto de tasa de cambio ≥ -3 (disminución de 8 veces respecto al control), es decir 100 juegos de sondas que correspondieron a 94 genes distintos (■ **Tabla 28.B**).

De todos estos genes, resultan especialmente interesantes y serán candidatos para los primeros estudios, por su posible implicación en las fases iniciales de la adhesión celular, las integrinas alfa 1 (ITGA1; tasa de cambio: **+6**), alfa 5 (ITGA5; **+5**) y alfa 4 (ITGA4, no enseñada en tabla; **+4,5**), cuyas variaciones fueron significativas respecto a otras integrinas, tales como alfa 2b (ITGA2B; **+1,7**), alfa E (ITGAE; **-1,4**), alfa 3 (ITGA3; **-0,9**), alfa 6 (ITGA6; **-0,8**), beta 5 (ITGB5; **-0,5**) o beta 8 (ITGB8; **-0,5**). También serán objeto de estudio la metaloproteasa de matriz 2 (MMP2; **+6,9**), y el gen homeo box A9 implicado en desarrollo (HOXA9; **-3,5**), éste último por estar considerablemente reprimido en células HEC-1A (tasa de cambio **-6.1**) respecto a RL95-2, tal como se indica más adelante en el apartado **12.4.3**.

12.4.1.1. Análisis y Comprobación de Genes Candidatos por Inmunofluorescencia

Se analizaron por microscopía óptica confocal (Zeiss LSM 510 Meta) los patrones e intensidades de fluorescencia de las integrinas $\alpha 1$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$ en células endometriales RL95-2 control (0 horas) y células que fueron co-cultivadas durante 42 horas con JAR/G y separadas por citometría de flujo, tal como se describió en **8.1 (Figura 10, etapa 7c)**. Para ello, las células pre y post interacción se incubaron directamente con sobrenadantes de transfectantes o ascitis (dilución 1/1.000) conteniendo los respectivos anticuerpos: anti $\alpha 1$ (TS 2/7), anti $\alpha 4$ (HP 2/4 y HP 1/7) y anti $\alpha 5$ (P1D6), todos ellos cedidos gentilmente por en Dr. Francisco Sanchez-Madrid. Como anticuerpo secundario se empleó Alexa 488 contra ratón diluido 1/100 (Invitrogen), y To-pro-3 a una dilución 1/1.000 para la tinción de los núcleos.

Se observó en todos los casos un incremento de las intensidades de fluorescencia en la membrana citoplasmática de las células endometriales RL95-2 como consecuencia de la interacción durante 42 horas con células trofoblásticas JAR/G (**Figura 47.A, B y C**). Asimismo, en el caso de la integrina alfa 4 se detectó la formación de agregados o cúmulos de proteína en la zona de la membrana citoplasmática, tal como se puede apreciar en los cortes basal (I) y meridional (II) de la **figura 47.B**.

El análisis realizado por Western Blot arrojó resultados similares, confirmando la correlación existente entre las variaciones observadas a nivel mRNA (microarrays) y su correspondiente proteína.

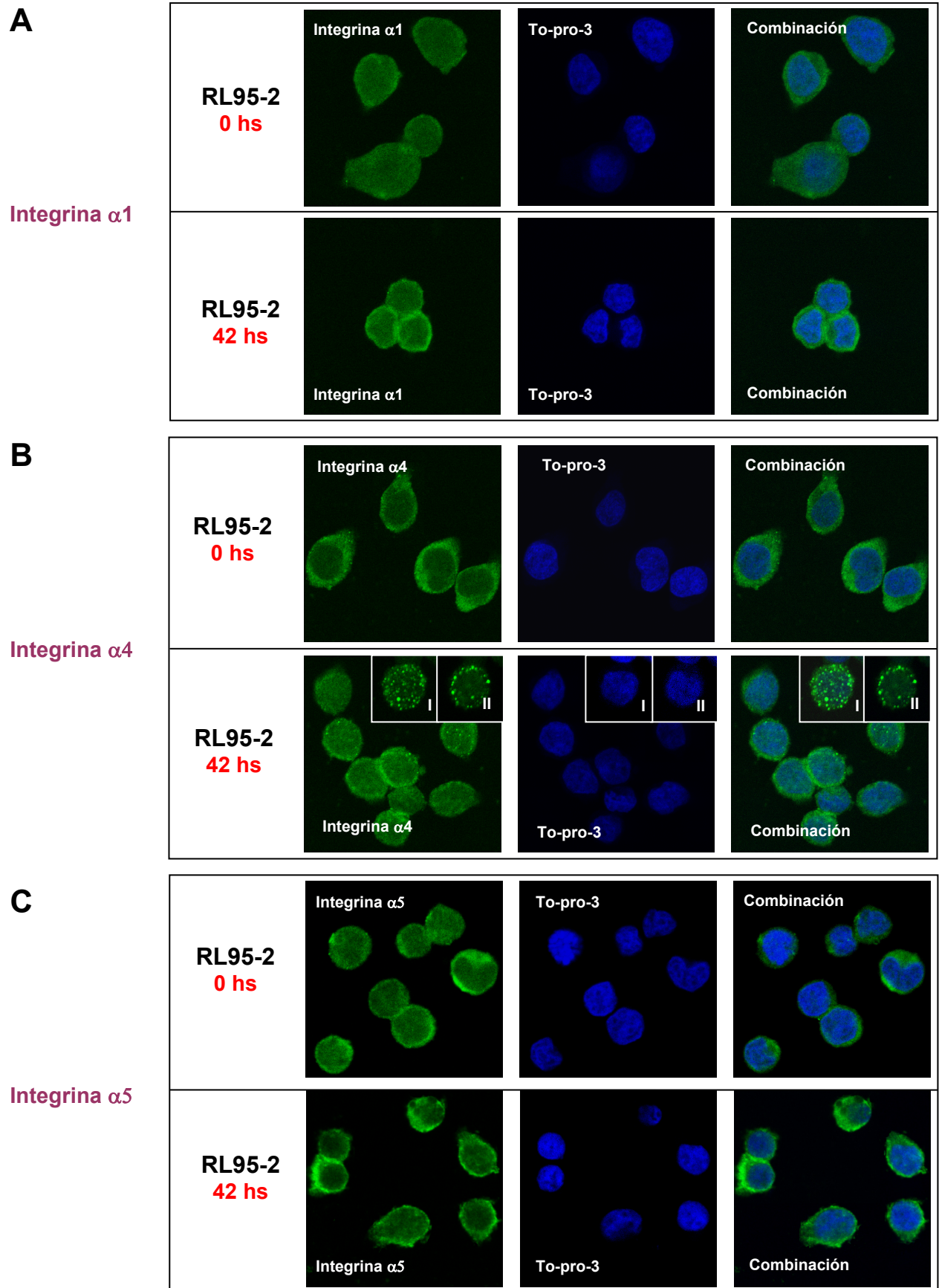


Figura 47. Microscopía óptica confocal de las integrinas $\alpha 1$ (A), $\alpha 4$ (B) y $\alpha 5$ (C) en células endometriales RL95-2 control (0 hs) y post co-cultivo (durante 42) con células trofoblásticas JAR/G. En (B) se enseña además un plano basal (I) y otro meridional (II) de una célula, donde se aprecian los cúmulos de proteína en la membrana citoplasmática. Imágenes con Objetivo 63X y zoom 2X.

12.4.2. Resultados de la Comparación JAR/G_42hs vs. JAR/G Control

Las variaciones de expresión en células JAR/G producidas durante el co-cultivo de 42 horas con células RL95-2 fueron escasas, tal como se pudo observar en la gráfica de dispersión denominada *Selección* de la **Figura 45** (fila 2), donde los puntos se alinearon cercanos a la diagonal, indicando una tasa de cambio baja. Se obtuvieron sólo 67 juegos de sondas sobreexpresadas con una tasa de cambio ≥ 3 (incremento de al menos 8 veces respecto al control sin interacción), que correspondieron a 65 genes diferentes (■ **Tabla 29.A**). Asimismo, resultaron reprimidos 56 juegos de sondas con un valor absoluto de tasa de cambio ≥ -3 , correspondientes a 54 genes diferentes (■ **Tabla 29.B**).

De todos ellos, resulta de especial interés para futuros estudios el gen PAPP-A (Proteína Plasmática Asociada al Embarazo), sobreexpresado con una tasa de cambio de **4,4** en el array, el cual ya había sido estudiado previamente por RT-PCR semicuantitativa en la Sección II de Resultados, no observándose en tal oportunidad una expresión diferencial de mRNA, pero sí obteniéndose un tamaño de amplicón menor, distinto al teórico predicho por análisis bioinformático. La clonación y secuenciación del mismo demostró ser una variante alternativa de corte y empalme (*splicing*) del mRNA de este gen.

Otros genes candidato a ser estudiados son la proteína ligadora de factores de crecimiento de tipo insulina 3 (IGFBP3; tasa de cambio: **+8**) y los numerosos juegos de sondas que se sobreexpresaron o reprimieron, y que corresponden a genes, mRNAs/cDNAs clonados y proteínas hipotéticas desconocidas que no han sido estudiados hasta el momento.

12.4.3. Análisis de los Resultados de la Comparación HEC-1A vs. RL95-2

En este caso, al tratarse de la comparación de dos líneas celulares endometriales diferentes, el número de genes sobreexpresados y reprimidos, así como la tasa de cambio, fueron considerablemente mayores tal como se pudo apreciar en las gráficas de dispersión en la **Figura 45** (fila 3). Se obtuvieron 892 juegos de sondas sobreexpresadas, con una tasa de cambio ≥ 3 (incremento de 8 veces). De todas ellas, 317 sondas presentaron una tasa ≥ 5 (incremento de al menos 32 veces) y 168 juegos de sondas un valor de tasa de cambio ≥ 6 (incremento de 64 veces). Estas 168 sondas últimas correspondieron a 136 genes diferentes (■ **Tabla 30.A**). De la misma manera, el análisis de las sondas reprimidas indicó la presencia de 780 juegos de sondas con un valor absoluto de tasa de cambio ≥ -3 (disminución de al menos 8 veces), siendo la tasa de 268 de ellas ≥ -5 (disminución de al menos 32 veces) y ≥ -6 (disminución de al menos 64 veces) para 142 juegos de sondas, correspondientes estos últimos a 124 genes diferentes (■ **Tabla 30.B**).

Los genes candidatos a ser estudiados por su posible importancia en la implantación (ventana de implantación) son el gen de la proteína ligadora de factor de crecimiento de tipo insulina 6 (IGFBP6; tasa de cambio: **+6,3**), sobreexpresado en células endometriales “no adherentes” HEC-1A respecto a células “adherentes” RL95-2. Además son de especial interés los genes reprimidos, es decir, aquellos que están presentes en células RL95-2 (durante la ventana de implantación) y reprimidos en células HEC-1A (fuera de la ventana de implantación), tales como gen específico de placenta 8 (PLAC8; **-7,4**), la glicoproteína 6 beta-1 específica del embarazo (PSG6; **-6,4**), la distonina (DST; **-6,1**), el inhibidor 3 de unión al DNA-proteína HLH (ID3; **-7,6**), genes homeo box D13 y A9 involucrados en el desarrollo (HOXD13; **-6,6** y HOXA9; **-6,1**), así como otros no estudiados o actualmente desconocidos.

En la **Tabla 32** (■) se enseñan los genes sobreexpresados y reprimidos comunes a las tablas comparativas RL95-2_42hs vs. RL95-2 y HEC-1A vs. RL95-2, observándose una estrecha correlación entre sendas tasas de cambio obtenidas a partir de cada comparación. Los datos sugieren que una vez adheridas las células JAR/G sobre las células RL95-2, éstas últimas adquieren patrones de expresión para estos genes similares a los mostrados por las células endometriales “no adherentes” HEC-1A.

12.4.4. Análisis de los Resultados de la Comparación JAR/G vs. JAR

La inclusión de este último array se realizó para evaluar el grado de modificación genómica producido en las células JAR como consecuencia de la inserción del transgen EGFP empleando sistemas de transferencia génica retroviral. Fijando ± 3 como límite de la tasa de cambio (correspondiente a una variación de 8 veces respecto al control) se obtuvieron resultados de sobreexpresión para 123 juegos de sondas de las 54.674 contenidas en el array, correspondientes a 118 genes (■ **Tabla 31.A**). De igual manera, tan solo 48 juegos de sondas mostraron represión respecto al control, correspondiendo a 48 genes (■ **Tabla 31.B**). Ninguno de estos genes parecieran estar implicados directamente en el proceso de adhesión celular, sugiriendo que las células JAR/G constituyen un excelente sistema para evaluar adhesión y expresión génica en el modelo trofoblasto-endometrio desarrollado en este trabajo.

Tabla 28.A. Genes sobreexpresados en células epiteliales endometriales RL95-2 por interacción durante 42 horas con células trofoblásticas JAR/G.

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|-------------|--|-----------|--|----------------|----------|
| 1555623_at | dermal papilla derived protein 12 | DERP12 | | 10,1 | 0,000027 |
| 215440_s_at | brain expressed X-linked-like 1 | BEXL1 | | 9,3 | 0,00002 |
| 212077_at | caldesmon 1 | CALD1 | contracción y desarrollo muscular; unión actina, troponina C, calmodulina, miosina y tropomiosina; citoesqueleto | 9,1 | 0,00002 |
| 229390_at | hypothetical protein LOC441168 | LOC441168 | | 8,9 | 0,000346 |
| 209122_at | adipose differentiation-related protein | ADFP | región extracelular y retículo endoplásmico | 8,8 | 0,00002 |
| 209243_s_at | paternally expressed 3 | PEG3 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | 8,7 | 0,00002 |
| 213764_s_at | microfibrillar associated protein 5 | MFAP5 | componente estructural de la matriz extracelular | 8,7 | 0,00003 |
| 229349_at | FLJ16517 protein | FLJ16517 | regulación transcripcional DNA-dependiente; unión al DNA | 8,7 | 0,00002 |
| 1556395_at | Full length insert cDNA clone YB44H10 | | | 8,6 | 0,000241 |
| 201809_s_at | endoglin (Osler-Rendu-Weber syndrome 1) | ENG | adhesión celular; circulación; organogénesis; memb. plasm. | 8,6 | 0,00003 |
| 203184_at | fibrillin 2 (congenital contractural arachnodactyly) | FBN2 | morfogénesis; componente estructural de matriz extracelular | 8,4 | 0,00002 |
| 227705_at | transcription elongation factor A (SII)-like 7 | TCEAL7 | factor con actividad de elongación en la transducción | 8,4 | 0,000023 |
| 202620_s_at | procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 | PLOD2 | modificación y metabolismo proteico; retículo endoplásmico | 8 | 0,00002 |

Ver Tabla Completa en CD adjunto...

Tabla 28.B. Genes reprimidos en células epiteliales endometriales RL95-2 por interacción durante 42 horas con células trofoblásticas JAR/G.

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|-------------|---|----------|--|----------------|----------|
| 228955_at | Homo sapiens, clone IMAGE:4753714, mRNA | | | -6,3 | 0,999954 |
| 242625_at | radical S-adenosyl methionine domain containing 2 | RSAD2 | actividad catalítica; unión de iones hierro | -6,1 | 0,999727 |
| 232024_at | GTPase, IMAP family member 2 | GIMAP2 | unión a nucleótidos y a GTP; componente de membrana | -5,7 | 0,999954 |
| 213479_at | neuronal pentraxin II | NPTX2 | transmisión sináptica; unión a calcio y azúcares | -5,2 | 0,999611 |
| 233858_at | cDNA FLJ10149 fis, clone HEMBA1003380 | | | -5,2 | 0,998168 |
| 236029_at | FAT tumor suppressor homolog 3 (Drosophila) | FAT3 | adhesión celular homofílica; ; unión a calcio; membrana | -5,2 | 0,99994 |
| 221417_x_at | endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 8 | EDG8 | transducción de señal; receptor de lisoesfingolípidos y ácido lisofosfatídico; componente de membrana | -5,1 | 0,99998 |
| 203144_s_at | KIAA0040 | KIAA0040 | | -5 | 0,999922 |
| 217173_s_at | low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia) | LDLR | glicosilación; metabolismo-transporte de lípidos (colesterol) y esteroides; endocitosis; membrana plasmática | -5 | 0,99998 |
| 204457_s_at | growth arrest-specific 1 | GAS1 | arresto ciclo celular (fase S) y proliferación; membrana | -4,5 | 0,99998 |
| 221011_s_at | likely ortholog of mouse limb-bud and heart gene | LBH | | -4,5 | 0,999654 |

Ver Tabla Completa en CD adjunto...

Tabla 29.A. Genes sobreexpresados en células trofoblásticas JAR/G por interacción durante 42 horas con células epiteliales endometriales RL95-2.

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|---|----------|---|----------------|----------|
| 202286_s_at | tumor-associated calcium signal transducer 2 | TACSTD2 | receptor de superficie celular ligado a transducción de señal; proliferación celular; percepción visual; citosol | 8,3 | 0,000052 |
| 210095_s_at | insulin-like growth factor binding protein 3 | IGFBP3 | regulación del crecimiento celular; inductor apoptosis y diferenciación del mioblasto; unión IGF; región extracelular | 8 | 0,000023 |
| 226228_at | aquaporin 4 | AQP4 | transporte; neurogénesis; excreción; membrana | 5,7 | 0,000241 |
| 214618_at | CASP8 and FADD-like apoptosis regulator | CFLAR | proteólisis y peptidólisis; anti-apoptosis; regulación positiva de cascada I-kappaB kinasa/NF-kappaB; actividad caspasa | 5,5 | 0,001201 |
| 219965_s_at | PDZ domain containing, X chromosome | FLJ21687 | unión de proteínas | 5,4 | 0,000078 |
| 1557046_x_at | cDNA FLJ33508 fis, clone BRAMY2005094 | | | 5,3 | 0,001486 |
| 208245_at | RAB9, member RAS oncogene family, pseudogene 1 | RAB9P1 | | 5,2 | 0,000307 |
| 217120_s_at | cofactor required for Sp1 transcriptional activation, subunit 2, 150kDa | CRSP2 | regulación transcripción sobre promotor RNA polimerasa II; ruta de señalización del receptor de andrógenos; | 5,2 | 0,000147 |
| 1558508_a_at | chromosome 1 open reading frame 53 | C1orf53 | | 5,1 | 0,001486 |
| 201008_s_at | thioredoxin interacting protein | TXNIP | | 5,1 | 0,000438 |

Ver Tabla Completa en CD adjunto...

Tabla 29.B. Genes reprimidos en células trofoblásticas JAR/G por interacción durante 42 horas con células epiteliales endometriales RL95-2.

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|-------------|---|---------|--|----------------|----------|
| 1555623_at | dermal papilla derived protein 12 | DERP12 | | -7,7 | 0,99998 |
| 238391_at | SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2 | SMURF2 | catabolismo proteico dependiente de ubiquitina; regulador negativo de la transcripción y del receptor TGFβ; núcleo | -5,7 | 0,999922 |
| 211179_at | runt-related transcription factor 1 (acute myeloid leukemia 1; aml1 oncogene) | RUNX1 | regulación transcripcional DNA-dependiente; activador de la RNA polimerasa II; desarrollo; núcleo | -5,3 | 0,998923 |
| 233847_x_at | Uncharacterized gastric protein ZA31P | | | -5,3 | 0,999886 |
| 211427_s_at | potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13 | KCNJ13 | transporte de iones potasio; complejo de canales de potasio operados por voltaje; membrana | -5,2 | 0,999906 |
| 1567703_at | Human oral cancer candidate gene, clone T9, 3 end | | | -4,9 | 0,999932 |
| 206797_at | N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase) | NAT2 | metabolismo; actividad arilamina N-acetil transferasa | -4,9 | 0,99998 |
| 244517_x_at | Ring finger protein 146 | RNF146 | ubiquitinación proteica; unión de iones metálicos | -4,9 | 0,998799 |
| 224354_at | gastric-associated differentially-expressed protein | YA61P | | -4,8 | 0,99998 |
| 209904_at | troponin C, slow | TNNC1 | desarrollo muscular; unión a calcio; | -4,6 | 0,999954 |
| 230462_at | numb homolog (Drosophila) | NUMB | desarrollo; componente de membrana plasmática | -4,6 | 0,999611 |

Ver Tabla Completa en CD adjunto...

Tabla 30.A. Genes sobreexpresados en células epiteliales endometriales “no adherentes” HEC-1A respecto a células endometriales “adherentes” RL95-2.

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|-------------|--|----------|---|----------------|---------|
| 219564_at | potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 16 | KCNJ16 | transporte iones potasio; canales de potasio regulados por voltaje; membrana | 11,8 | 0,00002 |
| 209875_s_at | secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1) | SPP1 | osificación; anti-apoptosis; señalización y adhesión celular; quimiotaxis células inmunes T-helper 1; diferenciación células mieloides; activador proliferación células T; regulador negativo mineralización del hueso; matriz extracelular | 10,5 | 0,00002 |
| 227803_at | ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 5 (putative function) | ENPP5 | metabolismo nucleótidos; actividad hidrolasa; componente de membrana | 10,2 | 0,00002 |
| 212077_at | caldesmon 1 | CALD1 | contracción y desarrollo muscular; unión a actina, miosina, tropomiosina y calmodulina; citoesqueleto | 10,1 | 0,00002 |
| 203324_s_at | caveolin 2 | CAV2 | componente de membrana (membrana caveolar) | 9,9 | 0,00002 |
| 205625_s_at | calbindin 1, 28kDa | CALB1 | unión a Vitamina D, calcio y proteínas; | 9,8 | 0,00002 |
| 202833_s_at | serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1 | SERPINA1 | respuesta a la fase aguda; inhibidor de endopeptidasas de tipo serina; unión a proteínas; región extracelular | 9,7 | 0,00002 |
| 203716_s_at | dipeptidylpeptidase 4 (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2) | DPP4 | proteólisis y peptidólisis; respuesta inmune; actividad aminopeptidasa; membrana | 9,7 | 0,00002 |

Ver Tabla Completa en CD adjunto...

Tabla 30.B. Genes reprimidos en células epiteliales endometriales “no adherentes” HEC-1A respecto a células endometriales “adherentes” RL95-2.

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|-------------|---|-----------|---|----------------|----------|
| 209604_s_at | GATA binding protein 3 | GATA3 | regulación transcripcional; percepción sonidos; morfogénesis; respuesta de defensa; núcleo | -11 | 0,99998 |
| 200953_s_at | cyclin D2 | CCND2 | regulación ciclo celular (división); núcleo | -10,6 | 0,99998 |
| 219529_at | chloride intracellular channel 3 | CLIC3 | transporte; canales ion cloro regulados por voltaje; memb. | -10,4 | 0,99998 |
| 210397_at | defensin, beta 1 | DEFB1 | respuesta inmune innata a patógenos, bacterias y parásitos | -10,2 | 0,99998 |
| 227361_at | heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3B1 | HS3ST3B1 | | -10 | 0,999977 |
| 203571_s_at | chromosome 10 open reading frame 116 | C10orf116 | | -9,9 | 0,99998 |
| 201147_s_at | tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory) | TIMP3 | ruta señalización receptor transmembrana tirosina kinasa; percepción visual; inducción apoptosis; matriz extracelular | -9,6 | 0,99998 |
| 225710_at | cDNA FLJ34013 fis, clone FCBBF2002111 | | | -9,5 | 0,99998 |
| 218454_at | hypothetical protein FLJ22662 | FLJ22662 | | -9,4 | 0,99997 |
| 201008_s_at | thioredoxin interacting protein | TXNIP | | -9,3 | 0,99998 |
| 203535_at | S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B) | S100A9 | respuesta inflamatoria; transducción señal; espacio extracel. | -9,3 | 0,99998 |

Ver Tabla Completa en CD adjunto...

Tabla 31.A. Genes sobreexpresados en células trofoblásticas JAR/G como consecuencia de la transducción con retrovirus de las células JAR.

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|-------------|---|----------|---|----------------|----------|
| 1555623_at | dermal papilla derived protein 12 | DERP12 | | 7,7 | 0,00002 |
| 233822_x_at | uncharacterized gastric protein YC12P | LOC57400 | aminoacilación de seril-tRNA | 7,1 | 0,000101 |
| 224354_at | gastric-associated differentially-expressed protein | YA61P | | 6,7 | 0,000078 |
| 212706_at | RAS p21 protein activator 4 | RASA4 | cascada de señalización intracelular; activador GTPasa | 6,3 | 0,000068 |
| 233847_x_at | Uncharacterized gastric protein ZA31P | | | 6,2 | 0,00002 |
| 217388_s_at | kynureninase (L-kynurenine hydrolase) | KYNU | catabolismo del triptofano; biosíntesis de NAD; citoplasma | 6,1 | 0,000046 |
| 241345_at | zinc finger protein 265 | ZNF265 | corte y empalme (<i>splicing</i>) de RNA; núcleo | 6,1 | 0,000692 |
| 1559147_at | cDNA: FLJ23328 fis, clone HEP12645 | | | 6 | 0,001336 |
| 220132_s_at | C-type lectin superfamily 2, member D | CLEC2D | transducción de señal; unión de azúcares; membrana | 5,9 | 0,000865 |
| 239725_at | GPI deacylase | PGAP1 | actividad catalítica | 5,9 | 0,000189 |
| 203108_at | G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A | GPRC5A | receptor asociado a proteína G para la transducción de señales; membrana plasmática | 5,7 | 0,000552 |
| 217578_at | Exportin 1 (CRM1 homolog, yeast) | XPO1 | importación proteica al núcleo; poro nuclear, nucleoplasma | 5,5 | 0,00002 |
| 237278_x_at | ATPase, Ca++ transporting, type 2C, member 1 | ATP2C1 | transporte de cationes y homeostasis; metabolismo; Golgi | 5,5 | 0,000147 |

Ver Tabla Completa en CD adjunto...

Tabla 31.B. Genes reprimidos en células trofoblásticas JAR/G, modificados como consecuencia de la transducción con retrovirus de las células JAR.

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|-------------|---|-----------|--|----------------|----------|
| 224924_at | tetratricopeptide repeat domain 7A | TTC7A | | -5,2 | 0,999135 |
| 207780_at | cylicin, basic protein of sperm head cytoskeleton 2 | CYLC2 | espermatogénesis y diferenciación celular; componente estructural del citoesqueleto | -5 | 0,99775 |
| 241784_x_at | DNA helicase HEL308 | HEL308 | actividad helicasa dependiente de ATP; | -5 | 0,998168 |
| 236896_at | Transcribed locus | | | -4,9 | 0,998923 |
| 231967_at | PHD finger protein 20-like 1 | PHF20L1 | regulación de la transcripción DNA-dependiente | -4,8 | 0,999508 |
| 244467_at | LOC440829 | LOC440829 | | -4,7 | 0,999508 |
| 1569690_at | hypothetical protein LOC339834 | LOC339834 | | -4,5 | 0,998923 |
| 209739_s_at | patatin-like phospholipase domain containing 4 | PNPLA4 | metabolismo lipídico | -4,5 | 0,999973 |
| 204824_at | endonuclease G | ENDOG | metabolismo del DNA; actividad hidrolasa y endonucleasa | -4,4 | 0,999973 |
| 242857_at | FERM, RhoGEF and pleckstrin domain protein 2 | FARP2 | proteína de unión del citoesqueleto | -4,4 | 0,998664 |
| 205259_at | nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2 | NR3C2 | regulación de la transcripción; receptor de hormonas esteroideas; componente celular nuclear | -4,3 | 0,998514 |

Ver Tabla Completa en CD adjunto...

Tabla 32. Genes sobreexpresados y reprimidos comunes entre las comparativas de datos totales **RL95-2_42hs vs. RL95-2** y **HEC-1A vs. RL95-2**. (Incluye datos de **Tablas 28.A+B vs Tablas 30.A+B**).

| # Sonda | Símbolo | Tasa de Cambio | | # Sonda | Símbolo | Tasa de Cambio | | # Sonda | Símbolo | Tasa de Cambio | |
|--------------|----------|----------------|---------|--------------|-----------|----------------|---------|--------------|-----------|----------------|---------|
| | | R_42h vs. R | H vs. R | | | R_42h vs. R | H vs. R | | | R_42h vs. R | H vs. R |
| 244567_at | --- | 11,8 | 11,7 | 244359_s_at | --- | 5,3 | 4 | 219658_at | PTCD2 | 4,2 | 3,7 |
| 212077_at | CALD1 | 9,1 | 10,1 | 1560926_at | PPP4R2 | 5,3 | 3,7 | 232125_at | --- | 4,2 | 5,8 |
| 215028_at | SEMA6A | 7,9 | 4,7 | 54632_at | THADA | 5,2 | 5,6 | 1569523_a_at | LAT1-3TM | 4,2 | 3,2 |
| 1569110_x_at | PDCD6 | 7,9 | 9,3 | 225911_at | LOC255743 | 5,2 | 6,5 | 201313_at | ENO2 | 4,1 | 3,5 |
| 237456_at | RYBP | 7,2 | 4,1 | 226851_at | LYPLAL1 | 5,2 | 6,8 | 229363_at | --- | 4 | 3,5 |
| 244532_x_at | --- | 7,1 | 6,9 | 229454_at | BCLAF1 | 5,2 | 4,1 | 240304_s_at | TMC5 | 4 | 3,5 |
| 201616_s_at | CALD1 | 7 | 8,1 | 230789_at | SUHW2 | 5,2 | 6 | 206239_s_at | SPINK1 | 3,9 | 4,8 |
| 209448_at | HTATIP2 | 7 | 8,8 | 1562472_at | --- | 5,1 | 5,6 | 243993_at | PCTK2 | 3,9 | 3,2 |
| 239162_at | DAPK1 | 6,9 | 6,9 | 210517_s_at | AKAP12 | 5 | 3,5 | 208510_s_at | PPARG | 3,8 | 4,6 |
| 205234_at | SLC16A4 | 6,8 | 5,6 | 216189_at | --- | 5 | 6,9 | 234628_at | RAB28 | 3,8 | 3,7 |
| 1554690_a_at | TACC1 | 6,8 | 4,8 | 222139_at | KIAA1466 | 5 | 4,6 | 217254_s_at | EPO | 3,6 | 3,5 |
| 207052_at | HAVCR1 | 6,4 | 6,7 | 230174_at | LYPLAL1 | 5 | 4,9 | 203717_at | DPP4 | 3,5 | 8,1 |
| 243303_at | ECHDC1 | 6,4 | 5,4 | 234082_at | --- | 5 | 6,2 | 205122_at | TMEFF1 | 3,5 | 3,3 |
| 222931_s_at | THNSL1 | 6,3 | 6,9 | 244010_at | MLL3 | 5 | 4,2 | 204291_at | ZNF518 | 3,4 | 4,1 |
| 226145_s_at | FRAS1 | 6,3 | 9,2 | 201628_s_at | RRAGA | 4,9 | 5,7 | 214724_at | DIXDC1 | 3,4 | 4,4 |
| 242794_at | MAML3 | 6,3 | 4,6 | 213067_at | MYH10 | 4,9 | 5,5 | 1558444_at | --- | 3,4 | 3 |
| 242814_at | SERPINB9 | 6,3 | 3,2 | 220399_at | FLJ22639 | 4,9 | 3,9 | 228030_at | RBM6 | 3,3 | 3,8 |
| 230337_at | SOS1 | 6,2 | 5,3 | 225166_at | ARHGAP18 | 4,9 | 3,5 | 229178_at | LOC145786 | 3,3 | 3,2 |
| 203695_s_at | DFNA5 | 6,1 | 3,8 | 244042_x_at | --- | 4,9 | 4,8 | 205749_at | CYP1A1 | 3,2 | 4,6 |
| 204416_x_at | APOC1 | 6,1 | 3,6 | 244114_x_at | --- | 4,9 | 4,1 | 1556294_at | --- | 3,2 | 4,3 |
| 1555146_at | ATF2 | 6,1 | 4,3 | 1565800_x_at | --- | 4,9 | 4,1 | 215034_s_at | TM4SF1 | 3,2 | 6,8 |
| 1559147_at | --- | 6,1 | 7,1 | 206018_at | FOXG1B | 4,9 | 5,1 | 202998_s_at | LOXL2 | 3 | -3 |
| 242708_at | PEX1 | 6,1 | 3,7 | 229602_at | --- | 4,8 | 4,8 | 206043_s_at | KIAA0703 | 3 | 3,1 |
| 234084_x_at | DUSP24 | 5,9 | 5,4 | 203716_s_at | DPP4 | 4,8 | 9,7 | 208716_s_at | LOC54499 | 3 | 6 |
| 240758_at | CENTG2 | 5,9 | 4,9 | 203963_at | CA12 | 4,8 | 6,8 | 215761_at | DMXL2 | 3 | 3,1 |
| 243709_at | FLJ90709 | 5,9 | 4,6 | 211478_s_at | DPP4 | 4,8 | 9,5 | 222128_at | --- | 3 | 3,6 |
| 209723_at | SERPINB9 | 5,8 | 6,9 | 224367_at | BEX2 | 4,8 | 7,2 | 224723_x_at | LOC401397 | 3 | 4,8 |
| 214164_x_at | CA12 | 5,8 | 7,5 | 224819_at | TCEAL8 | 4,7 | 7,2 | 213479_at | NPTX2 | -5,2 | -4,6 |
| 239954_at | ZNF160 | 5,8 | 4 | 213787_s_at | EBP | 4,7 | 8,4 | 236029_at | FAT3 | -5,2 | -5,8 |
| 242343_x_at | ZNF518 | 5,8 | 5 | 214235_at | CYP3A5 | 4,7 | 8,3 | 221417_x_at | EDG8 | -5,1 | -8,1 |
| 204437_s_at | FOLR1 | 5,6 | 5,9 | 226707_at | PP3856 | 4,7 | 6 | 233743_x_at | EDG8 | -4,6 | -5,2 |
| 207326_at | BTC | 5,6 | 4,8 | 233479_at | PGAP1 | 4,7 | 4,4 | 204457_s_at | GAS1 | -4,5 | -4,3 |
| 224443_at | MGC14801 | 5,6 | 8,6 | 244132_x_at | ZNF518 | 4,6 | 4 | 229901_at | ZNF488 | -4,4 | -5,4 |
| 230563_at | RASGEF1A | 5,6 | 8,3 | 208613_s_at | FLNB | 4,5 | 5,5 | 225016_at | APCDD1 | -4,3 | -4,8 |
| 237381_at | --- | 5,6 | 4,9 | 208614_s_at | FLNB | 4,4 | 4,8 | 1554127_s_at | MSRB3 | -4,1 | -6,1 |
| 1556049_at | RTN4 | 5,5 | 3,2 | 203303_at | TCTE1L | 4,4 | 6,9 | 214595_at | KCNG1 | -4 | -3,3 |
| 1558759_s_at | CLASP2 | 5,5 | 4 | 204508_s_at | CA12 | 4,4 | 6,6 | 224184_s_at | BOC | -3,8 | -4 |
| 207837_at | RBPMS | 5,4 | 3,7 | 213109_at | --- | 4,4 | 5,4 | 204664_at | ALPP | -3,6 | -3,9 |
| 213796_at | SPRR1A | 5,4 | 4,1 | 223449_at | SEMA6A | 4,4 | 3,6 | 209905_at | HOXA9 | -3,5 | -6,1 |
| 219288_at | C3orf14 | 5,4 | 5,9 | 240801_at | C21orf37 | 4,4 | 4,1 | 225782_at | --- | -3,3 | -3,9 |
| 223294_at | CXorf26 | 5,4 | 7,7 | 1552482_at | RAPH1 | 4,3 | 3,7 | 223843_at | SCARA3 | -3,1 | -3,6 |
| 225660_at | SEMA6A | 5,4 | 3,6 | 217564_s_at | CPS1 | 4,2 | 6,8 | 219522_at | FJX1 | -3 | -3,5 |
| 1560066_at | --- | 5,3 | 7,1 | | | | | | | | |

Discusión



13. Receptividad Endometrial e Implantación Embrionaria

La implantación de embriones en humanos es un proceso complejo y específico mediante el cual el blastocisto entra en contacto con la superficie del epitelio endometrial materno, condicionando el éxito de la implantación a que lo haga dentro de un período de tiempo concreto denominado “ventana de implantación”. Durante este período, comprendido entre los días 5 y 9 posteriores a la ovulación, el endometrio se vuelve funcionalmente receptivo para el embrión, teniendo lugar una serie de transformaciones estructurales, morfológicas y moleculares (Psychoyos, 1986). En general, la implantación embrionaria humana representa un área de conocimiento en la que existen pocos estudios, y que aportan datos no contrastados. Actualmente no se dispone de información fiable y completa sobre el comportamiento de los diferentes factores moleculares que intervienen en el proceso o de cómo estos interaccionan. Además, resulta difícil interpretar muchos de los resultados disponibles, ya que la mayoría proceden de investigaciones realizadas en modelos animales, cuyas conclusiones no siempre se pueden extrapolar a la especie humana.

