Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Regulación de la proliferación y diferenciación de células de endometrio por hormonas esteroideas ováricas

Mestre Citrinovitz, Ana Cecilia

2014-04-28

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Mestre Citrinovitz, Ana Cecilia. (2014-04-28). Regulación de la proliferación y diferenciación de células de endometrio por hormonas esteroideas ováricas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Mestre Citrinovitz, Ana Cecilia. "Regulación de la proliferación y diferenciación de células de endometrio por hormonas esteroideas ováricas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-04-28.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Regulación de la proliferación y diferenciación de células de endometrio por hormonas esteroideas ováricas

Tesis presentada para optar al título de

Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Ana Cecilia Mestre Citrinovitz

Director de tesis: Dra. Patricia E. Saragüeta

Consejero de Estudios: Dr. Omar Coso

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental.

IBYME-CONICET

Buenos Aires, 2014

“Regulación de la proliferación y diferenciación de células de endometrio por hormonas esteroideas ováricas.”

RESUMEN

El estroma uterino experimenta cambios morfológicos y funcionales que dan lugar a la decidua, un tejido compacto cuya función es el correcto progreso de la preñez. El receptor de progesterona (RP) y el receptor de estradiol (RE) participan en el crecimiento y la diferenciación de las distintas áreas deciduales del endometrio de la rata. En esta tesis se estudia el papel de estos receptores, sus vías de señalización y la participación de nuevas moléculas involucradas en las etapas iniciales de la decidualización. Caracterizamos, mediante el uso de ARN pequeño de interferencia específico, el papel de una nueva proteína regulada en la decidualización, la proteína de unión a ARN CSD-C2. Encontramos que el bloqueo del RP, mediante su antagonista onapristona, produjo la reabsorción de los sitios de implantación (SIs) y la disminución en la expresión proteica del RP, RE, PCNA, DESMINA y CCND3, en los niveles de ARNm de *Prl8a2*, y de *Hand2* y *Bmp2*, y en la activación de ERK. El efecto deletéreo de onapristona fue parcialmente contrarrestado por el antagonista del RE faslodex, restituyendo los niveles de los receptores de hormonas, de los marcadores de proliferación y diferenciación analizados, y aumentando compensatoriamente los niveles de *Hand2* y *Bmp2,* y pERK. El tratamiento de ratas preñadas con el inhibidor de pERK, evidenció su importancia en la formación de la decidua, manteniendo la capacidad proliferativa de las células estromales y limitando su diferenciación en las distintas áreas deciduales. Estos hallazgos muestran la importancia del balance de señalización de los receptores hormonales, a la vez que describen nuevas moléculas responsables de la decidualización endometrial durante la preñez temprana.

PALABRAS CLAVE

Endometrio - Decidualización - Receptor de Progesterona - Receptor de Estradiol

“Regulation of proliferation and differentiation of endometrial cell by ovarian steroid hormones."

ABSTRACT

The uterine stroma undergoes complex morphological and functional shifts that build the decidua, a specialized compact tissue leading to successful pregnancy. Progesterone receptor (PR) and estrogen receptor (ER) participate in growth and differentiation of several rat decidual regions. This thesis studies the role of these receptors, related signalling pathways and novel molecules during the initial steps of pregnancy. We characterized the role of the RNA binding protein, CSD-C2, during decidualization by specific siRNA in vivo administration. Early suppression of progesterone receptor activity by treatment with the progesterone antagonist (onapristone) resulted in resorption of the implantation sites (ISs) with concomitant decrease in the expression of PR, ER, PCNA, DESMIN, CCND3, *Prl8a2*, and signalling players such as *Hand2*, *Bmp2* and ERK activation. The deleterious effect of onapristone was partially counteracted by the ER antagonist (Faslodex) with rescue of hormone steroid receptors, markers of proliferation and differentiation and the probably compensatory increase of *Hand2*, *Bmp2* and ERK activation compared to oil treated controls. The treatment of pregnant rats with MEK inhibitor showed ERK activation relevance during the late stage of decidua development, keeping the proliferation capacity of stromal cells and limiting the differentiation process in specified regions of decidual tissues. These findings highlight the balance of ovarian steroid hormone receptors during early pregnancy, and describe new players in the decidualization process.

KEYWORDS

Endometrium - Decidualization - Progesterone receptor - Estrogen receptor

Publicaciones

Los resultados de esta tesis forman parte de los siguientes trabajos:

Ovarian steroid receptors and activated MAPK in the regional decidualization in rats. Griselda Vallejo, Ana C. Mestre-Citrinovitz, Verena Mönckedieck, Ruth Grümmer, Elke Winterhager, Patricia Saragüeta. Biol Reprod. 2011 May;84(5):1063-71. Epub 2011 Jan 19.

Estrogen receptor antagonist Faslodex partially rescues rat implantation site resorption produced by Progesterone receptor antagonist Onapristone. Ana C. Mestre-Citrinovitz, Veronika Kleff, Griselda Vallejo, Elke Winterhager, Patricia Saragüeta. Manuscrito enviado a BOR (Marzo 2014).

Además he participado en trabajos que dieron origen a las siguientes publicaciones:

Changes in global gene expression during in vitro decidualization of rat endometrial stromal cells. Griselda Vallejo, Darío Maschi, Ana C. Mestre-Citrinovitz, Kazuhiro Aiba, Ricardo Maronna, Victor Yohai, Minoru S. H.Ko, Miguel Beato, Patricia Saragüeta. (J Cell Physiol. 2010 Jan; 222(1):127-37)

Early transcription factors and Cdc2 are responsible for progestin-induced proliferation of endometrial stroma via ERK-mediated induction. Griselda Vallejo, Alejandro La Greca, Inti Tarifa, Ana C. Mestre-Citrinovitz, Cecilia Ballaré, Elke Winterhager, Miguel Beato, Patricia Saragüeta. En revisión para PLOS ONE.

Abreviaturas

aa	aminoácidos
Ac	anticuerpo
adm	zona adyacente al miometrio
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
AM	antimesometrio
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNpi	ácido ribonucleico pequeño de interferencia
ASB	albúmina sérica bovina
cep	cono ecto-placentario
DAM	decidua antimesometrial
DBD	dominio de unión al ADN
DM	decidua mesometrial
dpc	días post-coito
dRPR	proteína relacionada a prolactina expresada en la decidua
DS	desvío estándar
DUL	dominio de unión al ligando
E_2	estradiol
EI	estroma indiferenciado
ERK	quinasa regulada extracelularmente
ESIs	entre sitios de implantación
HE	hematoxilina-eosina
ICI	ICI 182.780
IHQ	inmunohistoquímica
kDa	kilodalton
LH	hormona luteinizante
M	mesometrio
MEC	matriz extra-celular
MEK	quinasa activada por mitógeno (quinasa regulada por señales extracelulares)
MEKK	quinasa quinasa activada por mitógeno
Mio	miometrio
MMP	metaloproteasa de MEC

M-MTV	tumor de virus mamario de ratón
NE	no específico
NT	no tratada
ONA	Onapristona
OVX	ovariectomía
P_4	progesterona
pb	pares de bases
PBS	buffer fosfato salino
pc	post-coito
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PRL	prolactina
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RE	receptor de estradiol
REα	receptor de estradiol alfa
REβ	receptor de estradiol beta
RP	receptor de progesterona
RPA	isoforma A del receptor de progesterona
RPB	isoforma B del receptor de progesterona
RPC	isoforma C del receptor de progesterona
RT-PCR	transcripción reversa seguida de PCR
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SFB-ch	suero fetal bovino-charcolizado
SI/SIs	sitio/s de implantación
TGF-β	Factor transformante de crecimiento β
U	unión entre M-AM
uNK	*Natural killer* uterinas
UTR	región del ARN no codificante
UV	ultravioleta
ZDP	zona decidual primaria
ZDS	zona decidual secundaria

Publicaciones **1**

Abreviaturas **2**

INTRODUCCIÓN **8**

1. Fisiología uterina **9**

1.1 El endometrio 9

1.2 La decidua 10

1.3 El papel de la progesterona y el estradiol en el remodelamiento endometrial 13

1.3.1 Estructura y mecanismo de acción de los receptores de progesterona y de estradiol 16

1.3.2 Antagonistas del receptor de progesterona y del receptor de estradiol 19

1.3.3 Decidualización y efectos de los antagonistas del receptor de progesterona y del receptor de estradiol 20

1.4 Ciclo celular y endoreduplicación durante la decidualización 20

1.5 Factores paracrinos y moléculas claves para el desarrollo de la decidua 23

1.6 Angiogénesis en la decidua 24

2. Modelos *in vitro* para el estudio de la proliferación y la diferenciación decidual **25**

2.1 Las células estromales endometriales normales de rata, las células UIII 26

3. La vía de ERK **27**

4. Cold Shock Domain-C2, una proteína de unión a ARN **28**

HIPÓTESIS y OBJETIVOS **31**

1. Hipótesis **32**

2. Objetivos **32**

MATERIALES y MÉTODOS **34**

1. Reactivos **35**

2. Cultivo Celular **36**

2.1 Condiciones de cultivo de las líneas celulares UIII y UIII-like 36

3. Experimentos de preñez **36**

3.1. Cuidado animal y Preñez 36

3.2. Tratamientos con antagonistas e inhibidores 37

3.2.1 Tratamiento tardío con los antagonistas del RP y el RE 37

3.2.3 Tratamiento tardío con el inhibidor de MEK 38

3.3. Cirugías 38

3.3.1 Implantación de mini-bombas osmóticas 38

3.3.2 Inyección intrauterina de ARN pequeño de interferencia 39

3.4. Recolección de tejidos 39

4. Técnicas Bioquímicas y de Biología Molecular 39

4.1. Análisis de expresión génica a nivel de ARNm 39

4.1.1. Experimentos *in vitro*: PCR a tiempo final 39

4.1.2. Experimentos *in vivo*: PCR en tiempo real 40

4.2. Análisis de expresión génica a nivel de proteína 41

4.2.1. Aislamiento de proteínas totales 41

5. Técnicas Histológicas 42

5.1. Tinción con Hematoxilina-Eosina 42

5.2. Tinciones inmunohistoquímicas 42

6. Ensayo *in vitro* de unión a ARNm blanco 42

7. Estadística 43

RESULTADOS 44

Capítulo 1: Decidualización en la rata. Modelo experimental 45

1.1 Desarrollo de la decidua en la rata 45

1.2. Localización del RP, el REα, el REβ y de pERK en sitios de implantación de 8 dpc 46

1.3 Caracterización de la cinética de expresión de Desmina y Ciclina D3 durante la decidualizacíon en la rata 49

1.4 Conclusiones parciales 51

Capítulo 2: Efectos de los antagonistas del RP y el RE y del inhibidor de la activación de ERK en la proliferación y la diferenciación de la decidua 53

2.1 Decidualización temprana 53

2.1.1 Interacción entre las vías de señalización del RP y del RE en la decidualización temprana 53

2.1.1.1 Acción del RP y el RE sobre la morfología de los SIs 54

2.1.1.2 Acción del RP y el RE sobre la proliferación y la diferenciación decidual . 58

2.1.1.3 Acción del RP y el RE sobre la angiogénesis decidual 61

2.1.1.4 Vías de señalización moduladas por la acción de los antagonistas del RP y el RE 64

2.1.2 Efectos de la inhibición de la activación de ERK sobre el desarrollo temprano de la decidua 71

2.2. Decidualización tardía 74

2.2.1 Interacción entre las vías de señalización del RP y el RE en la decidualización tardía 74

2.2.2 Efectos de la inhibición de de la activación de ERK sobre el desarrollo tardío de la decidua 78

2.3. Conclusiones parciales 83

Capítulo 3: CSD-C2: papel durante la decidualización y regulación por hormonas esteroideas ováricas 84

3.1 Expresión y regulación hormonal de *Csd-c2* durante la decidualización *in vitro* 84

3.2 Expresión, regulación y función de CSD-C2 durante la decidualización *in vivo* . 86

3.2.1 Expresión de CSD-C2 durante la decidualización *in vivo* 86

3.2.2 Regulación hormonal de la expresión de CSD-C2 durante la decidualización *in vivo* 87

3.2.2 Evaluación de la relevancia biológica de CSD-C2 88

3.2.3 Capacidad de CSD-C2 uterino para unirse a sus ARNm blancos 91

3.3 Conclusiones parciales 93

DISCUSIÓN 94

Localización del RP, el REα, el REβ y ERK activado en la decidua 95

Efectos morfológicos de la acción de los antagonistas del RP y el RE 96

Efectos de la acción de los antagonistas del PR y el RE sobre la expresión de marcadores de decidualización 99

Efectos de la acción de los antagonistas del PR y el RE sobre la angiogénesis.... 101

Efectos de la acción de los antagonistas del PR y el RE sobre la expresión de dichos receptores 103

Efectos de la acción de los antagonistas del RP y el RE sobre la expresión de moléculas dependientes del RP..... 103

Regulación hormonal de la activación de ERK y relación con la angiogénesis..... 105

Papel de ERK durante el desarrollo decidual 106

CSD-C2 y su papel durante la decidualización..... 108

Hipótesis sobre preñez y adaptación..... 109

CONCLUSIONES..... 112

ANEXO..... 115

Fe de erratas 117

REFERENCIAS..... 118

INTRODUCCIÓN

1. Fisiología uterina

1.1 El endometrio

El **útero** es el principal órgano del sistema reproductivo femenino en la mayoría de los mamíferos y está compuesto por el miometrio y el endometrio (Figura 1). El miometrio consta de dos capas de músculo, la capa de músculo circular interno, en contacto con el endometrio, y la del músculo longitudinal externo (Kurita y Nakamura 2008). El endometrio está constituido por un epitelio columnar simple, un estroma fibroblástico y glándulas endometriales. Las distintas zonas funcionales del endometrio en roedores se definen de acuerdo con la conexión con la irrigación sanguínea. El mesometrio (M) es la zona por donde se irriga el útero y constituirá el sitio de placentación. A la zona opuesta en ubicación se la denomina antimesometrio (AM) y constituirá el sitio de implantación y anidación del embrión.

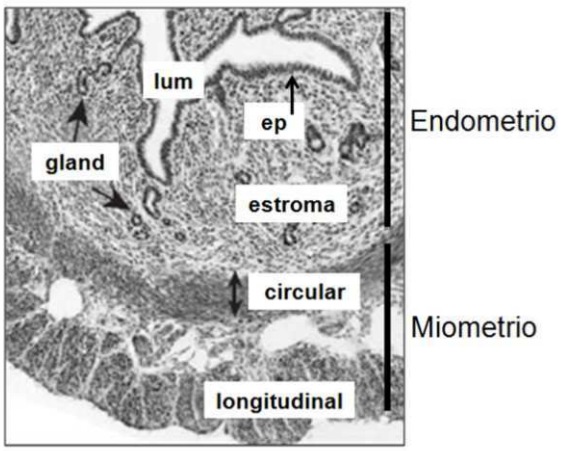


Figura 1. Histología del útero de roedor. En el corte transversal del útero se observan las capas uterinas orientadas radialmente: el estroma fibroblástico endometrial, el músculo circular interno y el músculo longitudinal externo. ep: epitelio luminal, estroma: estroma endometrial, gland: glándulas, circular: músculo circular, longitudinal: músculo longitudinal. Tomado de Kurita y Nakamura, 2008.

En los mamíferos, el útero experimenta etapas de proliferación, diferenciación y muerte celular de manera cíclica en respuesta a los niveles séricos de las hormonas esteroideas ováricas, progesterona (P_4) y estradiol (E_2). La **plasticidad tisular**, que se pierde normalmente en la mayoría de los órganos adultos, se mantiene en el endometrio durante la etapa adulta permitiendo el constante remodelamiento característico. Estas modificaciones se potencian en presencia del blastocisto y dan

lugar a la decidua. De esta manera, el endometrio se vuelve competente para la recepción e implantación del embrión y el correcto avance de la preñez, principales funciones del útero.

1.2 La decidua

Las variaciones endocrinas durante la fase pre y peri-implantatoria y las señales del blastocisto llevan al endometrio a diferenciarse en la decidua, un tejido compacto y especializado propio de la preñez. El tejido decidual tiene un **papel fundamental** en el establecimiento de la interacción materno-fetal, de la cual dependerá el correcto avance de la preñez. El desarrollo de la decidua influirá en la regulación de la invasión trofoblástica para una correcta orientación y desarrollo placentario, y en la regulación de la respuesta inmune materna hacia el embrión semialogénico. Asimismo, la decidua rodea al embrión en desarrollo proveyéndolo de una barrera física que, a la vez, funciona como fuente de nutrientes y hormonas antes del desarrollo de una placenta funcional (Gibori, Jayatilak y col., 1987; Huet-Hudson, Andrews y col., 1989).

En los **humanos**, la diferenciación del estroma a células deciduales ocurre en respuesta a las variaciones hormonales durante la fase secretoria del ciclo menstrual. A estas células se las denomina pre-deciduales. Una vez que la preñez se establece, y en presencia de P_4, la diferenciación prosigue formando el tejido decidual que persistirá a la largo de la preñez (Ziegler, Fanchin y col., 1998; Maruyama and Yoshimura, 2008; Salamonsen, 2008). En cambio, en **roedores** la decidualización solo ocurre en presencia del blastocisto (Tranguch, Daikoku y col., 2005).

En el desarrollo de la decidua, el endometrio experimenta drásticos **cambios morfológicos y funcionales** que involucran la proliferación y diferenciación del estroma, el remodelamiento de la matriz extra-celular (MEC), gran desarrollo vascular y la proliferación e infiltración de células *Natural killer* uterinas (uNK). Este nuevo tejido se rodea por una membrana basal formada por colágeno IV y laminina.

Los fibroblastos estromales se diferencian en un **tipo celular epiteloide redondeado** que y se caracteriza por la acumulación de glicógeno y lípidos en el citoplasma, por el aumento en el número de lisosomas y por la gran cantidad de uniones célula-célula (Dey, Lim y col., 2004).

Otra característica de las células deciduales es la adquisición de **poliploidía** (Dey, Lim y col., 2004), que consiste en la presencia de múltiples copias de ADN genómico en el núcleo celular. Aún no se entiende muy bien el valor adaptativo de la

característica poliploide de las células deciduales. Se especula que la poliploidización limitaría la vida de las células deciduales, las cuales mueren liberando espacio para el embrión en crecimiento. Por otro lado, una de las principales funciones de la decidua es participar del crecimiento embrionario que requiere de una alta tasa de síntesis proteica. La generación de un gran número de copias del genoma completo, por endoreduplicación, podría asegurar una mayor capacidad de síntesis proteica al aumentar el número de copias disponibles para la transcripción de cada gen (Dey, Lim y col., 2004).

Las células deciduales presentan un **perfil secretorio y biosintético propio** (Gibori, Jayatilak y col., 1987; Huet-Hudson, Andrews y col., 1989). Muestran un aumento en los niveles de expresión de proteínas estructurales, como DESMINA y CONEXINA43, y de proteínas de secreción, como las proteínas relacionadas a PROLACTINA (PRP), factores de crecimiento y citoquinas, en relación a las células estromales que les dan origen (Glasser y Julian 1986; Grummer, Chwalisz y col., 1994; Rasmussen, Orwig y col. 1997; Dey, Lim y col., 2004).

La decidualización es un **proceso finamente regulado en espacio y tiempo**, comienza en el lado antimesometrial (AM) del endometrio, donde el embrión toma el primer contacto con el epitelio uterino durante la noche del día 3[i] post coito (pc), y se extiende hacia el mesometrio (Figura 2). Las células deciduales del AM y M presentan distintos fenotipos morfológicos, bioquímicos y funcionales como resultado de una diferenciación específica (Gibori, Jayatilak y col., 1987; Parr y Parr 1989; Gu, Srivastava y col., 1995).

Las células estromales del antimesometrio diferencian a la **decidua antimesometrial** (DAM). Las células de esta zona se caracterizan por un fenotipo celular con gran extensión citoplasmática, gran cantidad de uniones *gap* y estrechas entre las células, resultando en un tejido muy compacto que anidará al embrión en desarrollo. La zona de la DAM que estará en contacto con el embrión se desarrolla primero. Esta zona se denomina zona decidual primaria (ZDP) y su formación -proliferación y diferenciación- se da entre los días 4 y 7 pc (Figura 2). La ZDP tiene una naturaleza avascular y epiteloide. Alrededor del día 7 pc las células de la ZDP empiezan a regresionar y desaparecen completamente entre los días 8 y 9 pc. Las células en contacto con la ZDP continúan proliferando durante los días 7 y 8 pc y diferencian a células poliploides, mono o binucleadas, con gran extensión de

[i] Designamos día cero de preñez -0 días post coito, dpc- al día en que se detecta presencia de espermatozoides en el tracto reproductivo de la hembra.

[ii] Ver esquema con ejes de cortes en ANEXO.

[iii] Siempre que se habla de **tratamiento temprano** se refiere al tratamiento de las hembras

citoplasma constituyendo la zona decidual secundaria (ZDS) de la DAM (Dey 1996; Tan, Raja y col. 2002).

En el mesometrio, zona que se vasculariza y hacia donde se desarrollará la placenta que nutrirá al embrión, se forma la **decidua mesometrial** (DM). La proliferación del estroma en el mesometrio comienza en el día 7 pc, las células diferenciadas resultantes son más pequeñas y aisladas que las células de la DAM, y se conectan por extensiones citoplasmáticas.

Al final de su desarrollo, la decidua presenta distintas **zonas morfológicas y funcionales** (Bell, 1983; Parr y Parr, 1989) (Figura 2):

a) La decidua antimesometrial (DAM) y mesometrial (DM) con células diferenciadas.
b) La zona de unión entre el M y el AM (U), zona de transición, donde comienza la formación de vasos.
c) El área adyacente al miometrio uterino (adm) con células estromales indiferenciadas y la presencia de algunas glándulas.

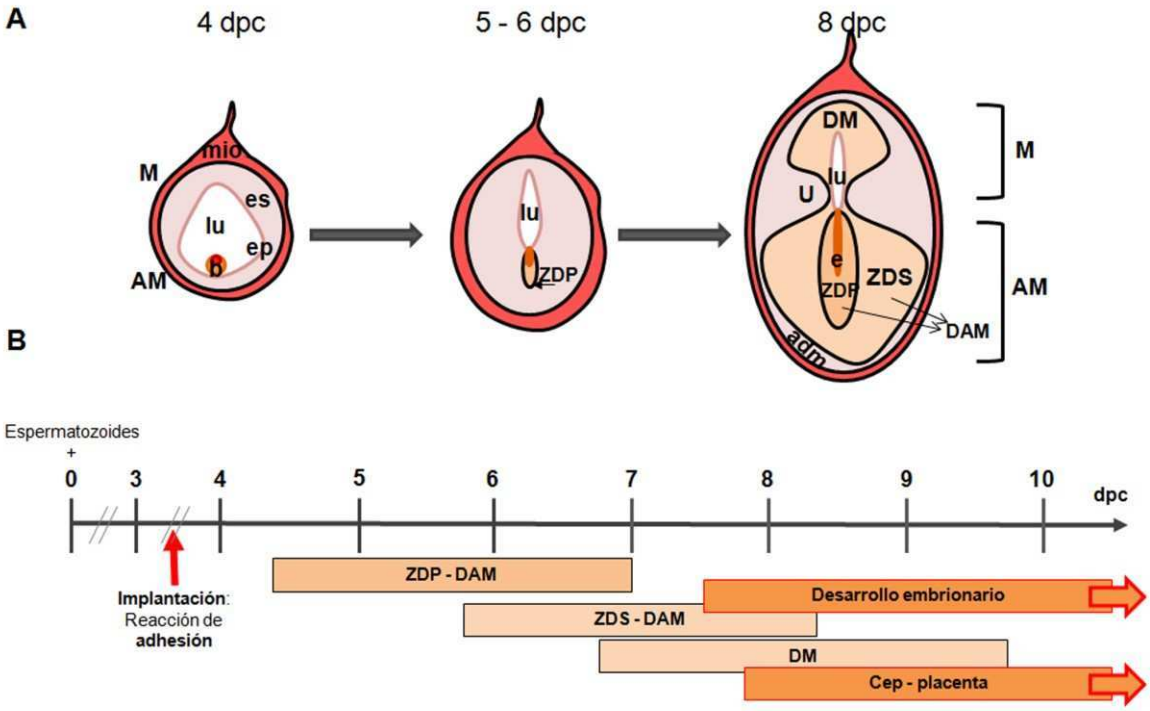


Figura 2. Desarrollo de la decidua en el roedor. A) El esquema representa cortes transversales de úteros a distintos días del proceso de implantación de un embrión de roedor. **B)** Línea de tiempo del desarrollo decidual. En la noche del día 3 pc ocurre la reacción de unión del blastocisto al lumen uterino en la zona del antimesometrio (AM) uterino. En el día 5 las células en contacto con el embrión proliferan y diferencian dando origen a la zona decidual primaria (ZDP). Más tardíamente, las células en contacto con la ZDP proliferan y diferencian dando origen a la zona decidual secundaria (ZDS). La ZDP y la ZDS constituyen la decidua antimesometrial (DAM). Las células estromales de la región del mesometrio

proliferan y diferencian constituyendo la decidua mesometrial (DM). lu, lumen uterino; es, estroma; ep: epitelio; DM, decidua mesometrial; DAM, decidua antimesometrial; ZDP, zona decidual primaria; ZDS, zona decidual secundaria; U, zona de unión entre M-AM; adm, área adyacente al miometrio; M, mesometrio; AM, antimesometrio; Mio, miometrio, cep: cono ecto-placentario.

Por último, la decidualización no solo depende de gran proliferación y diferenciación celular, sino que también involucra la muerte celular programada. Inicialmente el epitelio uterino adyacente al embrión muere por apoptosis (Finn, 1975). Más avanzada la preñez, la decidua antimesometrial se reduce a medida que las células diferenciadas mueren en respuesta al crecimiento del embrión. Las células deciduales en los roedores tienen una vida muy corta incluso cuando la diferenciación es inducida artificialmente, y aún en presencia de P_4 (Gu, Soares y col., 1994). La **regresión decidual** esta finamente controlada y requiere de un gran número de factores, entre ellos los miembros de la super-familia de TGF-β (Nie, Li y col., 2005).

Cualquier **perturbación en las vías de señalización** que dirigen e integran los cambios moleculares tempranos en las células endometriales compromete los eventos subsiguientes necesarios para la correcta implantación y el desarrollo embrionario.

1.3 El papel de la progesterona y el estradiol en el remodelamiento endometrial

Los **cambios** que experimenta el endometrio desde su desarrollo y durante la vida reproductiva de la hembra **son guiados por las hormonas esteroideas ováricas**, progesterona y estradiol. La P_4 tiene un papel fundamental controlando funciones reproductivas claves, como la ovulación, la decidualización, el mantenimiento de la preñez y el parto (Lydon, DeMayo y col., 1995). El E_2 regula el ciclo estral/menstrual y, luego de la fecundación, su presencia es imprescindible para la reacción de adhesión -*attachment*- del blastocisto al epitelio uterino (Yoshinaga y Adams, 1966).

La figura 3 muestra las variaciones hormonales durante el **ciclo estral** de la rata. Este dura entre 4 y 5 días, y está dividido en 4 etapas: proestro, estro, metaestro y diestro. El E_2 domina el ciclo estral en roedores (Figura 3), sus niveles aumentan gradualmente desde el metaestro hasta el proestro, donde alcanzan su máximo nivel. La mayor parte de la poca progesterona sintetizada antes de la ovulación es convertida en 20α-hidroxiprogesterona, un metabolito inactivo (Fuller W. Bazer, 1998). El pequeño aumento en los niveles séricos de P_4 que se detecta en el proestro es necesario para reforzar la acción de E_2 sobre el hipotálamo generando el pico de la hormona luteinizante (LH). En respuesta al aumento de LH, la hembra entra en estro y

ovula durante la madrugada. En estro los niveles de estradiol caen y el ciclo comienza nuevamente (Smith, Freeman y col., 1975).

Cuando hay apareo se produce un aumento en los niveles de progesterona producidos por el cuerpo lúteo recién formado, iniciándose la fase luteal en roedores. De esta manera, la progesterona sincroniza la fertilización con la preparación del útero para la implantación (ventana de receptividad).

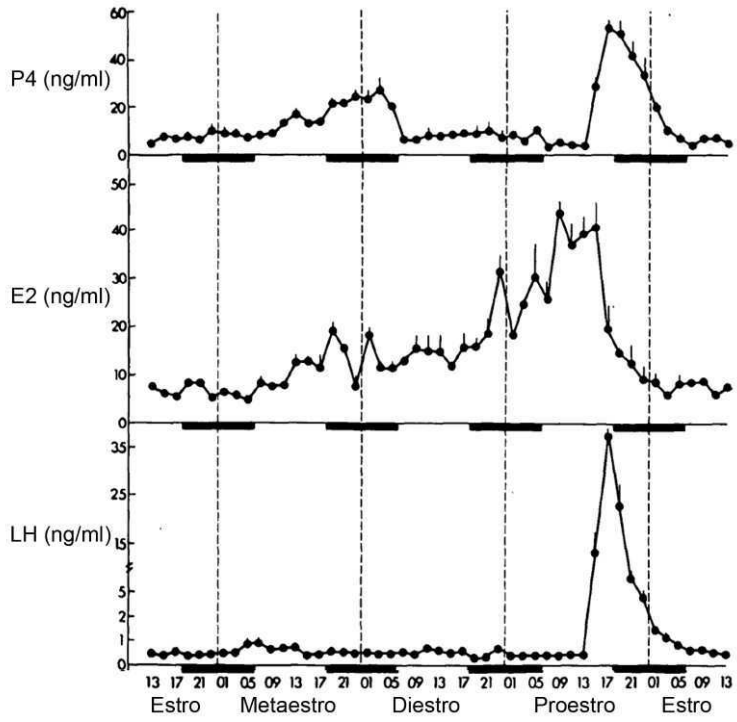


Figura 3. Ciclo estral de la rata. El gráfico muestra los niveles séricos de progesterona, estradiol y LH durante el ciclo estral de la rata. Adaptado de Smith y Col., 1975.

Los **cambios en los niveles séricos de P_4 y E_2 van acompañados por cambios en la proliferación y diferenciación** de las células del endometrio.

El **estrógeno** producido durante el proestro estimula la proliferación del epitelio luminal y glandular (Finn y Martin, 1969). Los niveles de E_2 caen en estro cuando, en presencia del macho, se da el apareo. Tras el coito se observa un pico de proliferación epitelial independiente del E_2.

En el día 1 pc el recién formado cuerpo lúteo sintetiza **progesterona** inhibiendo la proliferación de las células epiteliales y estimulando su función secretoria. La P_4 redirecciona el estímulo proliferativo del estradiol desde el epitelio hacia el estroma, preparándolo para la implantación del blastocisto. En el día 3 de preñez, la P_4 induce la proliferación de las células estromales peri-luminales del **antimesometrio** adyacentes al blastocisto en proceso de implantación (Figuras 2 y 4). Estas células sintetizan ADN

sin entrar en mitosis, dando lugar a células poliploides que forman la ZDP (Finn y Martin, 1969; Parr y Parr, 1989; Tong, Niklaus y col., 2008). La ola de proliferación y diferenciación se expande a partir del día 5 pc rápida y radialmente hacia el estroma en contacto con la ZDP (Figuras 2 y 4) y se forma la zona decidual secundaria (ZDS). Martin y col. evidenciaron, mediante el uso de timidina tritiada, que las células periféricas a la ZDP incorporan timidina al mismo tiempo que las células de la región peri-luminal (Das y Martin, 1978). En el momento que las células de la ZDP comienzan a diferenciarse, las células estromales periféricas siguen experimentando rondas de división celular antes de diferenciarse y dar lugar a la ZDS (Martin, Finn y col., 1973; Das y Martin, 1978). En el **mesometrio** las células estromales proliferan más tardíamente y se diferencian constituyendo la decidua mesometrial (DM). La proliferación de estas células durante el proceso de diferenciación es exclusivamente dependiente de progesterona, sin la cual la reacción decidual se frena y el tejido regresiona (Ogle, George y col., 1998).

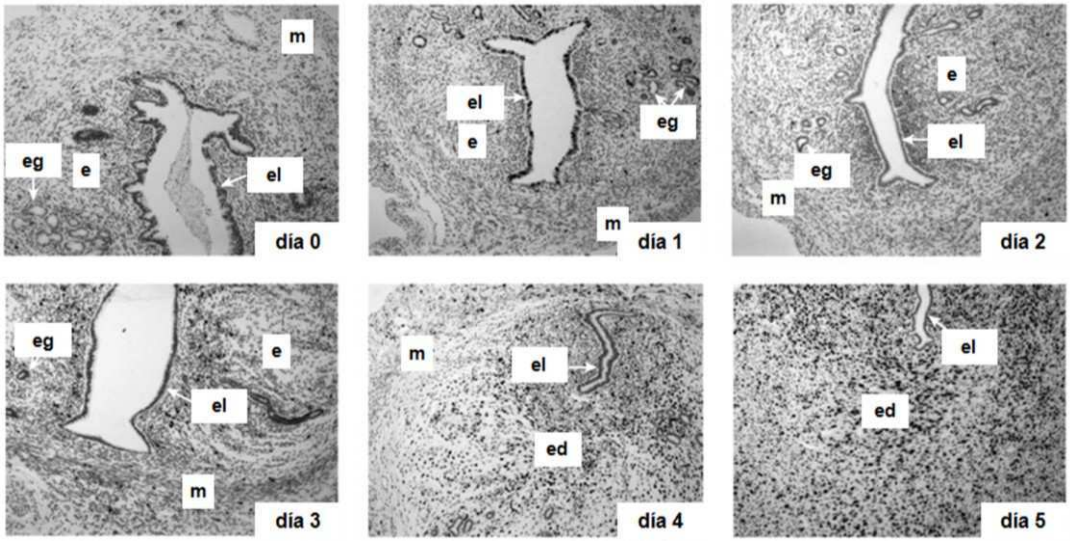


Figura 4. Proliferación celular en el útero del ratón durante los periodos pre y peri-implantatorios. Se muestran secciones transversales del útero de ratón, orientados con el mesometrio hacia arriba, aislados en el día de preñez que se indica. Dos horas previas al sacrificio, se administró bromodeoxiuridina (BrdU) a las hembras preñadas y mediante el uso de un anticuerpo específico se detectaron las células en proliferación (teñidas de negro) en cortes en parafina. eg: epitelio glandular; el, epitelio luminal; e; estroma; m, miometrio; ed, estroma diferenciado. Adaptado de Tong y col., 2008.