Es por ello que resulta de gran utilidad para los tratamientos de reproducción asistida, conocer con precisión la función y mecanismo de los marcadores que intervienen durante la ventana de implantación, tanto los morfológicos (pinópodos), como los bioquímicos (integrinas, mucinas y otras moléculas), ya que ello permitiría realizar la transferencia embrionaria en el momento de mayor receptividad y seleccionar aquellos embriones con mayores probabilidades de anidación, permitiendo de esta forma aumentar el porcentaje de embarazos, y al mismo tiempo evitar las gestaciones múltiples. Los fallos de implantación constituyen, por tanto, el principal factor limitante en los tratamientos de reproducción asistida. De modo que, un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en este proceso podría permitir incrementar las tasas de gestación por ciclo menstrual, y además contribuir al tratamiento de enfermedades gestacionales tales como la pre-eclampsia o la pérdida temprana del embarazo.

En resumen, el éxito de la implantación estará condicionado por el contacto inicial del embrión con los tejidos maternos, que se produce entre las células trofoblásticas que conforman la cubierta externa del blastocisto y el epitelio luminal endometrial. En este sentido, se han desarrollado diversos modelos para estudiar la adhesión trofoblasto-endometrio, tal como se describió en el punto 2, aunque no existe en la actualidad ningún modelo experimental que sea sencillo, fiable y reproducible para estudiar esta interacción. La mayoría de los diseños experimentales tienen un componente subjetivo elevado, requieren de una gran habilidad del operador, o requieren equipamientos sofisticados, por lo cual no son aplicables y reproducibles en la mayoría de los laboratorios. Por este motivo, uno de los propósitos del presente trabajo fue el diseño de un nuevo modelo experimental que permita cuantificar la adhesión trofoblasto-epitelio endometrial, y más aún, que posibilite el estudio de los factores moleculares que contribuyen a la adhesión y al mantenimiento del embarazo en las etapas iniciales de la implantación.

14. El Modelo de Adhesión Trofoblasto-Endometrio Basado en la Técnica de Citometría de Flujo

Para mimetizar las interacciones moleculares embrión-endometrio que tienen lugar durante la fase inicial de adhesión en la implantación, se utilizaron dos líneas celulares trofoblásticas, JAR y JEG-3, y dos líneas celulares derivadas de epitelio endometrial, RL95-2 y HEC-1A. Ambos tipos celulares fueron utilizados para los co-cultivos en el modelo de adhesión celular diseñado. Como herramienta de análisis

se escogió la tecnología de Citometría de Flujo por ser una metodología ampliamente difundida, cuyo equipamiento se encuentra disponible en numerosos centros de investigación, lo que posibilita la utilización de nuestro modelo de adhesión en la mayoría de los laboratorios.

La selección de la citometría de flujo, tanto para cuantificar la adhesión como para la separación diferencial de las células trofoblásticas y endometriales tras su co-cultivo, implicó la inserción de un gen marcador en uno de los tipos celulares. Estudios preliminares habían demostrado la imposibilidad de identificar ambos tipos celulares en función de sus tamaños y complejidad celular. Se utilizó para tal fin el gen de la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP, *Enhanced Green Fluorescent Protein*), el cual fue insertado en las líneas celulares trofoblásticas JAR y JEG-3, y en células de riñón 293 (utilizadas como control), empleando para ello técnicas de transferencia génica retroviral. La transducción retroviral constituye un valioso sistema de transferencia génica que permite la integración de secuencias exógenas en el genoma de la célula huésped mientras se encuentre en un estado proliferativo, permitiendo así una expresión estable (Danos y Mulligan, 1988). Asimismo, desde su aislamiento a partir de la medusa *Aequorea victoria*, la proteína verde fluorescente (GFP) ha sido ampliamente modificada con el fin de optimizar su característica autofluorescencia para los diversos sistemas de expresión y detección (Cubitt y col., 1995). En particular la EGFP fue específicamente diseñada para el análisis de células humanas por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo (Cormack y col., 1996).

Tras la selección de las células infectadas EGFP positivas, separación y mantenimiento en cultivo durante meses, se obtuvieron poblaciones de células trofoblásticas y de riñón (renombradas como JAR/G, JEG-3/G y 293/G) que expresan establemente la proteína verde fluorescente. Como se pudo apreciar mediante análisis por citometría de flujo (**Figura 18**), estas células resultaron ser claramente distinguibles y separables, por su intensidad de fluorescencia, cuando se utilizaron para los co-cultivos con monocapas de células epiteliales endometriales. Empleando el modelo de adhesión desarrollado, esquematizado en la **figura 8**, se comprobó la mayor adhesividad que muestran las células endometriales RL95-2 (alrededor del 80%) respecto a las células HEC-1A (cerca al 40%) para la adhesión de trofoblastos (**Figura 21**). Sorprendentemente se obtuvieron los mismos patrones de adhesividad cuando se co-cultivaron ambos tipos de células endometriales con células de epitelio renal 293/G, sugiriendo bien una baja especificidad en el reconocimiento célula-célula durante las etapas iniciales de la adhesión, o bien que las células de riñón 293/G expresan algunas de las moléculas de adhesión presentes en trofoblastos. Sí queda claro que las diferencias de adhesividad son determinadas por los tipos de células endometriales RL95-2 y HEC-1A, y que la adhesión de los trofoblastos al epitelio endometrial ocurre de una manera dependiente del tiempo (**Figura 24**), en concordancia con observaciones realizadas previamente por otros autores (Hohn y col., 2000; Chervenak e Illsley, 2000; Thie y col., 1998).

Para el modelo se emplearon células RL95-2 como modelo de epitelio uterino “receptivo”, puesto que presentan un fenotipo epitelial no polarizado que permite la adhesión de células de coriocarcinoma (células trofoblásticas) a su polo apical (John y col., 1993; Thie y col., 1997 y 1998). Estas células proceden de un carcinoma endometrial moderadamente diferenciado (Way y col., 1983) con características morfológicas y biológicas específicas (Tinel y col., 2000). Como modelo de epitelio uterino “no receptivo” se seleccionaron las células HEC-1A, que muestran una menor capacidad de adhesión de

células de coriocarcinoma, debida posiblemente a los mayores niveles de expresión de moléculas antiadherentes, tales como episialina (o mucina MUC-1), en comparación con los de células RL95-2. En este aspecto, Chervenak e Illsley han descrito en 2000 que ésta molécula se localiza en la superficie apical de las células epiteliales endometriales y actúa como un factor antiadherente, probablemente al inducir impedimentos estéricos, dada su estructura ampliamente glicosilada. Además, a diferencia de las células RL95-2, presentan una distribución polarizada de las integrinas (Thie y *col.*, 1995 y 1996). Por otra parte, estudios de expresión de RNAs realizados por investigadores sobre biopsias de endometrio (Domínguez y *col.*, 2003) demostraron una gran correlación entre las células RL95-2 y el endometrio receptivo (LH+7), y entre las células HEC-1A y el endometrio pre-receptivo (LH+2).

14.1. Agentes Inductores de la Diferenciación Celular Reducen la Adhesión de Trofoblastos a Células Epiteliales Endometriales

En la fase inicial de la implantación embrionaria, la adhesión del trofoblasto al epitelio y el posterior proceso de invasión del estroma parecen ser etapas que dependen de subtipos de células trofoblásticas diferenciadas, cada una con propiedades diferentes. De este modo, la capacidad del trofoblasto para iniciar una interacción con el epitelio uterino puede ser reducida por sustancias capaces de incrementar las características de diferenciación de las líneas celulares de coriocarcinoma placentario.

Para validar el modelo *in vitro* de adhesión trofoblasto-endometrio diseñado en este trabajo, se sometieron las células trofoblásticas JAR/G y JEG-3/G a un tratamiento previo con agentes inductores de la diferenciación celular. Luego se examinó la capacidad de adhesión que mostraron las células diferenciadas sobre las monocapas de células epiteliales endometriales RL95-2 y HEC-1A en co-cultivos de 1 hora. La **figura 25** muestra que el pre-tratamiento de las células trofoblásticas con agentes moduladores de la diferenciación celular, foskolina (FSK) y forbol-miristato-acetato (PMA), reduce en mayor o menor grado la adhesión de las células JAR/G, JEG-3/G y 293/G sobre monocapas de células endometriales RL95-2 y HEC-1A. Los resultados obtenidos, en particular aquellos en los que se ha utilizado PMA como agente inductor de la diferenciación de células trofoblásticas, mostraron una estrecha correlación con resultados publicados anteriormente por otros autores (Hohn y *col.*, 2000), demostrando así la eficiencia del modelo de adhesión trofoblasto-endometrio diseñado en nuestro laboratorio para cuantificar adhesión celular.

Los efectos de la diferenciación con estas drogas sobre las líneas celulares JAR/G, JEG-3/G y 293/G (**Figura 26**), tratadas durante 72 horas, fueron analizados por microscopía de fluorescencia *in vivo*, detectándose cambios morfológicos en las tres líneas celulares, tales como el aumento del tamaño de las células mononucleadas, y en algunos casos la formación de células multinucleadas de tipo sincitiotrofoblástico, como ocurrió especialmente con las células JEG-3/G al ser diferenciadas con el agente modulador PMA. Se pudo apreciar también el efecto de estas drogas en la proliferación celular, llegándose hasta arrestar la división de las células JAR/G y JEG-3/G por tratamiento con PMA. En el caso de las células tratadas con FSK la proliferación celular se vio levemente reducida.

Por otra parte, los efectos descritos en este trabajo respecto a la disminución de la adhesión de las células trofoblásticas, contrastan con las características de invasividad mostrada por las mismas. Se observó que a pesar de haber una disminución considerable en la adhesión como consecuencia de la

diferenciación de las células JAR/G o JEG-3/G, las mismas conservaron sus propiedades para invadir la matriz endometrial (**Figura 26.E**). En concordancia con observaciones realizadas por otros autores (Aplin, 1991), podemos concluir que la diferenciación *in vivo* de células trofoblásticas es un proceso muy complejo que origina sub-poblaciones de células trofoblásticas con diversas propiedades y funciones, y que la variación de la adhesión como consecuencia de la diferenciación celular es independiente del programa que regula la invasividad. La placenta es una estructura tipo tumoral altamente invasiva, en la cual una subpoblación de células trofoblásticas, conocidas como trofoblasto extravillosos, invaden el estroma endometrial y su vasculatura para establecer un intercambio de moléculas materno-fetal adecuado. Los mecanismos responsables de su invasión son idénticos a los de las células cancerígenas. Sin embargo, a diferencia de estas, su proliferación, migración e invasividad *in situ* están estrictamente controladas por el TGF- β del estroma (Lala y col., 2002). En resumen, las células trofoblásticas JAR (provenientes de trofoblasto humano temprano; representan el trofoectodermo) constituyen un excelente modelo para el estudio de los procesos biológicos fundamentales como invasividad, proliferación y diferenciación, así como también para la identificación de nuevos genes y la caracterización funcional de los mismos durante la implantación y la formación de la placenta.

Los resultados anteriores, en conjunto, indican que la cuantificación de la adhesión por citometría de flujo según el modelo desarrollado es sencilla, precisa y altamente reproducible, pudiéndose practicar en la mayoría de los laboratorios. Permite, a su vez, analizar el efecto de drogas y otros factores circundantes durante la adhesión trofoblasto-endometrio.

15. La Aplicación del Modelo de Adhesión Trofoblasto-Endometrio Desarrollado para Estudios de Expresión Génica

Tradicionalmente la Genómica Funcional ha asociado rasgos o características visibles (fenotipo) con el gen o los genes que los producían (genotipo). Más recientemente, los avances en los procesos biotecnológicos han permitido determinar qué genes están implicados, la naturaleza de la interacción y el tiempo en la asociación gen-rasgo. Sin embargo, la expresión de cada gen (su actividad) varía de unas células a otras, de unos estadios de desarrollo a otros, en procesos normales o patológicos y en función de las condiciones medioambientales. Sólo entendiendo los pormenores de la expresión génica podremos conocer los procesos biológicos moleculares en los que intervienen los genes, los rasgos que determinan, la regulación a la que se ven sometidos, la interacción con otros genes, la identificación de un patrón de comportamiento en un gen, dependiendo de las condiciones que le circundan o la actividad que desarrolla un gen cuando está alterado en relación a su actividad normal.

Tal como se mencionó anteriormente en la sección II de resultados, el modelo de adhesión de células trofoblásticas (JAR/G y JEG-3/G) a células epiteliales endometriales (RL95-2 y HEC-1A) fue aplicado para estudios de expresión génica, demostrando una gran versatilidad y reproducibilidad. La inclusión de un gen marcador estable en las células trofoblásticas ha permitido la exitosa separación por citometría de flujo de las células trofoblásticas y endometriales luego de diferentes tiempos de interacción, facilitando el posterior estudio de los niveles de mRNAs y proteínas (con índices de pureza e integridad elevados) en ambos tipos celulares. Así, mientras otras metodologías proporcionan una imagen estática de la expresión génica en endometrio o trofoblasto, el estudio de patrones de expresión

seriados realizado a tiempos variables con este nuevo modelo de adhesión trofoblasto-endometrio podría revelar el diálogo dinámico existente entre el embrión y el endometrio en el momento de la implantación.

La utilización de la técnica de RT-PCR semicuantitativa para el estudio de los niveles de expresión de RNA mensajero de los genes pre-seleccionados, en base a los criterios descritos en 11.1, tiene ciertas ventajas e inconvenientes. En primer lugar, es un método económico, que no requiere equipamientos costosos ni análisis bioinformático, y que permite la identificación y discriminación de variantes de corte-empalme alternativos de mRNAs (*splicing*), tal como se ocurrió con el gen PAPP-A donde se pudo identificar una nueva variante en células trofoblásticas, distinta a la descrita en tejido placentario a término. Por otra parte, tiene la desventaja de ser una metodología lenta y engorrosa, ya que el análisis se debe hacer individualmente para cada gen, e introduce fuentes de error tales como la contaminación, la precisión en el pipeteo durante la preparación de las muestras, la determinación de las condiciones óptimas de amplificación para cada gen, o bien la correcta carga en el gel de los productos de RT-PCR de modo que permita la semi-cuantificación densitométrica de las bandas. No obstante, muchas de estas fuentes de error pudieron ser eliminadas y otras estrictamente controladas, tal como se describió en este trabajo, al utilizar equipos comerciales de RT-PCR en un solo paso cuyas mezclas de reacción vienen preparadas, minimizando así las fuentes de error relacionadas al operador. En estas condiciones, el tamizaje realizado con esta metodología permitió identificar variaciones en los niveles de mRNA de los genes IGFBP7/MAC-25, UBA-2 y MUC-1 en las células endometriales RL95-2 luego de su co-cultivo durante tiempos variables con células trofoblásticas JAR/G (**Figura 29.A**). De la misma manera, se identificaron variaciones de los niveles de expresión de los genes TEF-5, UBA-2, PLA-1 y MUC-1 en la fracción de células trofoblásticas JAR/G (**Figura 29.B**).

La posterior cuantificación de cada uno de estos genes por RT-PCR en tiempo real (LightCycler) permitió confirmar su expresión génica diferencial durante la interacción de las células trofoblásticas con las endometriales, e identificar cuando estas variaciones eran consecuencia directa de la interacción trofoblasto-endometrio (grado de especificidad), y cuando una consecuencia de la alta densidad celular alcanzada durante los co-cultivos prolongados.

Asimismo, el modelo de adhesión desarrollado permitió la separación celular y el posterior análisis de los niveles de proteína tanto por Western Blot como por Inmunofluorescencia, estableciéndose así una correlación con las variaciones en los niveles de mRNA previamente detectadas para cada gen.

15.1. Genes Identificados en Células Epiteliales Endometriales RL95-2

Durante años, se ha postulado una hipótesis simple del control de la unión embrión-endometrio por la inducción esteroide de una o más moléculas de adhesión en la superficie de las células del epitelio endometrial luminal durante la ventana de implantación, incrementando así la adhesividad-receptividad endometrial. Estos receptores podrían interactuar con ligandos conocidos de la superficie trofoectodérmica externa del blastocisto una vez que éste ha perdido su membrana pelúcida (Aplin, 1997). En este sentido, se han realizado avances considerables en la descripción de la composición de estas dos superficies celulares en ratón y en humanos. Como resultado de estos estudios ha surgido una segunda hipótesis: la pérdida de moléculas anti-adherentes podría facilitar la unión (Hey y col., 1994; Surveyor y col., 1995). En ambos casos, seguirá una interacción compleja con el estroma subyacente.

15.1.1. Molécula de Anti-adhesión MUC-1

Las mucinas pertenecen a una familia de glicoproteínas altamente glicosiladas, de elevado peso molecular, que pueden encontrarse en la superficie de numerosas células epiteliales y en la zona apical de células epiteliales endometriales (Devine y McKenzie, 1992). Son el principal componente del moco y se cree que cumplen un rol importante en la implantación. Una de las mucinas altamente glicosiladas es MUC-1, asociada a membrana, cuya expresión en endometrio depende del ciclo menstrual. A medida que el blastocisto se acerca a la superficie epitelial, es probable que inicialmente se encuentre con el glicocálix epitelial, el cual en humanos es más abundante durante el período implantatorio (Hey y *col.*, 1994). En ratones, la mucina MUC-1 (Episialina) disminuye considerablemente durante la fase inicial de la implantación (Surveyor y *col.*, 1995), sugiriendo una función antiadherente de la misma como consecuencia del impedimento estérico producido por su estructura altamente glicosilada. En conejo, Hoffman y *col.* han descrito en 1998 un incremento de MUC-1 durante los períodos pre y peri-implantación aunque, a pesar de ello, la expresión de MUC-1 se vio reducida dramáticamente en la zona del epitelio luminal donde tiene lugar la aposición del blastocisto, sugiriendo un efecto regulador de tipo local, posiblemente mediado por señalizaciones del blastocisto.

En humanos, se ha observado a la mucina MUC-1 en la superficie apical del epitelio endometrial, aunque han aparecido reportes contradictorios describiendo su incremento (Hey y *col.*, 1994 y 1995) o su represión (Rye y *col.*, 1993) durante la fase de implantación embrionaria. Tradicionalmente se creyó que MUC-1 podría constituir una barrera a la implantación que debe ser removida para permitir la interacción embrión-endometrio (**Figura 48.A**). Alternativamente, una sobreexpresión de MUC-1 en el endometrio podría ser significativa para la adhesión del embrión, puesto que las mucinas podrían actuar como ligandos específicos para iniciar el anclaje del embrión, permitiendo las interacciones posteriores mediadas por integrinas u otras moléculas de adhesión (**Figura 48.B**).

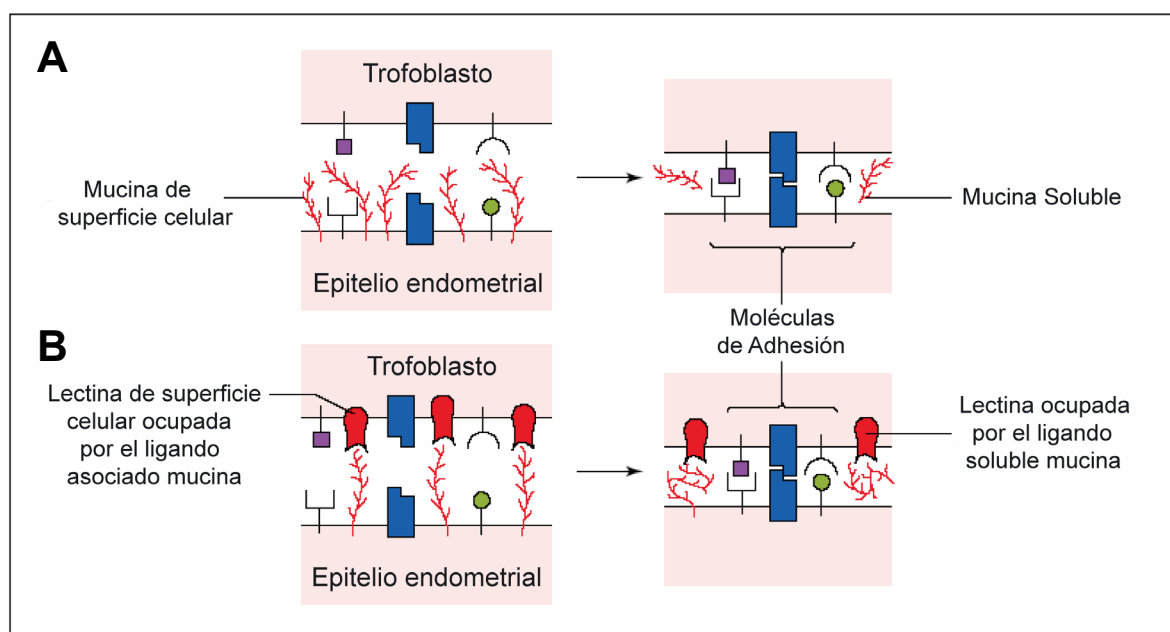


FIGURA 48. (A) Posible rol de la mucina de superficie celular MUC-1 como inhibidor estérico de la interacción embrión-endometrio. La adhesión ocurriría por reducción localizada de esta mucina en la superficie celular. (B) Unión inicial del trofoectodermo con azúcares de la mucina MUC-1 endometrial, seguida de interacciones mediadas por otras moléculas de adhesión (Aplin, 1997).

Los resultados del análisis de expresión génica de esta mucina MUC-1 en células endometriales “adherentes” RL95-2 han demostrado que se produce un incremento gradual de los niveles de mRNA y proteína como resultado de la interacción con células trofoblásticas JAR/G (**Figura 40**), y que el mismo es específico de esta interacción trofoblasto-endometrio. Estos datos concuerdan con las observaciones realizadas por Meseguer y *col.* en 2001, donde demostraban el incremento inicial de esta mucina en células epiteliales endometriales en presencia de blastocistos humanos (fase de aposición). A pesar de ello, nuestros estudios difieren en la observación realizada por estos mismos autores sobre la posterior remoción local de MUC-1 que tiene lugar en el sitio de implantación (fase de adhesión). En este aspecto, nuestros datos muestran un incremento progresivo y continuo de MUC-1 durante las primeras 42 horas de interacción. Sorprendentemente, el incremento producido por interacción de células trofoblásticas JAR/G sobre las células endometriales “no adherentes” HEC-1A fue considerablemente mayor.

Los datos en conjunto permiten sacar varias conclusiones. En primer lugar, que las células endometriales “adherentes” RL95-2 expresan menos cantidad de mucina MUC-1 que las células “no adherentes” HEC-1A, lo que podría confirmar el efecto anti-adhesión de esta proteína si lo correlacionamos con las tasas de adhesión obtenidas para cada línea celular. En segundo lugar, que las células endometriales responden con un incremento de mucina MUC-1 frente a la presencia de células trofoblásticas JAR/G. En el caso de RL95-2, los niveles de MUC-1 podrían establecer una barrera selectiva para la implantación del embrión. Se ha observado una disminución de la abundancia de la mucina MUC-1 en muestras de endometrio de mujeres con abortos espontáneos recurrentes (Serle y *col.*, 1994; Hey y *col.*, 1995), lo que podría permitir la implantación inicial de embriones incompetentes para su desarrollo a término y con anomalías intrínsecas. Además de establecer un umbral selectivo, el hecho que una vez adheridos los trofoblastos los niveles de MUC-1 sigan incrementándose podría suponer que una vez adherido el embrión exista una sobreexpresión de este gen para impedir la adhesión de otros embriones. En cierta forma, esta observación explicaría el porque del fracaso de las técnicas de fertilización asistida cuando se transfieren múltiples embriones simultáneamente al endometrio materno. El mayor incremento de MUC-1 mostrado por las células HEC-1A frente a los trofoblastos resultará en un impedimento para la implantación, sugiriendo que el éxito de la misma estará condicionado a que el embrión entre en contacto con el epitelio uterino exactamente en la fase receptiva de la ventana de implantación, donde los niveles de MUC-1 sean los óptimos. En este aspecto, existen evidencias sobre la acción de MUC-1 como ligando de las selectinas y de moléculas de adhesión, como ICAM-1, siendo posible también la interacción de una lectina o una glucosiltransferasa de superficie con un azúcar presente en la proteína (Campbell y *col.*, 1995). Este aumento, producido por el blastocisto, sugiere que MUC-1 podría funcionar como primer anclaje del embrión al epitelio endometrial. Sólo los embriones de buena calidad podrían preparar el epitelio para su adhesión.

MUC-1 tiene un dominio extracelular compuesto mayoritariamente por una región de repeticiones en tándem (40-90) formadas por unidades de 20 aminoácidos extensamente O-glicosilados, correspondiendo el 50% del peso de la molécula a los carbohidratos. Su propiedad antiadherente está fundamentada en su extensa estructura, ya que sobresale 200-500 nm de la membrana, mientras que la mayoría de las proteínas existentes en la superficie celular permanecen dentro del glicocálix, el cual es de aproximadamente 10 nm de grosor. Posee una pequeña región citoplasmática que parece estar

asociada con el citoesqueleto, que podría estar fosforilada y desempeñar mecanismos de transducción de señal (Domínguez y *col.*, 2002). El análisis por Western Blot de esta proteína en nuestro sistema experimental (**Figura 41**) ha demostrado la existencia de diversas isoformas con tamaños moleculares marcadamente distintos, probablemente consecuencia del alto grado de glicosilación que sufren este tipo de proteínas (Campbell y *col.*, 2000), la secreción de variantes alternativas (Ligtenberg y *col.*, 1990) o bien de mucina soluble resultante de la ruptura proteolítica en la superficie celular (Boshell y *col.*, 1992). La visualización por inmunofluorescencia permitió también confirmar su incremento, detectándose su acumulación en la membrana celular (**Figura 42**).

La complejidad y precisión de los mecanismos que regulan este gen lo convierten en un buen candidato para posteriores estudios, dada su potencial capacidad para condicionar el éxito de la implantación embrionaria. En este aspecto, nuestro modelo de adhesión constituye una excelente herramienta para descifrar las interacciones moleculares durante las etapas iniciales de la implantación.

15.1.2. Molécula IGFBP7/MAC-25

La superfamilia de las IGFBPs, proteínas de unión de factores de crecimiento semejantes a la insulina, son un grupo de seis proteínas solubles diferentes (IGFBP-1 a -6) que no muestran homología de secuencia con los receptores de factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGF-1R e IGF-2R). Sin embargo, tienen afinidad por los IGFs, los cuales desempeñan un papel importante en la fisiología del organismo al regular, entre otras cosas, la proliferación, diferenciación, supervivencia, y metabolismo celular, la diferenciación y estructura tisular, carcinogénesis, maduración de órganos, crecimiento y desarrollo del organismo, y otras funciones (Duan y Xu, 2005). En los últimos años la familia se ha ampliado con la descripción de un grupo heterogéneo de al menos 10 nuevas proteínas con similitud estructural a las IGFBPs y con afinidad por los IGFs. Estas proteínas han sido denominadas IGFBP-rPs (IGFBP-rP1 a -rP10; proteínas relacionadas con las IGFBPs) y, según los conocimientos disponibles hasta la fecha, regulan diversas funciones biológicas: proliferación, adhesión y migración celular, reproducción y desarrollo fetal, angiogénesis y reparación tisular, inflamación y crecimiento tumoral.

Las IGFBPs se unen a los IGFs con elevada afinidad, lo transportan y estabilizan en los fluidos biológicos y regulan su biodisponibilidad en células y tejidos, modulando la unión a sus receptores. En cambio, las proteínas IGFBP-rPs se unen a IGFs con baja afinidad ya que conservan tan solo el extremo amino terminal de las IGFBPs (López-Bermejo y *col.*, 2000; Oh y *col.*, 1996).

Estudios de expresión génica recientes han identificado al gen IGFBP7/MAC-25, conocido también como IGFBP-rP1, como un nuevo gen implicado en la receptividad endometrial humana (Domínguez y *col.*, 2003). Su baja afinidad por IGF y la homología estructural conservada con la familia de las IGFBPs humanas (20-25% de identidad polipeptídica), sugieren propiedades biológicas únicas de esta molécula, independientemente de su capacidad de unión a IGF. En este aspecto, se ha descrito su sobreexpresión durante la ventana de implantación, según el análisis realizado en biopsias de endometrio receptivo (LH+7) y muestras de endometrio no receptivo (LH+2). Exactamente el mismo patrón de expresión diferencial se observó al comparar las líneas celulares RL95-2 (equivalente a un endometrio receptivo) y HEC-1A (endometrio no receptivo), sugiriendo la implicación de este gen durante

la implantación embrionaria (Domínguez y col., 2003). Sin embargo, el rol de esta molécula en la receptividad endometrial aún no ha sido determinado.