La respuesta del endometrio a P_4 y E_2 puede reproducirse en **modelos de animales ovariectomizados** (ovx) mediante la administración exógena de las hormonas esteroideas ováricas. En ratones ovx tratados con E_2 durante 3 días se simula la preparación (*priming*) del útero que fisiológicamente es inducido por el E_2 secretado por el ovario antes del coito. La administración de P_4 y E_2 conduce a un

aumento en la división de las células estromales y a una reducción en la mitosis epitelial. Esta respuesta del endometrio es máxima cuando las hormonas (P_4 + E_2) se administran 4 días luego del *priming* con estradiol, reproduciendo el incremento en la proliferación que se observa en las células estromales antes de la implantación embrionaria (Finn y Martin, 1970).

El efecto inhibitorio de la progesterona sobre la proliferación del epitelio endometrial fue claramente demostrado por Martin L y col. (1973). La síntesis de ADN en el útero de ratones ovx evidenció que el tratamiento con progesterona inhibe no solo la proliferación epitelial (luminar y glandular) inducida por estradiol, sino también la proliferación basal de este tejido. Asimismo, estos autores, observaron que la progesterona aumenta el número de células estromales que sintetizan ADN, y que la posterior administración de estradiol conduce a un aumento del 30–40% de células estromales (Martin, Finn y col., 1973).

La conexión entre la proliferación de las células estromales y el proceso de diferenciación decidual se estudió en modelos de pseudopreñez de ratas ovariectomizadas tratadas con P_4 y E_2 en combinación. Moulton y col. identificaron el destino de las células que sintetizaban ADN, mediante la marcación de las células uterinas con timidina tritiada y la posterior separación de las mismas en función a su tiempo de sedimentación. Observaron que las células estromales que sintetizan ADN al principio de la pseudopreñez o en respuesta al tratamiento hormonal diferencian posteriormente hacia el fenotipo decidual (Moulton y Koenig, 1984).

1.3.1 Estructura y mecanismo de acción de los receptores de progesterona y de estradiol

Las acciones de P_4 y E_2 sobre la fisiología uterina están mediadas por la unión a sus respectivos receptores, el receptor de progesterona (RP) y el receptor de estradiol (RE), y por interacción de estos con sus respectivos coreguladores (McKenna y O'Malley, 2002; Lonard y O'Malley, 2006). Dichos receptores se expresan en varios tejidos, aunque predominantemente en el tracto reproductivo femenino.

Los **receptores de hormonas esteroideas** son factores de transcripción activados por ligando y pertenecen a la super-familia de receptores nucleares.

Los miembros de esta super-familia comparten **similitudes estructurales y dominios funcionales claves** (Evans, 1988; Tsai y O'Malley, 1994) (Figura 5). Dentro de los dominios que presentan, se encuentra el dominio de unión al ADN (DBD), constituido por motivos de dedos de zinc responsables del reconocimiento y unión a

sus secuencias blanco en el ADN (elemento respondedor a hormona, ERH). Dependiendo del receptor en cuestión, la secuencia consenso del ERH varía. El dominio de unión al ligando (DUL) es el dominio del receptor al que se une específicamente el agonista o antagonista. Está constituido por un arreglo de 12 hélices-α que arman el bolsillo al que se une el ligando (Tsai y O'Malley, 1994; Renaud y Moras, 2000; Robinson-Rechavi, Escriva Garcia y col., 2003). La unión de un ligando a este bolsillo induce cambios conformacionales que determinan la capacidad del receptor de reclutar a distintos coactivadores transcripcionales. Los dominios AF-1 y AF-2 están involucrados en la activación transcripcional independiente o dependiente de ligando, respectivamente. La deleción de las regiones AF-1 y AF-2 disminuye la capacidad de los receptores para regular la expresión génica (Metzger, Ali y col., 1995).

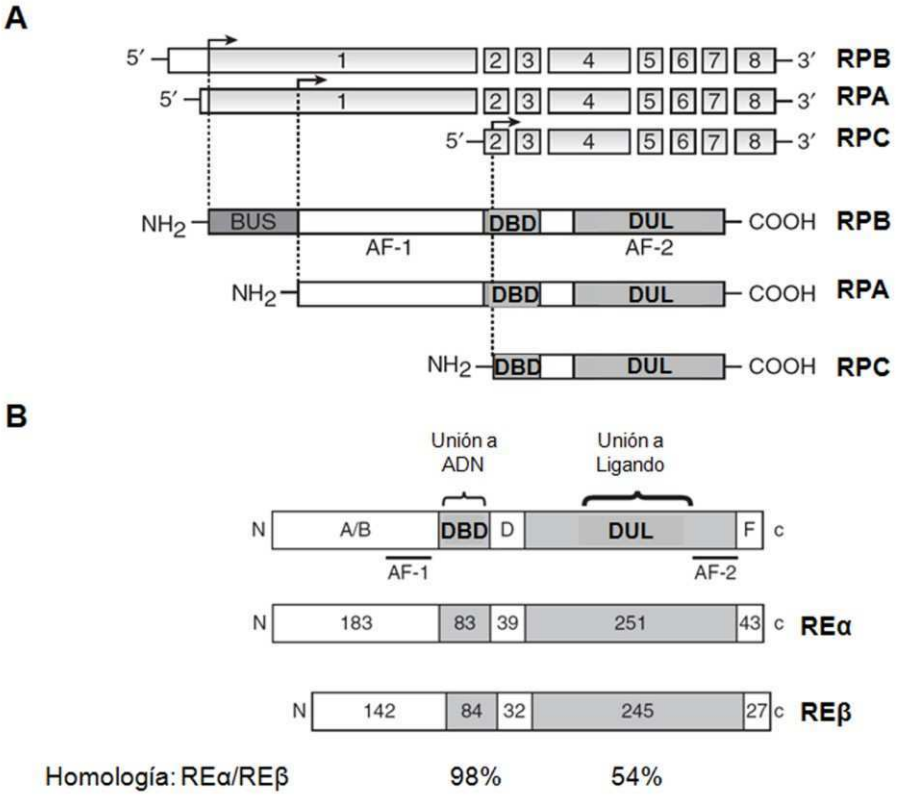


Figura 5. Estructura de los receptores de estradiol y de progesterona. A) Representación esquemática de las distintas isoformas del RP. Se indican los distintos sitios de iniciación de la traducción. Los recuadros del 1 al 8 representan a los exones. **B)** Representación esquemática del REα y REβ. DBD, dominio de unión al ADN; DUL, dominio de unión al ligando; AF-1 y AF-2, dominios de activación. Tomado de Hewitt y Korach, 2008 y de Lee, Wang y DeMayo, 2008.

El **receptor de progesterona** está codificado en un único gen y existen tres isoformas del receptor que median la acción de esta hormona, las isoformas A, B y C (RPA, RPB y RPC) (Figura 5A). Estas isoformas se originan por el uso de sitios de

inicio de la transcripción alternativos en el gen del RP. La isoforma A carece de 164 aminoácidos (aa) en el extremo N-terminal que contiene la isoforma B. La isoforma C, por otro lado, contiene un DBD truncado (Lee, Wang y col., 2008). La P_4, actuando a través del RPA y RPB, media la producción de factores autocrinos y paracrinos en las células estromales que refuerzan la respuesta de crecimiento y diferenciación de las células epiteliales y estromales (Tsai y O'Malley, 1994). La pérdida de respuesta del estroma a la P_4 vuelve al endometrio uterino refractario a la implantación del blastocisto (Lydon, DeMayo y col., 1995).

El **receptor de estradiol** presenta dos formas, el receptor de estradiol alfa (REα) y el receptor de estradiol beta (REβ) (Figura 5B). Dos genes diferentes, *Ers1* y *Ers2,* codifican para los receptores de estradiol α y β, respectivamente. Los DBD de ambos receptores comparten un 98% de similitud de secuencia, mientras que los DUL comparten sólo un 54% de sus secuencias. Sin embargo, ambos receptores tienen afinidades similares por E_2 (Hewitt y Korach, 2008).

Los receptores de hormonas esteroideas estimulan la **transcripción génica** de distintas maneras. La **vía genómica clásica** involucra la interacción directa de los receptores con sus genes blanco. El receptor unido a la hormona transloca al núcleo, reúne coactivadores y se une a los ERH presentes en el ADN del gen blanco. El complejo hormona-receptor también recluta a otros factores de transcripción, como AP1 o SP1, y regula la expresión de genes que carecen de ERH. Los receptores de hormonas esteroideas pueden, además, interactuar con quinasas citoplasmáticas y activar **vías de señalización ¨no genómicas¨** o ¨extranucleares¨ (Hewitt y Korach, 2008; Lee, Wang y col., 2008). Vicent y col. demostraron que la activación de las cascadas de señalización citoplasmáticas es esencial en el remodelamiento de la cromatina y la activación transcripcional de una gran número de genes blanco de las hormonas esteroideas (Vicent, Ballaré y col., 2008). Asimismo, este efecto no genómico también estaría mediado por la acción de las hormonas esteroideas sobre receptores no clásicos (Mani, Mermelstein y col., 2012).

El RP y el RE son **regulados a nivel post-traduccional** mediante fosforilación, sumoilación, acetilación, etc (Faus y Haendler, 2006). Estas modificaciones afectan la estabilidad, localización subcelular y la actividad de los receptores, a la vez que influyen en los mecanismos de regulación específicos del tipo celular o del gen blanco regulado. En relación a la fosforilación, las proteínas quinasa activadas por mitógeno (MAPK) fosforilan en residuos serina tanto al RP como al RE luego de la unión de sus ligandos. En general la fosforilación de los receptores de hormonas esteroideas ováricas lleva a un aumento en su actividad transcripcional (Faus y Haendler, 2006).

1.3.2 Antagonistas del receptor de progesterona y del receptor de estradiol

Se han desarrollado muchos **ligandos sintéticos**, esteroideos o no esteroideos, con capacidad de unión competitiva e inhibición o activación del RP y el RE. Estas drogas, además de las ventajas terapéuticas, son una herramienta muy valiosa para el estudio de los mecanismos de acción de las hormonas esteroideas ováricas.

Los **antagonistas del RP** se dividen en dos categorías según su mecanismo de interacción e inactivación. Los antagonistas de tipo I, como la Onapristona utilizada en esta tesis, evitan la asociación del RP al ADN; mientras que los de tipo II, como RU486, promueven la unión del receptor al ADN e inhiben etapas posteriores de la vía de acción, posiblemente a nivel de los cambios conformacionales necesarios para la actividad transcripcional del receptor. Se han encontrado evidencias de que los compuestos de tipo I estimulan la fosforilación del RP en menor medida que los compuestos de tipo II. RU486 puede estimular la fosforilación específica del RP como si fuera un agonista del RP. Por otro lado, la Onapristona no es susceptible de interaccionar con la vía de transducción de señales de AMPc, actuando como agonista parcial, como ocurre con los antagonistas de tipo II. La Onapristona resulta, en varias condiciones, un antagonista más ¨puro¨, sin efectos agonistas, que los compuestos de tipo II (Edwards, Altmann y col., 1995).

Dentro de los **antagonistas del RE**, el tamoxifeno es el antiestrógeno más comúnmente utilizado en el tratamiento clínico del cáncer de mama (Santen, Manni y col., 1990). Este compuesto, sin embargo, posee una actividad mixta ya que estimula la proliferación celular en el endometrio, donde funciona como agonista del RE. Existe un gran interés en el desarrollo de compuestos con actividad antiestrogénica ¨pura¨ tanto en mama como endometrio. En la búsqueda de este tipo de compuestos surgió el ICI182.780 (Faslodex^{TM}), un antagonista del receptor de estradiol con alta afinidad dicho receptor y sin efectos agonistas en otros tejidos blanco del estradiol como el útero. ICI es un inhibidor competitivo del estradiol y tiene una afinidad de unión al RE aproximadamente 100 veces mayor que el tamoxifeno. Estudios con ICI en animales detectaron la ausencia de actividad estimulatoria en útero, además de mostrar que ICI bloquea la actividad trófica del tamoxifeno en dicho órgano (Wakeling, Dukes y col., 1991; Kauffman y Bryant, 1995). Dukes y col., midieron el tamaño del útero de monos (*Macaca nemestrina*), ovariectomizados y posteriormente tratados con estradiol, utilizando imágenes obtenidas por resonancia magnética (MRI) y observaron que el

tratamiento con ICI bloquea la proliferación uterina. La tasa y extensión de la involución del endometrio fue similar en los monos tratados con E_2 e ICI en combinación que en los tratados y posteriormente privados de E_2 (Dukes, Miller y col., 1992).

1.3.3 Decidualización y efectos de los antagonistas del receptor de progesterona y del receptor de estradiol

En nuestro laboratorio se estudió el **efecto de la administración de ONA e ICI en el desarrollo de la decidua** (Vallejo, 2009; Vallejo, Mestre-Citrinovitz y col., 2011). El protocolo consistió en la inyección subcutánea de ONA, ICI u ONA+ICI a ratas preñadas durante los días 6 y 7 pc. Los sitios de implantación (SIs) resultantes fueron analizados en el día 8 pc. Con este esquema experimental Vallejo y col. abordaron el estudio del efecto de los antagonistas sobre las últimas etapas de la diferenciación de la DAM y la DM. Por esta razón, a este protocolo lo nombraremos a partir de aquí como protocolo de tratamiento tardío.

Estos resultados mostraron que los antagonistas modifican las extensiones de las distintas áreas deciduales de los SIs de ratas tratadas en relación a los SIs de ratas no tratadas (NT). El tratamiento con ONA redujo la extensión de la DAM y la DM, al igual que los tratamientos con ICI y ONA+ICI. Estos dos últimos tratamientos, con ICI, produjeron un aumento en la proporción de las zonas indiferenciadas de la decidua (U y adm).

Los niveles proteicos del RPA, RPB, REα y ERK activado (pERK) en las muestras provenientes de los SIs de 8 dpc aumentaron en relación a su expresión en días más tempranos de preñez. Los tratamientos con ONA e ICI disminuyeron los niveles de estas moléculas en distinto grado, indicando la importancia de la acción de la P_4 y el E_2 sobre la expresión del RP y el RE (Vallejo, Mestre-Citrinovitz y col., 2011).

1.4 Ciclo celular y endoreduplicación durante la decidualización

El **ciclo celular** se regula en dos puntos de control (*checkpoints*), el pasaje de G1-S y el de G2-M. El avance a través de estas fases involucra la interacción entre Ciclinas, quinasas dependientes de Ciclinas (CDKs) e inhibidores de CDKs (CKIs).

Las Ciclinas de tipo D (D1, D2, D3), también llamadas Ciclinas G1, se acumulan a lo largo de la fase G1. La entrada a la fase S depende de la formación de una holoenzima compuesta por estas Ciclinas y las quinasas CDK4 o CDK6. La

proteína de retinoblastoma (Rb) y otros miembros de su familia, p107 y p130, son reguladores negativos del ciclo celular. La proteína Rb se desfosforila durante las fases G0 y G1 temprana y se une e inhibe a E2F1, un factor de transcripción cuyos genes blanco son esenciales para la división celular. El complejo Ciclina/CDK fosforila a estos reguladores, inhibiéndolos y permitiendo la liberación de E2F1 con lo cual el ciclo prosigue a través de la fase G1 (Riley, Lee y col., 1994). La sobre-expresión de las Ciclinas de tipo D acorta la fase G1 y permite un pasaje rápido a la fase S (Resnitzky, Gossen y col., 1994). El complejo Ciclina A/CDK2 es necesario para la progresión a través de la fase S. La unión de Ciclina A y B a CDK1 y su subsiguiente fosforilación y activación resultan esencial para la transición a través de G2-M (Figura 6).

La activación de las CDKs está limitada por la acción de dos familias de **CKIs**, p21 y p16. La familia de p16 incluye a p15, p16, p18 y p19, e inhibe a CDK4 y CDK6, quinasas asociadas a las Ciclinas tipo D. La familia de p21 consta de p21, p27 y p57, e inhiben CDKs de manera menos específica que la familia de p16. Las CKIs se acumulan en las células quiescentes en fase G0 y sus niveles disminuyen en respuesta a estímulos proliferativos. La progresión a través del ciclo celular depende del balance entre reguladores positivos y negativos (Sherr y Roberts 1999).