El análisis de los niveles de expresión de este gen fue estudiado en este trabajo utilizando el modelo de adhesión trofoblasto-endometrio desarrollado y la metodología RT-PCR cuantitativa. El co-cultivo de células epiteliales endometriales RL95-2 y HEC-1A con células trofoblásticas JAR/G durante tiempos variables permitió: (i) en primer lugar confirmar los mayores niveles basales de expresión de IGFBP7/MAC-25 en las células endometriales RL95-2 respecto a HEC-1A y (ii) en segundo lugar, detectar la disminución gradual que tiene lugar en las células epiteliales RL95-2 a medida que estas interactúan a lo largo del tiempo con las células trofoblásticas JAR/G (**Figura 37.B**). Asimismo, los estudios realizados a nivel proteínico IGFBP7/MAC-25 permitieron identificar los mismos patrones que los observados a nivel de mRNA. Se comprobó la disminución en los niveles de proteína por Western Blot (**Figura 38**; disminución de la banda de 31 kDa) y por Inmunofluorescencia (**Figura 39**). Esta última permitió, además, observar la localización citoplasmática de la proteína y su disminución en las células endometriales RL95-2 tras el co-cultivo con trofoblastos JAR/G.

Tradicionalmente diversos autores han atribuido a IGFBP7/MAC-25 funciones relacionadas con: supresión del crecimiento de células, pues se ha descrito su extensa distribución en tejidos normales y su menor expresión en células tumorales (Kato, 2000; Oh y col., 1996); estimulación de prostaciclina en células endoteliales (Yamauchi y col., 1994); la contribución a la formación de nuevos capilares sanguíneos en tejidos tumorales (Akaogi y col., 1996); unión y retención de factores de crecimiento y quimioquinas, que contribuyen a la migración leucocitaria a través de vénulas endoteliales (Gunn y col., 1998). Una hipótesis reciente propone cierto paralelismo entre los procesos de implantación embrionaria y de migración transendotelial leucocitaria (Domínguez y col., 2005). La misma establece un claro paralelismo entre los diferentes pasos de *aposisión/adhesión/invasión* del embrión sobre el endometrio humano y las etapas de *rodamiento/adhesión/extravasación* del leucocito sobre el endotelio activado. En ambos casos, la expresión y actividad de moléculas de adhesión como selectinas e integrinas está regulada por mediadores solubles del epitelio endometrial o del endotelio vascular, responsables de iniciar las interacciones moleculares necesarias para la captura del blastocisto o del leucocito respectivamente. Considerando la posibilidad de que esta hipótesis sea relativamente acertada, es probable que IGFBP7/MAC-25 actúe como una molécula presentadora de quimioquinas u otras moléculas de adhesión, puesto que los resultados obtenidos en este trabajo confirman la sobreexpresión de esta molécula en el epitelio endometrial durante la ventana de implantación y la represión gradual de la misma a medida que las células endometriales RL95-2 interactúan con las células trofoblásticas JAR/G. Estos datos sugieren que IGFBP7/MAC-25 es esencial en las etapas iniciales de la implantación, no siendo necesaria su presencia una vez que el trofoblasto ya se ha adherido al epitelio endometrial.

15.1.3. Molécula UBA-2

La modificación post-transduccional de proteínas por ubiquitina u otras proteínas semejantes ha sido ampliamente estudiada en las últimas dos décadas. La ubiquitinación dependiente de ATP se lleva a cabo a través de una ruta que involucra varias etapas, la cual finaliza con la transferencia de ubiquitina en un grupo amino presente en residuos de lisina de la proteína diana (Hershko y Ciechanover, 1998).

La degradación selectiva mediada por ubiquitina desempeña un rol importante en el control de numerosos procesos: progresión del ciclo celular, transducción de señal, regulación transcripcional, endocitosis, desregulación de receptores, respuesta inmune, desarrollo y muerte celular. Anormalidades en este proceso se han visto asociadas con ciertas patologías, incluida las transformaciones malignas.

Estudios realizados por Okuma *y col.* (1999) en humanos, basados en las observaciones realizadas en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, sugirieron la participación conjunta, formando un complejo, de las proteínas UBA-2 y SUA-1 (SUMO-1 activating enzyme) en la conjugación de SUMO-1 con otras proteínas. SUMO-1 es una proteína con elevada similitud a la ubiquitina, pero a diferencia de ésta, la conjugación de proteínas con SUMO-1 estaría relacionada con mecanismos distintos a la ruta de degradación de proteínas por el proteosoma. La modificación post-transduccional por SUMO-1 parece regular la estructura y localización intracelular de ciertas proteínas, a través de un proceso de reacciones enzimáticas similares a las de ubiquitinación.

El análisis de los niveles de expresión del gen UBA-2, realizado en diferentes tiempos de interacción de células endometriales RL95-2 con trofoblásticas JAR/G, demostró un incremento notable de los niveles de mensajero a las 16 horas, para luego recuperar su valor inicial a las 42 horas (**Figura 43**). Los datos aportan indicios sobre la participación activa de esta proteína con actividad enzimática durante las etapas iniciales del proceso de adhesión de células trofoblásticas a células epiteliales endometriales. No obstante, se requerirá un estudio más exhaustivo para determinar si el incremento del gen UBA-2 durante la implantación embrionaria condiciona la degradación o estabilización de las proteínas. Estudios recientes de su homólogo realizados en *Saccharomyces cerevisiae* demuestran una función estabilizadora de este dominio UBA-2 cuando es transferido a ciertas proteínas, que permite la interacción de la proteína con el proteosoma sin que exista degradación (Heessen *y col.*, 2005).

15.2. Genes Identificados en Células Trofoblásticas JAR/G

15.2.1. El Factor Transcripcional PLA-1/SKN-1A

La placenta humana es una estructura de tipo tumoral altamente invasiva crítica durante el proceso de implantación, en la cual una subpoblación de células trofoblásticas adopta un comportamiento invasivo hacia el endometrio materno y su vasculatura para establecer un adecuado intercambio materno-fetal de moléculas y nutrientes, y lograr la adaptación inmunológica (Lala *y col.*, 2002; Cross *y col.*, 2003). A medida que las células trofoblásticas se diferencian secretarán una serie de hormonas, tales como la hormona lactógeno placentario 3 (PL-3), una variante placentaria de la hormona de crecimiento (GHv) o la gonadotropina coriónica (CG), necesarias para el establecimiento y mantenimiento del embarazo (Goffin *y col.*, 1996). Poco se conoce acerca de los factores de transcripción específicos de placenta y la regulación del gen que dirige la síntesis de la hormona lactógeno placentario.

Recientemente se ha identificado al factor transcripcional PLA-1/SKN-1A como un factor específico de placenta que regula la transcripción del gen de la hormona lactógeno placentario 3, el cual también se expresa en líneas celulares de coriocarcinoma tales como JAR, JEG-3 y BeWo (Jimenez-Mateo *y col.*, 2005). Este factor, que presenta dominios conservados con otros miembros de la familia

POU, se une a secuencias POU consenso del DNA en el promotor del gen de la hormona lactógeno placentario 3 (PL-3), y es capaz de transactivar su transcripción con una elevada especificidad.

A pesar de ser un factor transcripcional cuyos niveles de expresión son considerablemente bajos en células trofoblásticas JAR/G en relación a los existentes en placenta a término, se ha podido detectar un notable incremento en los niveles de mRNA de PLA-1 en células JAR/G como consecuencia de la interacción con células endometriales RL95-2. Para ello se empleó el modelo de adhesión trofoblasto-endometrio diseñado en este trabajo, pudiéndose detectar un incremento gradual de los niveles de RNA mensajero y de proteína PLA-1 como consecuencia del co-cultivo (**Figura 31**). Sin embargo, se comprobó que este aumento de los niveles de PLA-1 observado en células trofoblásticas JAR/G no es producido específicamente por su interacción con células endometriales RL95-2, sino más bien como consecuencia del elevado grado de confluencia celular alcanzado durante los co-cultivos prolongados. El análisis de este factor transcripcional en células JAR/G a diferentes grados de confluencia permitió comprobar su incremento de manera proporcional a la densidad celular alcanzada (**Figura 31.C**). Asimismo, se pudo comprobar la rápida degradación de este RNA mensajero cuando las células JAR/G fueron tripsinizadas y resuspendidas para someterlas a separación por citometría de flujo. Mediante análisis de la proteína PLA-1 por Western Blot e Inmunofluorescencia se obtuvieron los mismos patrones de expresión diferencial, localizándose el factor en el núcleo de las células trofoblásticas.

Los datos sugieren que los niveles de expresión del factor transcripcional PLA-1 se incrementan notablemente durante las etapas iniciales de la implantación embrionaria, posiblemente como consecuencia del elevado contacto existente entre las células a medida que el embrión invade los tejidos maternos. De este modo, se activará tempranamente la transcripción del gen de la hormona lactógeno placentario 3, garantizando el suministro de sustratos energéticos desde la madre al feto. Evidencias previas correlacionan los niveles de PL-3 con el estado de salud fetal. Los embarazos que culminan en abortos se asocian a una disminución en los niveles de esta hormona, siendo también inferiores en otras patologías gestacionales tales como pre-eclampsia, distrofia fetoplacentaria, embarazos con sufrimiento fetal crónico, etc (Yen y Jaffe, 1991).

15.2.2. El Factor Transcripcional TEF-5

Los factores potenciadores de la transcripción (TEF-1, -3, -4 y -5) contienen un dominio TEA/ATTS (Burglin, 1991) de unión al DNA, y reconocen una secuencia consenso que contiene un núcleo ATG. Estos factores se han identificado en diversos organismos, y se ha observado su participación en varios procesos durante el desarrollo (Jacquemin y *col.*, 1998). El desarrollo de tejidos y órganos durante la embriogénesis requiere de una regulación génica precisa en tiempo y espacio. El control transcripcional se realiza a través de elementos reguladores como promotores y secuencias potenciadores (*enhancers*). En este sentido, se ha caracterizado recientemente un nuevo factor transcripcional TEF-5 que se expresa predominantemente en placenta (Jacquemin y *col.*, 1997), el cual transactiva el gen de la hormona lactógeno placentario (Jiang y *col.*, 1999) y la expresión específica de placenta del gen humano 3 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa tipo I (HSD3B1). La expresión de este último gen dará origen a una enzima crítica para la producción de progesterona placentaria, esencial para el mantenimiento del embarazo (Peng y *col.*, 2004).

La cuantificación del mRNA de TEF-5 en células trofoblásticas JAR/G, luego de diferentes tiempos de interacción con células endometriales RL95-2, ha permitido observar una leve disminución en sus niveles de mensajero (**Figura 34.B**). Mediante el análisis de la proteína TEF-5 realizado por Western Blot se detectó una disminución mucho más pronunciada de este factor transcripcional (**Figura 35**), aunque sin embargo en los estudios realizados por Inmunofluorescencia esta disminución fue mucho más leve (**Figura 36**). Considerando la elevada homología de secuencia que presentan todos los miembros de esta familia de factores transcripcionales y que el anticuerpo utilizado es de tipo policlonal, no podemos descartar que las diferencias observadas estén relacionadas con la unión inespecífica del anticuerpo a TEF-1, miembro principal de esta familia cuya expresión es particularmente elevada en tejido placentario. En general, los datos parecen indicar que durante las etapas de adhesión del trofoblasto a células epiteliales endometriales existe una leve represión transcripcional del gen TEF-5. Por otra parte, se observó también un incremento en los niveles de expresión de TEF-5 en función del mayor grado de confluencia celular alcanzado (**Figura 34.C**). Teniendo en cuenta que la instancia que precede la diferenciación del trofoblasto a sincitiotrofoblasto *in vivo* requiere de una elevada densidad celular, esta última observación concuerda con otros estudios realizados en 1998 por Jacquemin *y col.*, que indican que TEF-5 se expresa selectivamente en los sincitiotrofoblastos de la placenta a término y, además, que TEF-5 es sobreexpresado durante la diferenciación en cultivo de citotrofoblastos a sincitiotrofoblastos, mientras que TEF-1 se reprime.

La expresión de TEF-5 y TEF-1 en células trofoblásticas JAR/G (poco diferenciadas; correspondientes a etapas tempranas) sugiere que estos factores podrían desempeñar un rol importante en la diferenciación y especificación del linaje celular de los trofoblastos. Por lo tanto, se requerirán estudios complementarios para determinar la implicación de TEF-5 en el desarrollo placentario.

16. Micromatrices de DNA e Identificación de Nuevos Genes Humanos

Esta tecnología hace uso de la información de secuencias del genoma humano completo con el fin de investigar y entender el funcionamiento de los genes, células y organismos. La información de secuencias es utilizada directamente para el diseño de micromatrices bidimensionales donde se condensan oligonucleótidos sintéticos a alta densidad sobre un soporte de vidrio (Lipshutz *y col.*, 1999). Las micromatrices de sondas GeneChip® de Affymetrix utilizadas en este trabajo permitieron la cuantificación simultánea de numerosos genes en células epiteliales endometriales RL95-2 o HEC-1A, y en células trofoblásticas JAR/G control. Estos resultados fueron luego comparados con los obtenidos a partir de células RL95-2* y JAR/G* co-cultivadas durante 42 horas y separadas por citometría de flujo.

La potencia de estos sistemas permitió la obtención, en tiempos muy breves, de grandes volúmenes de información, que necesitaron ser gestionados con técnicas bioinformáticas para extraer los conocimientos que pueden resultar de utilidad en la investigación biomédica. Brevemente, hemos realizado un estudio global del transcriptoma humano en células endometriales “adherentes” RL95-2 y células endometriales “no adherentes” HEC-1A con el fin de identificar genes que se expresan diferencialmente durante la ventana de implantación (HEC-1A vs RL95-2; **Figura 49.A**). Asimismo se estudiaron los genes en células endometriales RL95-2 pre y post interacción durante 42 horas con células trofoblásticas JAR/G (RL95-2_42hs vs RL95-2; **Figura 49.B**) para determinar qué genes se

sobreexpresan y/o reprimen durante las etapas iniciales de la implantación embrionaria. Ello permitirá identificar los genes endometriales implicados en la adhesión inicial con el trofoblasto que son críticos para el mantenimiento del embarazo.

De igual manera, se estudiaron los genes en las células trofoblásticas JAR/G pre y post interacción (JAR/G_42hs vs JAR/G; **Figura 49.C**) con el fin de detectar aquellos que se sobreexpresan o reprimen durante la adhesión, obteniéndose una serie de genes candidatos que podrían ser esenciales para el mantenimiento del embarazo, la diferenciación de las células trofoblásticas y el desarrollo de la placenta, el control de la respuesta inmune o el intercambio materno-fetal de nutrientes. También se incluyó una última muestra de células JAR sin transducir, para compararla con las células JAR/G (que expresan establemente la proteína verde fluorescente) y determinar de alguna manera el grado de modificación genética introducido por la utilización de técnicas de transferencia génica retroviral (JAR/G vs JAR; **Figura 49.D**). El número de genes sobreexpresados y reprimidos fue escaso. Posiblemente el metabolismo de las células JAR y sus funciones no se hayan alterado si consideramos que se trata de una línea celular pseudotriploide (~68 cromosomas). Más aún, la aneuploidía en este tipo de células (>45% tetraploides y 15% poliploides) es un componente importante de la placentación normal quizás limitando el potencial proliferativo e invasivo de los citotrofblastos dentro del útero (Weier y *col.*, 2005).

El análisis comparativo realizado posteriormente entre los resultados obtenidos para HEC-1A vs RL95-2 y RL95-2_42hs vs RL95-2 permitió identificar aquellos genes que se encuentran presentes y ausentes en el epitelio endometrial durante la ventana de implantación y que a su vez se activan y reprimen en el endometrio (células RL95-2) durante la interacción con las células trofoblásticas. Este grupo de genes resulta especialmente importante pues pueden ser críticos para la implantación embrionaria durante la ventana de implantación (**Figura 49.E**). El paralelismo entre los valores de tasa de cambio resultantes para estos genes indica que las células endometriales RL95-2 adquieren un patrón de expresión semejante al de HEC-1A tras haberse adherido las células trofoblásticas (**Tabla 32**).

El análisis de la forma de las gráficas de dispersión con todos los puntos (gráficas denominadas *Completo*, **Figura 45**) ha permitido corroborar la consistencia de los datos obtenidos ya que, en todos los casos se observa una distribución normal en forma de cohete (*rocket layout*) típica de los resultados de expresión génica, en los que un alto porcentaje de genes están expresándose a niveles muy bajos, apareciendo en el extremo inferior izquierdo de las gráficas, y a medida que la señal aumenta el número de transcritos baja de forma exponencial. La distribución de los puntos en una segunda gráfica de dispersión (gráfica denominada *Selección*, **Figura 45**), en la que se han eliminado los puntos correspondientes a las sondas sin cambio, da una idea general del número de secuencias sobreexpresadas y reprimidas, así como de la tasa de cambio de éstas. Las mayores diferencias de expresión se encontraron en las células RL95-2 co-cultivadas, siendo mucho menores para las células JAR/G co-cultivadas. De igual manera, el análisis comparativo de los patrones de expresión de las células HEC-1A respecto a las RL95-2 demostró las diferencias entre estas dos líneas celulares endometriales, cuyos comportamientos son claramente diferentes frente a la adhesión de trofoblastos.

La similitud o paralelismo establecido entre los resultados obtenidos para las reacciones de RT-PCR cuantitativas y los microarrays (**Figura 46**), en primer lugar confirmaron las variaciones en los niveles de

expresión de mRNA descritas en la Sección II de Resultados y, en segundo lugar, indicaron la consistencia de los resultados obtenidos mediante microarrays.

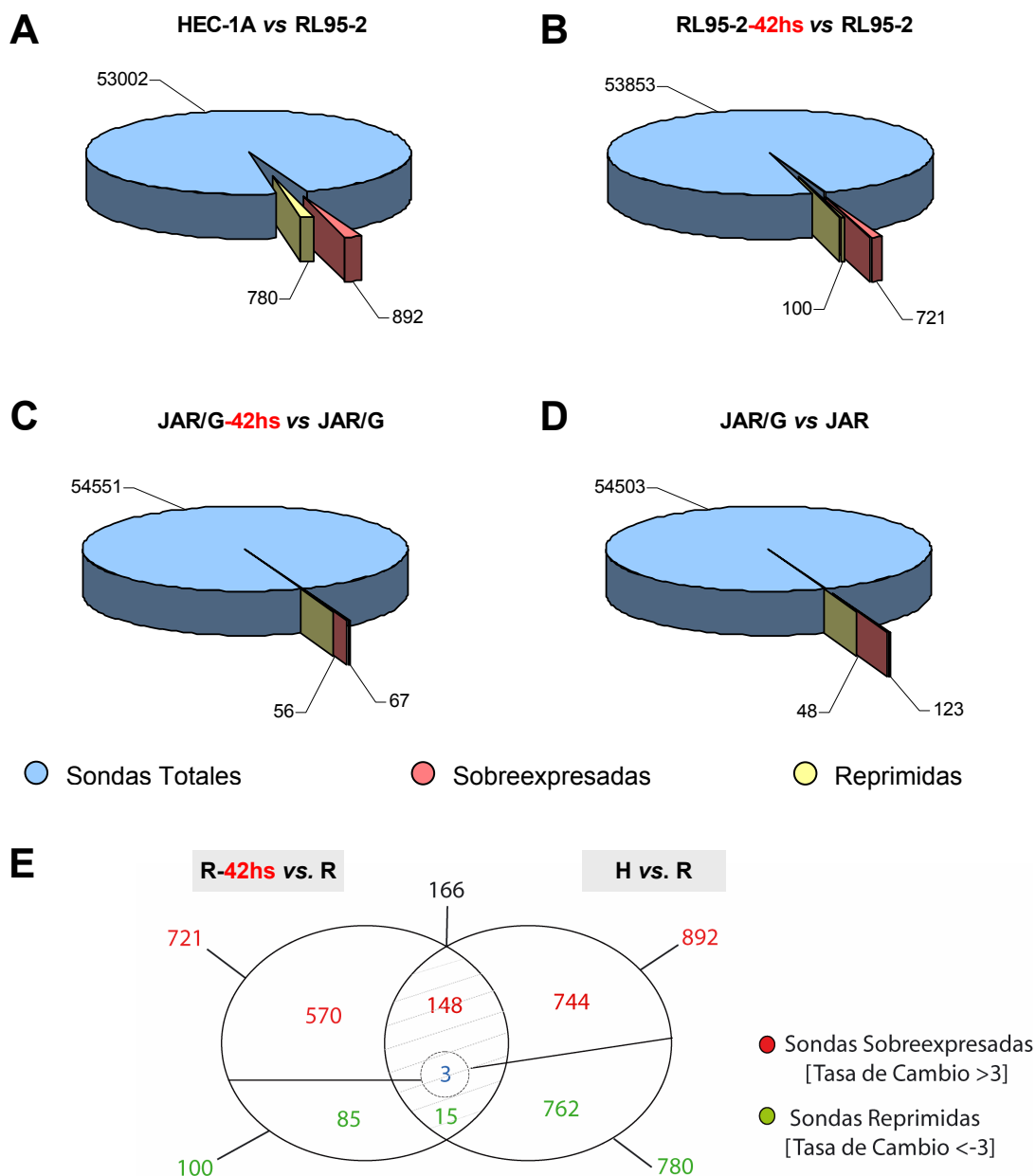


FIGURA 49. Estudio global del transcriptoma humano en células endometriales y trofoblásticas empleando la tecnología de microarrays de Affymetrix. (A) Sondas sobreexpresadas y reprimidas en células endometriales no adherentes HEC-1A respecto a las adherentes RL95-2, (B) en células RL95-2 post interacción durante 42hs con trofoblastos JAR/G, (C) en células trofoblásticas JAR/G post interacción con células RL95-2 y (D) en trofoblastos establemente transducidos JAR/G respecto a células JAR control. (E) Sondas que se expresan diferencialmente en HEC-1A respecto a RL95-2 y a su vez en RL95-2 co-cultivadas con células JAR/G

16.1. Rol de las Integrinas en la Implantación Embrionaria

Estas moléculas de adhesión, ampliamente estudiadas en la implantación, son glicoproteínas de membrana compuestas por dos subunidades (α y β). La homología entre las subunidades suele ser de una 40-50%. Se han descrito más de 15 subunidades α y 8 de β , las cuales se asocian entre ellas no covalentemente para formar distintos complejos heterodiméricos que actúan como receptores implicados

en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (Lessey, 1998; Albelda y Buck, 1990). Poseen un dominio extracelular, un fragmento transmembrana y una cola citoplasmática (Hynes, 1992). Como receptores de superficie celular reconocen las secuencias RGD (Arg-Gly-Asp) de las moléculas fibronectina, vitronectina, laminina y colágeno IV, componentes mayoritarios de la matriz extracelular.

En este trabajo, se han estudiado las integrinas $\alpha 1$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$. Se han seleccionado estos genes en base a diversos criterios: en primer lugar por expresarse diferencialmente en las células endometriales RL95-2 luego de su interacción con trofoblastos, tal como se describió en el apartado **12.4.1**; por ser moléculas de adhesión implicadas en la interacción trofoblasto-endometrio; por ser las únicas subunidades de la familia de integrinas que resultaron altamente sobreexpresadas según los análisis realizados con microarrays, mientras otras permanecieron inalteradas ($\alpha 2b$) o incluso levemente reprimidas (αE , $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 5$, o $\beta 8$); y finalmente como herramienta para confirmar y validar los resultados obtenidos mediante la tecnología de microarrays.

La comprobación se realizó directamente a nivel de proteínas para, por un lado, validar los resultados de los microarrays, y por otro confirmar la transducción de cada RNA mensajero a su correspondiente proteína. Tal como se observa en la **figura 47**, se detectó un claro incremento de las tres subunidades de integrinas en la zona de la membrana celular, siendo el mismo más pronunciado en el caso de las integrinas $\alpha 1$ y $\alpha 4$. En este último caso también se observó la aparición de granulaciones que posiblemente corresponden a la formación de unos complejos conocidos como adhesiones focales, donde las integrinas se unen a proteínas del citoesqueleto intracelular y filamentos de actina. La unión del receptor integrina con su ligando induce la agrupación de otras integrinas adyacentes de forma cooperativa, lo que provocará la activación de señales intracelulares mediadas por integrinas, continuando así con la transducción de señales (Miyamoto y *col.*, 1995).

Otros autores han asociado con anterioridad la pérdida o carencia de integrina $\alpha 4/\beta 1$ con casos de infertilidad sin causa aparente, considerando las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 4$ y $\beta 3$ como potenciales marcadores de receptividad uterina (Lessey y *col.*, 1995). También se ha descrito la influencia que tiene la expresión anormal de integrinas $\alpha 5/\beta 1$ (interacción con fibronectina) y $\alpha 1/\beta 1$ (interacción con laminina) sobre la capacidad de invasión del citotrofoblasto al endometrio (Di Simona y *col.*, 2002). De esta manera, las variaciones en las integrinas $\alpha 1$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$ detectadas en este trabajo no hacen más que corroborar la importancia de las mismas para el proceso de implantación embrionaria y, además, sugieren su participación en rutas de transducción de señal, posiblemente para regular otros procesos posteriores como la formación de la placenta.

Conclusiones



1. Se ha desarrollado un nuevo modelo de adhesión celular *in vitro* basado en citometría de flujo para el estudio de la adhesión de células trofoblásticas a células epiteliales endometriales humanas.
2. Se ha cuantificado la adhesión de las líneas celulares trofoblásticas JAR/G y JEG-3/G sobre monocapas de células epiteliales endometriales RL95-2 y HEC-1A.
3. Se ha evaluado el efecto de agentes moduladores de la diferenciación celular sobre la adhesividad de las células trofoblásticas frente al epitelio uterino.
4. Se ha analizado la expresión génica de un reducido grupo de genes, preseleccionados por su potencial implicación en la fase inicial de la implantación embrionaria. Se identificaron variaciones significativas en los niveles de mRNA y proteínas de los factores transcripcionales PLA-1 y TEF-5 en células trofoblásticas JAR/G y de los genes MUC-1, UBA-2 e IGFBP7/MAC-25 en las células endometriales RL95-2.
5. Se realizaron estudios globales del transcriptoma humano en células trofoblásticas y endometriales empleando el modelo de adhesión celular trofoblasto-endometrio y la tecnología de Microarrays, identificándose numerosos genes sobreexpresados y reprimidos durante la fase inicial de la adhesión embrionaria.

Bibliografía



- Aflalo ED, Sod-Moriah UA, Potashnik G and Har-Vardi I** (2004). Differences in the implantation rates of rat embryos developed in vivo and in vitro: possible role for plasminogen activators. *Fertil Steril*, **81**: 780-785.
- Afonso S, Romagnano L and Babiarz B** (1997). The expression and function of cystatin C and cathepsin B and cathepsin L during mouse embryo implantation and placentation. *Development*, **124**: 3415-3425.
- Agrawal A, Eastman QM and Schatz DG** (1998). Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system. *Nature*, **394**: 744-751.
- Ahmet N, Williams JF and Weidemann MJ** (1991). The human promyelocytic HL60 cell line: a model of myeloid cell differentiation using dimethyl sulfoxide, phorbol ester and butyrate. *Biochem Int*, **23**: 591-602.
- Akaogi K, Okabe Y, Sato J, Nagashima Y, Yasumitsu H, Sugahara K and Miyazaki K** (1996). Specific accumulation of tumor-derived adhesion factor in tumor blood vessels and in capillary tube-like structures of cultured vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 8384-8389.
- Albelda SM and Buck CA** (1990). Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J*, **4**: 2868-2880.
- Altieri A, Franceschi S, Ferlay J, Smith J and La Vecchia C** (2003). Epidemiology and aetiology of gestational trophoblastic diseases. *Lancet Oncol*, **4**: 670-678. Revisión.
- Aplin JD** (1991). Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J Cell Sci*, **99**: 681-692. Revisión.
- Aplin JD, Hey NA and Graham RA** (1998). Human endometrial MUC1 carries keratan sulfate: characteristic glycoforms in the luminal epithelium at receptivity. *Glycobiology*, **8**: 269-276.
- Aplin JD, Seif MW, Graham RA, Hey NA, Behzad F and Campbell S** (1994). The endometrial cell surface and implantation. Expression of the polymorphic mucin MUC-1 and adhesion molecules during the endometrial cycle. *Ann N Y Acad Sci*, **734**: 103-121. Revisión.
- Aplin John D** (1997). Adhesion molecules in implantation. *Rev Reprod*, **2**: 84-93.
- Athanassiades A, Hamilton GS and Lala PK** (1998). Vascular endothelial growth factor stimulates proliferation but not migration or invasiveness in human extravillous trophoblast. *Biol Reprod*, **59**: 643-654.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K** (1989). *Current Protocols in Molecular Biology*. Capítulos 2, 3, 4, 15 y 19. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience.
- Bai SX, Wang YL, Qin L, Xiao ZJ, Herva R and Piao YS** (2005). Dynamic expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, -9 and -14) and the tissue inhibitors of MMPs (TIMP-1, -2 and -3) at the implantation site during tubal pregnancy. *Reprod*, **129**: 103-113.
- Baltimore D** (2001). Our genome unveiled. *Nature*, **409**: 814-816.
- Bergh PA. and Navot D** (1992). The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertility and Sterility*, **58**: 537-542.
- Boshell M, Lalani EN, Pemberton L, Burchell J, Gendler S and Taylor-Papadimitriou J** (1992). The product of the human MUC1 gene when secreted by mouse cells transfected with the full-length cDNA lacks the cytoplasmic tail. *Biochem Biophys Res Commun*, **185**: 1-8.
- Bradford MM** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**: 248-254.
- Burglin TR** (1991). The TEA domain: a novel, highly conserved DNA-binding motif. *Cell*, **66**: 11-12.

- Burgoon LD, Eckel-Passow JE, Gennings C, Boverhof DR, Burt JW, Fong CJ and Zacharewski TR** (2005). Protocols for the assurance of microarray data quality and process control. *Nucleic Acids Res*, **33**: e172. Actualmente solo disponible en formato electrónico *on line*.
- Caballero-Campo P, Martín JC, Domínguez F, Meseguer M, Valbuena D and Mercader A** (2000). La implantación embrionaria: aspectos clínicos y básicos. In: Hernández E, Simón C, Veiga A, editors. Actualizaciones Sociedad Española de Fertilidad. Técnicas de reproducción asistida N°2. 1ªed. 2000.
- Campbell S, Larsen J, Seif MW, Allen TD, Knox F, Jones CJ and Aplin JD** (2000). Mosaic characteristics of human endometrial epithelium in vitro: analysis of secretory markers and cell surface ultrastructure. *Mol Hum Reprod*, **6**: 41-49.
- Campbell S, Swann HR, Seif MW, Kimber SJ and Aplin JD** (1995). Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo. *Hum Reprod*, **10**: 1571-1578.
- Carey M and Smale ST** (2000). Transcriptional Regulation in Eukaryotes. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 65-70.
- Case-Green SC, Mir KU, Pritchard CE and Southern EM** (1998). Analysing genetic information with DNA arrays. *Curr Opin Chem Biol*, **2**: 404-410.
- Castrillo JL and Avila SM** (2004). Differentially Expressed Genes during the Endometrial Implantation Window: New Technologies for a very old question. *Tissue-Specific Gene-Expression in Human Cells*, Capítulo **1**: 11-17.
- Chaouat G, Menu E, Delage G, Moreau JF, Khrishnan L, Hui L, Meliani AA, Martal J, Raghupathy R, Lelaidier C, et al** (1995). Immuno-endocrine interactions in early pregnancy. *Hum Reprod*, **10**: 55-59.
- Chervenak JL and Illsley NP** (2000). Episialin acts as an antiadhesive factor in an in vitro model of human endometrial-blastocyst attachment. *Biol of Reprod*, **63**: 294-300.
- Cheung AN** (2003). Pathology of gestational trophoblastic diseases. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, **17**: 849-868. Revisión.
- Chomczynsky P and Sacchi N** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**: 156-159.
- Christina A Harrington, Carsten Rosenow and Jacques Retief** (2000). Monitoring gene expression using DNA microarrays. *Curr Opin in Microb*, **3**: 285-291.
- Cormack BP, Valdivia RH and Falkow S** (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, **173**: 33-38.
- Cross JC, Baczyk D, Dobric N, Hemberger M, Hughes M, Simmons DG, Yamamoto H and Kingdom JC** (2003). Genes, development and evolution of the placenta. *Placenta*, **24**: 123-130. Revisión.
- Csapo AI and Pulkkinen M** (1978). Indispensability of the human corpus luteum in the maintenance of early pregnancy. Luteectomy evidence. *Obstet Gynecol Surv*, **33**: 69-81.
- Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA and Tsien RY** (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci*, **20**: 448-455. Revisión.
- Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA and Stewart CL** (1996). Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 3115-3120.