Varias Ciclinas (A, B1, D1 y E), CDKs (1, 2 y 4) y CKIs (p27) son **reguladas durante el ciclo menstrual** en el útero humano. La expresión de estas moléculas, tanto en epitelio como estroma, aumenta durante la fase proliferativa del ciclo, sugiriendo su participación en la proliferación celular. Durante la fase secretoria o luego de la administración de P_4, la expresión de p27 correlaciona con la supresión de la proliferación de las células epiteliales, glandulares y luminales (Dey, Lim y col., 2004).

En roedores la expresión espacio-temporal de las Ciclinas de tipo D y E y de las CDKs es **regulada por estradiol y/o progesterona**. P_4 inhibe la proliferación epitelial, dicha inhibición depende de la exclusión del núcleo del complejo Ciclina D1/CDK4 junto con la inactivación de las Ciclinas A y E por CDK2 (Jones, Kimler y col., 2000).

Las células deciduales del antimesometrio se caracterizan por la transición de un ciclo celular replicativo a uno **endoreduplicativo** con la consecuente adquisición de poliploidía (Dey, Lim y col., 2004). La represión de distintos reguladores de la transición de la fase G2-M lleva a la pérdida de la regulación del ciclo celular. Como resultado, las células deciduales entran en rondas cíclicas de replicación de ADN

desreguladas resultando en grandes células mono o binucleadas con contenido haploide mayor a 4C (Figura 6).

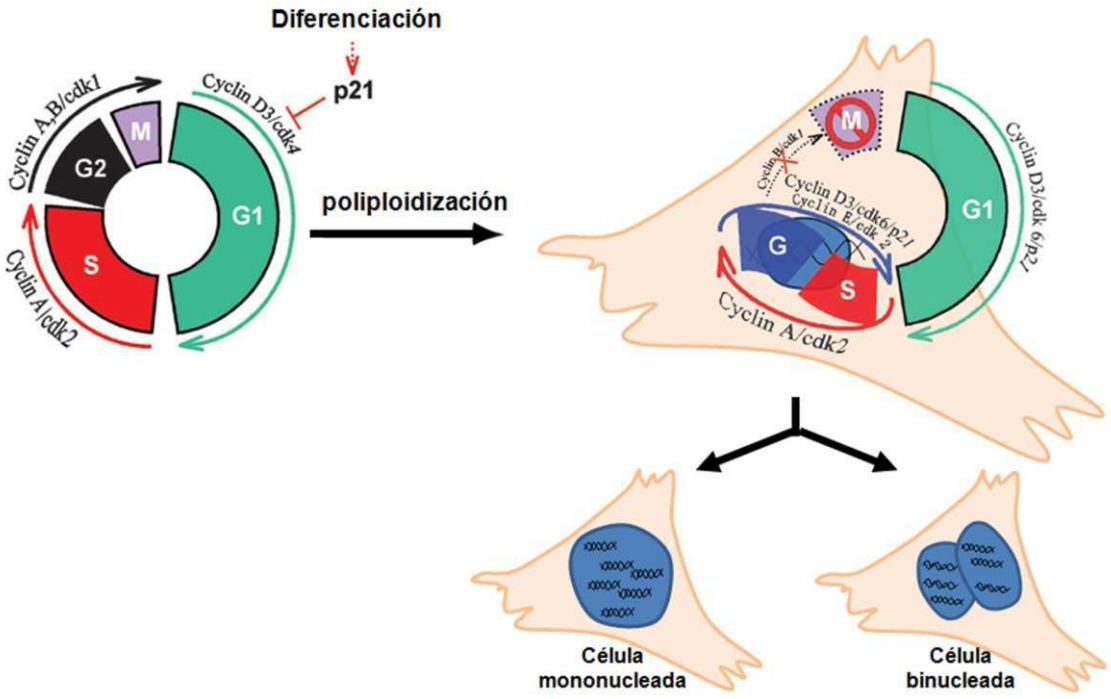


Figura 6. Regulación del ciclo celular y la endoreduplicación en células deciduales. Se muestra un esquema del modelo propuesto para el desarrollo de la poliploidización decidual. Se compara la interacción de distintos reguladores del ciclo celular en el ciclo normal v. ciclo endoreplicativo. La expresión de p21 es clave para el pasaje al endociclo, la formación del complejo ternario CCND3, CDK6 y p21 junto con la expresión de Ciclina E/CDK2 llevarían a las células deciduales a rondas de replicación de ADN sin citoquinesis resultando en células poliploides terminalmente diferenciadas. Las células poliploides pueden ser mono o binucleadas. Adaptado de Dey y col., 2004 y Tan y col., 2003.

Los niveles de expresión de la **Ciclina D3** (CCND3) varían a lo largo de la preñez en el útero de ratón. En la mañana del día 4 pc su expresión en el estroma uterino es baja y aumenta en los SIs con el avance de la implantación. Al comienzo de la preñez, el complejo Ciclina D3/CDK4 está asociado con la proliferación estromal. La expresión conjunta en el momento y el sitio de implantación del embrión sugiere un rol de este complejo en la proliferación del estroma uterino. El cese de la proliferación de la zona decidual primaria en el día 6 pc (Figura 2) correlaciona con la expresión de p21 y la disminución en los niveles de Ciclina D3 y CDK4. La posterior expresión de Ciclina D3 y CDK4 en el estroma en contacto con la ZDP es consistente con la formación de la zona decidual secundaria. La posterior diferenciación terminal de la ZDS, incluyendo el desarrollo de poliploidía, se asocia con la presencia del complejo ternario Ciclina D3/CDK6/p21. La presencia de Ciclina E, A y CDK2 junto con la disminución de Ciclina

B/CDK1 en las células de la ZDS refuerza la hipótesis de la endoreduplicación del estroma (Tan, Raja y col., 2002; Tan, Li y col., 2004).

1.5 Factores paracrinos y moléculas claves para el desarrollo de la decidua

La acción de la P_4 y el E_2 puede ser directa o indirecta a través de la inducción de distintos **factores de crecimiento y moléculas de señalización**. Además de la acción hormonal, el diálogo entre el embrión y el endometrio estimula también la expresión de factores importantes para la implantación y subsiguiente desarrollo de la preñez. De esta manera, las células deciduales y el blastocisto, secretan factores autocrinos y paracrinos que regulan la decidualización, la angiogénesis uterina y el crecimiento embrionario, y modulan la respuesta inmune materna. Entre estos factores encontramos: mediadores lipídicos, como las prostaglandinas (PGs) y los endocanabinoides, como la anandamida; moléculas de señalización y factores de transcripción, como las proteínas de la familia WNT, HOXA-10, HOXA-11, FOXO1, HAND2, STAT5, STAT3; citoquinas, como LIF, TNF-α IL-11, IL-6; factores remodeladores de la matriz extracelular, las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMP); factores de crecimiento, como IGFBP1, IHH, miembros de la familia de EGF y TGF-β, FGF; entre otros factores (Schmid, Paria y col., 1997; Dey, Lim y col., 2004; Tranguch, Daikoku y col., 2005; Fonseca, Correia-da-Silva y col., 2013; Salleh, 2014). Los **ratones genéticamente modificados** deficientes en varias de estas moléculas muestran fallas en la decidualización, evidenciando la importancia de las mismas durante el establecimiento de la preñez (Dey, Lim y col., 2004; Wang y Dey, 2006; Tong, Niklaus y col., 2008).

La proteína morfogénica ósea, **BMP2**, perteneciente a la super-familia de factores de crecimiento de TGF-β, y su receptor han sido relacionados con el proceso de decidualización. Ying y Zhao mostraron que BMP2 tiene una expresión diferencial a lo largo del proceso de decidualización (Ying y Zhao, 2000). El uso de la antiprogestina RU486 puso en evidencia que la expresión de BMP2 está regulada positivamente por P_4 y que BMP2 está involucrado funcionalmente en la decidualización en humanos y roedores (Li, Kannan y col., 2007). Lee y col. generaron ratones con una deleción condicional de Bmp2 y demostraron que la baja fertilidad de estos ratones es debida a la falta de respuesta decidual luego de la reacción de adhesión del blastocisto al epitelio uterino (Lee, Jeong y col., 2007).

Además de los factores de crecimientos, numerosos factores de transcripción son cruciales para el desarrollo decidual. Recientemente, Bagchi y col., utilizando el

antagonista del RP, RU486, en ratones ovx y tratados con P_4, identificaron a ***Hand2*** como un gen regulado por el RP (Bagchi, Li y col., 2005). HAND2, transcripto derivado de corazón y cresta neural 2, ha sido localizado en el estroma uterino. Sus niveles aumentan acompañando el proceso de decidualización *in vitro* tanto en células humanas como murinas (Huyen y Bany, 2011). La inhibición de la expresión de *Hand2* mediante el uso de ARN de interferencia redujo el grado de diferenciación de la decidua (Huyen y Bany, 2011).

1.6 Angiogénesis en la decidua

La coordinación espacio-temporal entre la decidualización y los procesos de **vascularización durante el periodo de implantación** es de suma importancia para el desarrollo de un útero receptivo y el correcto avance de la preñez. El endometrio se transforma en un tejido receptivo muy vascularizado durante la fase secretoria. En presencia del blastocisto la decidualización continúa, y la extensa angiogénesis permite el establecimiento de una red de vasos y capilares que mantienen el desarrollo y el crecimiento placentario, y que posibilitan la conexión entre los suministros de sangre del feto y la madre. Durante este proceso el feto queda rodeado de un tejido especializado, constituido por trofoblastos, a través del cual puede aprovechar el suministro de sangre materna sin provocar una respuesta inmune perjudicial, ya que la interacción directa del feto semialogénico con la madre resultaría en el rechazo inmunológico del mismo. La invasión trofoblástica debe ser suficiente para alcanzar el suministro de sangre materno sin que esto cause inconvenientes a la madre. La naturaleza altamente invasiva de los trofoblastos es controlada por la decidua (Plaisier, 2010). Tanto la angiogénesis -formación de vasos a partir de vasos preexistentes por elongación, ramificación o invaginación-, como la vasculogénesis o neoangiogénesis -formación de vasos *de novo* a partir de células endoteliales precursoras- son procesos importantes en el desarrollo y remodelamiento de la vasculatura uterina (Plaisier, 2010).

La formación de vasos en la decidua, es un **proceso muy regionalizado**. La mayoría de los capilares y vasos tempranos se extienden desde el miometrio hacia el cono-ectoplacentario del embrión en crecimiento a través de la zona de unión entre en AM y M (zona U) (ver esquema en Figura 2).

La angiogénesis y el desarrollo vascular en el útero están **regulados** por un gran número de factores solubles (Smith, 2000). A su vez, estos factores son modulados por E_2 y P_4 (Ma, Tan y col., 2001), por las células deciduales, los

trofoblastos y las células uNK. Debido a que durante la preñez temprana los cambios en la permeabilidad y densidad vascular ocurren en la proximidad de los SIs se sugiere que factores derivados del embrión afectan la expresión génica relacionada con la angiogénesis (Bany y Cross, 2006; Plaks, Kalchenko y col., 2006). Por otro lado, condiciones fisiopatológicas, como la hipoxia, también influyen en la regulación de la angiogénesis endometrial (Sharkey, Day y col., 2000). La angiogénesis se promoverá o inhibirá dependiendo de la producción, e interacción entre los factores locales (Girling y Rogers, 2005).

Los **factores solubles** mayormente descriptos como reguladores de la angiogénesis son: el factor de crecimiento de endotelial vascular (VEGF), los miembros de la familia de angiopoyetinas, la familia de factores de crecimiento fibroblástico (FGF) y las proteasas de matriz extracelular.

El **VEGF**, mitógeno específico de células endoteliales es una glicoproteína homodimérica con varias funciones en el desarrollo vascular. La familia de VEGF consta de varios miembros –A,B,C,D y PIGF- que interaccionan con dos receptores, VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (KDR), y promueven la proliferación, migración y apoptosis de las células endoteliales, además de regular la permeabilidad vascular (Ferrara, 2004). Existe una versión truncada soluble de VEGFR-1 (sFlt1) que se une a VEGFA y PIGF, previniendo la unión de estas moléculas al receptor completo e inhibiendo su función (Smith, 2000). Hyder y col. demostraron que tanto E_2 como el tamoxifeno aumentan los niveles de transcripción de *Vegf* en el útero de roedores (Hyder, Stancel y col., 1996). También observaron que esta inducción es más prominente en la región del estroma en contacto con el epitelio uterino.

La familia del factor de crecimiento fibroblástico (**FGF**) está compuesta por polipéptidos muy conservados con alta afinidad por proteoglicanos de heparina-sulfato (Ornitz e Itoh, 2001). Dentro de esta familia, el FGF básico (bFGF – FGF-2) fue aislado por primera vez de muestras de placenta humana. FGF-2 es un factor proangiogénico y estimula la proliferación, la migración celular y la síntesis de proteasas de células endoteliales (Hamai, Fujii y col., 1998). El análisis de la decidua de ratas pseudopreñadas mostró que los niveles de FGF-2 aumentan junto con el avance de la decidualización y que su expresión es mayor en el mesometrio que en el antimesometrio endometrial (Srivastava, Gu y col., 1998). Por lo tanto, este factor podría tener una gran importancia en el desarrollo vascular durante la implantación.

2. Modelos *in vitro* para el estudio de la proliferación y la diferenciación decidual

La proliferación y diferenciación endometrial pueden ser estudiadas ***in vitro*** en líneas celulares endometriales establecidas o cultivos primarios adecuadamente estimulados. El análisis de los cambios morfológicos y de la expresión de marcadores clásicos de diferenciación decidual como dPRP -PRL8A2- y DESMINA (Glasser y Julian, 1986; Gu, Soares y col., 1994), permiten describir modelos experimentales simples y robustos para el estudio de los procesos y mecanismos que controlan la diferenciación endometrial.

2.1 Las células estromales endometriales normales de rata, las células UIII

Tessier-Prigent y col. fueron el primer grupo en describir la **decidualización *in vitro* de células estromales de rata** (Tessier-Prigent, Willems y col., 1999). Establecieron la línea celular UIII, descripta como una línea de células estromales normales derivadas de útero de rata inmortalizadas espontáneamente. Estas células retienen los receptores de progesterona, estradiol y prolactina, y la respuesta a progesterona para su crecimiento (Cohen, Pageaux y col., 1993; Vallejo, Ballaré y col., 2005).

Utilizando las células UIII como modelo experimental, **nuestro laboratorio** realizó importantes avances en el estudio de la proliferación y diferenciación decidual (Vallejo, Ballaré y col., 2005; Ballaré, Vallejo y col., 2006; Vallejo, Maschi y col., 2010).

En el 2005 definimos que concentraciones picomolares de la **progestina sintética R5020** (agonista del RP) **inducen la proliferación de las células UIII**. Dicha proliferación esta mediada por la unión de R5020 al RP que interacciona con el REβ, en ausencia de $E_{2,\ y}$ activa vías no genómicas del RP (Vallejo, Ballaré y col., 2005).

En el 2010 definimos el **patrón de expresión génica asociado a la diferenciación decidual en células UIII** inducidas con 10% de suero libre de esteroides (SFB-ch) mediante el uso de microarreglos de ADNc. Este cambio fue confirmado por la adquisición del fenotipo epiteloide y la expresión de desmina, marcador de decidualización tardío (Glasser y Julian, 1986). Dentro de este patrón de expresión las funciones: expresión génica y arquitectura y remodelamiento de la cromatina fueron las funciones más significativamente representadas. Las variaciones en los niveles de expresión génica fue validada por PCR a tiempo final en el modelo de decidualización *in vitro* de células UIII e *in vivo*, comparando los niveles de expresión génica entre el útero de rata no preñada y los SIs de 8 dpc (Vallejo, Maschi y col., 2010).

3. La vía de ERK

La fosforilación de proteínas es una de las modificaciones post-traduccionales clave en la transducción de señales. Por lo tanto, las **quinasas** tienen un papel regulatorio importante en casi todos los aspectos de la biología celular (Roskoski, 2012).

Las **proteínas quinasas activadas por mitógenos** (MAPK) de mamíferos consisten en quinasas citoplasmáticas que conectan las señales que llegan desde el exterior con el interior celular. Dentro de este grupo se encuentran la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), la familia de p38 y la familia de c-Jun (JNK). Estas quinasas fosforilan específicamente en residuos serina/treonina. La vía de señalización es, en general, iniciada por la activación de una pequeña proteína G. Luego la vía continúa con la activación secuencial por fosforilación de quinasas pertenecientes a niveles diferentes. La cascada de señalización de cada familia de MAPK consiste en al menos 3 niveles: una MAPK quinasa quinasa (MAP3K), una MAPK quinasa (MAP2K) y una MAPK. Cada quinasa fosforila a la quinasa del siguiente nivel activándola. El último eslabón de la cadena, MAPK, cataliza la fosforilación de un gran número de sustratos proteicos: factores de transcripción, otras quinasas, fosfatasas, etc. Además de la activación por las quinasas de los niveles superiores, las MAPK pueden ser reguladas o activadas por la interacción con otras vías de señalización citoplasmáticas (Ballaré, Vallejo y col., 2006; Shaul y Seger, 2007).