- Danos O and Mulligan RC** (1988). Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**: 6460-6464.
- Dardalhon V, Noraz N, Pollok K, Rebouissou C, Boyer M, Bakker AQ, Spits H and Taylor N** (1999) Green fluorescence protein as a selectable marker of fibronectin-facilitated retroviral gene transfer in primary human T lymphocytes. *Hum Gen Ther*, **10**: 5-14.
- Das SK, Wang XN, Paria BC, Damm D, Abraham JA, Klagsbrun M, Andrews GK and Dey SK** (1994). 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*, **120**: 1071-1083.
- Devine PL and McKenzie IF** (1992). Mucins: structure, function, and associations with malignancy. *Bioessays*, **14**: 619-625.
- Di Simone N, Castellani R, Caliandro D and Caruso A** (2002). Antiphospholipid antibodies regulate the expression of trophoblast cell adhesion molecules. *Fertil Steril*, **77**: 805-811.
- Dignam JD, Lebovitz RM and Roeder RG** (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 1983;**11**: 1475-1489.
- Dimitriadis E, White CA, Jones RL and Salamonsen LA (2005)**. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update*, **11**: 613-630. Epub 2005 Jul 8.
- Dominguez F, Avila S, Cervero A, Martin J, Pellicer A, Castrillo JL and Simon C** (2003). A combined approach for gene discovery identifies insulin-like growth factor-binding protein-related protein 1 as a new gene implicated in human endometrial receptivity. *J Clin Endocrinol Metab*, **88**:1849-1857.
- Dominguez F, Pellicer A y Simón C** (2002). Biología Molecular de la Implantación Embrionaria. *Cuadernos de Medicina Reproductiva*, Vol 8. N°2. Editorial Médica Panamericana.
- Dominguez F, Yanez-Mo M, Sanchez-Madrid F and Simon C** (2005). Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players? *FASEB J*, **19**: 1056-60.
- Duan C and Xu Q** (2005). Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *Gen Comp Endocrinol*, **142**: 44-52. Revisión.
- Enders AC** (2000). Trophoblast-uterine interactions in the first days of implantation: models for the study of implantation events in the human. *Semin Reprod Med*, **18**: 255-263.
- Enders AC and Lopata A** (1999). Implantation in the marmoset monkey: expansion of the early implantation site. *Anat Rec*, **256**: 279-299.
- Fazleabas AT and Strakova Z** (2002). Endometrial function: cell specific changes in the uterine environment. *Mol Cell Endocrinol*, **186**: 143-147. Revisión.
- Garcia J and Castrillo JL** (2004). Differential display RT-PCR analysis of human choriocarcinoma cell lines and normal term trophoblast cells: identification of new genes expressed in placenta. *Placenta*, **25**: 684-693.
- Garcia J and Castrillo JL** (2005). Identification of two novel human genes, DIPLA1 and DIPAS, expressed in placenta tissue. *Gene*, **344**: 241-250.
- Genbacev O, DiFederico E, McMaster M and Fisher SJ** (1999). Invasive cytotrophoblast apoptosis in pre-eclampsia. *Hum Reprod*, **14** Suppl 2: 59-66. Revisión.
- Gershon D** (2005). DNA microarrays: more than gene expression. *Nature*, **437**: 1195-1198.

- Goda SK and Minton NP** (1995). A simple procedure for gel electrophoresis and Northern blotting of RNA. *Nucleic Acids Res*, **23**: 3357-3358.
- Goffin V, Shiverick KT, Kelly PA and Martial JA** (1996). Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals. *Endocr Rev*, **17**: 385-410. Revisión.
- Gonzales DS, Jones JM, Pinyopummintr T, Carnevale EM, Ginther OJ, Shapiro SS and Bavister BD** (1996). Trophoctoderm projections: a potential means for locomotion, attachment and implantation of bovine, equine and human blastocysts. *Hum Reprod*, **11**: 2739-2745.
- Grummer R, Hohn HP, Mareel MM and Denker HW** (1994). Adhesion and invasion of three human choriocarcinoma cell lines into human endometrium in a three-dimensional organ culture system. *Placenta*, **15**: 411-429.
- Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD and Williams LT** (1998). A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 258-263.
- Heessen S, Masucci MG and Dantuma NP** (2005). The UBA2 domain functions as an intrinsic stabilization signal that protects Rad23 from proteasomal degradation. *Mol Cell*, **18**: 225-235.
- Heneweer C, Kruse LH, Kindhauser F, Schmidt M, Jakobs KH, Denker HW and Thie M** (2002). Adhesiveness of human uterine epithelial RL95-2 cells to trophoblast: rho protein regulation. *Mol Hum Reprod*, **8**: 1014-1022.
- Hershko A and Ciechanover A** (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, **67**:425-479. Revisión.
- Hey NA, Graham RA, Seif MW and Aplin JD** (1994). The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. *J Clin Endocrinol Metab*, **78**: 337-342.
- Hey NA, Li TC, Devine PL, Graham RA, Saravelos H and Aplin JD** (1995). MUC1 in secretory phase endometrium: expression in precisely dated biopsies and flushings from normal and recurrent miscarriage patients. *Hum Reprod*, **10**: 2655-2662.
- Hoffman LH, Olson GE, Carson DD and Chilton BS** (1998). Progesterone and implanting blastocysts regulate Muc1 expression in rabbit uterine epithelium. *Endocrinology*, **139**: 266-271.
- Hohn HP and Denker HW** (1994). The role of cell shape for differentiation of choriocarcinoma cells on extracellular matrix. *Exp Cell Res*, **215**: 40-50.
- Hohn HP, Linke M, Ugele B and Denker HW** (1998). Differentiation markers and invasiveness: discordant regulation in normal trophoblast and choriocarcinoma cells. *Exp Cell Res*, **244**: 249-258.
- Hohn HP, Linke M. and Denker HW** (2000). Adhesion of trophoblast to uterine epithelium as related to the state of trophoblast differentiation: in vitro studies using cell lines. *Mol Reprod and Develop*, **57**: 135-145.
- Hubank M and Schatz DG** (1994). Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res*, **22**: 5640-5648.
- Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG and Kaufmann P** (1998). Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res*, **291**: 133-148.
- Hynes RO** (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, **69**: 11-25.

- Jacquemin P, Chen Z, Martial JA and Davidson I** (1999). Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse transcription factor TEF-5 (Tead3) gene. *Mamm Genome*, **10**: 632-634.
- Jacquemin P, Martial JA and Davidson I** (1997). Human TEF-5 is preferentially expressed in placenta and binds to multiple functional elements of the human chorionic somatomammotropin-B gene enhancer. *J Biol Chem*, **272**: 12928-12937.
- Jacquemin P, Sapin V, Alsat E, Evain-Brion D, Dolle P and Davidson I** (1998). Differential expression of the TEF family of transcription factors in the murine placenta and during differentiation of primary human trophoblasts in vitro. *Dev Dyn*, **212**: 423-436.
- Jiang SW, Wu K and Eberhardt NL** (1999). Human placental TEF-5 transactivates the human chorionic somatomammotropin gene enhancer. *Mol Endocrinol*, **13**: 879-889.
- Jimenez-Mateo O, Rodriguez-Torres A, Avila S and Castrillo JL** (2005). The Transcription Factor PLA-1/SKN-1A is Expressed in Human Placenta and Regulates the Placental Lactogen-3 Gene Expression. *Placenta*. [en imprenta].
- John NJ, Linke M and Denker HW** (1993). Quantitation of human choriocarcinoma spheroid attachment to uterine epithelial cell monolayers. *In Vitro Cell Dev Biol*, **29A**, 461-468.
- Kato MV** (2000). A secreted tumor-suppressor, mac25, with activin-binding activity. *Mol Med*, **6**: 126-135.
- Kawai S and Nishizawa M** (1984). New procedure for DNA transfection with polycationand dimethyl sulfoxide. *Mol Cell Biol*, **4(6)**: 1172-1174.
- Kodaman PH & Taylor HS** (2004). Hormonal regulation of implantation. *Obstet Gynecol Clin North Am*, **31**: 745-766.
- Kohler PO and Bridson WE** (1971). Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J. Clin. Endocrinol*, **32**: 683-687.
- Kuramoto H, Tamura S and Notake Y** (1972). Establishment of a cell line of human endometrial adenocarcinoma in vitro. *Am. J. Obstet. Gynecol*, **114(8)**: 1012-1019.
- Lala PK, Lee BP, Xu G and Chakraborty C** (2002). Human placental trophoblast as an in vitro model for tumor progression. *Can J Physiol Pharmacol*, **80**: 142-149. Revisión.
- Lander ES** (1999). Array of hope. *Nat Genet*, **21**: 3-4.
- Le Bouteiller P** (2004). The role of HLA-G expression in the embryo during implantation. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, **33**: 9-12. Revisión (Francés).
- Lessey BA** (1998). Endometrial integrins and the establishment of uterine receptivity. *Hum Reprod*, **13**: 247-261.
- Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW and Sun J** (1995). Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertil Steril*, **63**: 535-542.
- Levine M and Tjian R** (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature*, **424**: 147-151. Revisión.
- Lewin B** (1994). Genes V. Oxford University Press, New York, pp 233-252.
- Li HY, Chang SP, Yuan CC, Chao HT, Ng HT and Sung YJ** (2002). Establishment of an efficient method to quantify embryo attachment to endometrial epithelial cell monolayers. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **38**: 505-511.
- Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobelny D, Galardy R, Damsky CH and Fisher SJ** (1991). 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol*, **113**: 437-449.

- Ligtenberg MJ, Vos HL, Gennissen AM and Hilkens J** (1990). Episialin, a carcinoma-associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini. *J Biol Chem*, **265**: 5573-5578.
- Lim H, Gupta RA, Ma WG, Paria BC, Moller DE, Morrow JD, DuBois RN, Trzaskos JM and Dey SK** (1999). Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. *Genes Dev*, **13**: 1561-1574.
- Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM and Dey SK** (1997). Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*, **91**: 197-208.
- Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR and Lockhart DJ** (1999). High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet*, **21**: 20-24.
- Lobo SC, Huang ST, Germeyer A, Dosiou C, Vo KC, Tulac S, Nayak NR and Giudice LC** (2004). The immune environment in human endometrium during the window of implantation. *J Reprod Immunol*, **52**: 244-251.
- Lopez-Bermejo A, Buckway CK, Devi GR, Hwa V, Plymate SR, Oh Y and Rosenfeld RG** (2000). Characterization of insulin-like growth factor-binding protein-related proteins (IGFBP-rPs) 1, 2, and 3 in human prostate epithelial cells: potential roles for IGFBP-rP1 and 2 in senescence of the prostatic epithelium. *Endocrinology*, **141**: 4072-4080.
- Maniatis T and Reed R** (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature*, **416**: 499-506.
- Marions L and Danielsson KG** (1999). Expression of cyclo-oxygenase in human endometrium during the implantation period. *Mol Hum Reprod*, **5**: 961-965.
- Meikle SF, Danel I and Wilcox LS** (1999). Surveillance of assisted reproductive technology in the United States. An update. *Int J Technol Assess Health Care*, **15**: 11-14.
- Meseguer M, Aplin JD, Caballero-Campo P, O'Connor JE, Martin JC, Remohi J, Pellicer A and Simon C** (2001). Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biol Reprod*, **64**: 590-601.
- Miller JF, Williamson E, Glue J, Gordon YB, Grudzinskas JG and Sykes A** (1980). Fetal loss after implantation. A prospective study. *Lancet*, **2**: 554-556.
- Miyamoto S, Akiyama SK and Yamada KM** (1995). Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science*, **267**: 883-885.
- Morton H** (1998). Early pregnancy factor: an extracellular chaperonin 10 homologue. *Immunol Cell Biol*, **76**: 483-496. Revisión.
- Mullis KB** (1990) Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)*, **48**: 579-582.
- Nardo LG** (2005). Vascular endothelial growth factor expression in the endometrium during the menstrual cycle, implantation window and early pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol*, **17**: 419-423.
- Nasu K, Zhou Y, McMaster MT and Fisher SJ** (2000). Upregulation of human cytotrophoblast invasion by hepatocyte growth factor. *J Reprod Fertil Suppl*, **55**: 73-80.
- Norwitz ER, Schust DJ and Fisher SJ** (2001). Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med*, **345**:1400-1408.

- Oh Y, Nagalla SR, Yamanaka Y, Kim HS, Wilson E and Rosenfeld RG** (1996). Synthesis and characterization of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-7. Recombinant human mac25 protein specifically binds IGF-I and -II. *J Biol Chem*, **271**: 30322-30325.
- Okuma T, Honda R, Ichikawa G, Tsumagari N and Yasuda H** (1999). In vitro SUMO-1 modification requires two enzymatic steps, E1 and E2. *Biochem Biophys Res Commun*. **254**: 693-698.
- Pattillo RA, Gey GO, Delfs E, Huang WY, Hause L, Garancis DJ, Knoth M, Amatruda J, Bertino J, Friesen HG and Mattingly RF** (1971). The hormone-synthesizing trophoblastic cell in vitro: a model for cancer research and placental hormone synthesis. *Ann N Y Acad Sci*, **172**: 288-298.
- Pattillo RA, Ruckert A, Hussa R, Berstein R and Deles E** (1971). The Jar cell line – continuous human multihormone production and controls. *In Vitro*, **6**: 398-399.
- Peng L, Huang Y, Jin F, Jiang SW and Payne AH** (2004). Transcription enhancer factor-5 and a GATA-like protein determine placental-specific expression of the Type I human 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene, HSD3B1. *Mol Endocrinol*, **18**: 2049-2060.
- Peyron R, Aubeny E, Targosz V, Silvestre L, Renault M, Elkik F, Leclerc P, Ulmann A and Baulieu EE**. Early termination of pregnancy with mifepristone (RU 486) and the orally active prostaglandin misoprostol. *N Engl J Med*, **328**: 1509-1513.
- Piccinni MP** (2002). T-cell cytokines in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, **47**: 289-294. Revisión.
- Psychoyos A** (1986). Uterine receptivity for nidation. *Ann N Y Acad Sci*, **476**: 36-42. Revisión
- Psychoyos, A** (1976). Hormonal control of uterine receptivity for nidation. *J Reprod Fertil Suppl*, **25**: 17-28. Revisión
- Rebar RW and DeCherney AH** (2004). Assisted reproductive technology in the United States. *N Engl J Med*, **350**: 1603-1604.
- Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M and Fisher SJ** (2004). Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest*, **114**: 744-754. Revisión.
- Ritvos O, Jalkanen J, Pekonen F, Stenman H and Ranta T** (1988). Epidermal growth factor but not insuline-like growth factor-I potentials adenosine-3',5'-monophosphate-mediated chorionic gonadotropin secretion by cultured human choriocarcinoma cells. *Endocrinology*, **123**: 859-865.
- Rye PD, Bell SC and Walker RA** (1993). Immunohistochemical expression of tumour-associated glycoprotein and polymorphic epithelial mucin in the human endometrium during the menstrual cycle. *J Reprod Fertil*, **97**: 551-556.
- Sambrook J, Fritsch E F and Maniatis T** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sawicki W, Kieler J and Briand P** (1967). *Stain Technol*, **42**: 143.
- Schagger H and von Jagow G** (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, **166**: 368-379.
- Schena M, Shalon D, Davis RW and Brown PO** (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **270**: 467-470.
- Serle E, Aplin JD, Li TC, Warren MA, Graham RA, Seif MW and Cooke ID** (1994). Endometrial differentiation in the peri-implantation phase of women with recurrent miscarriage: a morphological and immunohistochemical study. *Fertil Steril*, **62**: 989-996.

- Shiotani M, Noda Y and Mori T** (1993). Embryo-dependent induction of uterine receptivity assessed by an in vitro model of implantation in mice. *Biol Reprod*, **49**: 794-801.
- Sibley CP, Hochberg A and Boime I** (1991). Bromo-adenosine stimulates choriogonadotropin production in JAr and cytotrophoblast cells: evidence for effects on two stages of differentiation. *Mol Endocrinol*, **5**: 582-586.
- Simon C, Caballero-Campo P, Garcia-Velasco JA and Pellicer A** (1998a). Potential implications of chemokines in reproductive function: an attractive idea. *J Reprod Immunol*, **38**: 169-193. Revisión.
- Simon C, Gimeno MJ, Mercader A, O'Connor JE, Remohi J, Polan ML and Pellicer A** (1997). Embryonic regulation of integrins beta 3, alpha 4, and alpha 1 in human endometrial epithelial cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, **82**: 2607-2016.
- Simon C, Landeras J, Zuzuarregui JL, Martin JC, Remohi J and Pellicer A** (1999). Early pregnancy losses in *in vitro* fertilization and oocyte donation. *Fertil Steril*, **72**: 1061-1065.
- Simon C, Moreno C, Remohi J and Pellicer A** (1998b). Molecular interactions between embryo and uterus in the adhesion phase of human implantation. *Hum Reprod, Suppl* **3**:219-32; discussion 233-6.
- Simón C, Portolés E, Mercader A, Frances A and Remohi J** (1996). Implantación embrionaria. En: Remohi J editors. *Reproducción Humana*. 1ª ed. Madrid. p. 70-76.
- Somkuti SG, Sun J, Yowell CW, Fritz MA and Lessey BA** (1996). The effect of oral contraceptive pills on markers of endometrial receptivity. *Fertil Steril*, **65**: 484-488.
- Spandorfer SD, Chung PH, Kligman I, Liu HC, Davis OK and Rosenwaks Z** (2000). An analysis of the effect of age on implantation rates. *J Assist Reprod Genet*, **17**: 303-306.
- Surveyor GA, Gendler SJ, Pemberton L, Das SK, Chakraborty I, Julian J, Pimental RA, Wegner CC, Dey SK and Carson DD** (1995). Expression and steroid hormonal control of Muc-1 in the mouse uterus. *Endocrinology*, **136**: 3639-3647.
- Suzuki S, Sato M, Senoo H and Ishikawa K** (2004). Direct cell-cell interaction enhances pro-MMP-2 production and activation in co-culture of laryngeal cancer cells and fibroblasts: involvement of EMMPRIN and MT1-MMP. *Exp Cell Res*, **293**: 259-266.
- Tabibzadeh S** (1994a). Cytokines and the hypothalamic-pituitary-ovarian-endometrial axis. *Hum Reprod*, **9**: 947-967. Revisión.
- Tabibzadeh S, Kong QF and Babaknia A** (1994b). Expression of adhesion molecules in human endometrial vasculature throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, **79**: 1024-1032.
- Thie M, Fuchs P and Denker HW** (1996). Epithelial cell polarity and embryo implantation in mammals. *Int J Dev Biol*, **40**: 389-393.
- Thie M, Harrach-Ruprecht B, Sauer H, Fuchs P, Albers A and Denker HW** (1995). Cell adhesion to the apical pole of epithelium: a function of cell polarity. *Eur J Cell Biol*, **66**: 180-191.
- Thie M, Herter P, Pommerenke H, Durr F, Sieckmann F, Nebe B, Rychly J and Denker HW** (1997). Adhesiveness of the free surface of a human endometrial monolayer for trophoblast as related to actin cytoskeleton. *Mol Hum Reprod*, **3**: 275-283.
- Thie M, Röspel R, Dettmann W, Benoit M, Ludwing M, Gaub HE and Denker HW** (1998). Interactions between trophoblast and uterine epithelium: monitoring adhesive forces. *Hum Reprod*, **13**: 3211-3219.

- Thurin A, Hausken J, Hillensjo T, Jablonowska B, Pinborg A, Strandell A and Bergh C** (2004). Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in in vitro fertilization. *N Engl J Med*, **351**: 2392-2402.
- Tinel H, Denker HW and Thie M** (2000). Calcium influx in human uterine epithelial RL95-2 cells triggers adhesiveness for trophoblast-like cells. Model studies on signalling events during embryo implantation. *Mol Hum Reprod*, **6**: 1119-1130.
- Uehara C, Suzuki K, Ino T, Kijiyama H, Kikkawa F, Nagasaka T. and Mizutani S** (2001). Upregulation of neutral endopeptidase expression and enzymatic activity during the differentiation of human choriocarcinoma cells. *Placenta*, **22**: 540-549.
- Wang J, Mayernik L, Schultz JF and Armant DR** (2000). Acceleration of trophoblast differentiation by heparin-binding EGF-like growth factor is dependent on the stage-specific activation of calcium influx by ErbB receptors in developing mouse blastocysts. *Development*, **127**: 33-44.
- Wang XQ, Duan XM, Liu LH, Fang YQ and Tan Y** (2005). Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester fluorescent dye for cell labeling. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. **37**: 379-385.
- Way DL, Grosso DS, Davis JR, Surwitt EA and Christian CD** (1983). Characterization of a new human endometrial carcinoma (RL95-2) established in tissue culture. *In Vitro*, **19**: 147-158.
- Weier JF, Weier HU, Jung CJ, Gormley M, Zhou Y, Chu LW, Genbacev O, Wright AA and Fisher SJ** (2005). Human cytotrophoblasts acquire aneuploidies as they differentiate to an invasive phenotype. *Dev Biol*, **279**: 420-432.
- Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, Armstrong EG and Nisula BC** (1988). Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med*, **319**: 189-194.
- Yamauchi T, Umeda F, Masakado M, Isaji M, Mizushima S and Nawata H** (1994). Purification and molecular cloning of prostacyclin-stimulating factor from serum-free conditioned medium of human diploid fibroblast cells. *Biochem J*, **303**: 591-598.
- Yen SSC and Jaffe RB** (1991). Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology and Clinical Management. Tercer edición. Ed. Saunders W B Co.
- Zeng F, Baldwin DA and Schultz RM** (2004). Transcript profiling during preimplantation mouse development. *Dev Biol*, **272**: 483-496.
- Zinaman MJ, Clegg ED, Brown CC, O'Connor J and Selevan SG** (1996). Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil Steril*, **65**: 503-509.

Tabla 28.A. Genes sobreexpresados en células epiteliales endometriales RL95-2 por interacción durante 42 horas con células trofoblásticas JAR/G.

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|---|-----------|---|----------------|----------|
| 244567_at | Transcribed locus | | | 11,8 | 0,000068 |
| 1555623_at | dermal papilla derived protein 12 | DERP12 | | 10,1 | 0,000027 |
| 215440_s_at | brain expressed X-linked-like 1 | BEXL1 | | 9,3 | 0,00002 |
| 212077_at | caldesmon 1 | CALD1 | contracción y desarrollo muscular; unión actina, troponina C, calmodulina, miosina y tropomiosina; citoesqueleto | 9,1 | 0,00002 |
| 229390_at | hypothetical protein LOC441168 | LOC441168 | | 8,9 | 0,000346 |
| 209122_at | adipose differentiation-related protein | ADFP | región extracelular y retículo endoplásmico | 8,8 | 0,00002 |
| 209243_s_at | paternally expressed 3 | PEG3 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | 8,7 | 0,00002 |
| 213764_s_at | microfibrillar associated protein 5 | MFAP5 | componente estructural de la matriz extracelular | 8,7 | 0,00003 |
| 229349_at | FLJ16517 protein | FLJ16517 | regulación transcripcional DNA-dependiente; unión al DNA | 8,7 | 0,00002 |
| 1556395_at | Full length insert cDNA clone YB44H10 | | | 8,6 | 0,000241 |
| 201809_s_at | endoglin (Osler-Rendu-Weber syndrome 1) | ENG | adhesión celular; circulación; organogénesis; memb. plasm. | 8,6 | 0,00003 |
| 203184_at | fibrillin 2 (congenital contractural arachnodactyly) | FBN2 | morfogénesis; componente estructural de matriz extracelular | 8,4 | 0,00002 |
| 227705_at | transcription elongation factor A (SII)-like 7 | TCEAL7 | factor con actividad de elongación en la transducción | 8,4 | 0,000023 |
| 202620_s_at | procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 | PLOD2 | modificación y metabolismo proteico; retículo endoplásmico | 8 | 0,00002 |
| 217506_at | Hypothetical gene supported by BC041875; BX648984 | | | 8 | 0,000167 |
| 1569110_x_at | programmed cell death 6 | PDCD6 | inducción de apoptosis por señales extracelulares | 7,9 | 0,000068 |
| 214612_x_at | melanoma antigen family A, 6 | MAGEA6 | | 7,9 | 0,000189 |
| 215028_at | sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A | SEMA6A | apoptosis; organización y biogénesis citoesqueleto; receptor sup. cel; desarrollo y diferenciación celular; membrana y axón | 7,9 | 0,00002 |
| 232191_at | chromosome 21 open reading frame 105 | C21orf105 | | 7,8 | 0,00002 |
| 234075_at | ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide (Wilson disease) | ATP7B | transporte ion cobre; metabolismo; unión de ATP; actividad hidrolasa sobre ac. anhídridos; endosoma, Golgi y membrana | 7,8 | 0,000052 |
| 209242_at | paternally expressed 3 | PEG3 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | 7,7 | 0,00002 |
| 223044_at | solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member1 | SLC40A1 | transporte-homeostasis de hierro; morfogénesis; citoplasma | 7,7 | 0,00002 |
| 238530_at | nicotinamide nucleotide transhydrogenase | NNT | transporte electrones y protones; mitocondria | 7,6 | 0,001651 |
| 1555299_s_at | endogenous retroviral family W, env(C7), member 1 (syncytin) | ERVWE1 | transposición de DNA; formación de sincitios; morfogénesis; integrado a membrana; cápside y envuelta viral | 7,4 | 0,00002 |
| 1557765_at | hypothetical protein LOC340109 | LOC340109 | | 7,4 | 0,000114 |
| 204724_s_at | collagen, type IX, alpha 3 | COL9A3 | transporte fosfatos; molécula estructural; matriz extracelular | 7,4 | 0,00002 |
| 206710_s_at | erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3 | EPB41L3 | organización y biogénesis del citoesqueleto de actina cortical | 7,4 | 0,000052 |
| 210274_at | melanoma antigen family A, 8 | MAGEA8 | | 7,4 | 0,000068 |

Tabla 28.A (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|--|-----------|--|----------------|----------|
| 237456_at | RING1 and YY1 binding protein | RYBP | regulación transcripción DNA-dependiente; apoptosis; núcleo | 7,2 | 0,00002 |
| 210467_x_at | melanoma antigen family A, 12 | MAGEA12 | | 7,1 | 0,00003 |
| 244532_x_at | Hypothetical LOC401131 | | | 7,1 | 0,00002 |
| 201616_s_at | caldesmon 1 | CALD1 | contracción y desarrollo muscular; unión actina, troponina C, calmodulina, miosina y tropomiosina; citoesqueleto | 7 | 0,000023 |
| 209448_at | HIV-1 Tat interactive protein 2, 30kDa | HTATIP2 | inducción apoptosis; factor transcripcional RNA pol. II; núcleo | 7 | 0,000027 |
| 1555341_at | unc-5 homolog C (C. elegans) | UNC5C | apoptosis; desarrollo; transducción de señal; membrana | 6,9 | 0,001201 |
| 1561198_at | Hypothetical LOC387790 | | | 6,9 | 0,001201 |
| 201069_at | matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase) | MMP2 | catabolismo del colágeno; actividad gelatinasa A; unión de iones calcio y zinc; matriz y espacio extracelular | 6,9 | 0,00002 |
| 239162_at | Death-associated protein kinase 1 | DAPK1 | fosforilación de proteínas; inducción apoptosis; citoesqueleto | 6,9 | 0,000088 |
| 1554690_a_at | transforming, acidic coiled-coil containing protein 1 | TACC1 | ciclo celular; división celular; núcleo | 6,8 | 0,000273 |
| 205234_at | solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 4 | SLC16A4 | transporte ácidos monocarboxílicos; membrana | 6,8 | 0,000241 |
| 227048_at | laminin, alpha 1 | LAMA1 | desarrollo embrionario; adhesión-migración celular; m. basal | 6,8 | 0,00002 |
| 242334_at | NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 4 | NALP4 | | 6,8 | 0,00002 |
| 1568646_x_at | Zinc finger protein 208 | ZNF208 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | 6,7 | 0,002032 |
| 201445_at | calponin 3, acidic | CNN3 | contracción músculo liso; unión actina, calmodulina, troponina C y tropomiosina | 6,7 | 0,00002 |
| 204273_at | endothelin receptor type B | EDNRB | regulador negativo adenilato ciclasa; señalización proteína G ligado a segundo mensajero IP3; neurogénesis; membrana | 6,7 | 0,000692 |
| 228462_at | iroquois homeobox protein 2 | IRX2 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | 6,7 | 0,00002 |
| 230863_at | Low density lipoprotein-related protein 2 | LRP2 | glicosilación proteínas; metab. lípidos; endocitosis; lisosoma | 6,7 | 0,000052 |
| 203886_s_at | fibulin 2 | FBLN2 | adhesión celular; unión calcio y proteínas; matriz extracelular | 6,6 | 0,00002 |
| 227711_at | hypothetical protein FLJ32942 | FLJ32942 | | 6,6 | 0,00002 |
| 227911_at | Rho GTPase activating protein 28 | ARHGAP28 | escape o liberación viral; membrana | 6,6 | 0,00249 |
| 1557581_x_at | Calcineurin binding protein 1 | CABIN1 | receptor de superficie celular ligado a transducción de señal | 6,5 | 0,000189 |
| 219932_at | solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 6 | SLC27A6 | metabolismo de ácidos graso de cadena larga; ligación CoA | 6,5 | 0,00002 |
| 207052_at | hepatitis A virus cellular receptor 1 | HAVCR1 | actividad como receptor | 6,4 | 0,000438 |
| 217578_at | Exportin 1 (CRM1 homolog, yeast) | XPO1 | importación proteica al núcleo; poro nuclear y nucleoplasma | 6,4 | 0,000052 |
| 219563_at | chromosome 14 open reading frame 139 | C14orf139 | | 6,4 | 0,000389 |
| 243303_at | Enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 1 | ECHDC1 | metabolismo; actividad catalítica; | 6,4 | 0,000088 |
| 1569372_at | Homo sapiens, clone IMAGE:4998578, mRNA | | | 6,3 | 0,000027 |

Tabla 28.A (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|---|----------|--|----------------|----------|
| 209942_x_at | melanoma antigen family A, 3 | MAGEA3 | | 6,3 | 0,000101 |
| 221530_s_at | basic helix-loop-helix domain containing, class B, 3 | BHLHB3 | proliferación y diferenciación celular; organogénesis; regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | 6,3 | 0,00002 |
| 222931_s_at | threonine synthase-like 1 (bacterial) | THNSL1 | metabolismo; biosíntesis treonina; | 6,3 | 0,000774 |
| 226145_s_at | Fraser syndrome 1 | FRAS1 | comunicación celular; matriz extracelular y membrana | 6,3 | 0,000774 |
| 228600_x_at | hypothetical protein MGC72075 | MGC72075 | | 6,3 | 0,000167 |
| 242794_at | mastermind-like 3 (Drosophila) | MAML3 | regulación transcripcional DNA-dependiente; neurogénesis; ruta de señalización Notch; coactivador RNA pol II; núcleo | 6,3 | 0,000273 |
| 242814_at | serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9 | SERPINB9 | inhibidor de endopeptidasas tipo serina; unión a proteínas; citosol | 6,3 | 0,000035 |
| 244267_at | Hypothetical LOC401056 | | | 6,3 | 0,000492 |
| 1555340_x_at | RAP1A, member of RAS oncogene family | RAP1A | transporte proteico intracelular; regulación negativa ciclo celular; transducción de señal mediada por GTPasa; memb. | 6,2 | 0,000147 |
| 221024_s_at | solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 10 | SLC2A10 | transporte de carbohidratos (glucosa); membrana | 6,2 | 0,000346 |
| 230337_at | son of sevenless homolog 1 (Drosophila) | SOS1 | transducción señal de la proteína Ras; activador Rho GTPasa | 6,2 | 0,000068 |
| 238257_at | Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 10 | MLLT10 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | 6,2 | 0,000865 |
| 241186_at | Transcribed locus | | | 6,2 | 0,000273 |
| 1555146_at | activating transcription factor 2 | ATF2 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | 6,1 | 0,000273 |
| 1559147_at | cDNA: FLJ23328 fis, clone HEP12645 | FLJ23328 | | 6,1 | 0,000966 |
| 1563057_at | Homo sapiens, clone IMAGE:3451831, mRNA | | | 6,1 | 0,000088 |
| 1563670_at | zinc finger protein 390 | ZNF390 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | 6,1 | 0,00225 |
| 203695_s_at | deafness, autosomal dominant 5 | DFNA5 | percepción de sonidos | 6,1 | 0,00002 |
| 204416_x_at | apolipoprotein C-I | APOC1 | metabolismo y transporte de lípidos; región extracelular | 6,1 | 0,000346 |
| 234614_at | <i>Hs</i> Friend leukemia virus integration 1 (FLI1) gene | FLI1 | | 6,1 | 0,001201 |
| 237836_at | Transcribed locus | | | 6,1 | 0,000214 |
| 242708_at | Peroxisome biogenesis factor 1 | PEX1 | biogénesis-organización del peroxisoma; transporte proteico | 6,1 | 0,000389 |
| 1553275_s_at | <i>Hs</i> hypothetical protein FLJ25613 (FLJ25613) | FLJ25613 | | 6 | 0,00225 |
| 1560359_at | Integrin, alpha 1 | ITGA1 | biosíntesis de proteínas; receptor laminina y colágeno; núcleo | 6 | 0,000307 |
| 1565806_at | FLJ37035 protein | FLJ37035 | | 6 | 0,001651 |
| 1569677_a_at | hypothetical protein FLJ25692 | FLJ25692 | unión de ácidos nucleicos | 6 | 0,000307 |
| 204637_at | glycoprotein hormones, alpha polypeptide | CGA | señalización célula-célula; actividad hormonal; extracelular | 6 | 0,000027 |

Tabla 28.A (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|--|-------------------|--|----------------|----------|
| 1562249_at | hypothetical protein LOC285965 | LOC285965 | | 5,9 | 0,000492 |
| 205997_at | a disintegrin and metalloproteinase domain 28 | ADAM28 | proteólisis y peptidólisis; espermatogénesis; membrana | 5,9 | 0,00002 |
| 209859_at | tripartite motif-containing 9 | TRIM9 | ubiquitinación de proteínas; unión de zinc y iones metálicos | 5,9 | 0,000052 |
| 214603_at | melanoma antigen family A, 2 melanoma antigen family A, 2B | MAGEA2 MAGEA2B | | 5,9 | 0,000214 |
| 218312_s_at | zinc finger protein 447 | ZNF447 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | 5,9 | 0,000088 |
| 229730_at | FLJ42461 protein | FLJ42461 | | 5,9 | 0,00002 |
| 230711_at | Endothelial PAS domain protein 1 | EPAS1 | angiogénesis; coactivador transcripcional RNA polimerasa II; diferenciación celular; transducción de señal; núcleo | 5,9 | 0,000114 |
| 233318_at | Homo sapiens, clone IMAGE:3446232, mRNA | | | 5,9 | 0,000046 |
| 234084_x_at | Dual specificity phosphatase 24 (putative) | DUSP24 | desfosforilación proteínas; actividad hidrolasa; señalización | 5,9 | 0,000046 |
| 234088_at | Hypothetical protein LOC154761 | LOC154761 | | 5,9 | 0,00002 |
| 239534_at | Transcribed locus, strongly similar to XP_520752.1 PREDICTED: similar to DEAD box polypeptide 47 isoform 1; E4-DEAD box protein [Pan troglodytes] | | | 5,9 | 0,000147 |
| 240758_at | Trinucleotide repeat containing 17 | CENTG2 | | 5,9 | 0,000046 |
| 243709_at | hypothetical protein FLJ90709 | FLJ90709 | transporte de aminoácidos; membrana | 5,9 | 0,000046 |
| 208096_s_at | collagen, type XXI, alpha 1 | COL21A1 | transporte fosfatos; adhesión celular; estructural; citoplasma | 5,8 | 0,00013 |
| 208268_at | a disintegrin and metalloproteinase domain 28 | ADAM28 | proteólisis y peptidólisis; espermatogénesis; membrana | 5,8 | 0,000273 |
| 209723_at | serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9 | SERPINB9 | inhibidor de endopeptidasas tipo serina; unión a proteínas; citosol | 5,8 | 0,00002 |
| 214164_x_at | carbonic anhydrase XII | CA12 | metabolismo de compuestos de un solo carbono; membrana | 5,8 | 0,000167 |
| 214596_at | cholinergic receptor, muscarinic 3 | CHRM3 | modificación proteica; neurogénesis; proliferación; membrana | 5,8 | 0,000241 |
| 221143_at | replication protein A4, 34kDa | RPA4 | iniciación de la replicación del DNA; núcleo | 5,8 | 0,000774 |
| 232823_at | LOC440585 | | | 5,8 | 0,00013 |
| 233025_at | PDZ domain containing 3 | PDZK3 | adhesión celular; región extracelular, núcleo y retículo endopl. | 5,8 | 0,00002 |
| 238305_at | Vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1-like 1 | VKORC1L1 | integrado a membrana | 5,8 | 0,00225 |
| 239954_at | zinc finger protein 160 | ZNF160 | regulación transcrip. DNA-dependiente; hemopoyesis; núcleo | 5,8 | 0,00002 |
| 242343_x_at | Zinc finger protein 518 | ZNF518 | unión a ácidos nucleicos y a iones zinc; núcleo | 5,8 | 0,000068 |
| 244247_at | Glutaminase | GLS | catabolismo glutamina; actividad hidrolasa; mitocondria | 5,8 | 0,000966 |
| 1560187_at | Homo sapiens, clone IMAGE:5767628, mRNA | | | 5,7 | 0,000492 |
| 1565026_a_at | orofacial cleft 1 candidate 1 | OFCC1 | | 5,7 | 0,000214 |

Tabla 28.A (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|--|----------|--|----------------|----------|
| 203104_at | colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog | CSF1R | fosforilación de aminoácidos proteicos; ruta de señalización receptor transmembrana de la tirosina kinasa; desarrollo y proliferación celular; rta. humoral; membrana plasmática | 5,7 | 0,00002 |
| 227174_at | WD repeat domain 72 | WDR72 | | 5,7 | 0,000389 |
| 202619_s_at | procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 | PLOD2 | modificación y metabolismo proteico; retículo endoplásmico | 5,6 | 0,000046 |
| 204309_at | cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1 | CYP11A1 | transporte de electrones; metabolismo lipídico; biosíntesis y metabolismo hormonas esteroides/colesterol; mitocondria | 5,6 | 0,000023 |
| 204437_s_at | folate receptor 1 (adult) | FOLR1 | endocitosis mediada por receptor; transporte ac. fólico; memb | 5,6 | 0,000027 |
| 207326_at | betacellulin | BTC | regulador positivo ciclo celular; proliferación; receptor de EGF | 5,6 | 0,000552 |
| 223333_s_at | angiopoietin-like 4 | ANGPTL4 | estimulación angiogénesis y metab. lipídico; diferenciación; inhibición apoptosis y lipasas; respuesta a hipoxia-inanición; | 5,6 | 0,00002 |
| 224443_at | chromosome 1 open reading frame 97 | C1orf97 | | 5,6 | 0,000552 |
| 230563_at | RasGEF domain family, member 1A | RASGEF1A | transducción de señal mediada por GTPasa pequeña | 5,6 | 0,00002 |
| 233317_at | CD9 antigen (p24) | CD9 | adhesión y motilidad celular; fusión del esperma a membrana plasmática del óvulo; activador plaquetas; membrana | 5,6 | 0,00002 |
| 236732_at | Jumonji domain containing 2C | JMJD2C | regulación transcripcional DNA-dependiente; | 5,6 | 0,000273 |
| 237452_at | Collagen, type XXVII, alpha 1 | COL27A1 | transporte de fosfatos; adhesión celular; colágeno-citoplasma | 5,6 | 0,000438 |
| 1556049_at | reticulon 4 | RTN4 | regulación negativa de anti-apoptosis y extensión axonal; retículo endoplásmico y membrana nuclear | 5,5 | 0,000023 |
| 1558759_s_at | cytoplasmic linker associated protein 2 | CLASP2 | proteína de unión | 5,5 | 0,000552 |
| 1561817_at | cDNA FLJ35294 fis, clone PROST2008724 | | | 5,5 | 0,00225 |
| 201909_at | ribosomal protein S4, Y-linked 1 | RPS4Y1 | biosíntesis de proteínas; unión de RNA; ribosoma y citosol | 5,5 | 0,000027 |
| 206507_at | zinc finger protein 96 | ZNF96 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | 5,5 | 0,00002 |
| 232628_at | Family with sequence similarity 13, member A1 | FAM13A1 | | 5,5 | 0,00002 |
| 240055_at | Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3 | SLC2A14 | espermatogénesis; transporte carbohidratos (glucosa); diferenciación celular; membrana | 5,5 | 0,000189 |
| 1552719_at | cancer susceptibility candidate 4 | CASC4 | | 5,4 | 0,001266 |
| 207837_at | RNA binding protein with multiple splicing | RBPMS | procesamiento del RNA | 5,4 | 0,002032 |
| 213796_at | small proline-rich protein 1A | SPRR1A | desarrollo epidérmico y queratinización | 5,4 | 0,00002 |
| 219288_at | chromosome 3 open reading frame 14 | C3orf14 | | 5,4 | 0,00002 |
| 223294_at | chromosome X open reading frame 26 | CXorf26 | | 5,4 | 0,000307 |
| 225660_at | sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A | SEMA6A | apoptosis; organización y biogénesis citoesqueleto; receptor sup. cel; desarrollo y diferenciación celular; membrana y axón | 5,4 | 0,000023 |

Tabla 28.A (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|---|-----------|---|----------------|----------|
| 228894_at | hypothetical protein LOC253842 | LOC253842 | | 5,4 | 0,000307 |
| 232799_at | KIAA1571 protein | KIAA1571 | unión ácidos nucleicos y iones zinc | 5,4 | 0,00003 |
| 240555_at | Microphthalmia-associated transcription factor | MITF | regulación transcripción DNA-dependiente; desarrollo; núcleo | 5,4 | 0,000865 |
| 1560066_at | Homo sapiens, clone IMAGE:3922927, mRNA | | | 5,3 | 0,00225 |
| 1560926_at | Protein phosphatase 4, regulatory subunit 2 | PPP4R2 | modificación de proteínas; centrosoma | 5,3 | 0,00002 |
| 202075_s_at | phospholipid transfer protein | PLTP | metabolismo y transporte de lípidos; región extracelular | 5,3 | 0,00002 |
| 221009_s_at | angiopoietin-like 4 | ANGPTL4 | estimulación angiogénesis y metab. lipídico; diferenciación; inhibición apoptosis y lipasas; respuesta a hipoxia-inanición; | 5,3 | 0,00002 |
| 232575_at | prostate cancer antigen 3 | PCA3 | | 5,3 | 0,000273 |
| 237105_at | mRNA; cDNA DKFZp686G1498 from clone DKFZp686G1498 | | | 5,3 | 0,001077 |
| 241794_at | ARP6 actin-related protein 6 homolog (yeast) | ACTR6 | molécula estructural; unión a proteínas; citoesqueleto | 5,3 | 0,000552 |
| 244359_s_at | Hypothetical LOC401131 | | | 5,3 | 0,00003 |
| 1568784_at | Homo sapiens, clone IMAGE:5272174, mRNA | | | 5,2 | 0,000147 |
| 203592_s_at | follistatin-like 3 (secreted glycoprotein) | FSTL3 | espacio extracelular | 5,2 | 0,00002 |
| 210747_at | major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1 | HLA-DQB1 | respuesta inmune; presentación y procesamiento de antígenos exógenos vía MHC clase II; membrana | 5,2 | 0,000492 |
| 225911_at | likely ortholog of mouse nephronectin | NPNT | unión de iones calcio; membrana | 5,2 | 0,000088 |
| 226851_at | lysophospholipase-like 1 | LYPLAL1 | actividad catalítica | 5,2 | 0,000346 |
| 227868_at | hypothetical protein LOC154761 | LOC154761 | | 5,2 | 0,00002 |
| 229454_at | BCL2-associated transcription factor 1 | BCLAF1 | regulación transcrip. DNA-dependiente; inducción apoptosis | 5,2 | 0,000052 |
| 230789_at | suppressor of hairy wing homolog 2 (Drosophila) | SUHW2 | regulación transcrip. DNA-dependiente; unión al DNA; núcleo | 5,2 | 0,001201 |
| 236471_at | nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3 | NFE2L3 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | 5,2 | 0,000078 |
| 54632_at | thyroid adenoma associated | THADA | actividad como receptor | 5,2 | 0,001017 |
| 1556472_s_at | sex comb on midleg-like 4 (Drosophila) | SCML4 | | 5,1 | 0,000273 |
| 1558034_s_at | ceruloplasmin (ferroxidase) | CP | transporte y homeostasis de iones (Cu; Fe); extracelular | 5,1 | 0,000046 |
| 1559640_at | Hypothetical protein FLJ38335 | FLJ38335 | | 5,1 | 0,000273 |
| 1560773_at | hypothetical gene supported by BC040718 | LOC388458 | | 5,1 | 0,001336 |
| 1562472_at | <i>Hs</i> cDNA FLJ33858 fis, clone CTONG2006129 | | | 5,1 | 0,000052 |
| 1569054_at | solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3 | SLC1A3 | neurotransmisor (sinápsis); transporte de L-glutamato y ácidos di carboxílicos; integrado a membrana | 5,1 | 0,00002 |
| 205635_at | kalirin, RhoGEF kinase | KALRN | fosforilación aminoácidos proteicos; neurogénesis; citoesq. | 5,1 | 0,001651 |

Tabla 28.A (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|-------------|--|----------|--|----------------|----------|
| 208189_s_at | myosin VIIA (Usher syndrome 1B (autosomal recessive, severe)) | MYO7A | percepción sensorial (visión y sonido); movimientos basados en microfilamentos de actina; citoesqueleto y miosina | 5,1 | 0,000147 |
| 232290_at | G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A | GPCR5A | ruta señalización receptor asociado a proteína G; membrana | 5,1 | 0,00003 |
| 233297_s_at | hypothetical protein FLJ20449 | FLJ20449 | regulación de la transcripción; núcleo | 5,1 | 0,000078 |
| 1555339_at | RAP1A, member of RAS oncogene family | RAP1A | transporte proteico intracelular; regulación negativa ciclo celular; transducción de señal mediada por GTPasa; memb. | 5 | 0,000088 |
| 201389_at | integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide) | ITGA5 | adhesión célula-matriz; ruta de señalización mediada por integrinas; unión a calcio y proteínas; membrana | 5 | 0,00002 |
| 207583_at | ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2 | ABCD2 | metabolismo y transporte ácidos grasos; peroxisoma y memb | 5 | 0,000492 |
| 210517_s_at | A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12 | AKAP12 | ruta señalización receptor asociado a proteína G; citoplasma | 5 | 0,001486 |
| 216189_at | <i>Hs</i> clone IMAGE:3344506, mRNA, partial cds | | | 5 | 0,001201 |
| 216659_at | dihydrofolate reductase pseudogene 1 | DHFRP1 | biosíntesis de glicina y nucleótidos; reductasa dihidrofolatos | 5 | 0,001486 |
| 219823_at | lin-28 homolog (C. elegans) | LIN28 | regulación transcripcional DNA-dependiente; unión al DNA | 5 | 0,000307 |
| 220515_at | dual specificity phosphatase 21 | DUSP21 | desfosforilación de aminoácidos proteicos; hidrolasa; núcleo | 5 | 0,001336 |
| 222112_at | epidermal growth factor receptor pathway substrate 15-like1 | EPS15L1 | endocitosis; unión de iones calcio; núcleo | 5 | 0,002032 |
| 222139_at | KIAA1466 gene | KIAA1466 | | 5 | 0,00002 |
| 230174_at | Lysophospholipase-like 1 | LYPLAL1 | actividad catalítica | 5 | 0,000023 |
| 230280_at | tripartite motif-containing 9 | TRIM9 | ubiquitinación de proteínas; unión de zinc y iones metálicos | 5 | 0,000552 |
| 232263_at | solute carrier family 6, member 15 | SLC6A15 | transporte de neurotransmisores; membrana | 5 | 0,000214 |
| 232541_at | Epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian) | EGFR | fosforilación de proteínas; proliferación celular (inhibidor ciclo celular); receptor de EGF; endosoma, membrana y citoesquel. | 5 | 0,00002 |
| 233857_s_at | ankyrin repeat and SOCS box-containing 2 | ASB2 | cascada de señalización intracelular | 5 | 0,001336 |
| 234082_at | cDNA FLJ11831 fis, clone HEMBA1006562 | | | 5 | 0,00002 |
| 236435_at | Zinc finger protein 292 | ZNF292 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | 5 | 0,000046 |
| 244010_at | B melanoma antigen family, member 4 | MLL3 | regulación transcripcional; ubiquitinación; transporte protones asociada a síntesis ATP; modificación cromatina; núcleo | 5 | 0,00002 |
| 244610_x_at | Ubiquitin-conjugating enzyme E2E 2 (UBC4/5 homolog, yeast) | UBE2E2 | ciclo ubiquitina | 5 | 0,000068 |

Tabla 28.B. Genes reprimidos en células epiteliales endometriales RL95-2 por interacción durante 42 horas con células trofoblásticas JAR/G.

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|-------------|---|----------|---|----------------|----------|
| 228955_at | Homo sapiens, clone IMAGE:4753714, mRNA | | | -6,3 | 0,999954 |
| 242625_at | radical S-adenosyl methionine domain containing 2 | RSAD2 | actividad catalítica; unión de iones hierro | -6,1 | 0,999727 |
| 232024_at | GTPase, IMAP family member 2 | GIMAP2 | unión a nucleótidos y a GTP; componente de membrana | -5,7 | 0,999954 |
| 213479_at | neuronal pentraxin II | NPTX2 | transmisión sináptica; unión a calcio y azúcares | -5,2 | 0,999611 |
| 233858_at | cDNA FLJ10149 fis, clone HEMBA1003380 | | | -5,2 | 0,998168 |
| 236029_at | FAT tumor suppressor homolog 3 (Drosophila) | FAT3 | adhesión celular homofílica; ; unión a calcio; membrana | -5,2 | 0,99994 |
| 221417_x_at | endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 8 | EDG8 | transducción de señal; receptor de liso esfingolípidos y ácido lisofosfatídico; componente de membrana | -5,1 | 0,99998 |
| 203144_s_at | KIAA0040 | KIAA0040 | | -5 | 0,999922 |
| 217173_s_at | low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia) | LDLR | glicosilación; metabolismo-transporte de lípidos (colesterol) y esteroides; endocitosis; membrana plasmática | -5 | 0,99998 |
| 233743_x_at | endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 8 | EDG8 | transducción de señal asociada a proteína G; receptor de liso esfingolípidos y ácido lisofosfatídico; membrana | -4,6 | 0,999911 |
| 204457_s_at | growth arrest-specific 1 | GAS1 | arresto ciclo celular (fase S) y proliferación; membrana | -4,5 | 0,99998 |
| 219987_at | hypothetical protein FLJ12684 | FLJ12684 | | -4,5 | 0,99998 |
| 221011_s_at | likely ortholog of mouse limb-bud and heart gene | LBH | | -4,5 | 0,999654 |
| 241869_at | apolipoprotein L, 6 | APOL6 | transporte y metab. lipídico; región extracelular y citoplasma | -4,5 | 0,999382 |
| 203682_s_at | isovaleryl Coenzyme A dehydrogenase | IVD | transporte de electrones; oxidorreducción; mitocondria | -4,4 | 0,997968 |
| 205284_at | KIAA0133 | KIAA0133 | componente de membrana | -4,4 | 0,999977 |
| 205706_s_at | ankyrin repeat domain 26 | ANKRD26 | | -4,4 | 0,998349 |
| 209990_s_at | G protein-coupled receptor 51 | GPR51 | ruta señalización receptor asociado a proteína G; sinapsis | -4,4 | 0,998664 |
| 229901_at | zinc finger protein 488 | ZNF488 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | -4,4 | 0,99998 |
| 235785_at | AT-binding transcription factor 1 | ATBF1 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | -4,4 | 0,99751 |
| 1554062_at | Xg blood group (pseudoautosomal boundary-divided on the X chromosome) | XG | componente de membrana | -4,3 | 0,999932 |
| 1560490_at | FAT tumor suppressor homolog 3 (Drosophila) | FAT3 | adhesión celular homofílica; ; unión a calcio; membrana | -4,3 | 0,999811 |
| 202898_at | syndecan 3 (N-syndecan) | SDC3 | unión de proteínas al citoesqueleto; membrana | -4,3 | 0,999922 |
| 213468_at | excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2 (xeroderma pigmentosum D) | ERCC2 | reparación de escisiones de nucleótidos asociados con la transcripción; inducción de apoptosis; percepción acústica; núcleo y complejo del factor transcripcional TFIIH | -4,3 | 0,999611 |
| 221837_at | kelch-like 22 (Drosophila) | KLHL22 | unión a proteínas | -4,3 | 0,999786 |
| 225016_at | adenomatosis polyposis coli down-regulated 1 | APCDD1 | | -4,3 | 0,99998 |

Tabla 28.B (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|--|--------------|--|----------------|----------|
| 226509_at | zinc finger protein 641 | ZNF641 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | -4,3 | 0,999786 |
| 235109_at | Zinc finger, BED domain containing 3 | ZBED3 | unión a iones metálicos y DNA | -4,3 | 0,99994 |
| 226036_x_at | caspase 2, apoptosis-related cysteine protease (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 2) | CASP2 | proteólisis y peptidólisis; actividad caspasa; regulación de apoptosis (anti-apoptosis); | -4,2 | 0,999911 |
| 1554127_s_at | methionine sulfoxide reductase B3 | MSRB3 | reparación de proteínas; mitocondria y retículo endoplásmico | -4,1 | 0,999973 |
| 208940_at | Selenophosphate synthetase 1 | SEPHS1 | modificación de proteínas; unión de ATP y GTP; transferasa | -4,1 | 0,99998 |
| 211774_s_at | DKFZp564I122 protein | DKFZp564I122 | | -4,1 | 0,99987 |
| 213797_at | radical S-adenosyl methionine domain containing 2 | RSAD2 | actividad catalítica | -4,1 | 0,999308 |
| 229147_at | Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 6 | RASSF6 | transducción de señal; unión a proteínas | -4,1 | 0,99998 |
| 231991_at | chromosome 20 open reading frame 160 | C20orf160 | | -4,1 | 0,999308 |
| 244834_at | chromosome 1 open reading frame 89 | C1orf89 | transducción de señal mediada por GTPasa pequeña | -4,1 | 0,999611 |
| 202780_at | 3-oxoacid CoA transferase 1 | OXCT1 | metabolismo succinil-Coenzima A; mitocondria | -4 | 0,999965 |
| 205942_s_at | SA hypertension-associated homolog (rat) | SAH | metabolismo; regulación presión sanguínea; | -4 | 0,999759 |
| 214595_at | potassium voltage-gated channel, subfamily G, member1 | KCNG1 | transporte potasio; complejo canales regulados por voltaje | -4 | 0,999965 |
| 225400_at | chromosome 1 open reading frame 19 | C1orf19 | procesamiento mRNA y tRNA; núcleo | -4 | 0,999977 |
| 235783_at | Chromosome 1 open reading frame 33 | C1orf33 | biogénesis de ribosomas; núcleo | -4 | 0,999308 |
| 210256_s_at | phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I α | PIP5K1A | metabolismo glicerofosfolípidos; fosforilación | -3,9 | 0,99987 |
| 219384_s_at | adenosine deaminase, tRNA-specific 1 | ADAT1 | procesamiento tRNA | -3,9 | 0,99998 |
| 219560_at | hypothetical protein FLJ21125 | FLJ21125 | | -3,9 | 0,999965 |
| 220172_at | hypothetical protein FLJ13096 | FLJ13096 | | -3,9 | 0,999135 |
| 220444_at | zinc finger protein 557 | ZNF557 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | -3,9 | 0,999786 |
| 222288_at | Similar to CG9996-PA | | | -3,9 | 0,999382 |
| 239790_s_at | Transcribed locus | | | -3,9 | 0,999562 |
| 207060_at | engrailed homolog 2 | EN2 | regulación transcrip. DNA-dependiente; desarrollo; núcleo | -3,8 | 0,997968 |
| 210108_at | calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit | CACNA1D | transporte de cationes calcio; membrana; complejo de canales de calcio regulados por voltaje | -3,8 | 0,999811 |
| 214507_s_at | exosome component 2 | EXOSC2 | procesamiento rRNA; exosoma (complejo RNasa); núcleo | -3,8 | 0,99998 |
| 218681_s_at | stromal cell-derived factor 2-like 1 | SDF2L1 | actividad hidrolasa; membrana | -3,8 | 0,99998 |
| 224184_s_at | brother of CDO | BOC | | -3,8 | 0,999786 |
| 1552897_a_at | potassium voltage-gated channel, subfamily G, member3 | KCNG3 | transporte catiónico; retículo endoplásmico y membrana | -3,7 | 0,998923 |
| 228900_at | Transcribed locus | | | -3,7 | 0,998799 |

Tabla 28.B (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|--|-----------|--|----------------|----------|
| 238654_at | hypothetical protein LOC147645 | LOC147645 | | -3,7 | 0,999308 |
| 241343_at | Ribonuclease H1 | RNASEH1 | catabolismo del RNA; actividad ribonucleasa H e hidrolasa | -3,7 | 0,99997 |
| 204324_s_at | golgi phosphoprotein 4 | GOLPH4 | lúmen aparato de Golgi, membrana y vesículas endocíticas | -3,6 | 0,999693 |
| 204664_at | alkaline phosphatase, placental (Regan isozyme) | ALPP | metabolismo; unión de iones magnesio; membrana | -3,6 | 0,999382 |
| 218939_at | leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1 | LETM1 | trasducción de señal; desarrollo; mitocondria y membrana plasmática | -3,6 | 0,999786 |
| 227014_at | similar to aspartate beta hydroxylase (ASPH) | LOC57168 | modificación aminoácidos; memb. retículo endoplásmico | -3,6 | 0,999693 |
| 204821_at | butyrophilin, subfamily 3, member A3 | BTN3A3 | componente de membrana | -3,5 | 0,999786 |
| 205097_at | solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2 | SLC26A2 | transporte de sulfatos; membrana | -3,5 | 0,99998 |
| 209905_at | homeo box A9 | HOXA9 | regulación transcrip. DNA-dependiente; desarrollo; núcleo | -3,5 | 0,99997 |
| 218525_s_at | hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit inhibitor | HIF1AN | regulación transcripción; actividad oxidorreductasa; núcleo | -3,5 | 0,999833 |
| 222006_at | Fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism) | FGFR3 | casca de MAPKKK y JAK-STAT; desarrollo esquelético; fosforilación de proteínas; crecimiento celular; membrana | -3,5 | 0,999654 |
| 227752_at | serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2-like (aminotransferase 2) | SPTLC2L | biosíntesis; transferencia de grupos nitrogenados | -3,5 | 0,999833 |
| 230398_at | tensin 4 | TNS4 | casca de señalización intracelular | -3,5 | 0,998923 |
| 235588_at | establishment of cohesion 1 homolog 2 (S. cerevisiae) | ESCO2 | ciclo celular; actividad aciltransferasa; núcleo | -3,5 | 0,999226 |
| 203349_s_at | ets variant gene 5 (ets-related molecule) | ETV5 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | -3,4 | 0,99997 |
| 203500_at | glutaryl-Coenzyme A dehydrogenase | GCDH | transporte de electrones; oxidorreducción; mitocondria | -3,4 | 0,999786 |
| 219836_at | zinc finger, BED-type containing 2 | ZBED2 | unión a iones metálicos y DNA | -3,4 | 0,999965 |
| 226446_at | hairy and enhancer of split 6 (Drosophila) | HES6 | regulación transcripcional DNA-depte; diferenciación; núcleo | -3,4 | 0,999922 |
| 204488_at | transmembrane protein 15 | TMEM15 | componente de membrana | -3,3 | 0,998349 |
| 223709_s_at | wingless-type MMTV integration site family, member10A | WNT10A | ruta de señalización frizzled-2; desarrollo; región extracelular | -3,3 | 0,998514 |
| 224959_at | solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2 | SLC26A2 | transporte de sulfatos; membrana | -3,3 | 0,99998 |
| 228917_at | Zinc finger protein 510 | ZNF510 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | -3,3 | 0,998664 |
| 234334_s_at | laminin, beta 4 | LAMB4 | adhesión celular; molécula estructural; membrana basal | -3,3 | 0,999833 |
| 1554159_a_at | zinc finger, MYND domain containing 11 | ZMYND11 | inhibidor transcripcional del promotor RNA polimerasa II; regulación negativa del ciclo celular; proliferación; núcleo | -3,2 | 0,99987 |
| 201185_at | protease, serine, 11 (IGF binding) | PRSS11 | regulador crecimiento celular; proteólisis y peptidólisis | -3,2 | 0,99998 |
| 201367_s_at | zinc finger protein 36, C3H type-like 2 | ZFP36L2 | proliferación celular; núcleo | -3,2 | 0,999922 |
| 202359_s_at | sorting nexin 19 | SNX19 | casca de señalización intracelular; transporte proteico | -3,2 | 0,999611 |
| 210182_at | cortistatin | CORT | inhibición ruta señalización adenilato ciclasa; sinapsis | -3,2 | 0,999833 |

Tabla 28.B (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|-------------|--|---------|---|----------------|----------|
| 218612_s_at | tumor suppressing subtransferable candidate 4 | TSSC4 | | -3,2 | 0,999034 |
| 203032_s_at | fumarate hydratase | FH | ciclo ácidos tricarboxílicos; metab. fumarato; regulador negativo ciclo celular; mitocondria | -3,1 | 0,999977 |
| 205088_at | chromosome X open reading frame 6 | CXorf6 | | -3,1 | 0,999135 |
| 207357_s_at | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10 (GalNAc-T10) | GALNT10 | transferasa de grupos glicosídicos; unión de azúcares y iones calcio y manganeso; aparato de Golgi y membrana | -3,1 | 0,998349 |
| 211814_s_at | cyclin E2 | CCNE2 | regulación y control del ciclo y división celular; núcleo | -3,1 | 0,999693 |
| 220298_s_at | spermatogenesis associated 6 | SPATA6 | | -3,1 | 0,99751 |
| 221650_s_at | mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 18 homolog (yeast) | MED18 | | -3,1 | 0,999727 |
| 223355_at | asparagine-linked glycosylation 1 homolog (yeast, beta-1,4-mannosyltransferase) | ALG1 | glicosilación de proteínas; biosíntesis lipopolisacáridos; actividad manosil transferasa; retículo endoplásmico | -3,1 | 0,999886 |
| 223843_at | scavenger receptor class A, member 3 | SCARA3 | transporte fosfatos; estrés oxidativo; protección a UV; citopl. | -3,1 | 0,99998 |
| 230701_x_at | kinesin family member 9 | KIF9 | movimiento basado en microtúbulos; microtúbulo | -3,1 | 0,999226 |
| 235638_at | Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 6 | RASSF6 | transducción de señal; unión a proteínas | -3,1 | 0,99987 |
| 205380_at | PDZ domain containing 1 | PDZK1 | transporte y proliferación celular | -3 | 0,99998 |
| 209567_at | RRS1 ribosome biogenesis regulator homolog | RRS1 | biogénesis de ribosomas; núcleo | -3 | 0,999911 |
| 212141_at | MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 | MCM4 | iniciación de la replicación del DNA; transcripción; núcleo | -3 | 0,999226 |
| 219522_at | four jointed box 1 (Drosophila) | FJX1 | espacio extracelular y núcleo | -3 | 0,99998 |
| 223842_s_at | scavenger receptor class A, member 3 | SCARA3 | transporte fosfatos; estrés oxidativo; protección a UV; citopl. | -3 | 0,99998 |
| 223950_s_at | FLYWCH-type zinc finger 1 | FLYWCH1 | actividad catalítica | -3 | 0,999654 |

Tabla 29.A. Genes sobreexpresados en células trofoblásticas JAR/G por interacción durante 42 horas con células epiteliales endometriales RL95-2.