La **cascada de activación de ERK** está formada por Ras (pequeña proteína G), Raf (MAP3K), MEK (MAP2K) y ERK (MAPK). ERK presenta dos isoformas ERK1 (44 kDa) y ERK2 (42 kDa) que son fosforiladas y activadas por MEK, quinasa dual específica, en un residuo tirosina y en uno treonina (Shaul y Seger, 2007).

PD98059 (PD), es un **inhibidor sintético específico de la vía de MAPK** que ha sido utilizado para la identificación del papel fisiológico de ERK (Alessi, Cuenda y col., 1995). PD se une a la forma inactiva de MEK inhibiendo su activación por Raf y por otros reguladores río arriba.

La cascada de **ERK regula un gran número de procesos celulares** como la adhesión, la migración, la supervivencia, la diferenciación, el metabolismo y la proliferación celular (Roskoski, 2012). Particularmente en el útero, nuestro grupo demostró que los niveles de ERK activado (pERK) aumentan desde el día 0 de preñez hacía el día 8 pc acompañando el desarrollo de la decidua (Vallejo, Mestre-Citrinovitz y col., 2011). Además, observamos que *in vitro* la proliferación de las células

endometriales UIII en respuesta a R5020 depende de la activación de las vías de ERK y AKT (Vallejo, Ballare y col., 2005). Thienel y col. observaron que la activación de ERK en la decidua estaría regulada por progesterona y óxido nítrico, y sugirieron que podría tener un papel importante durante la decidualización (Thienel, Chwalisz y col., 2002).

4. Cold Shock Domain-C2, una proteína de unión a ARN

Los estudios con microarreglos de ADNc usados para conocer el patrón de expresión génica durante la diferenciación decidua mostraron a ***Cold shock Domain-C2***, *Csd-c2*, como el gen más sobre-expresado (Vallejo, Maschi y col., 2010). *Csd-c2* pertenece al grupo de genes con función en expresión génica y el aumento en su expresión fue validado durante la decidualización *in vivo* (Figura 7). CSD-C2 no había sido previamente asociado a la decidualización.

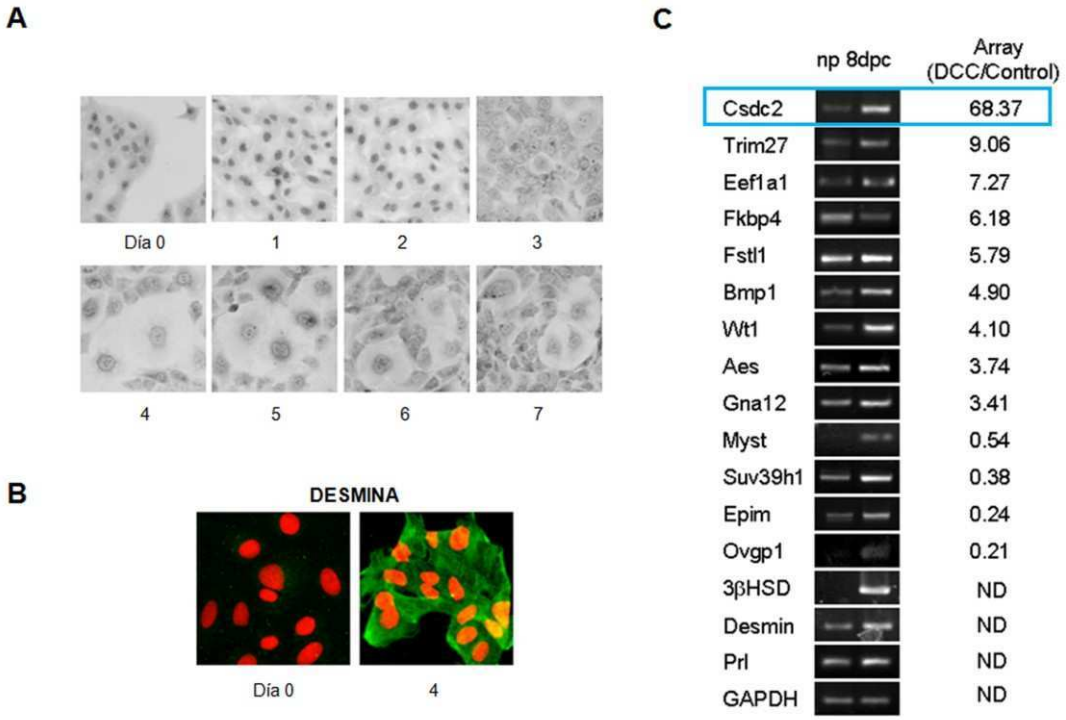


Figura 7. Modelo de diferenciación *in vitro* de las células UIII. A) Se muestran los cambios morfológicos a distintos días de cultivo en medio con 10% de SFB-ch **B)** Los cambios morfológicos son acompañados por el aumento en la expresión de desmina. La imagen muestra los cambios al día 4 de tratamiento. **C)** Validación en la decidualización *in vivo* de genes sobre-expresados durante la decidualización in vitro de las células UIII. NP, rata no preñada; 8 dpc, SIs de 8 días de preñez; DCC/control, 10%SFB-ch/control; ND, no determinado. Resultados de Vallejo y col., 2010.

El grupo dirigido por la Dra. Di Liegro reportó, en 1996, el descubrimiento de un ADNc codificante para una proteína que contiene dos sitios putativos de unión a ARN

doble cadena (ARNdc). Esta proteína se descubrió en base a su capacidad de unirse al ARNm de la variante H3.3 de las histonas de rata (Castiglia, Scaturro y col., 1996). En un primer momento a esta novedosa proteína, expresada en cerebro de rata, fue nombrada PIPPin.

Estudios más detallados de la secuencia de PIPPin llevaron a identificar 3 **dominios de unión a ácidos nucleídos**: un dominio central *cold shock* (CSD) y 2 dominios putativos de unión a ARN doble cadena denominados PIP1 y PIP2 (Figura 8) (Nastasi, Scaturro y col., 1999). La presencia de un dominio *cold shock* en PIPPin justificó el cambio de nombre a CSD-C2. Por este dominio CSD-C2 es arte de la familia de proteínas *Y-box*. Esta familia está integrada por proteínas altamente conservadas de unión a ácidos nucleicos que interaccionan con ADN y ARN para controlar la transcripción y traducción de genes específicos (Mihailovich, Militti y col., 2010).

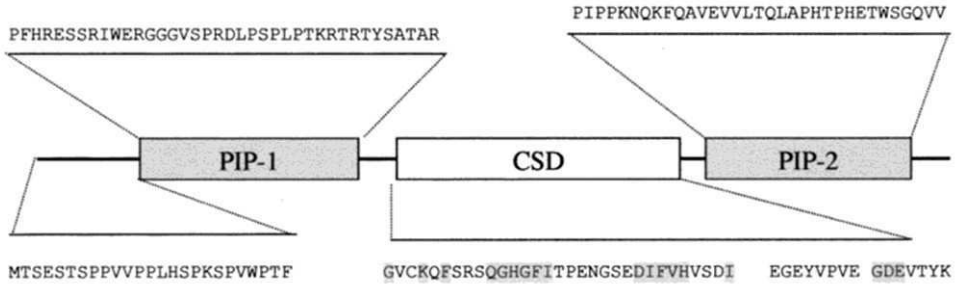


Figura 8. Esquema de la proteína CSD-C2. Se muestran los distintos dominios de unión ácidos nucleicos. Dos dominios PIP y un dominio CSD central. CSD, *Cold shock domain*. Tomado de Nastasi y col., 1999.

Se ha descripto que **CSD-C2 se une *in vitro* a los ARNm de las histonas H1° y H3.3** posiblemente inhibiendo su traducción. CSD-C2 se une en el extremo de la región 3´UTR, el cual incluye al sitio de poli-adenilación. Se ha postulado que la regulación a nivel post-transcripcional sería mediante la inhibición de la poli-adenilación de dichos mensajeros (Nastasi, Scaturro y col., 1999). Por otro lado, Raimondi y col. determinaron que la capacidad de unión de CSD-C2 a sus ARNm blanco depende de la presencia de los 3 dominios (Raimondi, D'Asaro y col., 2003).

La **expresión** de CSD-C2 fue descripta primero en el cerebro de rata. Su expresión está enriquecida en algunas neuronas piramidales de la corteza cerebral y en las células de Purkinje del cerebelo (Nastasi, Muzi y col., 2000). Si bien CSD-C2 está presente tanto en citoplasma como en núcleo, solo en los extractos nucleares de

las neuronas se encontraron los complejos CSD-C2-ARNm de H1° o H3.3 (Nastasi, Scaturro y col., 1999).

En cuanto a su **función**, su expresión estaría relacionada con la diferenciación neuronal terminal. Variantes de las histonas H1° y H3.3 se acumulan en las células nerviosas durante la maduración neuronal, sin embargo en las células postmitóticas los niveles de estas histonas están disminuidos. Se sugiere que CSD-C2 regula negativamente los niveles de ARNm de estas histonas permitiendo la diferenciación terminal de las neuronas piramidales (Nastasi, Scaturro y col., 1999).

La **regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional** depende en gran medida de la actividad de proteínas de unión a ARN (RBP, por las siglas en ingles). Las proteínas con dominios CSD tienen funciones en una gran variedad de procesos (Mihailovich, Militti y col., 2010). Los ARN mensajeros (ARNm) que codifican para histonas son de gran interés debido a la participación de sus productos de traducción en el remodelamiento de la cromatina, suceso clave para la regulación de la expresión génica a nivel transcripcional (Di Liegro, Schiera y col., 2013).

HIPÓTESIS y OBJETIVOS

1. Hipótesis

El presente trabajo se basa en las siguientes hipótesis:

A) La interacción entre las vías de señalización del RP y el RE es crítica para el correcto establecimiento de la preñez. Proponemos que el bloqueo de la activación del RP impacta en la cascada de señalización disparada por el RE, y viceversa, afectando el desarrollo de la decidua. Postulamos a ERK como un mediador clave en la interacción de estos receptores.

B) Debido a su aumento de expresión en los SIs de 8 dpc en relación a úteros de ratas no preñadas y a su ya descripto papel de CSD-C2 en la diferenciación neuronal, proponemos a la proteína *Cold Shock Domain C2* (CSD-C2) como un factor importante para la correcta diferenciación decidual.

2. Objetivos

El objetivo general de este proyecto es:

a) Identificar los factores que intervienen en las vías de señalización del RP y el RE, regulando el proceso de decidualización durante la preñez temprana. Estudiar el papel de ERK en relación a la acción del RP y el RE.

b) Identificar la función de CSD-C2 durante la decidualización.

De esta manera, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

Estudiar la función e interacción del PR y el RE en las primeras etapas del desarrollo de la decidua en los sitios de implantación de rata mediante la administración temprana de sus respectivos antagonistas. Analizar la morfología de los sitios de implantación y la calidad de la decidua. Estudiar las variaciones hormono-dependientes de marcadores y moléculas claves para la decidualización previamente relacionadas con la acción del RP y el RE. Estudiar los niveles de activación de ERK y su variación en relación a la actividad del RP y el RE.

Estudiar el papel de la activación de ERK durante la decidualización *in vivo* mediante la administración de un inhibidor específico. Analizar la morfología de los sitios de implantación y la calidad de la decidua. Estudiar el papel de ERK en la regulación de la expresión del RP y el RE y en su interacción.

Determinar de la relevancia biológica de la expresión de CSD-C2 durante la decidualización. Estudiar su regulación por hormonas esteroideas ováricas.

MATERIALES y MÉTODOS

1. Reactivos

El R5020 y el estradiol se obtuvieron de PerkinElmer (Norwalk, CT), la Onapristona (ZK 98299) se obtuvo de Bayer Schering (Alemania) y el antiestrógeno Faslodex (ICI 182780) de Tocris (Bristol, Reino Unido). El PD98059 fue provisto por LC laboratories (Woburn, MA) y Cell Signaling Technology (Danvers, MA). La albúmina bovina (ASB) fue provista por Carl Roth (Karlsruhe). Las mini-bombas osmóticas –modelo 1003D- se obtuvieron de Charles River (http://www.alzet.com/products/ALZET_Pumps, Berlin, Alemania). El suero fetal bovino fue obtenido de Bioser (Buenos Aires, Argentina) y el isoflurano de DeltaSelect (Munich, Alemania). El oligo(dT)15 primer fue provisto por Biodynamics (Buenos Aires, Argentina). El medio M199, los antibióticos, la agarosa, la transcriptasa reversa M-MLV, First-Strand buffer 5x, primers, DTT (0.1 M), dNTP-Mix (10 mM c/u), el Sybr green y la Oligofectamina fueron obtenidos de Invitrogen (Gaithersburg, MD). La eosina amarillenta de Cicarelli Laboratorios (Buenos Aires, Argentina) y la hematoxilina Activada - Solución de Gil Nº2 de Biopur (Buenos Aires, Argentina). El SuperSignal West Dura Extended Duration substrate de Thermo Scientific (Rockford, EUA). El Gel extraction Kit Omega Bio-tek, Norcross, USA. Power SYBR Master Mix Applied Biosystems. RNeasy Midi Kit Qiagen, Hilden. El DMSO se compró en Merck (Darmstadt) y IHC SELECT provino de Millipore (EUA). La Interferina es de Polyplus transfection (INTERFERin®, Francia). Las mezclas de inhibidores: EDTAfree Complete Protease Inhibitor Cocktail and PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail, se obtuvieron de Roche (Mannheim, Alemania). El ARN pequeño de interferencia específico contra CSD-C2 (h) (sc-76146) fue obtenido de Santa Cruz Biotechnology y el no especifico (NE scramble siRNA Negative control siRNA) de Quiagen (Gene Glove).

Los anticuerpos (Ac) utilizados fueron: Ac policlonal C-16 contra Ciclina D3 humana (h), Ac policlonal C-12 contra CSD-C2h, Ac policlonal C14 contra ERK2, Ac policlonal C20 contra RPh, Ac policlonal H190 contra RPh, Ac policlonal HC-20 contra REα, Ac anti-PCNAh, Ac anti-FGF-2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Santa Cruz, CA), Ac monoclonal contra hREβ Clon PPG5/10 (DAKO Inc., Glostrup, Denmark), Ac policlonal anti-GAPDH (HyTest Ltd); Ac anti-DESMINA (Dako); Ac anti CD31 (SZ31) (Dianova, Hamburg), Ac contra CX43 (Sigma), Ac monoclonal D13.14.4E contra ERK 1-2 fosforilada (Tre 202/ Tir 204), Ac 14C10 contra GAPDH (cell signaling). Ac contra IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rabanito (HRP, por las siglas del inglés), hecho en oveja; y Ac contra IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rabanito, hecho en

burro (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heigts, IL). Los anticuerpos secundarios para IHQ se obtuvieron de Dako (DAKO Inc., Glostrup, Denmark).

2. Cultivo Celular

2.1 Condiciones de cultivo de las líneas celulares UIII y UIII-like

Se crecieron las células normales estromales de útero de rata UIII y los cultivos de UIII-like en medio M199 con rojo fenol (rojo) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y gentamicina (100 µg/ml) en estufa a 37°C con una atmósfera húmeda de CO_2 5%. El medio de cultivo fue reemplazado cada 2 días.

2.2 Experimentos de estimulación hormonal

Para los experimentos de estimulación hormonal se sembraron $5x10^5$ células en placas de plástico de 60mm especiales para cultivo celular y se cultivaron en M199 rojo suplementado con 10% de SFB. El medio fue reemplazado por medio M199 sin rojo fenol (blanco) y libre de suero (ayuno) 24hs después del plaqueo. Después de dos días en estas condiciones el medio fue reemplazado por M199 blanco fresco con 1% o 10% de suero libre de esteroides (SFB-ch), suplementado con L-Glutamina (0,1 mg/ml) y gentamicina (100 µg/ml). Las células en medio con 1% de suero fueron estimuladas con 100 nM EGF, 1.10^{-8} M de la progestina R5020 (R) o Estradiol (E) o el tratamiento combinado de R5020 y Estradiol (RE), los controles fueron tratados con el mismo volumen de etanol, vehículo de las hormonas. El medio fue reemplazado cada dos días. Las células fueron colectadas a tiempo cero (T0), día 2 y día 4 en solución desnaturalizante para su posterior análisis de expresión génica a nivel de ARNm. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

3. Experimentos de preñez

3.1. Cuidado animal y Preñez

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar (Schering, TZH y Charles River, Alemania). Los animales fueron mantenidos en condiciones estandarizadas de luz y temperatura (ciclos luz/oscuridad 12/12 hs, a 22°C ± 1°C y 55% ± 10% humedad ambiental). Las ratas fueron alimentadas con comida balanceada y agua *ad libitum*. El diseño experimental se llevó a cabo con hembras adultas vírgenes (2 a 6 meses de

edad) con peso mayor a 250gr y con machos de fertilidad probada. Todos los experimentos realizados fueron previamente autorizados por los comités de ética y comités de bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental y/o la Universidad de Diusburg- Essen.

El estadío del ciclo en el que se encuentra cada hembra se determina mediante análisis del hisopado vaginal (ciclado) (Rugh, 1994). Por lo tanto, las hembras fueron cicladas diariamente y se aparearon durante la noche que se encontraban en proestro u estro. A la mañana siguiente se evaluó la presencia de esperma en el tracto reproductivo por lavado vaginal. El día con esperma positivo fue designado como día 0 post coito (dpc). El día 4 pc fue confirmado por el lavado del cuerno uterino y conteo del número de blastocistos en cada cuerno. Los días 6, 7, 8, 9, 10, 14 y 20 de preñez fueron confirmados por la presencia de sitios de implantación (SIs). Se utilizaron mínimo 3 ratas por cada tratamiento o punto de la cinética de preñez.

3.2. Tratamientos con antagonistas e inhibidores

Para los tratamientos con antagonistas, las ratas preñadas fueron inyectadas por vía subcutánea (sc) con el antiprogestágeno Onapristona (ONA) y el antiestrógeno ICI182.780 (ICI), solos o en combinación. Las ratas control fueron inyectadas con aceite de maní, vehículo de los antagonistas.

3.2.1 Tratamiento temprano con los antagonistas del RP y el RE

El antiprogestágeno ONA fue disuelto en benzilbenzoato (20 mg/ml) y para las inyecciones sc 0.5 o 1 mg de ONA fueron llevados a un volumen final de 150 o 300 µl, respectivamente, con aceite de maní. El antiestrógeno ICI fue disuelto en Etanol (20 mg/ml), y el volumen correspondiente a 0.5 mg fue llevado a 500 µl con aceite de maní. Las dosis utilizadas fueron: 0.5 o 1 mg ONA o 0.5 mg ICI por día durante los días 5 y 6 pc. Las ratas se sacrificaron el día 7 pc. Para el estudio a ONA+ICI las ratas fueron tratadas con 1 mg ONA + 0.5 mg ICI por día durante los días 5 y 6 pc, y sacrificadas los días 7, 10, 14 o 20 pc. Un mínimo de tres animales fue usado para cada tratamiento y tiempo analizado (Figura 14).

3.2.1 Tratamiento tardío con los antagonistas del RP y el RE

Las drogas fueron disueltas en etanol (20 mg/ml) y se llevaron a volumen final de 200 µl con aceite de sésamo. Las dosis utilizadas fueron: 1 mg ONA, 0.5 mg ICI y 1 mg ONA + 0,38 mg ICI por día los día 6 y 7 pc. Los animales se sacrificaron el día 8 pc. Un mínimo de tres animales fueron usados para cada tratamiento (Figura 30).

3.2.3 Tratamiento tardío con el inhibidor de MEK

Para los tratamientos con el inhibidor de la vía de activación de ERK, un grupo experimental fue inyectado por vía intraperitoneal (ip) los días 6 y 7 de preñez con 5 mg/día de PD98059, el inhibidor específico de la vía de ERK (Di Paola, Galuppo y col. 2010) disuelto en DMSO. Los animales control fueron inyectados con 500 µl DMSO. Los animales fueron sacrificados el día 8 pc. Tres animales fueron usados para cada aproximación experimental (Figura 30).

3.3. Cirugías

Las ratas con 5 días de preñez fueron pesadas y anestesiadas con una mezcla de Xilacina y Ketamina 1:4 (1 µl anestesia/gr). Se controlaron los signos vitales y de conciencia. Se realizó un corte en la zona dorsal izquierda y/o derecha, entre las extremidades superiores e inferiores, dependiendo el cuerno uterino a tratar. Una vez localizado el cuerno uterino se realizó una pequeña incisión en el extremo superior del útero por debajo del oviducto, del lado del antimesometrio (AM). Dependiendo del caso se procedió a la implantación de las mini-bombas osmóticas o la inyección intrauterina de la solución correspondiente. Se cerró la apertura de la rata y se controlaron los signos vitales hasta que la rata recobró conciencia. Las ratas operadas fueron inyectadas con analgésico (Temgesic: 0.05 mg/Kg) cada 12 hs hasta el final del experimento. Todas las operaciones fueron realizadas entre las 8 y las 11 de la mañana. Los sacrificios se realizaron entre medio día y la tarde del día 7 pc dependiendo del tratamiento.

3.3.1 Implantación de mini-bombas osmóticas

Se colocó en el cuerno uterino derecho de ratas con 5 días de preñez mini-bombas osmóticas conteniendo el inhibidor de MEK (PD98059). Las bombas osmóticas 1003D ALZET fueron cargadas con 100 µl de una solución de 0 µM, 100 µM o 200 µM de PD en 1% DMSO (vehículo) siguiendo las indicaciones de los fabricantes

y se las dejó durante la noche en solución salina a 37°C. Se dirigió el flujo desde las bombas hacia el lumen uterino y de esta manera se logró un flujo local y continuo (1.0 µl/hr) de PD durante los días 5 y 6 pc. Los animales fueron sacrificados en el medio día del día 7 pc. Tres animales fueron usados para cada aproximación experimental.

3.3.2 Inyección intrauterina de ARN pequeño de interferencia

Las ratas preñadas fueron inyectadas intrauterinamente en la mañana del día 5 pc con 100 µl de 100 nM (cuerno derecho) o 10 nM (cuerno izquierdo) de ARN pequeño de interferencia (ARNpi) contra *Csd-c2* (Figura 39A). Los animales control fueron inyectados con la misma concentración de ARNpi no específico (NE). Se utilizaron dos agentes de transfección distintos, Oligofectamina e Interferina. Todos los animales tratados fueron sacrificados en la tarde del día 7 pc. Un mínimo de tres animales fue usado para cada aproximación experimental.

3.4. Recolección de tejidos

Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical bajo anestesia con isofluorano. Los cuernos uterinos de las ratas sin preñar (NP) y de ratas preñadas de 2 y 4 dpc fueron extraídos y cortados transversalmente, los segmentos fueron congelados en nitrógeno líquido para el subsecuente análisis por *western blot*. Los sitios de implantación de 6, 7, 8, 9, 10, 14 y 20 dpc fueron cortados y congelados en nitrógeno líquido para análisis por *western blot* y para extracción de ARN total, o fijados en 4% formalina para análisis morfológicos (tinción con hematoxilina-eosina) y de inmunohistoquímica (IHQ).

4. Técnicas Bioquímicas y de Biología Molecular

4.1. Análisis de expresión génica a nivel de ARNm

4.1.1. Experimentos *in vitro*: PCR a tiempo final

La extracción de ARN total se realizó con tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987). Para determinar los niveles de expresión de ARNm, se sintetizó ADN copia (ADNc) a partir de cantidades iguales de ARN (2.5 µg) con la transcriptasa Reversa M-MLV. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con polimerasa Taq de ADN. La reacción de amplificación por PCR fue

llevada a cabo dentro de la fase exponencial de amplificación. Los primers utilizados y sus respectivas temperaturas de *annealing* y número de ciclos se muestran en la tabla 1. Las reacciones de PCR realizadas para evaluar la abundancia relativa de RNA mensajero se llevaron a cabo en el equipo My Cycle (BioRad). Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles con 1.3% agarosa y visualizados bajo luz UV luego incubarlos con SYBRgreen. La confirmación del producto deseado se realizó por comparación del tamaño del amplicón con un marcador de peso molecular.

Gen	Secuencia	tamaño amplicón (pb)	T°	# ciclos
β-Act	5'-CCGGGACCTGACAGACTACCT-3' 5'-CCGCTCATTGCCGATAGTGAT-3'	217	60	25
Desmina	5'-CTGGTACCCCCTTCTAAGCC-3' 5'-CTCACAGACTCTGAACCCTC-3'	209	59	30
Csd-c2	5'-GCCTATGTCTTATCACCC-3' 5'-GAGCCCAGCAACTTAGA-3'	194	54	32

Tabla 1. *Primers* utilizados en los ensayos de RT-PCR a tiempo final. pb, pares de bases; T°, temperatura de *annealing*.

4.1.2. Experimentos *in vivo*: PCR en tiempo real

Los SIs se homogenizaron (Polytron PT-MR 300, Brinkmann) en 2 ml solución tampón de disgregación y la extracción de ARN total se realizó con el kit *RNeasy Midi* según las indicaciones del fabricante. Partiendo de 1.5 µg de ARN total se realizó la reacción de retrotranscripción utilizando oligonucleótidos oligo-(dT)15 y la enzima transcriptasa reversa M-MLV. Las reacciones de PCR se realizaron en 25 µl finales. La cuantificación se efectuó mediante el uso de una curva estándar de ADNc de concentración conocida (0.1 fentogramo a 1 picogramo) para cada par de *primers* utilizado y en cada reacción realizada. Se utilizo el gen de *β-Actina* (*β-Act*) como gen normalizador en todas las reacciones. Las PCRs cuantitativas se realizaron con la mezcla de reacción de *Power SYBR Master Mix 5x* según las instrucciones del fabricante en un volumen final de 20 µl. Las mediciones se realizaron por triplicado. Se utilizó el siguiente programa:

1 ciclo 95°C 10 min
45 ciclos 95°C 15 seg
60°C 1 min

Para asegurar la especificidad de los productos amplificados se realizó el análisis de la curva de disociación.

Gen	Secuencia	tamaño amplicón (pb)
β-Act	5'-CGCGAGTACAACCTTCTTGC-3' 5'-ATACCCACCATCACACCCTG-3'	200
Vegfa	5'-GTACCTCCACCATGCCAAGT-3' 5'-ACACAGGACGGCTTGAAGAT-3'	183
Hand2	5'-GGGATCCGGAGTCGCAGTAT-3' 5'-GGCAAAGCCCTTCTCACTCC-3'	173
Bmp2	5'-AAACACAAACAGCGGAAGCG-3' 5'-TGGTTGGTGGAGTTCAGGTG-3'	173
Prl8a2	5'-TAACAGTGCCATCCAGCGAG-3' 5'-GCCTATACATGCGTGCAACC-3'	122
Csd-c2	5'-CCTACCAAACGGACCAGGAC-3' 5'-ACTCCCCCTCGATGTCAGAA-3'	166

Tabla 2. *Primers* utilizados en los ensayos de RT-PCR en tiempo real. pb, pares de bases.

4.2. Análisis de expresión génica a nivel de proteína

4.2.1. Aislamiento de proteínas totales

Los extractos proteicos fueron obtenidos por homogenización (Polytron PT-MR 300, Brinkmann) de muestras de tejido en 2 ml de solución RIPA (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxicholato, 1 mM EDTA, 0.1% SDS) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas.

4.2.2. SDS-PAGE y *western blot*

La concentración proteica fue determinada con el ensayo de Bradford. Se realizó la corrida electroforética en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Luego de la transferencia, incubamos las membranas de nitrocelulosa en presencia de los anticuerpos primarios correspondientes para detectar la presencia de p-ERK1-2, ERK 2, DESMINA, CCND3, FGF-2, CX43, CSD-C2, PCNA, RP, REα, GAPDH y β-ACTINA. El revelado se realizó mediante el método de quimioluminiscencia utilizando kits comerciales. La densitometría de las bandas se realizó utilizando el programa ImageQuant 3.3 (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heigts, IL).

5. Técnicas Histológicas

5.1. Tinción con Hematoxilina-Eosina

Los sitios de implantación fueron fijados en formalina al 4%, deshidratados en una serie creciente de alcoholes y embebidos en parafina. Los tacos fueron cortados en secciones transversales seriadas de 7 µm utilizando con un micrótomo (Mikrotom 2050 Supercut Reichert-Jung Leica, Wetzlar). Los cortes luego fueron desparafinados y rehidratados en una serie decreciente de alcoholes y teñidos con hematoxilina-eosina (HE) para su visualización morfológica. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio Axiophot (Zeiss, Jena, Alemania). Los diámetros de los SIs fueron medidos (mm) con Image J 1.43 software (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, EUA).

5.2. Tinciones inmunohistoquímicas

Las secciones de 7 µm fueron desparafinadas, rehidratadas en una serie decreciente de alcoholes y lavadas en PBS (Solución de fosfato salina). Para el bloqueo de las peroxidasas endógenas se incubaron las secciones con H_2O_2:PBS 1:3 durante 30 minutos y luego con 0.5% ASB-PBS por 20 min. Las secciones fueron incubadas durante toda la noche (ON) con el anticuerpo primario y lavadas con PBS. Se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente (RT) y después se incubó con el complejo estreptavidina-peroxidasa durante 30 min. Por último se reveló en oscuridad con 3.3 Dianimobencidina (DAB), el sustrato de la enzima peroxidasa. Los controles negativos se realizaron omitiendo el anticuerpo primario. Previo al bloqueo de las peroxidasas, las secciones fueron hervidas durante 15-20 minutos en solución citrato para lograr una mejor exposición de antígenos para la detección de Desmina y CD31. Luego del hervor se dejaron las muestras en la solución citrato hasta que alcanzaran temperatura ambiente (30-40 min aproximadamente). Pasado ese tiempo se precedió igual que con las otras secciones.

6. Ensayo *in vitro* de unión a ARNm blanco

Los ensayos *in vitro* de unión a ARNm blanco fueron realizados según lo previamente descripto por el grupo de la Dra. Di Liegro (Nastasi, Scaturro y col., 1999). Brevemente, entre 25 y 50 µg de extractos proteicos de SIs de ratas de 7 dpc fueron

incubados (10 min a RT) con el ARNm de la histona H3.3 marcado radioactivamente (5.0×10^6 cpm). Luego se incubó a 37ºC durante 30 min con la ARNasa T1, para degradar todos los ARNm que no estuvieran unidos a proteínas (Castiglia, Cestelli y col., 1994). Posteriormente se trató los extractos con luz UV para unir las proteínas a sus ARNm blanco protegidos durante la digestión con la enzima. Los extractos resultantes fueron analizados en gel de poliacrilamida desnaturalizante con SDS (SDS-PAGE). Los geles se revelaron por autoradiografía.

7. Estadística

Los resultados de los experimentos fueron analizados mediante el test de ANOVA seguido del test de comparación múltiple de *Tukey*. Para los análisis de frecuencia (Tablas en figuras 15B y 26) se realizaron análisis de tablas de contingencia seguidos por el test de *Chi-cuadrado*. Para los resultados de las figuras 17, 22, 33, 35, 38B, 40 y 41 se realizó un *t-test* pareado. Se consideraron significativas aquellas diferencias donde $P < 0.05$. Todos los experimentos fueron realizados un mínimo de 3 veces, obteniéndose resultados similares. Los análisis estadísticos y los gráficos fueron realizados con el programa GraphPad Prim 4.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

RESULTADOS

Capítulo 1: Decidualización en la rata. Modelo experimental

1.1 Desarrollo de la decidua en la rata

El presente trabajo se centró en el estudio de la proliferación y diferenciación de las células del endometrio y su regulación por las hormonas esteroideas ováricas, Estrógeno (E_2) y Progesterona (P_4), en un modelo *in vivo* de preñez.

Inicialmente corroboramos que el **desarrollo espacio-temporal de la decidua** en la cepa elegida coincida con los cambios morfológicos previamente descriptos (Figura 2). Para ello, analizamos la morfología de cortes transversales[ii] de sitios de implantación (SIs) de distintos días de preñez teñidos con hematoxilina y eosina (HE). Estudiamos los días 6, 7, 8 y 10 post-coito (pc), por ser los días con mayor proliferación y diferenciación de las células estromales endometriales (Dey 1996; Tan, Raja y col. 2002).

En el antimesometrio de los sitios de implantación del **día 6 pc** observamos la presencia de células redondeadas dispuestas de manera compacta rodeando al embrión en crecimiento. Este cambio en los SIs con respecto al estroma antimesometrial del endometrio de ratas no preñadas indica el comienzo del desarrollo de la zona decidual primaria (ZDP) (Figuras 9 y 2).

En el **día 7 pc**, observamos un incremento en el tamaño de los SIs y una mayor extensión y desarrollo de la decidua antimesometrial (DAM) en comparación con el día 6 pc. Dentro de la DAM, distinguimos una ZDP de mayor tamaño rodeada por células mono o binucleadas con gran extensión citoplasmática, morfología característica de la zona decidual secundaria (ZDS). Además, en los SIs del día 7 pc observamos una expansión de la zona del mesometrio (M) y la presencia del tipo celular consistente con el fenotipo menos compacto característico de la decidua mesometrial (DM) (Figura 9).

En el **día 8 pc** observamos una decidua antimesometrial de mayor tamaño y muy desarrollada, una ZDP en retroceso y el crecimiento incipiente del embrión y del cono ecto-placentario (cep) en relación al día 7 pc. El mesometrio de los SIs de 8 dpc presentó mayor tamaño que el observado en el día 7 pc (Figura 9).