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|---|--------------|---|----------------|----------|
| 202286_s_at | tumor-associated calcium signal transducer 2 | TACSTD2 | receptor de superficie celular ligado a transducción de señal; proliferación celular; percepción visual; citosol | 8,3 | 0,000052 |
| 210095_s_at | insulin-like growth factor binding protein 3 | IGFBP3 | regulación del crecimiento celular; inductor apoptosis y diferenciación del mioblasto; unión IGF; región extracelular | 8 | 0,000023 |
| 226228_at | aquaporin 4 | AQP4 | transporte; neurogénesis; excreción; membrana | 5,7 | 0,000241 |
| 214618_at | CASP8 and FADD-like apoptosis regulator | CFLAR | proteólisis y peptidólisis; anti-apoptosis; regulación positiva de cascada I-kappaB kinasa/NF-kappaB; actividad caspasa | 5,5 | 0,001201 |
| 219965_s_at | PDZ domain containing, X chromosome | FLJ21687 | unión de proteínas | 5,4 | 0,000078 |
| 1557046_x_at | cDNA FLJ33508 fis, clone BRAMY2005094 | | | 5,3 | 0,001486 |
| 208245_at | RAB9, member RAS oncogene family, pseudogene 1 | RAB9P1 | | 5,2 | 0,000307 |
| 217120_s_at | cofactor required for Sp1 transcriptional activation, subunit 2, 150kDa | CRSP2 | regulación transcripción sobre promotor RNA polimerasa II; ruta de señalización del receptor de andrógenos; | 5,2 | 0,000147 |
| 1558508_a_at | chromosome 1 open reading frame 53 | C1orf53 | | 5,1 | 0,001486 |
| 201008_s_at | thioredoxin interacting protein | TXNIP | | 5,1 | 0,000438 |
| 1570303_at | cDNA clone IMAGE:4620024, partial cds | | | 5 | 0,001336 |
| 1558534_at | PI-3-kinase-related kinase SMG-1-like | DKFZp547E087 | unión | 4,9 | 0,000774 |
| 211200_s_at | EF-hand calcium binding domain 2 | EFCAB2 | desarrollo muscular; actividad motriz; unión a calcio; miosina | 4,8 | 0,000046 |
| 223861_at | HORMA domain containing 1 | HORMAD1 | | 4,8 | 0,000492 |
| 242766_at | Similar to ankyrin repeat domain 20A | | | 4,8 | 0,000966 |
| 1556839_s_at | Spectrin, beta, non-erythrocytic 5 | SPTBN5 | organización y biogénesis del citoesqueleto de actina | 4,6 | 0,000692 |
| 1559293_x_at | Chromosome 9 open reading frame 14 | C9orf14 | | 4,5 | 0,000189 |
| 242799_at | Transcribed locus | | | 4,5 | 0,000023 |
| 202820_at | aryl hydrocarbon receptor | AHR | regulación transcripcional DNA-dependiente; transducción de señal; respuesta a estrés; ciclo celular; apoptosis; núcleo | 4,4 | 0,000552 |
| 232748_at | pregnancy-associated plasma protein A, pappalysin 1 | PAPPA | proteólisis y peptidólisis; embarazo; diferenciación celular; espacio extracelular | 4,4 | 0,000552 |
| 229103_at | Wingless-type MMTV integration site family, member 3 | WNT3 | morfogénesis; transducción de señal de la ruta "frizzled-2" | 4,3 | 0,000492 |
| 233000_x_at | Hs DNA sequence clone RP5-885L7 ch20q13.2-13.33 | | | 4,2 | 0,001201 |
| 242069_at | Chromobox homolog 5 (HP1 alpha homolog, Drosophila) | CBX5 | ensamblaje y desensamblaje de la cromatina; cromatina | 4,2 | 0,000023 |
| 1554649_at | Smoothelin | SMTN | contracción de músculo liso y desarrollo; citoesqueleto actina | 4,1 | 0,00225 |
| 1558990_at | Chromosome 18 open reading frame 21 | C18orf21 | | 4,1 | 0,00225 |
| 210331_at | HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 | HECW1 | ciclo de la ubiquitin; actividad ligasa de proteína-ubiquitina; espacio intracelular | 4,1 | 0,000492 |

Tabla 29.A (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|--|-----------|---|----------------|----------|
| 227855_at | hypothetical protein FLJ10357 | FLJ10357 | | 4,1 | 0,001651 |
| 230259_at | chromosome 10 open reading frame 125 | C10orf125 | transporte de carbohidratos | 4,1 | 0,000618 |
| 236609_at | PMS1 postmeiotic segregation increased 1 (S. cerevisiae) | PMS1 | regulación transcripcional DNA-dependiente; reparación de errores; regulador negativo del ciclo celular; núcleo | 4,1 | 0,000774 |
| 1559343_at | SNRPN upstream reading frame | SNRPN | procesamiento del mRNA; complejo nucleolar | 4 | 0,00225 |
| 208382_s_at | DMC1 dosage suppressor of mck1 homolog, meiosis-specific homologous recombination (yeast) | DMC1 | reparación del DNA; ciclo celular; recombinación meiótica; espermatogénesis; formación gametas femeninas; núcleo | 4 | 0,000101 |
| 1552825_at | zinc finger protein 396 | ZNF396 | regulación transcripcional negativa DNA-dependiente; núcleo | 3,9 | 0,000273 |
| 1559441_s_at | Cytochrome P450, family 4, subfamily V, polypeptide 2 | CYP4V2 | transporte de electrones; membrana | 3,9 | 0,000692 |
| 205952_at | potassium channel, subfamily K, member 3 | KCNK3 | transporte iones potasio; transmisión sináptica; membrana | 3,9 | 0,001651 |
| 201010_s_at | thioredoxin interacting protein | TXNIP | | 3,8 | 0,000023 |
| 240836_at | zinc finger protein 19 (KOX 12) | ZNF19 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | 3,8 | 0,000273 |
| 1570116_at | <i>Hs</i> Similar to hypothetical protein FLJ20378 | | | 3,7 | 0,00225 |
| 204179_at | myoglobin | MB | transporte de oxígeno y electrones; desarrollo muscular | 3,7 | 0,000214 |
| 216391_s_at | kelch-like 1 (Drosophila) | KLHL1 | organización y biogénesis citoesqueleto actina; citoplasma | 3,7 | 0,00249 |
| 216438_s_at | thymosin, beta 4, X-linked | TMSB4X | organización y biogénesis del citoesqueleto; citoplasma | 3,7 | 0,00002 |
| 1555968_a_at | cDNA FLJ30424 fis, similar to ZINC FINGER PROTEIN 195 | | | 3,6 | 0,00225 |
| 1556486_at | Homo sapiens, Similar to hypothetical gene LOC118703, clone IMAGE:4825811, mRNA, partial cds | | | 3,6 | 0,000692 |
| 1560253_at | LIM homeobox 9 | LHX9 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | 3,6 | 0,002032 |
| 206199_at | carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 7 | CEACAM7 | componente de membrana plasmática | 3,6 | 0,00004 |
| 209695_at | protein tyrosine phosphatase type IVA, member 3 | PTP4A3 | desfosforilación de aminoácidos proteicos; membrana | 3,6 | 0,002032 |
| 231967_at | PHD finger protein 20-like 1 | PHF20L1 | regulación transcripcional DNA-dependiente | 3,6 | 0,00003 |
| 235215_at | Transcribed locus, moderately similar to XP_521389.1 PREDICTED: similar to UTY [Pan troglodytes] | | | 3,6 | 0,000692 |
| 236936_at | Transcribed locus | | | 3,6 | 0,000068 |
| 212143_s_at | insulin-like growth factor binding protein 3 | IGFBP3 | regulación del crecimiento celular; inductor apoptosis y diferenciación del mioblasto; unión IGF; región extracelular | 3,5 | 0,00002 |
| 232184_at | amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) | ALS2 | organización y biogénesis del endosoma; citosol-endosoma | 3,5 | 0,001486 |
| 234111_at | cDNA: FLJ23063 fis, clone LNG04745 | | | 3,5 | 0,000692 |
| 241075_at | Transcribed locus | | | 3,5 | 0,002032 |
| 241911_at | cyclin-dependent kinase-like 3 | CDKL3 | | 3,5 | 0,00225 |

Tabla 29.A (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|-------------|---|---------|---|----------------|----------|
| 211222_s_at | huntingtin-associated protein 1 (neuroan 1) | HAP1 | transmisión sináptica; desarrollo; citoesqueleto de actina | 3,4 | 0,001336 |
| 215313_x_at | major histocompatibility complex, class I, A | HLA-A | presentación de antígenos endógenos vía MHC clase I | 3,3 | 0,001336 |
| 224387_at | COMM domain containing 5 | COMMD5 | núcleo | 3,3 | 0,000346 |
| 236574_at | UG=Hs.188680 ESTs | | | 3,3 | 0,001486 |
| 241377_s_at | Mindbomb homolog 2 (Drosophila) | ZZANK1 | ruta de señalización "Notch"; ubiquitinación; regulación positiva de la cascada I-kappaB kinasa/NF-kappaB | 3,3 | 0,001651 |
| 222272_x_at | scinderin | SCIN | encapsulado de extremos de filamentos de actina; citoesq. | 3,2 | 0,000147 |
| 234179_at | Acyloxyacyl hydrolase (neutrophil) | AOAH | metabolismo de lípidos; respuesta inflamatoria; membrana | 3,2 | 0,000389 |
| 41469_at | protease inhibitor 3, skin-derived (SKALP) | PI3 | copulación; inhibidor endopeptidasa tipo serina; extracelular | 3,2 | 0,000499 |
| 46947_at | Guanine nucleotide binding protein-like 3 nucleolar-like | GNL3L | unión de GTP | 3,2 | 0,00001 |
| 235040_at | RUN domain containing 1 | RUNDC1 | | 3,1 | 0,002032 |
| 203021_at | secretory leukocyte protease inhibitor; antileukoproteinase | SLPI | inhibición de endopeptidasas de tipo serina | 3 | 0,00002 |
| 205014_at | fibroblast growth factor binding protein 1 | FGFBP1 | señalización célula-célula; regulación negativa de la proliferación celular; unión a heparina; espacio extracelular | 3 | 0,000046 |
| 239582_at | promyelocytic leukemia | PML | regulación transcripcional DNA-dependiente; ubiquitinación | 3 | 0,000389 |
| 240795_at | Homo sapiens, clone IMAGE:5288566, mRNA | | | 3 | 0,001077 |

Tabla 29.B. Genes reprimidos en células trofoblásticas JAR/G por interacción durante 42 horas con células epiteliales endometriales RL95-2.

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|--|-----------|--|----------------|----------|
| 1555623_at | dermal papilla derived protein 12 | DERP12 | | -7,7 | 0,99998 |
| 238391_at | SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2 | SMURF2 | catabolismo proteico dependiente de ubiquitina; regulador negativo de la transcripción y del receptor TGFβ; núcleo | -5,7 | 0,999922 |
| 211179_at | runt-related transcription factor 1 (acute myeloid leukemia 1; aml1 oncogene) | RUNX1 | regulación transcripcional DNA-dependiente; activador de la RNA polimerasa II; desarrollo; núcleo | -5,3 | 0,998923 |
| 233847_x_at | Uncharacterized gastric protein ZA31P | | | -5,3 | 0,999886 |
| 211427_s_at | potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13 | KCNJ13 | transporte de iones potasio; complejo de canales de potasio operados por voltaje; membrana | -5,2 | 0,999906 |
| 1555928_at | cDNA FLJ30680 fis, clone FCBBF2000123 | | | -5 | 0,999382 |
| 1567703_at | Human oral cancer candidate gene, clone T9, 3 end | | | -4,9 | 0,999932 |
| 206797_at | N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase) | NAT2 | metabolismo; actividad arilamina N-acetil transferasa | -4,9 | 0,99998 |
| 244517_x_at | Ring finger protein 146 | RNF146 | ubiquitinación proteica; unión de iones metálicos | -4,9 | 0,998799 |
| 224354_at | gastric-associated differentially-expressed protein | YA61P | | -4,8 | 0,99998 |
| 209904_at | troponin C, slow | TNNC1 | desarrollo muscular; unión a calcio; | -4,6 | 0,999954 |
| 230462_at | numb homolog (Drosophila) | NUMB | desarrollo; componente de membrana plasmática | -4,6 | 0,999611 |
| 215267_s_at | solute carrier family 8 (sodium-calcium exchanger), member 2 | SLC8A2 | transporte de iones calcio y potasio; comunicación celular; | -4,5 | 0,999886 |
| 1552803_a_at | hypothetical protein FLJ32206 | FLJ32206 | | -4,4 | 0,998923 |
| 210664_s_at | tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor) | TFPI | coagulación sanguínea; inhibidor de endopeptidasa de tipo serina; región extracelular | -4,4 | 0,99994 |
| 226677_at | zinc finger protein 521 | ZNF521 | unión de iones zinc y ácidos nucleicos; núcleo | -4,3 | 0,99775 |
| 1568926_x_at | cardiac-MyBP-C associated Ca/CaM kinase | MLCK | fosforilación de aminoácidos proteicos; unión de ATP | -4,2 | 0,99751 |
| 223235_s_at | SPARC related modular calcium binding 2 | SMOC2 | unión de iones calcio; matriz extracelular | -4,2 | 0,999135 |
| 234623_x_at | Homo sapiens metastasis related protein (MB2) | MB2 | | -4,2 | 0,998514 |
| 215163_at | Homo sapiens cDNA FLJ12149 fis | | | -4,1 | 0,998168 |
| 232997_at | cDNA FLJ25684 fis, clone TST04185 | | | -4,1 | 0,999654 |
| 1555880_at | HERV-FRD provirus ancestral Env polyprotein | HERV-FRD | transposición DNA; membrana; cápside y envuelta viral | -4 | 0,99797 |
| 244524_at | Homo sapiens, clone IMAGE:4826696, mRNA | | | -4 | 0,999611 |
| 223655_at | scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M160 | M160 | receptor mendigo de membrana | -3,9 | 0,999611 |
| 234088_at | Hypothetical protein LOC154761 | LOC154761 | | -3,9 | 0,998664 |
| 240020_at | Hs.105741 /UG_TITLE=ESTs | | | -3,8 | 0,998349 |
| 217388_s_at | kynureninase (L-kynurenine hydrolase) | KYNU | catabolismo del triptofano; biosíntesis NAD; citoplasma | -3,7 | 0,99996 |

Tabla 29.B (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|-------------|---|---------------|---|----------------|----------|
| 220928_s_at | PR domain containing 16 | PRDM16 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | -3,7 | 0,999654 |
| 225817_at | cingulin-like 1 | CGNL1 | actividad motora; miosina | -3,7 | 0,999911 |
| 227971_at | Nik related kinase | NRK | fosforilación proteica; unión de ATP; actividad transferasa | -3,7 | 0,99775 |
| 230053_at | Transcribed locus | | | -3,7 | 0,999308 |
| 232049_at | cDNA: FLJ23065 fis, clone LNG04894 | | | -3,7 | 0,999382 |
| 234432_at | Homo sapiens metastasis related protein (MB2) | MB2 | | -3,7 | 0,999034 |
| 201427_s_at | selenoprotein P, plasma, 1 | SEPP1 | respuesta al estrés oxidativo; unión selenio; extracelular | -3,6 | 0,999948 |
| 202628_s_at | serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1 | SERPINE1 | coagulación sanguínea; inhibidor endopeptidasa de tipo serina; activador del plasminógeno; espacio extracelular | -3,6 | 0,999448 |
| 212706_at | RAS p21 protein activator 4 hypothetical protein FLJ21767 | RASA4FLJ21767 | cascada de señalización intracelular; activador GTPasa | -3,6 | 0,999786 |
| 220777_at | kinesin family member 13A | KIF13A | movimiento basado en microtúbulos; transporte proteico | -3,6 | 0,999786 |
| 238497_at | hypothetical protein MGC17839 | MGC17839 | componente de membrana | -3,6 | 0,999853 |
| 209417_s_at | interferon-induced protein 35 | IFI35 | respuesta inmune; respuesta a virus; núcleo | -3,5 | 0,999654 |
| 203729_at | epithelial membrane protein 3 | EMP3 | desarrollo; muerte y crecimiento celular; membrana | -3,4 | 0,998514 |
| 221013_s_at | apolipoprotein L, 2 | APOL2 | metabolismo y transporte lipídico (colesterol y lipoproteínas); desarrollo; respuesta a fase aguda; intra y extracelular | -3,4 | 0,997968 |
| 215356_at | ES cell associated transcript 8 | ECAT8 | | -3,3 | 0,999899 |
| 218044_x_at | parathymosin | PTMS | regulación ciclo celular; replicación DNA; desarrollo; núcleo | -3,3 | 0,999759 |
| 219951_s_at | chromosome 20 open reading frame 12 | C20orf12 | ruta de señalización de receptores asociados a proteína G | -3,3 | 0,998664 |
| 222571_at | ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 6 | ST6GALNAC6 | metabolismo carbohidratos; actividad sialil transferasa; glicosilación proteínas; biosíntesis de glicosfingolípidos; aparato de Golgi y membrana plasmática | -3,3 | 0,999382 |
| 220017_x_at | cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9 | CYP2C9 | transporte de electrones; retículo endoplásmico | -3,3 | 0,997968 |
| 1562514_at | Homo sapiens, clone IMAGE:5295326, mRNA | | | -3,2 | 0,999448 |
| 226403_at | transmembrane channel-like 4 | TMC4 | integrado en membrana | -3,2 | 0,999899 |
| 241292_at | Spastic paraplegia 20, spartin (Troyer syndrome) | SPG20 | | -3,2 | 0,999382 |
| 231674_at | UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B4 | UGT2B4 | catabolismo estrógenos; metabolismo; membrana plasm. | -3,1 | 0,998349 |
| 232174_at | Exostoses (multiple) 1 | EXT1 | desarrollo del esqueleto; biosíntesis glicosaminoglicanos; regulador negativo ciclo celular; biosíntesis de heparán sulfato proteoglicanos; transducción de señal; retículo/Golgi | -3,1 | 0,999135 |
| 236561_at | Transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kDa) | TGFBR1 | fosforilación proteica; transducción de señal; ensamblaje del complejo receptor de TGFβ; unión de ATP; membrana | -3,1 | 0,999508 |
| 239447_at | Transcribed locus | | | -3,1 | 0,999382 |

Tabla 29.B (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|-------------|--|----------|---|----------------|----------|
| 202627_s_at | serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1 | SERPINE1 | coagulación sanguínea; inhibidor endopeptidasa de tipo serina; activador del plasminógeno; espacio extracelular | -3 | 0,99996 |
| 209447_at | spectrin repeat containing, nuclear envelope 1 | SYNE1 | organización y biogénesis de núcleo y Golgi; diferenciación de células musculares | -3 | 0,998923 |
| 238825_at | acidic repeat containing | ACRC | componente de núcleo | -3 | 0,999922 |

Tabla 30.A. Genes sobreexpresados en células epiteliales endometriales "no adherentes" HEC-1A respecto a células endometriales "adherentes" RL95-2.

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|--|--------------|---|----------------|----------|
| 219564_at | potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 16 | KCNJ16 | transporte iones potasio; canales de potasio regulados por voltaje; membrana | 11,8 | 0,00002 |
| 244567_at | Transcribed locus | | | 11,7 | 0,000023 |
| 209875_s_at | secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1) | SPP1 | osificación; anti-apoptosis; señalización y adhesión celular; quimiotaxis células inmunes T-helper 1; diferenciación células mieloides; activador proliferación células T; regulador negativo mineralización del hueso; matriz extracelular | 10,5 | 0,00002 |
| 227803_at | ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 5 (putative function) | ENPP5 | metabolismo nucleótidos; actividad hidrolasa; componente de membrana | 10,2 | 0,00002 |
| 212077_at | caldesmon 1 | CALD1 | contracción y desarrollo muscular; unión a actina, miosina, tropomiosina y calmodulina; citoesqueleto | 10,1 | 0,00002 |
| 203324_s_at | caveolin 2 | CAV2 | componente de membrana (membrana caveolar) | 9,9 | 0,00002 |
| 205625_s_at | calbindin 1, 28kDa | CALB1 | unión a Vitamina D, calcio y proteínas; | 9,8 | 0,00002 |
| 202833_s_at | serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1 | SERPINA1 | respuesta a la fase aguda; inhibidor de endopeptidasas de tipo serina; unión a proteínas; región extracelular | 9,7 | 0,00002 |
| 203716_s_at | dipeptidylpeptidase 4 (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2) | DPP4 | proteólisis y peptidólisis; respuesta inmune; actividad aminopeptidasa; membrana | 9,7 | 0,00002 |
| 209937_at | transmembrane 4 L six family member 4 | TM4SF4 | N-glicosilación; regulador negativo proliferación celular | 9,6 | 0,000101 |
| 211478_s_at | dipeptidylpeptidase 4 (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2) | DPP4 | proteólisis y peptidólisis; respuesta inmune; actividad aminopeptidasa; membrana | 9,5 | 0,00002 |
| 219584_at | phospholipase A1 member A | PLA1A | metabolismo de lípidos y fosfatidilserina; | 9,5 | 0,00002 |
| 205476_at | chemokine (C-C motif) ligand 20 | CCL20 | quimiotaxis; respuesta inflamatoria; percepción sensorial; señalización célula-célula; espacio extracelular | 9,4 | 0,00002 |
| 221731_x_at | chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican) | CSPG2 | desarrollo; reconocimiento celular; matriz extracelular | 9,4 | 0,00002 |
| 1569110_x_at | programmed cell death 6 | PDCD6 | inducción de apoptosis por señalización extracelular | 9,3 | 0,000052 |
| 201645_at | tenascin C (hexabrachion) | TNC | adhesión celular; unión a proteínas; matriz extracelular | 9,3 | 0,00002 |
| 226556_at | Ribosomal protein L4 | RPL4 | biosíntesis de proteínas; unión a RNA; componente estructural del ribosoma; intracelular (ribosoma) | 9,3 | 0,00002 |
| 227614_at | hexokinase domain containing 1 | HKDC1 | glucólisis; actividad hexoquinasa; unión de ATP | 9,3 | 0,00002 |
| 214890_s_at | DKFZP564J102 protein | DKFZP564J102 | | 9,2 | 0,00002 |
| 226145_s_at | Fraser syndrome 1 | FRAS1 | comunicación celular; matriz extracelular | 9,2 | 0,00002 |
| 240253_at | Transcribed locus | | | 9,2 | 0,00002 |
| 205311_at | dopa decarboxylase, aromatic L-amino acid decarboxylase | DDC | metabolismo aminoácidos; biosíntesis catecolaminas | 9,1 | 0,00002 |

Tabla 30.A (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|--|-----------|---|----------------|----------|
| 220332_at | claudin 16 | CLDN16 | transporte iones magnesio; excreción; percepción sonido; adhesión célula-célula calcio independiente; membrana | 9 | 0,00002 |
| 239319_at | cDNA clone IMAGE:5297581, partial cds | | | 9 | 0,00002 |
| 205541_s_at | G1 to S phase transition 2 | GSPT2 | transición G1/S en el ciclo celular mitótico; catabolismo del mRNA; biosíntesis de proteínas; unión a GTP; intracelular | 8,9 | 0,00002 |
| 1556300_s_at | mRNA; cDNA DKFZp564A232 (clone DKFZp564A232) | | | 8,8 | 0,000078 |
| 209448_at | HIV-1 Tat interactive protein 2, 30kDa | HTATIP2 | inducción apoptosis; regulación promotor RNA pol II; núcleo | 8,8 | 0,00004 |
| 205894_at | arylsulfatase E (chondrodysplasia punctata 1) | ARSE | desarrollo del esqueleto; metabolismo | 8,6 | 0,00002 |
| 215726_s_at | cytochrome b-5 | CYB5 | transporte electrones; mitocondria, retículo endoplásmico | 8,6 | 0,000023 |
| 224443_at | chromosome 1 open reading frame 97 | C1orf97 | | 8,6 | 0,00002 |
| 226147_s_at | polymeric immunoglobulin receptor | PIGR | secreción proteínas; componente de membrana | 8,6 | 0,00002 |
| 202741_at | protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta | PRKACB | fosforilación de proteínas; transducción de señal; núcleo | 8,5 | 0,00002 |
| 213787_s_at | emopamil binding protein (sterol isomerase) | EBP | desarrollo esquelético; biosíntesis colesterol; retículo endopl. | 8,4 | 0,00002 |
| 214235_at | cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5 | CYP3A5 | transporte electrones; metabolismo xenobiótico y de esteroides; membrana, retículo endoplásmico; microsoma | 8,3 | 0,00002 |
| 1552566_at | chromosome 10 open reading frame 87 | C10orf87 | unión a proteínas | 8,3 | 0,00004 |
| 230563_at | RasGEF domain family, member 1A | RASGEF1A | transducción de señal mediada por GTPasa pequeña | 8,3 | 0,00002 |
| 207016_s_at | aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2 | ALDH1A2 | metabolismo vitamina A; deshidrogenasa de retina | 8,2 | 0,00002 |
| 214234_s_at | cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5 | CYP3A5 | transporte electrones; metabolismo xenobiótico y de esteroides; membrana, retículo endoplásmico, microsoma | 8,2 | 0,00002 |
| 201616_s_at | caldesmon 1 | CALD1 | contracción y desarrollo muscular; unión a actina, miosina, tropomiosina y calmodulina; citoesqueleto | 8,1 | 0,00002 |
| 203717_at | dipeptidylpeptidase 4 (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2) | DPP4 | proteólisis y peptidólisis; respuesta inmune; actividad aminopeptidasa; membrana | 8,1 | 0,000078 |
| 220393_at | glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase) domain containing 1 | GLULD1 | biosíntesis de glutamina y compuestos nitrogenados | 8,1 | 0,000114 |
| 238567_at | sphingosine-1-phosphate phosphatase 2 | SGPP2 | actividad hidrolasa; retículo endoplásmico y membrana | 8,1 | 0,00002 |
| 1569454_a_at | hypothetical protein LOC283352 | LOC283352 | | 8 | 0,00002 |
| 205433_at | butyrylcholinesterase | BCHE | metabolismo de cocaína; región extracelular | 8 | 0,000035 |
| 215646_s_at | chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican) | CSPG2 | desarrollo; reconocimiento celular; matriz extracelular | 8 | 0,00002 |
| 204059_s_at | malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic | ME1 | metabolismo malato (ciclo ác. tricarboxílicos); citosol | 7,9 | 0,00002 |
| 209366_x_at | cytochrome b-5 | CYB5 | transporte electrones; mitocondria, retículo endoplásmico | 7,9 | 0,00002 |
| 1563209_a_at | Homo sapiens, clone IMAGE:4513167, mRNA | | | 7,8 | 0,00002 |

Tabla 30.A (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|-------------|--|--|--|----------------|----------|
| 205674_x_at | FXYP domain containing ion transport regulator 2 | FXYP2 | transporte iones; complejo ATPasa de membrana intercambiador de sodio:potasio | 7,8 | 0,00002 |
| 232151_at | mRNA full length insert cDNA clone EUROIMAGE 2344436 | | | 7,8 | 0,00002 |
| 201425_at | aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial) | ALDH2 | metabolismo de carbohidratos y alcohol; mitocondria | 7,7 | 0,00002 |
| 211470_s_at | sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 1 | SULT1C1 | metabolismo aminas; sulfotransferasa; citoplasma | 7,7 | 0,000078 |
| 214307_at | homogentisate 1,2-dioxygenase (homogentisate oxidase) | HGD | catabolismo tirosina y L-fenilalanina; unión de iones hierro; actividad oxidorreductasa | 7,7 | 0,000035 |
| 223294_at | chromosome X open reading frame 26 | CXorf26 | | 7,7 | 0,00002 |
| 202784_s_at | nicotinamide nucleotide transhydrogenase | NNT | transporte electrones/protones; oxidorreducción; mitocondria | 7,6 | 0,00002 |
| 203323_at | caveolin 2 | CAV2 | componente de membrana (membrana caveolar) | 7,6 | 0,00002 |
| 205626_s_at | calbindin 1, 28kDa | CALB1 | unión a Vitamina D, calcio y proteínas; | 7,6 | 0,00002 |
| 211571_s_at | chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican) | CSPG2 | desarrollo y reconocimiento celular; matriz extracelular | 7,6 | 0,00002 |
| 229273_at | sal-like 1 (Drosophila) | SALL1 | regulación transcripcional; morfogénesis; núcleo | 7,6 | 0,000241 |
| 237552_at | cDNA clone IMAGE:4667929, partial cds | | | 7,6 | 0,00002 |
| 205342_s_at | sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 1 | SULT1C1 | metabolismo de aminas; sulfotransferasa; citoplasma | 7,5 | 0,000078 |
| 202363_at | sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) | SPOCK | proliferación, adhesión y motilidad celular; desarrollo; neurogénesis; unión a calcio; matriz extracelular | 7,5 | 0,00002 |
| 206517_at | cadherin 16, KSP-cadherin | CDH16 | adhesión celular homofílica; unión calcio, proteínas; memb. | 7,5 | 0,00002 |
| 214164_x_at | carbonic anhydrase XII | CA12 | metabolismo compuestos de un sólo carbono; membrana | 7,5 | 0,000027 |
| 221911_at | ets variant gene 1 | ETV1 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | 7,5 | 0,00003 |
| 226402_at | cytochrome P450, family 2, subfamily U, polypeptide 1 | CYP2U1 | transporte electrones; membrana | 7,5 | 0,000692 |
| 232267_at | G protein-coupled receptor 133 | GPR133 | transducción de señal; ruta de neuropéptidos; membrana | 7,5 | 0,00003 |
| 207434_s_at | FXYP domain containing ion transport regulator 2 | FXYP2 | transporte sodio/potasio; intercambiador ATPasa; membrana | 7,4 | 0,00002 |
| 235700_at | cancer/testis antigen CT45-2 cancer/testis antigen CT45-3 cancer/testis antigen CT45-4 cancer/testis antigen CT45-5 cancer/testis antigen CT45-6 cancer/testis antigen CT45-1 | CT45-2 CT45-3 CT45-4 CT45-5 CT45-6 CT45-1 | | 7,4 | 0,000189 |
| 207843_x_at | cytochrome b-5 | CYB5 | transporte electrones; mitocondria, retículo endoplásmico | 7,3 | 0,000035 |
| 228692_at | DEP domain containing 2 | DEPDC2 | cascada de señalización intracelular | 7,3 | 0,001651 |
| 224819_at | transcription elongation factor A (SII)-like 8 | TCEAL8 | factor de elongación en la transducción | 7,2 | 0,00002 |
| 224367_at | brain expressed X-linked 2 | BEX2 | | 7,2 | 0,00002 |

Tabla 30.A (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|-------------|---|----------|---|----------------|----------|
| 228423_at | Hypothetical protein FLJ21159 | FLJ21159 | | 7,2 | 0,00002 |
| 244780_at | sphingosine-1-phosphate phosphotase 2 | SGPP2 | actividad hidrolasa; retículo endoplásmico y membrana | 7,2 | 0,00002 |
| 1559147_at | cDNA: FLJ23328 fis, clone HEP12645 | | | 7,1 | 0,000023 |
| 1560066_at | Homo sapiens, clone IMAGE:3922927, mRNA | | | 7,1 | 0,00013 |
| 201617_x_at | caldesmon 1 | CALD1 | contracción y desarrollo muscular; unión a actina, miosina, tropomiosina y calmodulina; citoesqueleto | 7,1 | 0,00003 |
| 209387_s_at | transmembrane 4 L six family member 1 | TM4SF1 | componente de membrana | 7,1 | 0,00002 |
| 211184_s_at | Usher syndrome 1C (autosomal recessive, severe) | USH1C | señalización intracelular; percepción acústica y visual | 7,1 | 0,000023 |
| 229228_at | cAMP responsive element binding protein 5 | CREB5 | regulación positiva de la transcripción; núcleo | 7,1 | 0,00002 |
| 242406_at | Transcribed locus | | | 7,1 | 0,00002 |
| 226560_at | Sphingosine-1-phosphate phosphotase 2 | SGPP2 | actividad hidrolasa; retículo endoplásmico y membrana | 7 | 0,00002 |
| 217989_at | dehydrogenase/reductase (SDR family) member 8 | DHRS8 | metabolismo; actividad oxidorreductasa | 7 | 0,00002 |
| 216189_at | <i>Hs</i> , clone IMAGE:3344506, mRNA, partial cds | | | 6,9 | 0,000088 |
| 203303_at | t-complex-associated-testis-expressed 1-like | TCTE1L | | 6,9 | 0,00002 |
| 209723_at | serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9 | SERPINB9 | inhibidor de endopeptidasas de tipo serina; citosol | 6,9 | 0,00002 |
| 218729_at | latexin | LXN | inhibidor de metaloendopeptidasas | 6,9 | 0,00002 |
| 222931_s_at | threonine synthase-like 1 (bacterial) | THNSL1 | metabolismo, biosíntesis aminoácidos y treonina | 6,9 | 0,00002 |
| 226814_at | a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 9 | ADAMTS9 | catabolismo glicoproteínas; desarrollo; matriz extracelular | 6,9 | 0,00002 |
| 235947_at | Transcribed locus, moderately similar to XP_512541.1 PREDICTED: similar to hypothetical protein [Pan troglodytes] | | | 6,9 | 0,00002 |
| 239162_at | Death-associated protein kinase 1 | DAPK1 | fosforilación proteínas; inducción apoptosis; citoesqueleto | 6,9 | 0,00002 |
| 244532_x_at | Hypothetical LOC401131 | | | 6,9 | 0,00002 |
| 203963_at | carbonic anhydrase XII | CA12 | metabolismo compuestos de un sólo carbono; membrana | 6,8 | 0,00002 |
| 215034_s_at | transmembrane 4 L six family member 1 | TM4SF1 | componente de membrana | 6,8 | 0,00002 |
| 217564_s_at | carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial | CPS1 | ciclo de la urea; biosíntesis arginina y bases pirimidínicas; metab. glutamina y compuestos nitrogenados; mitocondria | 6,8 | 0,00002 |
| 226851_at | lysophospholipase-like 1 | LYPLAL1 | actividad catalítica | 6,8 | 0,00002 |
| 203817_at | guanylate cyclase 1, soluble, beta 3 | | | 6,7 | 0,00002 |
| 205478_at | protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A | PPP1R1A | metabolismo carbohidratos-glucógeno; transducción señal | 6,7 | 0,000023 |
| 205769_at | solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member2 | SLC27A2 | metabolismo ácidos grasos de cadena larga; peroxisoma | 6,7 | 0,00002 |
| 206082_at | <i>Hs</i> MHC class I region ORF (P5-1), mRNA | | | 6,7 | 0,00002 |