En el **día 10 pc** observamos una importante regresión de la DAM, mayor crecimiento del embrión en relación al día 8 pc y un desarrollo placentario avanzado.

[ii] Ver esquema con ejes de cortes en ANEXO.

Observamos una decidua mesometrial de gran extensión y mayor vascularización en relación a los días 7 y 8 pc.

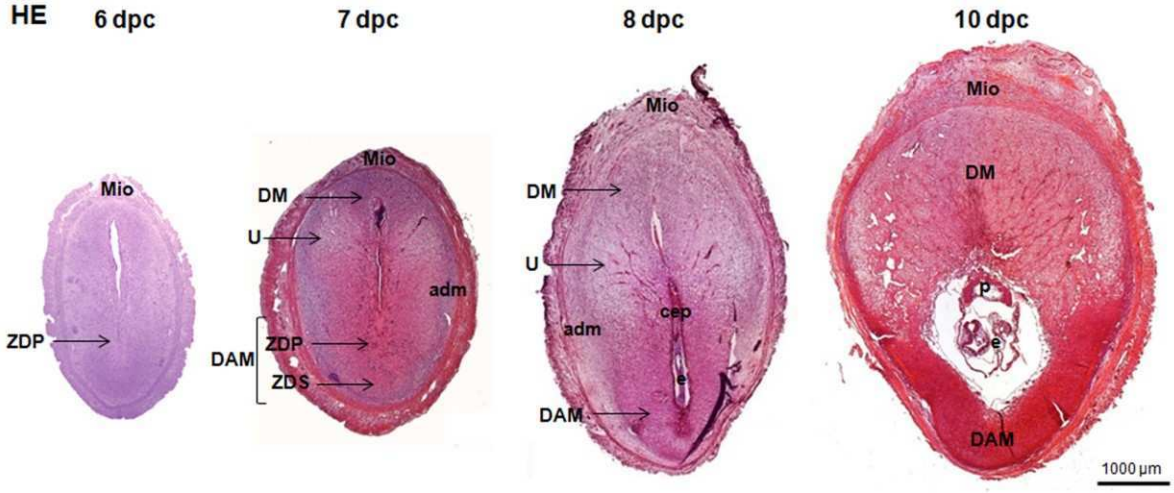


Figura 9. Desarrollo de la decidua en la rata. La morfología de los SIs de ratas de la cepa Wistar preñadas y sacrificadas los días 6, 7, 8 y 10 pc fue analizada por tinción con HE en cortes transversales de los mismos. M, mesometrio; AM, antimesometrio; ZDP, zona decidual primaria; ZDS, zona decidual secundaria; DAM, decidual antimesometrial; DM, decidua mesometrial; U, zona de unión entre M-AM; adm, área adyacente al miometrio; cep, cono ecto-placentario; e, embrión; p, placenta; Mio, miometrio. Barra: 1000 µm.

Concluimos que el proceso de decidualización en la cepa elegida coincide con las modificaciones espacio-temporales previamente descriptas en roedores. Los sitios de implantación de los días 7 y 8 pc mostraron el mayor desarrollo de la decidua antimesometrial (día 7 y 8) y mesometrial (día 8) sin un crecimiento avanzado del embrión o la placenta.

1.2. Localización del RP, el REα, el REβ y de pERK en sitios de implantación de 8 dpc

Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que los niveles proteicos del RP (A y B) y el REα y los niveles de activación de ERK aumentan en los SIs de 8 días post-coito (dpc) en relación a su expresión en días más tempranos de preñez. Estos aumentos están asociados al proceso de decidualización, ya que sólo se detectan en los SIs y no se detectan en las zonas de útero no decidualizado localizadas entre los sitios de implantación (ESIs) (Vallejo, 2009).

Con el objetivo de caracterizar la función de los receptores de P_4 y E_2 y su conexión con la vía de ERK en relación a la **localización subcelular** durante el desarrollo decidual analizamos la localización de dichos receptores y ERK activado (pERK) mediante la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) **en SIs de 8 dpc** (Figura 10 y 11).

La localización del RP en SIs de 8 dpc mostró señal positiva en todo el sitio de implantación. Este receptor mostró una señal exclusivamente citoplasmática en la zona de la DAM y una localización nuclear tanto en las células de la zona de unión entre el antimesometrio y el mesometrio (U), como en la región de la DM (Figura 10).

El **REα** se encontró en toda la decidua, y al igual que el RP presentó una fuerte tinción nuclear en la zona de la DM y en las células de la zona U, y una leve tinción tanto citoplasmática como nuclear en la DAM, a diferencia del RP.

El patrón de expresión del **REβ**, fue similar al del RP. El REβ se localizó en el citoplasma de las células de la DAM y en el núcleo de las células de la zona U y de la DM.

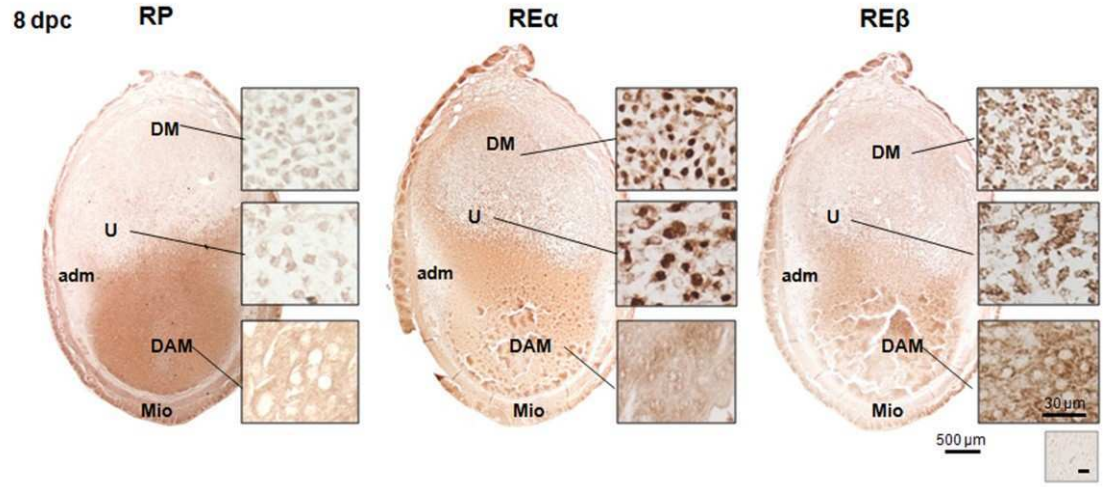


Figura 10. Localización del RP, el REα y el REβ en sitios de implantación de 8 dpc. Cortes transversales de SIs de 8 dpc fueron analizados por inmunohistoquímica con anticuerpos específicos anti-RP, anti-REα o anti-REβ. La figura muestra el SI completo y detalles de mayor aumento (20x) de las distintas áreas de la decidua. Los controles de especificidad se realizaron omitiendo el anticuerpo primario. DM, decidua mesometrial; DAM, decidua antimesometrial; U, zona de unión entre M-AM; adm, área adyacente al miometrio; Mio, miometrio. Barra: 500 µm; barra detalles: 30 µm.

Luego estudiamos la localización de la isoforma fosforilada de ERK (**pERK**) en SIs de los días 6, 7, 8 y 10 pc previamente analizados por tinción con HE (Figuras 9 y 11). En el día 6 pc pERK se encontró únicamente en el citoplasma y el núcleo de las células diferenciadas de la zona en contacto con el embrión en proceso de implantación, la ZDP. En el día 7 pc la señal citoplasmática y nuclear de pERK

acompañó el crecimiento de la ZDP y, además, se localizó en la zona U, donde presentó una fuerte señal nuclear. En el día 8 pc, observamos una fuerte señal nuclear en algunas células aisladas de la ZDP en regresión, en las células estromales del borde inferior del AM, en la zona U y en la decidua mesometrial. En el día 10 pc la señal de pERK se restringió a la zona U, en contacto con la placenta y con el embrión en desarrollo (Figura 11).

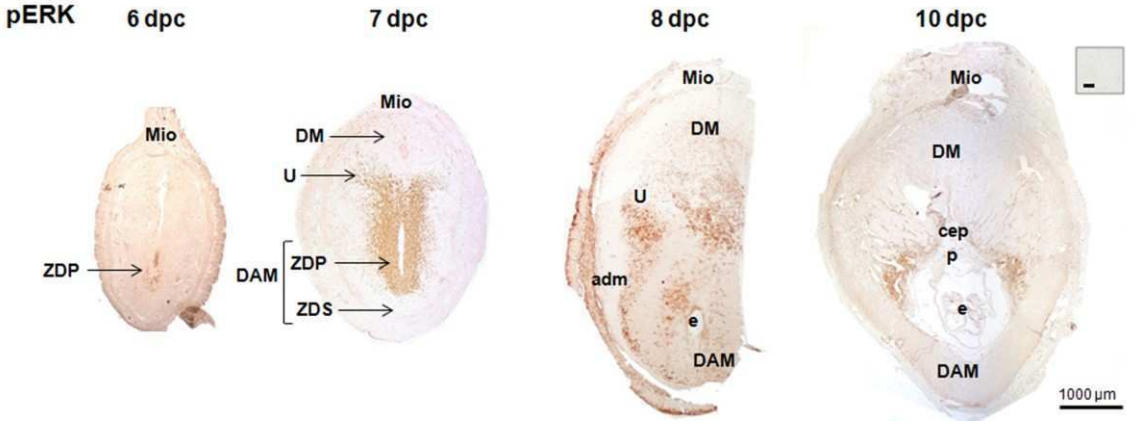


Figura 11. Localización de ERK activado durante el desarrollo de la decidua. La localización de pERK en SIs de ratas de la cepa Wistar preñadas y sacrificadas los días 6, 7, 8 y 10 pc fue analizada por inmunohistoquímica en cortes transversales con anticuerpos específicos anti-pERK. Los controles de especificidad se realizaron omitiendo el anticuerpo primario. ZDP, zona decidual primaria; ZDS, zona decidual secundaria; DAM, decidual antimesometrial; DM, decidua mesometrial; U, zona de unión entre M-AM; adm, área adyacente al miometrio; cep, cono ecto-placentario; e, embrión; p, placenta; Mio, miometrio. Barra: 1000µm.

En su conjunto, estos resultados muestran que la distribución de ERK activado se restringe a zonas específicas de la decidua mientras que los receptores de progesterona y estradiol se encuentran presentes en todo el sitio de implantación. La presencia conjunta del RP, REα y REβ en un mismo compartimento sugiere la necesidad de su acción conjunta o interacción durante el desarrollo de la decidua. La presencia de los receptores y pERK en la zona indiferenciada de unión entre el M-AM indica un papel de ERK como posible regulador negativo de la diferenciación decidual en dicha zona. Por otro lado, presencia conjunta de los receptores y pERK en el borde de la DAM con la zona adm en los SIs de 8 dpc sugiere que ERK podría limitar la extensión de la decidua que promoverían los receptores hormonales. Por último, ERK parece ser importante para la formación de la ZDP ya que su activación acompaña el desarrollo de la misma.

1.3 Caracterización de la cinética de expresión de Desmina y Ciclina D3 durante la decidualizacíon en la rata

Las células deciduales poseen un patrón de expresión génica propio, distinto a las células estromales de las cuales derivan. Con el objetivo de caracterizar el proceso de decidualización en nuestro modelo experimental estudiamos la cinética de expresión de dos **marcadores de diferenciación decidual**, DESMINA, marcador estructural clásico (Glasser y Julian, 1986) y Ciclina D3 (CCND3), marcador funcional de poliploidización y diferenciación terminal (Das, Lim y col., 1999; Tan, Raja y col., 2002). Analizamos la expresión de dichos marcadores en extractos proteicos de úteros de ratas no preñadas (NP) y de ratas preñadas de 2 y 4 días de preñez, y de sitios de implantación de 6, 7, 8 y 9 dpc mediante *western blot* utilizando anticuerpos específicos para cada marcador (Figura 12A).

Los niveles de ambos marcadores aumentaron con los días de preñez (Figura 12), alcanzando un máximo de expresión en el día 7 pc para CCND3 y en los días 6 y 7 pc para DESMINA (Figura 12A). Luego del día 7 pc observamos una clara disminución en la expresión de DESMINA y CCND3, coincidiendo temporalmente con el inicio de la regresión de la DAM. Además, analizamos la localización de dichos marcadores en la decidua antimesometrial de los SIs de 8 dpc mediante inmunohistoquímica. CCND3 presentó una fuerte señal en los núcleos de las células poliploides mono o binucleadas (Figura 12B). DESMINA mostró, en cambio, una fuerte tinción citoplasmática perinuclear (Figura 12B), en concordancia con lo previamente publicado (Korgun, Cayli y col. 2007).

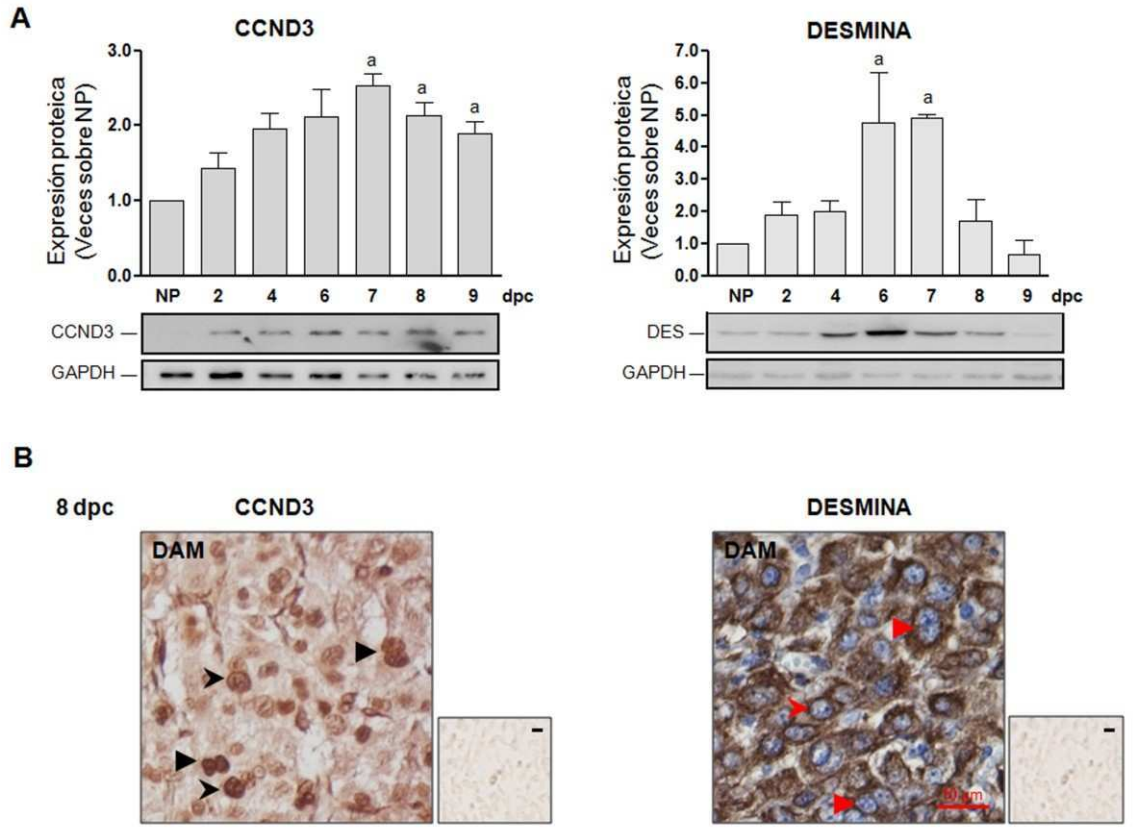


Figura 12. La expresión de CCND3 y DESMINA durante el proceso de decidualización. A) Cinética de la expresión de CCND3 y DESMINA durante la preñez. Para cada punto de la cinética de preñez los valores de unidades arbitrarias (UA) de las intensidades de las bandas de los *western blots* de CCND3 y DESMINA se relativizaron a los niveles de la proteína control GAPDH. Estos valores fueron luego normalizados por los valores obtenidos en úteros de hembras no preñadas (NP). Los valores del gráfico representan la media de las veces de cambio ± DS de tres muestras independientes. $P < 0.05$; a, diferencia estadística v. NP. La figura muestra una imagen representativa de un *western blot*. **B)** Cortes en parafina de SIs de 8 dpc fueron analizados por inmunohistoquímica con anticuerpos específicos, anti-Desmina y anti-CCND3. Los controles de especificidad se realizaron omitiendo el anticuerpo primario. La figura muestra el detalle (40x) de la zona DAM de un sitio representativo. DAM, decidua antimesometrial; punta de flecha llena, células binucleadas; punta de flecha vacía, células mononucleadas. Barra: 10 µm.