Tabla 30.A (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|---|---------------|--|----------------|----------|
| 207052_at | hepatitis A virus cellular receptor 1 | HAVCR1 | actividad como receptor | 6,7 | 0,000078 |
| 226127_at | prostate cancer antigen-1 | DEPC-1 | unión de iones hierro; actividad oxidorreductasa | 6,7 | 0,00002 |
| 226190_at | Ribosomal protein L4 | RPL4 | biosíntesis de proteínas; unión a RNA; componente estructural del ribosoma; intracelular (ribosoma) | 6,7 | 0,00002 |
| 228275_at | cDNA FLJ32438 fis, clone SKMUS2001402 | | | 6,7 | 0,00002 |
| 1557548_at | Homo sapiens, clone IMAGE:4819341, mRNA | | | 6,6 | 0,000046 |
| 204508_s_at | carbonic anhydrase XII | CA12 | metabolismo compuestos de un sólo carbono; membrana | 6,6 | 0,00002 |
| 204620_s_at | chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican) | CSPG2 | desarrollo; reconocimiento celular; matriz extracelular | 6,6 | 0,000035 |
| 205765_at | cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5 | CYP3A5 | transporte electrones; unión iones hierro; metabolismo xenobiótico y esteroide; membrana; retículo endoplásmico | 6,6 | 0,00002 |
| 206876_at | single-minded homolog 1 (Drosophila) | SIM1 | factor transcripción; neurogénesis; diferenciación; núcleo | 6,6 | 0,00006 |
| 230005_at | hypothetical protein DKFZp313A2432 | DKFZp313A2432 | | 6,6 | 0,00013 |
| 205767_at | epiregulin | EREG | regulación ciclo; angiogénesis; proliferación, señalización y diferenciación celular; receptor de EGF; región extracelular | 6,6 | 0,00003 |
| 240480_at | tubulointerstitial nephritis antigen | TINAG | proteólisis y peptidólisis; adhesión celular; morfogénesis túbulo de Malpighi; membrana basal | 6,6 | 0,000114 |
| 1564220_a_at | cDNA FLJ39613 fis, clone SKNSH2009357 | | | 6,5 | 0,000078 |
| 1568658_at | hypothetical gene supported by AK075484; BC014578 | LOC339804 | | 6,5 | 0,00002 |
| 204619_s_at | chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican) | CSPG2 | desarrollo; reconocimiento celular; matriz extracelular | 6,5 | 0,000023 |
| 222901_s_at | potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 16 | KCNJ16 | transporte de iones potasio; canales iónicos regulados por voltaje; membrana | 6,5 | 0,00002 |
| 225911_at | likely ortholog of mouse nephronectin | NPNT | unión de iones calcio; membrana | 6,5 | 0,000078 |
| 229659_s_at | Polymeric immunoglobulin receptor | PIGR | secreción proteínas; componente de membrana | 6,5 | 0,00004 |
| 232361_s_at | ets homologous factor | EHF | diferenciación cél. epiteliales; activador transcrip.; núcleo | 6,5 | 0,00002 |
| 213789_at | emopamil-binding protein (sterol isomerase) | EBP | desarrollo esquelético; biosíntesis colesterol; retículo endopl. | 6,4 | 0,000189 |
| 227940_at | Hypothetical protein LOC339803 | LOC339803 | | 6,4 | 0,000078 |
| 228111_s_at | dynein, axonemal, heavy polypeptide 1 | DNAH1 | motilidad ciliar/flagelar; respuesta a estímulos mecánicos | 6,4 | 0,000438 |
| 230093_at | testis specific A2 homolog (mouse) | TSGA2 | meiosis | 6,4 | 0,00002 |
| 235583_at | immunoglobulin-like domain containing receptor 1 | ILDR1 | actividad como receptor | 6,4 | 0,000023 |
| 1559361_at | Full length insert cDNA clone ZD75H06 | | | 6,3 | 0,000027 |
| 203851_at | insulin-like growth factor binding protein 6 | IGFBP6 | regulación crecimiento celular; transducción de señal; inhibición proliferación; unión a IGF; espacio extracelular | 6,3 | 0,00002 |

Tabla 30.A (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|--|--|---|----------------|----------|
| 1567912_s_at | cancer/testis antigen CT45-2 cancer/testis antigen CT45-3 cancer/testis antigen CT45-4 cancer/testis antigen CT45-5 cancer/testis antigen CT45-6 cancer/testis antigen CT45-1 | CT45-2 CT45-3 CT45-4 CT45-5 CT45-6 CT45-1 | | 6,3 | 0,000068 |
| 203895_at | phospholipase C, beta 4 | PLCB4 | metabolismo lipídico; señalización intracelular | 6,3 | 0,000046 |
| 205222_at | enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase | EHHADH | generación precursores de metabolitos y energía; metabolismo de lípidos y ácidos grasos; peroxisoma | 6,3 | 0,000078 |
| 214749_s_at | armadillo repeat containing, X-linked 6 | ARMCX6 | | 6,3 | 0,00002 |
| 218872_at | hypothetical protein FLJ20607 | TSC | unión a iones calcio | 6,3 | 0,00002 |
| 222771_s_at | myelin expression factor 2 | MYEF2 | transcripción; determinación destino mioblastos; núcleo | 6,3 | 0,000027 |
| 226086_at | synaptotagmin XIII | SYT13 | transporte; vesícula sináptica y membrana | 6,3 | 0,00002 |
| 229927_at | LEM domain containing 1 | LEMD1 | membrana nuclear | 6,3 | 0,000046 |
| 241390_at | Transcribed locus | | | 6,3 | 0,00004 |
| 1563462_at | mRNA, cDNA DKFZp686P12109 (clone DKFZp686P12109) | | | 6,2 | 0,000865 |
| 203954_x_at | claudin 3 | CLDN3 | adhesión célula-célula calcio independiente; membrana | 6,2 | 0,000027 |
| 208962_s_at | fatty acid desaturase 1 | FADS1 | desaturación ác. grasos; diferenciación celular; biosíntesis fosfolípidos e icosanoides; señalización célula-célula; regulación transcripcional; membrana y microsoma | 6,2 | 0,000078 |
| 209386_at | transmembrane 4 L six family member 1 | TM4SF1 | componente de membrana | 6,2 | 0,00002 |
| 222444_at | armadillo repeat containing, X-linked 3 | ARMCX3 | unión | 6,2 | 0,000078 |
| 224189_x_at | ets homologous factor | EHF | diferenciación cél. epiteliales; activador transcrip.; núcleo | 6,2 | 0,00002 |
| 226764_at | hypothetical protein LOC152485 | LOC152485 | unión a iones zinc y ácidos nucleicos; núcleo | 6,2 | 0,00002 |
| 234082_at | cDNA FLJ11831 fis, clone HEMBA1006562 | | | 6,2 | 0,00002 |
| 235278_at | Homo sapiens, clone IMAGE:4513167, mRNA | | | 6,2 | 0,00002 |
| 1556381_at | NMDA receptor regulated 1 | NARG1 | angiogénesis; diferenciación; regulador transcrip.; núcleo | 6,1 | 0,000023 |
| 205334_at | S100 calcium binding protein A1 | S100A1 | cascada señalización intracelular; regulación contracción cardíaca; retículo sarcoplásmico | 6,1 | 0,000023 |
| 205418_at | feline sarcoma oncogene | FES | fosforilación proteínas; desarrollo; proliferación celular | 6,1 | 0,00003 |
| 211355_x_at | leptin receptor | LEPR | metabolismo reservas de energía; desarrollo; membrana | 6,1 | 0,000865 |
| 220333_at | progesterin and adipoQ receptor family member V | PAQR5 | | 6,1 | 0,000078 |
| 232676_x_at | myelin expression factor 2 | MYEF2 | transcripción; determinación destino mioblastos; núcleo | 6,1 | 0,00002 |
| 239556_at | Homo sapiens, clone IMAGE:5276804, mRNA | | | 6,1 | 0,00002 |

Tabla 30.A (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|-------------|---|---------------|--|----------------|----------|
| 244056_at | surfactant associated protein G | SFTPG | | 6,1 | 0,00002 |
| 1569377_at | hypothetical protein MGC26979 | MGC26979 | | 6 | 0,00013 |
| 204058_at | malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic | ME1 | metabolismo malato (ciclo ác. tricarbóxicos); citosol | 6 | 0,00002 |
| 208716_s_at | transmembrane and coiled-coil domains 1 | TMCO1 | | 6 | 0,00002 |
| 209160_at | aldo-keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II) | AKR1C3 | metabolismo lípidos-prostaglandinas; proliferación celular; reductasa de grupos ceto/aldehído; transporte electrones | 6 | 0,00002 |
| 211098_x_at | transmembrane and coiled-coil domains 1 | TMCO1 | | 6 | 0,000078 |
| 211682_x_at | UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B28 | UGT2B28 | metabolismo xenobiótico; retículo endoplásm.; microsoma | 6 | 0,00004 |
| 214717_at | hypothetical protein DKFZp434H1419 | DKFZp434H1419 | | 6 | 0,000027 |
| 217109_at | mucin 4, tracheobronchial | MUC4 | adhesión célula-matriz; receptor ErbB-2; matriz-membrana | 6 | 0,000088 |
| 220738_s_at | ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 6 | RPS6KA6 | fosforilación proteínas; desarrollo sistema nervioso central | 6 | 0,001486 |
| 223272_s_at | chromosome 1 open reading frame 57 | C1orf57 | proteólisis y peptidólisis | 6 | 0,00002 |
| 226707_at | similar to CG3714 gene product | PP3856 | biosíntesis de nucleótidos piridínicos | 6 | 0,000101 |
| 228780_at | POU domain, class 3, transcription factor 3 | POU3F3 | regulación transcripcional; desarrollo del SNC; núcleo | 6 | 0,00002 |
| 229002_at | hypothetical protein MGC20262 | MGC20262 | | 6 | 0,00002 |
| 230789_at | suppressor of hairy wing homolog 2 (Drosophila) | SUHW2 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | 6 | 0,000068 |
| 236798_at | cDNA FLJ32438 fis, clone SKMUS2001402 | | | 6 | 0,00002 |

Tabla 30.B. Genes reprimidos en células epiteliales endometriales "no adherentes" HEC-1A respecto a células endometriales "adherentes" RL95-2.

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|---|-----------|--|----------------|----------|
| 209604_s_at | GATA binding protein 3 | GATA3 | regulación transcripcional; percepción sonidos; morfogénesis; respuesta de defensa; núcleo | -11 | 0,99998 |
| 200953_s_at | cyclin D2 | CCND2 | regulación ciclo celular (división); núcleo | -10,6 | 0,99998 |
| 219529_at | chloride intracellular channel 3 | CLIC3 | transporte; canales ion cloro regulados por voltaje; memb. | -10,4 | 0,99998 |
| 210397_at | defensin, beta 1 | DEFB1 | respuesta inmune innata a patógenos, bacterias y parásitos | -10,2 | 0,99998 |
| 227361_at | heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3B1 | HS3ST3B1 | | -10 | 0,999977 |
| 203571_s_at | chromosome 10 open reading frame 116 | C10orf116 | | -9,9 | 0,99998 |
| 201147_s_at | tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory) | TIMP3 | ruta señalización receptor transmembrana tirosina quinasa; percepción visual; inducción apoptosis; matriz extracelular | -9,6 | 0,99998 |
| 225710_at | cDNA FLJ34013 fis, clone FCBBF2002111 | | | -9,5 | 0,99998 |
| 218454_at | hypothetical protein FLJ22662 | FLJ22662 | | -9,4 | 0,99997 |
| 201008_s_at | thioredoxin interacting protein | TXNIP | | -9,3 | 0,99998 |
| 203535_at | S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B) | S100A9 | respuesta inflamatoria; transducción señal; espacio extracel. | -9,3 | 0,99998 |
| 209602_s_at | GATA binding protein 3 | GATA3 | regulación transcripcional; percepción sonidos; morfogénesis; respuesta de defensa; núcleo | -9,3 | 0,99998 |
| 230464_at | endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 8 | EDG8 | ruta señalización receptor asociado a proteína G; receptor lisoesfingolípidos-ac. lisofosfatídico; integrado a membrana | -9,3 | 0,99998 |
| 202575_at | cellular retinoic acid binding protein 2 | CRABP2 | regulación transcripcional; desarrollo epidermis; núcleo | -9,2 | 0,99998 |
| 201010_s_at | thioredoxin interacting protein | TXNIP | | -9,1 | 0,99998 |
| 1557411_s_at | similar to solute carrier family 25 , member 16 | LOC203427 | biosíntesis-transporte de proteínas; memb, ribosoma, mitoc. | -8,9 | 0,99998 |
| 206504_at | cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1 | CYP24A1 | transporte electrones; mitocondria | -8,9 | 0,99996 |
| 219768_at | V-set domain containing T cell activation inhibitor 1 | VTCN1 | | -8,8 | 0,99998 |
| 224646_x_at | H19, imprinted maternally expressed untranslated mRNA | H19 | | -8,8 | 0,99998 |
| 202499_s_at | solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3 | SLC2A3 | metabolismo-transporte carbohidratos (glucosa); membrana | -8,7 | 0,99998 |
| 215729_s_at | vestigial like 1 (Drosophila) | VGLL1 | regulación transcripción (coactivador); núcleo | -8,6 | 0,99998 |
| 1559477_s_at | Meis1, myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog (mouse) | MEIS1 | regulación transcripcional DNA dependiente; núcleo | -8,5 | 0,99998 |
| 224215_s_at | delta-like 1 (Drosophila) | DLL1 | desarrollo embrionario; comunicación celular; neurogénesis; ruta señalización Notch; diferenciación; morfogénesis oído interno; hemopoyesis; odontogénesis; determinación destino células receptor auditivo; adhesión; membrana-extracelular | -8,5 | 0,99998 |

Tabla 30.B (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|---|-------------------|---|----------------|----------|
| 1553296_at | G protein-coupled receptor 128 | GPR128 | transducción de señal ruta neuropéptidos; membrana | -8,5 | 0,99998 |
| 202286_s_at | tumor-associated calcium signal transducer 2 | TACSTD2 | transducción señal ligada a receptor sup. Celular; percepción visual; proliferación; citosol y membrana | -8,5 | 0,99998 |
| 222088_s_at | solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3 and member 14 | SLC2A3 SLC2A14 | metabolismo carbohidratos (glucosa); espermatogénesis; diferenciación celular; membrana | -8,4 | 0,99998 |
| 222242_s_at | kallikrein 5 | KLK5 | proteólisis y peptidólisis; desarrollo epidermis; extracelular | -8,4 | 0,999977 |
| 200633_at | ubiquitin B | UBB | | -8,3 | 0,99998 |
| 201148_s_at | tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory) | TIMP3 | ruta señalización receptor transmembrana tirosina kinasa; percepción visual; inducción apoptosis; matriz extracelular | -8,3 | 0,99998 |
| 201110_s_at | thrombospondin 1 | THBS1 | motilidad y adhesión celular; desarrollo, neurogénesis; coagulación sanguínea; región extracelular | -8,2 | 0,99998 |
| 225242_s_at | steroid sensitive gene 1 | URB | | -8,2 | 0,99998 |
| 228523_at | nanos homolog 1 (Drosophila) | NANOS1 | regulación transducción; unión a RNA y iones zinc | -8,2 | 0,999973 |
| 221417_x_at | endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 8 | EDG8 | ruta señalización receptor asociado a proteína G; memb. | -8,1 | 0,99998 |
| 222446_s_at | beta-site APP-cleaving enzyme 2 | BACE2 | proteólisis y secreción proteínas; procesamiento hormonas peptídicas; inhibidor biosíntesis precursores amieloides | -8,1 | 0,99998 |
| 1552767_a_at | heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2 | HS6ST2 | actividad transferasa | -8 | 0,999973 |
| 203256_at | cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental) | CDH3 | adhesión celular homofílica; percepción visual; membrana | -8 | 0,99998 |
| 224221_s_at | vav 3 oncogene | VAV3 | transducción señal mediada por GTPasa pequeña | -8 | 0,99998 |
| 235549_at | IBR domain containing 2 | IBRDC2 | transporte electrones; ubiquitinación proteínas; membrana | -8 | 0,99998 |
| 215516_at | laminin, beta 4 | LAMB4 | adhesión celular; unión proteínas; membrana basal | -7,9 | 0,99998 |
| 238455_at | <i>Hs</i> , Similar to AD038, clone IMAGE:3838464, mRNA | | | -7,9 | 0,99998 |
| 239624_at | LOC440885 | LOC440885 | | -7,9 | 0,99751 |
| 204855_at | serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5 | SERPINB5 | motilidad celular; inhibidor de endopeptidasas tipo serina | -7,8 | 0,99998 |
| 242397_at | Oxidised low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1 | OLR1 | proteólisis y peptidólisis; circulación; membrana | -7,7 | 0,99998 |
| 202497_x_at | solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3 | SLC2A3 | metabolismo-transporte carbohidratos (glucosa); membrana | -7,7 | 0,99998 |
| 215076_s_at | collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant) | COL3A1 | transporte fosfatos; circulación; organogénesis; colágeno tipo III y citoplasma | -7,7 | 0,99997 |
| 225612_s_at | UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5 | B3GNT5 | glicosilación proteínas; biosíntesis glicolípidos; desarrollo del sistema nervioso central; intracelular y membrana | -7,7 | 0,99998 |
| 224348_s_at | Homo sapiens PRO2605 mRNA | | | -7,6 | 0,99998 |

Tabla 30.B (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|---|-------------|--|----------------|----------|
| 207826_s_at | inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein | ID3 | desarrollo; regulación transcripción (co-represor); núcleo | -7,6 | 0,99998 |
| 200951_s_at | cyclin D2 | CCND2 | regulación ciclo celular (división); núcleo | -7,4 | 0,99998 |
| 210002_at | GATA binding protein 6 | GATA6 | activador transcripcional; desarrollo músculo; núcleo | -7,4 | 0,99998 |
| 219014_at | placenta-specific 8 | PLAC8 | | -7,4 | 0,99998 |
| 201641_at | bone marrow stromal cell antigen 2 | BST2 | respuesta inmune humoral; desarrollo; proliferación celular; activador cascada I-kappaB kinase/NF-kappaB; membrana | -7,3 | 0,999977 |
| 201842_s_at | EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein1 | EFEMP1 | percepción visual; unión iones calcio; matriz extracelular | -7,3 | 0,99998 |
| 209631_s_at | G protein-coupled receptor 37 (endothelin receptor type B-like) | GPR37 | ruta señalización receptor asociado a proteína G (receptor tipo rodopsina); integrado a membrana plasmática | -7,3 | 0,999899 |
| 227059_at | Glypican 6 | GPC6 | matriz extracelular y membrana | -7,3 | 0,99998 |
| 1555756_a_at | C-type lectin domain family 7, member A | CLEC7A | fagocitosis; reconocimiento celular; activación células T; señalización mediada por carbohidratos; respuesta humoral frente a hongos y bacterias; reducción virulencia; membrana | -7,2 | 0,99998 |
| 208978_at | cysteine-rich protein 2 | CRIP2 | unión a iones zinc | -7,2 | 0,99998 |
| 229309_at | Adrenergic, beta-1-, receptor | ADRB1 | activación adenilato ciclasa; ruta receptor asoc. prot-G; memb | -7,2 | 0,999811 |
| 203980_at | fatty acid binding protein 4, adipocyte | FABP4 | transporte; unión ácidos grasos; fracción soluble; citoplasma | -7,1 | 0,99998 |
| 209318_x_at | pleiomorphic adenoma gene-like 1 | PLAGL1 | regulación transcripcional; inducción apoptosis; núcleo | -7,1 | 0,99998 |
| 212614_at | AT rich interactive domain 5B (MRF1-like) | ARID5B | inhibidor de la transcripción DNA-dependiente; núcleo | -7,1 | 0,99998 |
| 221558_s_at | lymphoid enhancer-binding factor 1 | LEF1 | regulac. transcripción; ruta señalización receptor Wnt; núcleo | -7,1 | 0,99998 |
| 223384_s_at | tripartite motif-containing 4 | TRIM4 | ubiquitinación de proteínas; complejo ubiquitina-ligasa | -7,1 | 0,99998 |
| 226302_at | ATPase, Class I, type 8B, member 1 | ATP8B1 | metab. lípidos; digestión; transporte cationes/ac. biliar; memb | -7,1 | 0,99998 |
| 201009_s_at | thioredoxin interacting protein | TXNIP | | -7 | 0,99998 |
| 208690_s_at | PDZ and LIM domain 1 (elfin) | PDLIM1 | respuesta a estrés oxidativo; citoesqueleto | -7 | 0,99998 |
| 211368_s_at | caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase) | CASP1 | proteólisis y peptidólisis; transducción de señal; regulación apoptosis; cascada I-kappaB kinase/NF-kappaB; intracelular | -7 | 0,99998 |
| 215388_s_at | complement factor H and H-related 1 | CFH / CFHL1 | respuesta inmune; activación ruta complementos; extracel. | -7 | 0,99998 |
| 217867_x_at | beta-site APP-cleaving enzyme 2 | BACE2 | proteólisis y secreción proteínas; procesamiento hormonas peptídicas; inhibidor biosíntesis precursores amieloides | -7 | 0,99998 |
| 201149_s_at | tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory) | TIMP3 | ruta señalización receptor transmembrana tirosina kinasa; percepción visual; inducción apoptosis; matriz extracelular | -6,9 | 0,99998 |

Tabla 30.B (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|---|-----------|---|----------------|----------|
| 201058_s_at | myosin, light polypeptide 9, regulatory | MYL9 | regulación desarrollo y contracción del músculo; miosina | -6,9 | 0,999977 |
| 1555942_a_at | Nasopharyngeal carcinoma-associated antigen NPC-A-5 | | | -6,9 | 0,999911 |
| 212096_s_at | mitochondrial tumor suppressor 1 | MTUS1 | actividad como receptor | -6,9 | 0,99998 |
| 212768_s_at | olfactomedin 4 | OLFM4 | receptor de latrotoxina; membrana | -6,9 | 0,99998 |
| 215356_at | ES cell associated transcript 8 | ECAT8 | | -6,9 | 0,99996 |
| 218806_s_at | vav 3 oncogene | VAV3 | señalización intracelular mediada por GTPasa pequeña | -6,9 | 0,99998 |
| 219764_at | frizzled homolog 10 (Drosophila) | FZD10 | ruta de señalización frizzled; desarrollo; receptor Wnt; memb. | -6,9 | 0,999833 |
| 221047_s_at | MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1 | MARK1 | fosforilación proteínas; biogénesis-organización citoesquel. | -6,9 | 0,999973 |
| 242064_at | sidekick homolog 2 (chicken) | SDK2 | | -6,9 | 0,999886 |
| 1552701_a_at | CARD only protein | COPI | proteólisis y peptidólisis; regulación apoptosis; intracelular | -6,8 | 0,99998 |
| 1555148_a_at | hypothetical protein BC014602 | LOC130951 | | -6,8 | 0,99998 |
| 202917_s_at | S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A) | S100A8 | respuesta inflamatoria; unión de calcio; espacio extracelular | -6,8 | 0,99998 |
| 205487_s_at | vestigial like 1 (Drosophila) | VGLL1 | regulación transcripcional DNA depte (coactivador); núcleo | -6,8 | 0,99998 |
| 209173_at | anterior gradient 2 homolog (Xenopus laevis) | AGR2 | | -6,8 | 0,99998 |
| 224833_at | v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 | ETS1 | regulador transcrip.; respuesta inmune; inhibidor proliferación | -6,8 | 0,99997 |
| 225912_at | tumor protein p53 inducible nuclear protein 1 | TP53INP1 | apoptosis; núcleo | -6,8 | 0,999786 |
| 228698_at | SRY (sex determining region Y)-box 7 | SOX7 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | -6,8 | 0,99998 |
| 202391_at | brain abundant, membrane attached signal protein 1 | BASP1 | citoesqueleto y membrana plasmática | -6,7 | 0,99998 |
| 203773_x_at | biliverdin reductase A | BLVRA | transporte electrones y metabolismo | -6,7 | 0,999833 |
| 227522_at | similar to mouse 2310016A09Rik gene | LOC134147 | proteína hipotética LOC134147; actividad hidrolasa | -6,7 | 0,99998 |
| 235534_at | Transcribed locus, weakly similar to NP_872301.1 hypothetical protein FLJ25224 [Homo sapiens] | | | -6,7 | 0,999811 |
| 202177_at | growth arrest-specific 6 | GAS6 | crecimiento-proliferación celular; transducción señal; extracel. | -6,6 | 0,999654 |
| 202233_s_at | ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein | UQCRH | transporte electrones; fosforilación oxidativa; respiración aeróbica; mitocondria | -6,6 | 0,99998 |
| 207397_s_at | homeo box D13 | HOXD13 | desarrollo esqueleto; factor regulador transcripción; núcleo | -6,6 | 0,99987 |
| 213800_at | complement factor H | CFH | respuesta inmune; activación ruta complementos; extracel. | -6,6 | 0,99998 |
| 224997_x_at | H19, imprinted maternally expressed untranslated mRNA | H19 | | -6,6 | 0,99998 |
| 228776_at | gap junction protein, alpha 7, 45kDa (connexin 45) | GJA7 | transporte; contracción muscular; ensamblaje uniones intercelulares; comunicación; complejo conexón; membrana | -6,6 | 0,99998 |

Tabla 30.B (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|---|-----------|--|----------------|----------|
| 212489_at | collagen, type V, alpha 1 | COL5A1 | transporte fosfatos; adhesión; unión heparina; colágeno | -6,5 | 0,99998 |
| 209603_at | GATA binding protein 3 | GATA3 | regulación transcripcional; percepción sonidos; morfogénesis; respuesta de defensa; núcleo | -6,5 | 0,99998 |
| 223393_s_at | zinc finger protein 537 | ZNF537 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | -6,5 | 0,99998 |
| 1552367_a_at | scinderin | SCIN | encapsulado de extremos de filamentos de actina; citoesq. | -6,4 | 0,99998 |
| 1555705_a_at | chemokine-like factor super family 3 | CKLFSF3 | quimiotaxis; percepción sensorial; extracelular y membrana | -6,4 | 0,999973 |
| 206910_x_at | complement factor H-related 2 | CFHL2 | espacio extracelular | -6,4 | 0,999811 |
| 209035_at | midkine (neurite growth-promoting factor 2) | MDK | regulación ciclo; proliferación; neurogénesis; señalización célula-célula; desarrollo glándula suprarrenal; extracelular | -6,4 | 0,99998 |
| 209738_x_at | pregnancy specific beta-1-glycoprotein 6 | PSG6 | embarazo; espacio extracelular | -6,4 | 0,999899 |
| 213139_at | snail homolog 2 (Drosophila) | SNAI2 | inhibidor transcripción; desarrollo; interacción meso-endodermo; percepción sonido; núcleo | -6,4 | 0,999977 |
| 219938_s_at | proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2 | PSTPIP2 | | -6,4 | 0,99998 |
| 225817_at | cingulin-like 1 | CGNL1 | actividad motora; miosina | -6,4 | 0,999977 |
| 227276_at | plexin domain containing 2 | PLXDC2 | desarrollo; actividad como receptor; membrana | -6,4 | 0,99998 |
| 229616_s_at | hypothetical protein LOC196996 | LOC196996 | | -6,4 | 0,99998 |
| 212488_at | collagen, type V, alpha 1 | COL5A1 | transporte fosfatos; adhesión; unión heparina; colágeno | -6,3 | 0,99998 |
| 233090_at | Glypican 6 | GPC6 | componente de matriz extracelular y membrana plasmática | -6,3 | 0,999693 |
| 201150_s_at | tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory) | TIMP3 | ruta señalización receptor transmembrana tirosina kinasa; percepción visual; inducción apoptosis; matriz extracelular | -6,2 | 0,99997 |
| 204955_at | sushi-repeat-containing protein, X-linked | SRPX | adhesión celular; unión proteínas; superficie celular (memb) | -6,2 | 0,99996 |
| 206023_at | neuromedin U | NMU | regulación contracción músculo liso; digestión; señalización mediada por neuropéptidos | -6,2 | 0,99998 |
| 225128_at | KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) containing 2 | KDELC2 | | -6,2 | 0,999973 |
| 225763_at | RCSD domain containing 1 | RCSD1 | actividad kinasa | -6,2 | 0,999508 |
| 231928_at | hairy and enhancer of split 2 (Drosophila) | HES2 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | -6,2 | 0,99998 |
| 235079_at | Homo sapiens, clone IMAGE:4654429, mRNA | | | -6,2 | 0,99998 |
| 235952_at | Transcribed locus | | | -6,2 | 0,99998 |
| 1554127_s_at | methionine sulfoxide reductase B3 | MSRB3 | reparación de proteínas; mitocondria; retículo endoplásmico | -6,1 | 0,999899 |
| 202409_at | putative insulin-like growth factor II associated protein | LOC492304 | unión de factor de crecimiento de tipo insulina (IGF) | -6,1 | 0,99998 |
| 202976_s_at | Rho-related BTB domain containing 3 | RHOBTB3 | actividad GTPasa; unión a proteínas | -6,1 | 0,99997 |
| 204179_at | myoglobin | MB | transporte oxígeno; desarrollo muscular | -6,1 | 0,999954 |

Tabla 30.B (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|---|---------|---|----------------|----------|
| 204455_at | dystonin | DST | organización-biogénesis citoesqueleto; arresto ciclo celular; adhesión celular; señalización mediada por integrinas; membrana basal, citoplasma y citoesqueleto | -6,1 | 0,99996 |
| 206307_s_at | forkhead box D1 | FOXD1 | regulación transcripcional DNA dependiente; núcleo | -6,1 | 0,999973 |
| 209905_at | homeo box A9 | HOXA9 | regulación transcripción DNA-depte; desarrollo; núcleo | -6,1 | 0,999973 |
| 210004_at | oxidised low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1 | OLR1 | proteólisis y peptidólisis; circulación; membrana | -6,1 | 0,99998 |
| 212845_at | sterile alpha motif domain containing 4 | SAMD4 | | -6,1 | 0,99998 |
| 218559_s_at | v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian) | MAFB | regulación transcripción; desarrollo órganos sensoriales; núcleo | -6,1 | 0,99998 |
| 219936_s_at | G protein-coupled receptor 87 | GPR87 | ruta señalización receptor asociado a proteína G; memb. | -6,1 | 0,99998 |
| 229215_at | achaete-scute complex-like 2 (Drosophila) | ASCL2 | transcrip.; desarrollo SNC y periférico; diferenciación; núcleo | -6,1 | 0,99998 |
| 240135_x_at | Synapsin III | SYN3 | secreción neurotransmisores; vesícula sináptica | -6,1 | 0,999833 |
| 1557918_s_at | solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 1 | SLC16A1 | transporte aniones orgánicos (mevalonato); membrana | -6 | 0,99998 |
| 201787_at | fibulin 1 | FBLN1 | metabolismo quitina; componente estructural matriz extracel. | -6 | 0,99998 |
| 202437_s_at | cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 | CYP1B1 | desarrollo ocular; visión; transporte electrones; retículo end. | -6 | 0,99998 |
| 202994_s_at | fibulin 1 | FBLN1 | metabolismo quitina; componente estructural matriz extracel. | -6 | 0,99998 |
| 206832_s_at | sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3F | SEMA3F | desarrollo; espacio extracelular | -6 | 0,999654 |
| 209692_at | eyes absent homolog 2 (Drosophila) | EYA2 | desarrollo ocular; desarrollo; metabolismo; núcleo | -6 | 0,999977 |
| 213603_s_at | ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2) | RAC2 | transducción de señal mediada por GTPasa pequeña | -6 | 0,99998 |
| 216860_s_at | growth differentiation factor 11 | GDF11 | desarrollo esqueleto/mesodermo; neurogénesis; crecimiento | -6 | 0,99996 |
| 229125_at | ankyrin repeat domain 38 | ANKRD38 | | -6 | 0,99998 |

Tabla 31.A. Genes sobreexpresados en células trofoblásticas JAR/G como consecuencia de la transducción con retrovirus de las células JAR.

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|---|---|--|----------------|----------|
| 1555623_at | dermal papilla derived protein 12 | DERP12 | | 7,7 | 0,00002 |
| 233822_x_at | uncharacterized gastric protein YC12P | LOC57400 | aminoacilación de seril-tRNA | 7,1 | 0,000101 |
| 224354_at | gastric-associated differentially-expressed protein | YA61P | | 6,7 | 0,000078 |
| 212706_at | RAS p21 protein activator 4 | RASA4 | casca de señalización intracelular; activador GTPasa | 6,3 | 0,000068 |
| 233847_x_at | Uncharacterized gastric protein ZA31P | | | 6,2 | 0,00002 |
| 217388_s_at | kynureninase (L-kynurenine hydrolase) | KYNU | catabolismo del triptofano; biosíntesis de NAD; citoplasma | 6,1 | 0,000046 |
| 241345_at | zinc finger protein 265 | ZNF265 | corte y empalme (<i>splicing</i>) de RNA; núcleo | 6,1 | 0,000692 |
| 1559147_at | cDNA: FLJ23328 fis, clone HEP12645 | | | 6 | 0,001336 |
| 220132_s_at | C-type lectin superfamily 2, member D | CLEC2D | transducción de señal; unión de azúcares; membrana | 5,9 | 0,000865 |
| 239725_at | GPI deacylase | PGAP1 | actividad catalítica | 5,9 | 0,000189 |
| 203108_at | G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A | GPRC5A | receptor asociado a proteína G para la transducción de señales; membrana plasmática | 5,7 | 0,000552 |
| 217578_at | Exportin 1 (CRM1 homolog, yeast) | XPO1 | importación proteica al núcleo; poro nuclear, nucleoplasma | 5,5 | 0,00002 |
| 237278_x_at | ATPase, Ca++ transporting, type 2C, member 1 | ATP2C1 | transporte de cationes y homeostasis; metabolismo; Golgi | 5,5 | 0,000147 |
| 1555339_at | RAP1A, member of RAS oncogene family | RAP1A | transporte proteico intracelular; ciclo celular; membrana | 5,4 | 0,000046 |
| 244770_at | Hypothetical gene supported by AK091718 | | | 5,4 | 0,00225 |
| 1562988_at | PHEX27HOM gene, 3' UTR | | | 5,3 | 0,000774 |
| 227283_at | Clone 24841 mRNA sequence | | | 5,3 | 0,001077 |
| 213397_x_at | ribonuclease, RNase A family, 4 | RNASE4 | degradación del mRNA | 5,1 | 0,001486 |
| 1555340_x_at | RAP1A, member of RAS oncogene family | RAP1A | transporte proteico intracelular; ciclo celular; membrana | 5 | 0,000046 |
| 208498_s_at | amylase, alpha 1A; salivary amylase, alpha 1B; salivary amylase, alpha 1C; salivary amylase, alpha 2A; pancreatic amylase, alpha 2B; pancreatic | AMY1A AMY1B AMY1C AMY2A AMY2B | metabolismo carbohidratos; actividad alfa amilasa digestión, unión de iones calcio; extracelular metabolismo carbohidratos; actividad glicosil-hidrolasa | 4,9 | 0,000114 |
| 215717_s_at | fibrillin 2 (congenital contractural arachnodactyly) | FBN2 | morfogénesis; componente de la matriz extracelular | 4,9 | 0,000438 |
| 1557283_a_at | zinc finger protein 519 | ZNF519 | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | 4,8 | 0,000492 |
| 1557321_a_at | calpain 14 | CAPN14 | | 4,8 | 0,000214 |
| 208763_s_at | TSC22 domain family, member 3 | TSC22D3 | regulación de la transcripción DNA-dependiente | 4,8 | 0,00002 |
| 223772_s_at | DKFZP564G2022 protein | DKFZP564G2022 | componente de membrana | 4,8 | 0,000088 |
| 225817_at | cingulin-like 1 | CGNL1 | actividad motriz; miosina | 4,8 | 0,00013 |
| 1567703_at | Human oral cancer candidate gene mRNA | | | 4,7 | 0,000114 |

Tabla 31.A (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|-------------|--|-----------|--|----------------|----------|
| 220100_at | solute carrier family 22 (organic anion/cation transporter), member 11 | SLC22A11 | transporte; actividad catalítica; transporte de aniones orgánicos independiente de sodio; membrana plasmática | 4,7 | 0,00013 |
| 232801_at | RAD26L hypothetical protein | LOC375748 | unión a DNA; actividad helicasa; unión de ATP | 4,6 | 0,000966 |
| 241240_at | Activating transcription factor 6 | ATF6 | regulación transcripcional; co-activador RNA polimerasa II | 4,6 | 0,000865 |
| 206885_x_at | growth hormone 1 | GH1 | transducción de señales; actividad hormonal; extracelular | 4,5 | 0,000346 |
| 219503_s_at | transmembrane protein 40 | TMEM40 | | 4,5 | 0,000027 |
| 228339_at | Transcribed locus, strongly similar to XP_549577.1 | | | 4,5 | 0,00225 |
| 222142_at | cylindromatosis (turban tumor syndrome) | CYLD | catabolismo proteico dependiente de ubiquitina; regulador negativo del ciclo celular; citoesqueleto | 4,5 | 0,001832 |
| 208045_at | surfactant protein A binding protein | SPAR | intercambio gaseoso respiratorio; secreción proteínas | 4,4 | 0,000552 |
| 208581_x_at | metallothionein 1X | MT1X | transporte de electrones; respuesta a iones metálicos | 4,4 | 0,00002 |
| 213261_at | lupus brain antigen 1 | LBA1 | | 4,4 | 0,00003 |
| 217268_at | RAB7, member RAS oncogene family | RAB7 | transporte proteico intracelular; endocitosis; actividad GTPasa; endosoma | 4,4 | 0,000692 |
| 220364_at | hypothetical protein FLJ11235 | FLJ11235 | | 4,4 | 0,000492 |
| 1556865_at | Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 2 | PACSIN2 | transporte proteico intracelular; endocitosis; citoplasma; organización y biogénesis del citoesqueleto de actina | 4,3 | 0,000692 |
| 1569021_at | Phosphoinositide-3-kinase, class 2, alpha polypeptide | PIK3C2A | biosíntesis de fosfatidil inositol; ruta señalización intracelular | 4,3 | 0,000774 |
| 230607_at | C-myc promoter binding protein | MYCPBP | regulación de la transcripción DNA-dependiente; núcleo | 4,3 | 0,000214 |
| 200965_s_at | actin binding LIM protein 1 | ABLIM1 | biosíntesis y organización del citoesqueleto; órgano génesis | 4,2 | 0,000023 |
| 206797_at | N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase) | NAT2 | metabolismo; actividad aril-amina N-acetil transferasa | 4,2 | 0,00002 |
| 212185_x_at | metallothionein 2A | MT2A | homeostasis del ion cobre | 4,2 | 0,00002 |
| 214053_at | V-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian) | ERBB4 | fosforilación de aminoácidos; receptor transmembrana de ruta de señalización de la proteína tirosina kinasa; desarrollo proliferación celular; respuesta humoral; memb. plasmática | 4,2 | 0,001077 |
| 203807_x_at | chorionic somatomammotropin hormone 2 | CSH2 | embarazo; señalización célula-célula; región extracelular | 4,1 | 0,000114 |
| 217165_x_at | metallothionein 1F (functional) | MT1F | unión de iones metálicos (cobre, cadmio, zinc); citoplasma | 4,1 | 0,00002 |
| 234088_at | Hypothetical protein LOC154761 | LOC154761 | | 4,1 | 0,000101 |
| 224221_s_at | vav 3 oncogene | VAV3 | cascada de señalización intracelular mediada por GTPasa | 4 | 0,000346 |
| 237778_at | Diaphanous homolog 2 (Drosophila) | DIAPH2 | citoquinesis; diferenciación, biogénesis y organización celular (citoesqueleto actina); oogénesis; membrana | 4 | 0,000167 |
| 203779_s_at | epithelial V-like antigen 1 | EVA1 | adhesión celular; morfogénesis; membrana y citoesqueleto | 3,9 | 0,00004 |

Tabla 31.A (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|--|-----------|---|----------------|----------|
| 204326_x_at | metallothionein 1X | MT1X | transporte de electrones; respuesta a iones metálicos | 3,9 | 0,00002 |
| 206577_at | vasoactive intestinal peptide | VIP | contracción muscular; secreción de fluidos; actividad hormonal; regulador positivo de la proliferación; extracelular | 3,9 | 0,001651 |
| 215112_x_at | MCF2 cell line derived transforming sequence-like 2 | MCF2L2 | | 3,9 | 0,000492 |
| 235900_at | hypothetical protein MGC29671 | MGC29671 | transporte; integrada a membrana | 3,9 | 0,000167 |
| 238013_at | Pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 2 | PLEKHA2 | unión de fosfolípidos; núcleo y membrana | 3,9 | 0,001651 |
| 237628_at | Tryptophanyl tRNA synthetase 2 (mitochondrial) | WARS2 | biosíntesis de proteínas; aminoacilación de triptofanil tRNA | 3,9 | 0,001832 |
| 1556677_at | Zinc finger protein, Y-linked | ZFY | regulación transcripcional DNA-dependiente; núcleo | 3,8 | 0,001077 |
| 1569238_a_at | Homo sapiens, clone IMAGE:5259731, mRNA | | | 3,8 | 0,000214 |
| 206461_x_at | metallothionein 1H | MT1H | unión de iones metálicos (cobre y cadmio) y proteínas | 3,8 | 0,000189 |
| 228362_s_at | Hypothetical protein LOC441168 | LOC441168 | | 3,8 | 0,001832 |
| 233302_at | B-cell CLL/lymphoma 11B (zinc finger protein) | BCL11B | regulación de la transcripción DNA-dependiente; núcleo | 3,8 | 0,000552 |
| 236610_at | Phosphodiesterase 4D, cAMP-specific (phosphodiesterase E3 dunce homolog, Drosophila) | PDE4D | transducción de señal; metabolismo de nucleótidos cíclicos; actividad fosfodiesterasa e hidrolasa | 3,8 | 0,000046 |
| 227609_at | epithelial stromal interaction 1 (breast) | EPSTI1 | | 3,7 | 0,000046 |
| 238391_at | SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2 | SMURF2 | catabolismo proteico dependiente de ubiquitina; regulador negativo de la transcripción (receptor TGFβ); citoesqueleto | 3,7 | 0,000774 |
| 240178_at | Hypothetical protein MGC13168 | MGC13168 | | 3,7 | 0,000692 |
| 211924_s_at | plasminogen activator, urokinase receptor | PLAUR | motilidad celular; quimiotaxis; coagulación sanguínea; regulación proteólisis y peptidólisis; membrana plasmática | 3,6 | 0,000023 |
| 219921_s_at | dedicator of cytokinesis 5 | DOCK5 | unión a GTP | 3,6 | 0,00003 |
| 221916_at | Neurofilament, light polypeptide 68kDa | NEFL | componente del citoesqueleto; neurofilamento, axón | 3,6 | 0,001832 |
| 226818_at | macrophage expressed gene 1 | MPEG1 | | 3,6 | 0,00249 |
| 228018_at | chromosome 20 open reading frame 58 | C20orf58 | componente de membrana | 3,6 | 0,000307 |
| 230609_at | enthoprotin | ENTH | endocitosis; unión de lípidos | 3,6 | 0,000167 |
| 235414_at | zinc finger protein 383 | ZNF383 | regulación de la transcripción DNA-dependiente; núcleo | 3,6 | 0,000618 |
| 243450_at | A kinase (PRKA) anchor protein 13 | AKAP13 | casca de señalización intracelular; actividad kinasa; memb. | 3,6 | 0,001336 |
| 1558111_at | Muscleblind-like (Drosophila) | MBNL1 | desarrollo embrionario y del músculo; neurogénesis; núcleo | 3,5 | 0,000865 |
| 201819_at | scavenger receptor class B, member 1 | SCARB1 | transporte; apoptosis; adhesión celular; metabol. colesterol | 3,5 | 0,000438 |
| 202627_s_at | serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1 | SERPINE1 | coagulación sanguínea; inhibidor de endopeptidasas de tipo serina; activador del plasminógeno; espacio extracelular | 3,5 | 0,000147 |
| 204202_at | IQ motif containing E | IQCE | | 3,5 | 0,000774 |

Tabla 31.A (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|-------------|---|-----------|--|----------------|----------|
| 206130_s_at | asialoglycoprotein receptor 2 | ASGR2 | endocitosis; transducción de señal; receptor de membrana | 3,5 | 0,000078 |
| 208294_x_at | chorionic somatomammotropin hormone-like 1 | CSHL1 | actividad hormonal; región extracelular | 3,5 | 0,00006 |
| 210430_x_at | Rhesus blood group, D antigen | RHD | membrana plasmática | 3,5 | 0,000389 |
| 211456_x_at | Similar to 60S ribosomal protein L35 | | | 3,5 | 0,000088 |
| 219634_at | carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 11 | CHST11 | metab. carbohidratos; biosíntesis condroitin sulfato; Golgi | 3,5 | 0,000035 |
| 229241_at | lactate dehydrogenase D | LDHD | transporte de electrones; biosíntesis de ATP; mitocondria | 3,5 | 0,000492 |
| 242988_at | DC-STAMP domain containing 2 | DCST2 | | 3,5 | 0,000167 |
| 244655_at | Hypothetical LOC339025 | | | 3,5 | 0,001832 |
| 1553271_at | KIAA1463 protein | KIAA1463 | metabolismo; activ. catalítica; unión a factor transcripcional | 3,4 | 0,001486 |
| 1562546_at | Similar to F-box only protein 25 isoform 3; F-box protein Fbx25; F-box only protein 25 | | | 3,4 | 0,000167 |
| 203969_at | hypothetical protein LOC153914 | LOC153914 | | 3,4 | 0,000147 |
| 208356_x_at | chorionic somatomammotropin hormone 1 (placental lactogen) | CSH1 | actividad hormonal; región extracelular | 3,4 | 0,000052 |
| 209304_x_at | growth arrest and DNA-damage-inducible, beta | GADD45B | activación MAPKKK; apoptosis; estrés; diferenciación celular | 3,4 | 0,000865 |
| 213629_x_at | metallothionein 1F (functional) | MT1F | unión de iones metálicos (cobre, zinc y cadmio); citoplasma | 3,4 | 0,00002 |
| 228667_at | 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 4 (lysophosphatidic acid acyltransferase, delta) | AGPAT4 | metabolismo; biosíntesis de fosfolípidos; membrana | 3,4 | 0,000214 |
| 243736_at | Methyltransferase 5 domain containing 1 | FLJ33979 | actividad metil transferasa | 3,4 | 0,00003 |
| 203256_at | cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental) | CDH3 | adhesión celular homofílica; percepción visual; membrana | 3,3 | 0,000618 |
| 215267_s_at | solute carrier family 8 (sodium-calcium exchanger), member 2 | SLC8A2 | transporte de sodio y calcio; comunicación celular; membrana | 3,3 | 0,001651 |
| 226403_at | transmembrane channel-like 4 | TMC4 | componente de membrana | 3,3 | 0,000046 |
| 230941_at | hypothetical LOC400988 | LOC400988 | | 3,3 | 0,000692 |
| 242697_at | zinc finger protein 540 | ZNF540 | regulación de la transcripción DNA-dependiente; núcleo | 3,3 | 0,000966 |
| 45297_at | EH-domain containing 2 | EHD2 | unión de iones y ácidos nucleicos; actividad GTPasa; núcleo | 3,3 | 0,000009 |
| 1562440_at | Ribosomal protein L4 | RPL4 | biosíntesis proteica; componente estructural del ribosoma | 3,2 | 0,000241 |
| 1570329_at | Zinc finger protein 395 | ZNF395 | unión a ácidos nucleicos y al ion zinc; núcleo | 3,2 | 0,000618 |
| 204008_at | dynein, axonemal, light polypeptide 4 | DNAL4 | movimiento a través de microtúbulos; complejo axón-dineína | 3,2 | 0,000046 |
| 210845_s_at | plasminogen activator, urokinase receptor | PLAUR | motilidad celular; quimiotaxis; coagulación sanguínea; regulación proteólisis y peptidólisis; superficie celular | 3,2 | 0,00002 |
| 228751_at | CDC-like kinase 4 | CLK4 | fosforilación de aminoácidos; kinasa serina/treonina; núcleo | 3,2 | 0,000189 |
| 232641_at | zinc finger protein 596 | ZNF596 | regulación de la transcripción DNA-dependiente; núcleo | 3,2 | 0,000966 |

Tabla 31.A (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|-------------|--|-----------|--|----------------|----------|
| 240159_at | solute carrier family 15 (H+/peptide transporter) member2 | SLC15A2 | transporte de oligopéptidos y proteínas; membrana | 3,2 | 0,000346 |
| 1562794_at | Fibroblast growth factor 12 | FGF12 | actividad como factor de crecimiento; núcleo | 3,1 | 0,002032 |
| 203104_at | colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog | CSF1R | fosforilación de aminoácidos; receptor transmembrana de ruta de señalización de la proteína tirosina kinasa; desarrollo proliferación celular; respuesta humoral; memb. plasmática | 3,1 | 0,00002 |
| 207279_s_at | nebulette | NEBL | regulación longitud filamentos de actina; citoesqueleto | 3,1 | 0,001486 |
| 230366_at | hypothetical LOC149913 | LOC149913 | | 3,1 | 0,000774 |
| 1559787_at | cDNA FLJ40633 fis, clone THYMU2015439 | | | 3 | 0,002032 |
| 209346_s_at | phosphatidylinositol 4-kinase type II | PI4KII | biosíntesis de fosfatidil inositol; membrana plasmática | 3 | 0,001201 |
| 212489_at | collagen, type V, alpha 1 | COL5A1 | transporte de fosfatos; adhesión celular; colágeno tipo V | 3 | 0,000389 |
| 212992_at | chromosome 14 open reading frame 78 | C14orf78 | | 3 | 0,000101 |
| 221524_s_at | Ras-related GTP binding D | RRAGD | transporte; núcleo y citoplasma | 3 | 0,00002 |
| 226248_s_at | KIAA1324 | KIAA1324 | | 3 | 0,002032 |
| 232174_at | Exostoses (multiple) 1 | EXT1 | desarrollo del esqueleto; regulador negativo del ciclo celular; transducción de señal; biosíntesis de heparán sulfato proteoglicano y glicosaminoglicanos; retículo endoplásmico | 3 | 0,000865 |
| 235850_at | WD repeat domain 5B | WDR5B | señalización ligada al complejo heterodimérico proteína G | 3 | 0,00002 |
| 238717_at | cDNA FLJ31114 fis, clone IMR322000379 | | | 3 | 0,00249 |
| 239014_at | Cell division cycle and apoptosis regulator 1 | CCAR1 | unión a DNA y iones calcio | 3 | 0,000618 |
| 240569_at | Asialoglycoprotein receptor 2 | ASGR2 | endocitosis; receptor de sup. celular (azúcares); membrana | 3 | 0,000492 |

Tabla 31.B. Genes reprimidos en células trofoblásticas JAR/G, modificados como consecuencia de la transducción con retrovirus de las células JAR.

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|---|-----------|---|----------------|----------|
| 224924_at | tetratricopeptide repeat domain 7A | TTC7A | | -5,2 | 0,999135 |
| 207780_at | cylicin, basic protein of sperm head cytoskeleton 2 | CYLC2 | espermatogénesis y diferenciación celular; componente estructural del citoesqueleto | -5 | 0,99775 |
| 241784_x_at | DNA helicase HEL308 | HEL308 | actividad helicasa dependiente de ATP; | -5 | 0,998168 |
| 236896_at | Transcribed locus | | | -4,9 | 0,998923 |
| 231967_at | PHD finger protein 20-like 1 | PHF20L1 | regulación de la transcripción DNA-dependiente | -4,8 | 0,999508 |
| 244467_at | LOC440829 | LOC440829 | | -4,7 | 0,999508 |
| 1569690_at | hypothetical protein LOC339834 | LOC339834 | | -4,5 | 0,998923 |
| 209739_s_at | patatin-like phospholipase domain containing 4 | PNPLA4 | metabolismo lipídico | -4,5 | 0,999973 |
| 204824_at | endonuclease G | ENDOG | metabolismo del DNA; actividad hidrolasa y endonucleasa | -4,4 | 0,999973 |
| 242857_at | FERM, RhoGEF and pleckstrin domain protein 2 | FARP2 | proteína de unión del citoesqueleto | -4,4 | 0,998664 |
| 205259_at | nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2 | NR3C2 | regulación de la transcripción; receptor de hormonas esteroideas; componente celular nuclear | -4,3 | 0,998514 |
| 215232_at | KIAA0672 gene product | KIAA0672 | unión a proteínas; citoplasma | -4,3 | 0,999508 |
| 238190_at | Tu translation elongation factor, mitochondrial | TUFM | biosíntesis de proteínas; elongación transduccional | -4,2 | 0,998514 |
| 243755_at | prolactin receptor | PRLR | biosíntesis de esteroideas; anti apoptosis; receptor de superficie celular; implantación de embriones; lactancia | -4,3 | 0,997968 |
| 215543_s_at | like-glycosyltransferase | LARGE | metabolismo de N-acetylglucosamine y glicosfingolípidos | -4,1 | 0,998349 |
| 228932_at | Similar to implantation-associated protein | LOC442474 | | -4 | 0,999135 |
| 46947_at | Guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)-like | GNL3L | unión de GTP | -4 | 0,999993 |
| 1558508_a_at | chromosome 1 open reading frame 53 | C1orf53 | | -3,9 | 0,999922 |
| 1558906_a_at | Hs clone IMAGE:5265020, mRNA | | | -3,9 | 0,999562 |
| 226638_at | Rho GTPase activating protein 23 | ARHGAP23 | | -3,9 | 0,999899 |
| 234577_at | cDNA DKFZp434I1526 (from clone DKFZp434I1526) | | | -3,9 | 0,999693 |
| 209851_at | KIAA0853 | KIAA0853 | unión a metales y ácidos nucleicos | -3,8 | 0,998799 |
| 213719_s_at | SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4 | SMARCA4 | regulación de la transcripción a nivel promotor de la RNA polimerasa II; actividad helicasa e hidrolasa; nucleoplasma | -3,7 | 0,999922 |
| 216913_s_at | KIAA0690 | KIAA0690 | núcleo; integrado a membrana | -3,7 | 0,999899 |
| 227597_at | hypothetical protein MGC42174 | MGC42174 | biosíntesis de proteínas; ribosomas | -3,7 | 0,999727 |
| 235442_at | hypothetical protein FLJ22965 | FLJ22965 | | -3,7 | 0,999611 |
| 242069_at | Chromobox homolog 5 (HP1 alpha homolog) | CBX5 | ensamblaje y desensamblaje de la cromatina | -3,7 | 0,998664 |

Tabla 31.B (Continuación)

| # Sonda | Gen | Símbolo | Proceso Biológico y/o Función Molecular - Ubicación | Tasa de Cambio | Valor p |
|--------------|---|---------------|--|----------------|----------|
| 217139_at | voltage-dependent anion channel 1 | VDAC1 | transporte de aniones; programa apoptótico; mitocondria | -3,6 | 0,998349 |
| 204233_s_at | choline kinase alpha | CHKA | metabolismo y transporte de lípidos; actividad colin kinasa | -3,5 | 0,999911 |
| 204696_s_at | cell division cycle 25A | CDC25A | división celular, mitosis, proliferación | -3,5 | 0,999448 |
| 205876_at | leukemia inhibitory factor receptor | LIFR | receptor de superficie celular ligado a transducción de señal | -3,4 | 0,99751 |
| 226451_at | similar to RIKEN cDNA B230118G17 gene | MGC19604 | transporte de electrones; ligación de iones de hierro | -3,4 | 0,99994 |
| 232262_at | phosphatidylinositol glycan, class L | PIGL | biosíntesis del glicano de anclaje GPI fosfatidil inositol | -3,4 | 0,999786 |
| 234899_at | hypothetical protein LOC286436 | LOC286436 | | -3,3 | 0,998168 |
| 1553619_a_at | tripartite motif-containing 43 | TRIM43 | actividad ligasa en la ubiquitinación de proteínas | -3,2 | 0,999034 |
| 1555595_at | secernin 3 | SCRN3 | proteólisis y peptidólisis; actividad dipeptidasa | -3,2 | 0,999508 |
| 1559504_at | FLJ35409 protein | FLJ35409 | | -3,2 | 0,999562 |
| 206333_at | musashi homolog 1 (Drosophila) | MSI1 | ligación de nucleótidos (RNA); neurogénesis | -3,2 | 0,998514 |
| 228054_at | transmembrane protein 44 | TMEM44 | | -3,2 | 0,999226 |
| 232136_s_at | cortactin binding protein 2 | CTTNBP2 | | -3,2 | 0,998514 |
| 239863_at | cDNA FLJ43322 fis, clone NT2RI2027975 | | | -3,2 | 0,998168 |
| 224204_x_at | aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2 | ARNTL2 | regulación transcripción; transducción de señales; núcleo | -3,1 | 0,998923 |
| 208382_s_at | DMC1 dosage suppressor of mck1 homolog, meiosis-specific homologous recombination (yeast) | DMC1 | reparación del DNA; ciclo celular; recombinación meiótica; espermatogénesis; ligación de nucleótidos y ATP | -3,1 | 0,999508 |
| 214012_at | type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator | ARTS-1 | angiogénesis; proteólisis; procesamiento de antígenos vía MHC clase I; diferenciación de células adiposas; | -3,1 | 0,999786 |
| 223312_at | chromosome 2 open reading frame 7 | C2orf7 | proteólisis y peptidólisis; actividad peptidasa | -3 | 0,999922 |
| 225655_at | ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1 | UHRF1 | reparación del DNA; regulación de la transcripción; ciclo celular; ligación ubiquitina-proteína; núcleo | -3 | 0,99998 |
| 225682_s_at | polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide H (22.9kD) | POLR3H | transcripción a partir del promotor de la RNA polimerasa III dirigido por DNA | -3 | 0,999977 |
| 235085_at | hypothetical protein DKFZp761P0423 | DKFZp761P0423 | fosforilación de aminoácidos proteicos; proteína kinasa | -3 | 0,999382 |

Tabla 32. Genes sobreexpresados y reprimidos comunes entre las comparativas de datos totales **RL95-2-42hs vs. RL95-2** y **HEC-1A vs. RL95-2**. (Incluye datos de **Tablas 28.A+B vs Tablas 30.A+B**).

| Tasa de Cambio | | | | Tasa de Cambio | | | | Tasa de Cambio | | | |
|----------------|----------|-------------|---------|----------------|-----------|-------------|---------|----------------|-----------|-------------|---------|
| # Sonda | Símbolo | R_42h vs. R | H vs. R | # Sonda | Símbolo | R_42h vs. R | H vs. R | # Sonda | Símbolo | R_42h vs. R | H vs. R |
| 244567_at | --- | 11,8 | 11,7 | 244359_s_at | --- | 5,3 | 4 | 219658_at | PTCD2 | 4,2 | 3,7 |
| 212077_at | CALD1 | 9,1 | 10,1 | 1560926_at | PPP4R2 | 5,3 | 3,7 | 232125_at | --- | 4,2 | 5,8 |
| 215028_at | SEMA6A | 7,9 | 4,7 | 54632_at | THADA | 5,2 | 5,6 | 1569523_a_at | LAT1-3TM | 4,2 | 3,2 |
| 1569110_x_at | PDCD6 | 7,9 | 9,3 | 225911_at | LOC255743 | 5,2 | 6,5 | 201313_at | ENO2 | 4,1 | 3,5 |
| 237456_at | RYBP | 7,2 | 4,1 | 226851_at | LYPLAL1 | 5,2 | 6,8 | 229363_at | --- | 4 | 3,5 |
| 244532_x_at | --- | 7,1 | 6,9 | 229454_at | BCLAF1 | 5,2 | 4,1 | 240304_s_at | TMC5 | 4 | 3,5 |
| 201616_s_at | CALD1 | 7 | 8,1 | 230789_at | SUHW2 | 5,2 | 6 | 206239_s_at | SPINK1 | 3,9 | 4,8 |
| 209448_at | HTATIP2 | 7 | 8,8 | 1562472_at | --- | 5,1 | 5,6 | 243993_at | PCTK2 | 3,9 | 3,2 |
| 239162_at | DAPK1 | 6,9 | 6,9 | 210517_s_at | AKAP12 | 5 | 3,5 | 208510_s_at | PPARG | 3,8 | 4,6 |
| 205234_at | SLC16A4 | 6,8 | 5,6 | 216189_at | --- | 5 | 6,9 | 234628_at | RAB28 | 3,8 | 3,7 |
| 1554690_a_at | TACC1 | 6,8 | 4,8 | 222139_at | KIAA1466 | 5 | 4,6 | 217254_s_at | EPO | 3,6 | 3,5 |
| 207052_at | HAVCR1 | 6,4 | 6,7 | 230174_at | LYPLAL1 | 5 | 4,9 | 203717_at | DPP4 | 3,5 | 8,1 |
| 243303_at | ECHDC1 | 6,4 | 5,4 | 234082_at | --- | 5 | 6,2 | 205122_at | TMEFF1 | 3,5 | 3,3 |
| 222931_s_at | THNSL1 | 6,3 | 6,9 | 244010_at | MLL3 | 5 | 4,2 | 204291_at | ZNF518 | 3,4 | 4,1 |
| 226145_s_at | FRAS1 | 6,3 | 9,2 | 201628_s_at | RRAGA | 4,9 | 5,7 | 214724_at | DIXDC1 | 3,4 | 4,4 |
| 242794_at | MAML3 | 6,3 | 4,6 | 213067_at | MYH10 | 4,9 | 5,5 | 1558444_at | --- | 3,4 | 3 |
| 242814_at | SERPINB9 | 6,3 | 3,2 | 220399_at | FLJ22639 | 4,9 | 3,9 | 228030_at | RBM6 | 3,3 | 3,8 |
| 230337_at | SOS1 | 6,2 | 5,3 | 225166_at | ARHGAP18 | 4,9 | 3,5 | 229178_at | LOC145786 | 3,3 | 3,2 |
| 203695_s_at | DFNA5 | 6,1 | 3,8 | 244042_x_at | --- | 4,9 | 4,8 | 205749_at | CYP1A1 | 3,2 | -4,6 |
| 204416_x_at | APOC1 | 6,1 | 3,6 | 244114_x_at | --- | 4,9 | 4,1 | 1556294_at | --- | 3,2 | 4,3 |
| 1555146_at | ATF2 | 6,1 | 4,3 | 1565800_x_at | --- | 4,9 | 4,1 | 215034_s_at | TM4SF1 | 3,2 | 6,8 |
| 1559147_at | --- | 6,1 | 7,1 | 206018_at | FOXG1B | 4,9 | 5,1 | 202998_s_at | LOXL2 | 3 | -3 |
| 242708_at | PEX1 | 6,1 | 3,7 | 229602_at | --- | 4,8 | 4,8 | 206043_s_at | KIAA0703 | 3 | 3,1 |
| 234084_x_at | DUSP24 | 5,9 | 5,4 | 203716_s_at | DPP4 | 4,8 | 9,7 | 208716_s_at | LOC54499 | 3 | 6 |
| 240758_at | CENTG2 | 5,9 | 4,9 | 203963_at | CA12 | 4,8 | 6,8 | 215761_at | DMXL2 | 3 | 3,1 |
| 243709_at | FLJ90709 | 5,9 | 4,6 | 211478_s_at | DPP4 | 4,8 | 9,5 | 222128_at | --- | 3 | 3,6 |
| 209723_at | SERPINB9 | 5,8 | 6,9 | 224367_at | BEX2 | 4,8 | 7,2 | 224723_x_at | LOC401397 | 3 | 4,8 |
| 214164_x_at | CA12 | 5,8 | 7,5 | 224819_at | TCEAL8 | 4,7 | 7,2 | 213479_at | NPTX2 | -5,2 | -4,6 |
| 239954_at | ZNF160 | 5,8 | 4 | 213787_s_at | EBP | 4,7 | 8,4 | 236029_at | FAT3 | -5,2 | -5,8 |
| 242343_x_at | ZNF518 | 5,8 | 5 | 214235_at | CYP3A5 | 4,7 | 8,3 | 221417_x_at | EDG8 | -5,1 | -8,1 |
| 204437_s_at | FOLR1 | 5,6 | 5,9 | 226707_at | PP3856 | 4,7 | 6 | 233743_x_at | EDG8 | -4,6 | -5,2 |
| 207326_at | BTC | 5,6 | 4,8 | 233479_at | PGAP1 | 4,7 | 4,4 | 204457_s_at | GAS1 | -4,5 | -4,3 |
| 224443_at | MGC14801 | 5,6 | 8,6 | 244132_x_at | ZNF518 | 4,6 | 4 | 229901_at | ZNF488 | -4,4 | -5,4 |
| 230563_at | RASGEF1A | 5,6 | 8,3 | 208613_s_at | FLNB | 4,5 | 5,5 | 225016_at | APCDD1 | -4,3 | -4,8 |
| 237381_at | --- | 5,6 | 4,9 | 208614_s_at | FLNB | 4,4 | 4,8 | 1554127_s_at | MSRB3 | -4,1 | -6,1 |
| 1556049_at | RTN4 | 5,5 | 3,2 | 203303_at | TCTE1L | 4,4 | 6,9 | 214595_at | KCNG1 | -4 | -3,3 |
| 1558759_s_at | CLASP2 | 5,5 | 4 | 204508_s_at | CA12 | 4,4 | 6,6 | 224184_s_at | BOC | -3,8 | -4 |
| 207837_at | RBPMS | 5,4 | 3,7 | 213109_at | --- | 4,4 | 5,4 | 204664_at | ALPP | -3,6 | -3,9 |
| 213796_at | SPRR1A | 5,4 | -4,1 | 223449_at | SEMA6A | 4,4 | 3,6 | 209905_at | HOXA9 | -3,5 | -6,1 |
| 219288_at | C3orf14 | 5,4 | 5,9 | 240801_at | C21orf37 | 4,4 | 4,1 | 225782_at | --- | -3,3 | -3,9 |
| 223294_at | CXorf26 | 5,4 | 7,7 | 1552482_at | RAPH1 | 4,3 | 3,7 | 223843_at | SCARA3 | -3,1 | -3,6 |
| 225660_at | SEMA6A | 5,4 | 3,6 | 217564_s_at | CPS1 | 4,2 | 6,8 | 219522_at | FJX1 | -3 | -3,5 |
| 1560066_at | --- | 5,3 | 7,1 | | | | | | | | |