Asimismo, analizamos el patrón de localización de CCND3 en SIs de 7 dpc, momento de mayor expresión de dicha proteína (Figura 12A). En los SIs del día 7 pc observamos claramente la ausencia de CCND3 en los núcleos de las células de la ZDP (Figura 13). Por otro lado, teniendo en cuenta el análisis de la localización de ERK activado, notamos que la ausencia de localización nuclear de CCND3 en la ZDP se corresponde con la presencia de pERK en esa zona (Figuras 11 y 13). La ZDP es la primera zona de la decidua en formarse y, luego, regresiona muy rápidamente. La presencia de ERK activado en la ZDP tendría un papel regulatorio importante en la transitoriedad de esta zona.

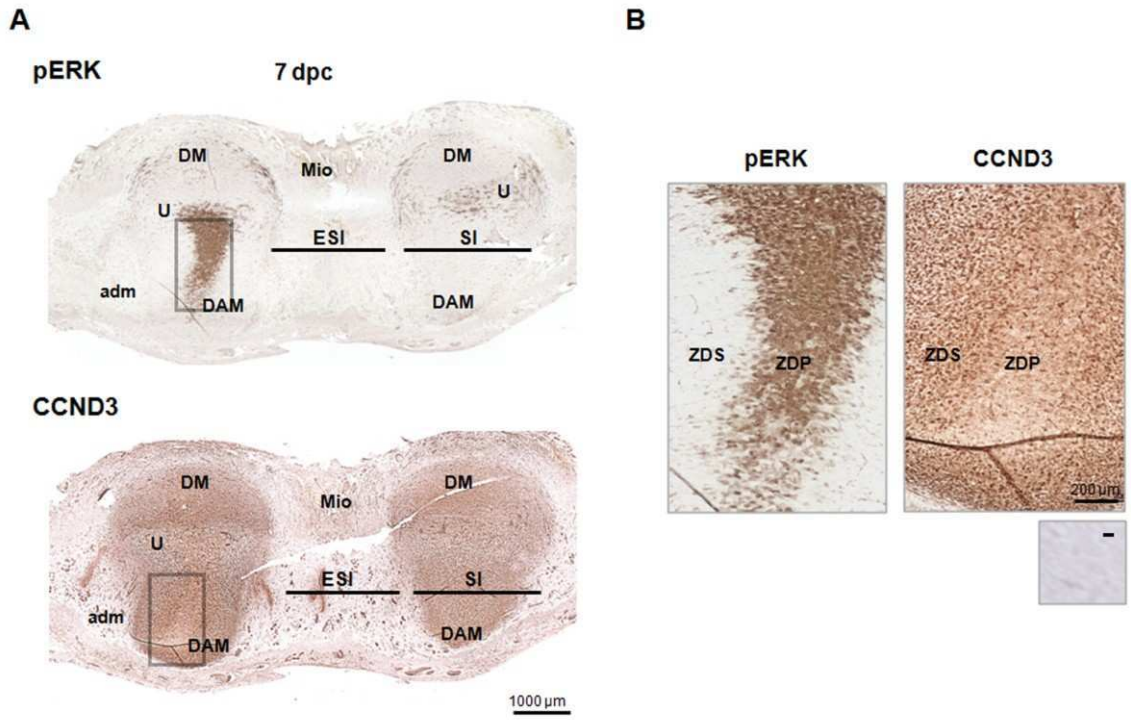


Figura 13. Localización de pERK y CCND3 en la ZDP de los SIs de 7 dpc. A) Cortes sagitales de dos SIs contiguos de 7 dpc fueron analizados por inmunohistoquímica con anticuerpos específicos anti-pERK y anti-CCND3. Los controles de especificidad se realizaron omitiendo el anticuerpo primario. Los recuadros indican la zona que se muestra en **B** con mayor aumento. **B)** Magnificación 10x de la ZDP de los SIs mostrados en **A**. ESI, zona entre-sitios de implantación; SI, sitio de implantación; DM, decidua mesometrial; DAM, decidua antimesometrial; ZDP, zona decidual primaria; U, zona de unión entre M-AM; adm, área adyacente al miometrio; mio, miometrio. Barra: 1000 µm; barra detalles: 200 µm.

En resumen, nuestros resultados muestran que ambos marcadores de diferenciación aumentan su expresión acompañando el desarrollo de la decidua. Luego del día 7 pc los niveles de DESMINA y CCND3 disminuyen coincidiendo temporalmente con el comienzo del crecimiento del embrión y el retroceso de la DAM. En relación a su localización en la decidua, la ausencia de CCND3 en los núcleos de las células de la ZDP de los SIs de ratas de 7 dpc coincide con la presencia de ERK activado.

1.4 Conclusiones parciales

Las ratas de la cepa Wistar presentan una decidualización normal y en concordancia con las modificaciones espacio-temporales que experimenta el endometrio durante la preñez temprana (Figura 2). Los días 7 y 8 de preñez muestran un mayor desarrollo de la decidua antimesometrial y mesometrial en relación al día 6 pc, pero sin un crecimiento avanzado del embrión como se observa en el día 10 pc. En el día 7 observamos la mayor expresión de DESMINA y CCND3. Esta observación,

conjuntamente con una mayor expresión del RPA, el RPB y el REα y de la activación de ERK en el día 8 dpc previamente observada, nos llevo a seleccionar los días 7 y 8 pc para el estudio de la acción hormonal sobre la proliferación y diferenciación decidual.

Capítulo 2: Efectos de los antagonistas del RP y el RE y del inhibidor de la activación de ERK en la proliferación y la diferenciación de la decidua

2.1 Decidualización temprana

Resultados previos del laboratorio mostraron que los tratamientos durante los días 6 y 7 pc con el antagonista del receptor de progesterona, Onapristona (ONA), y del receptor de estradiol, ICI182.780 (ICI), reducen la extensión de las distintas áreas diferenciadas de la decidua en SIs de 8 dpc (Vallejo, 2009). Por otro lado, los niveles de expresión de DESMINA y CCND3 observados en la cinética de preñez resultaron mayores en los días 6 y 7 pc, respectivamente, en relación a los demás días de la cinética analizados (Figura 12A). Estos resultados nos llevaron a proponer que la administración más temprana de los antagonistas, bloqueando la acción de las hormonas antes del incremento de los marcadores deciduales analizados, nos permitiría estudiar de manera más precisa la función e interacción de P_4 y E_2 durante la formación de la decidua. Asimismo, nos propusimos estudiar el papel de ERK activado en relación a la actividad del RP y el RE durante esta misma ventana temporal temprana. En consecuencia, establecimos un **protocolo de tratamiento temprano**, a partir del día 5 pc, que no interfiere con la implantación del embrión (Figuras 2, 14 y 28).

2.1.1 Interacción entre las vías de señalización del RP y del RE en la decidualización temprana

Para el estudio de la acción de los receptores hormonales administramos los antagonistas del RP y el RE, ONA e ICI, a ratas preñadas mediante una inyección subcutánea diaria de 1 mg de ONA, 0.5 mg de ICI o su combinación (ONA+ICI) durante los días 5 y 6 pc (Figura 14A). Los SIs se colectaron en el día 7 pc, cuando la DAM presenta un desarrollo avanzado y es máxima la expresión de DESMINA y CCND3 (Figuras 9 y 12).

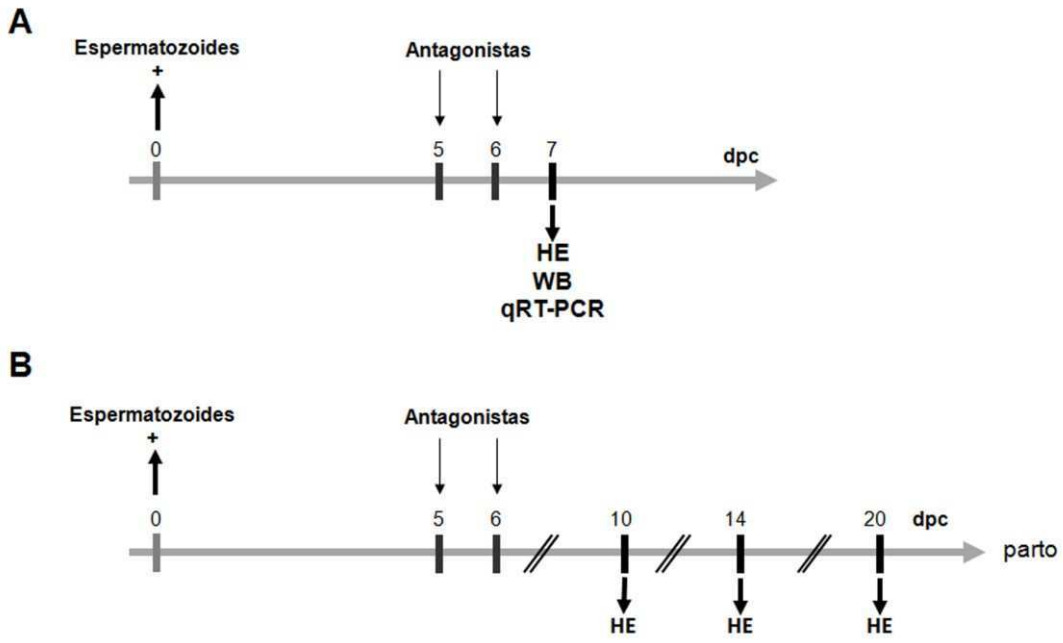


Figura 14. Esquema del protocolo de tratamiento temprano de ratas preñadas con los antagonistas del RP y el RE. Ratas preñadas fueron inyectadas de manera subcutánea con el antagonista del RP, Onapristona (ONA), con el antagonista del RE, ICI182.780 (ICI), o con su combinación (ONA+ICI) durante los días 5 y 6 pc. Las ratas control fueron inyectadas con aceite. **A)** Los SIs fueron colectados en el día 7 pc y embebidos en parafina para estudios histológicos o congelados en nitrógeno líquido para el análisis de la expresión proteica y de ARNm. **B)** Los SIs fueron colectados a distintos días de preñez (10, 14 y 20 dpc) y embebidos en parafina para estudios histológicos. HE, tinción con hematoxilina-eosina; WB, *western blot*; qRT-PCR, PCR en tiempo real.

2.1.1.1 Acción del RP y el RE sobre la morfología de los SIs

Analizamos la **morfología** de cortes transversales de los sitios de implantación resultantes de cada tratamiento con los antagonistas del RP y el RE mediante tinción con HE (Figuras 15 y 16A). La dosis de 1 mg de ONA produjo la reabsorción del 100% (12/12) de los sitios de implantación analizados. En estos cortes distinguimos restos de tejido decidual sin presencia de embrión (Figuras 15 y 16A). La morfología observada sería el resultado de un desarrollo anómalo concomitante con un proceso de reabsorción, que regenera al endometrio uterino a su estado no preñado. El tratamiento con ICI produjo un drástico efecto sobre la formación de los vasos sanguíneos en el área de la zona U y del mesometrio de la mayoría de los SIs analizados (Figura 15). Observamos una gran desorganización de los vasos, con presencia de glóbulos rojos dentro del tejido decidual y, en algunos casos, una mayor vascularización. Sorprendentemente, la acción conjunta de ONA+ICI rescató el desarrollo decidual de la reabsorción producida por el tratamiento con ONA. El 75% (9/12) de los SIs de ratas tratadas con ONA+ICI mostraron desarrollo decidual. Estos SIs presentaron diferenciación del estroma a las distintas áreas deciduales, pero

resultaron un 38 ± 7% más pequeños que los SIs de las ratas tratadas con aceite (vehículo) (Figura 15 y 16). Estos resultados indican que la ausencia de acción del RP resulta más deletérea para el desarrollo decidual que el bloqueo conjunto del RP y el RE. Por otro lado, se destaca la importancia de la acción de la P_4, a través del RP, en la proliferación celular necesaria para el desarrollo de los SIs.

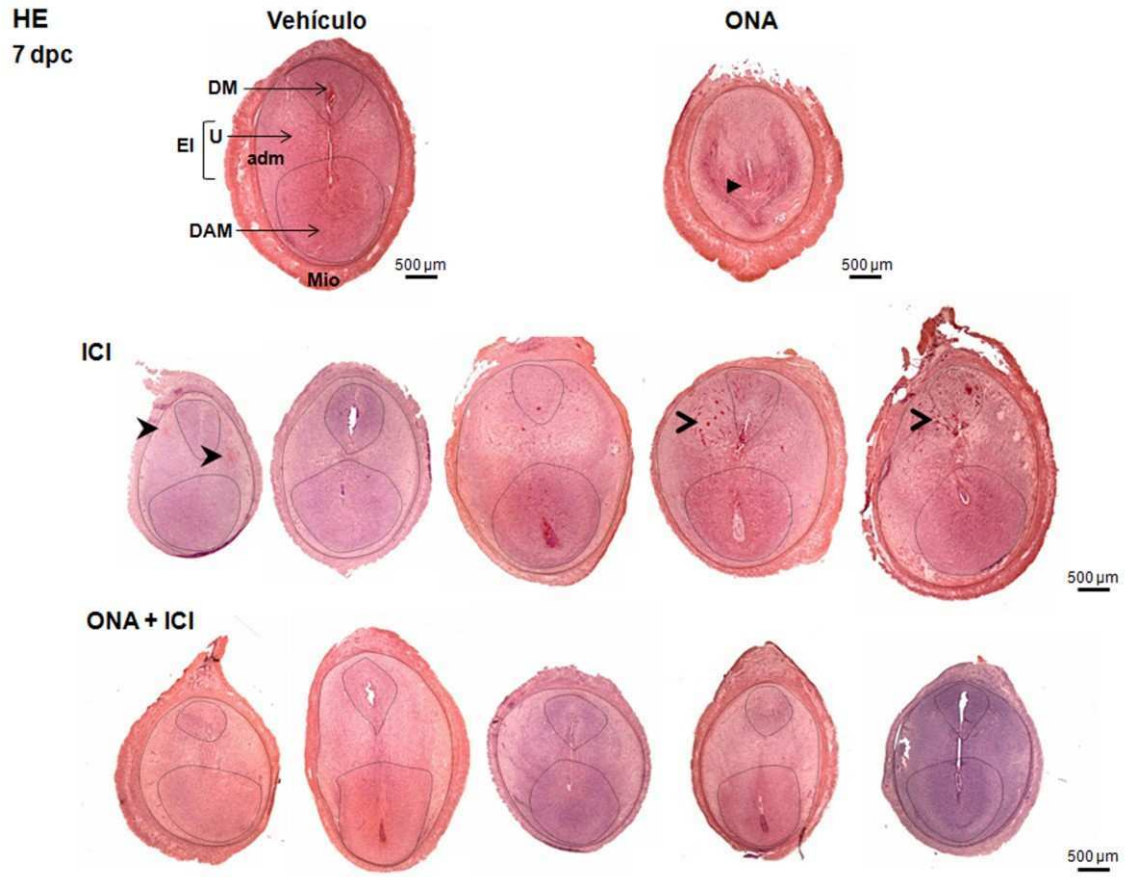
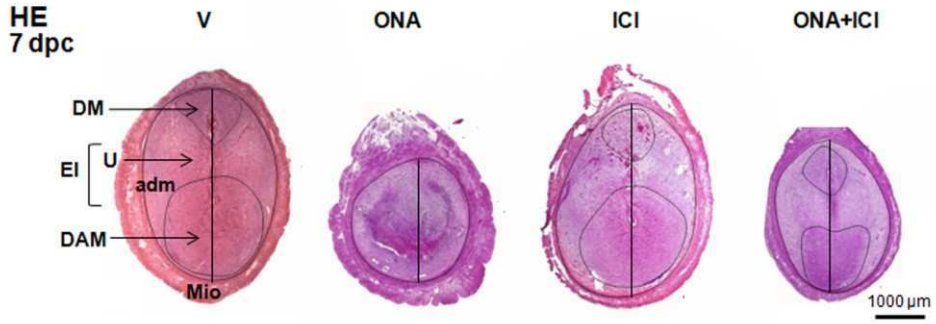


Figura 15. Efecto del tratamiento temprano con los antagonistas del RP y el RE sobre la morfología de los SIs. La morfología de los SIs de ratas tratadas tempranamente con el antagonista del RP, Onapristona (ONA), con el antagonista del RE, ICI182.780 (ICI), o su combinación (ONA+ICI) fue analizada en el día 7 pc por tinción con HE en cortes transversales de los mismos. Las ratas control fueron inyectadas con aceite (Vehículo). La figura muestra imagenes de tinción con HE de varios SIs para cada tratamiento (Vehículo, ONA, ICI y ONA+ICI). DM, decidua mesometrial; DAM, decidua antimesometrial; U, zona de unión entre M-AM; EI, estroma indiferenciado; adm, área adyacente al miometrio; mio, miometrio. Punta de flecha llena, restos de tejido decidual; punta de flecha semi-llena, infiltración de glóbulos rojos; punta de flecha vacía, desorganización de vasos-lagunas. Barra: 500 µm.

Cuantificamos el diámetro (largo M-AM), el área total de la decidua y las proporciones de las distintas zonas (DAM: decidua antimesometrial, DM: decidua mesometrial y EI: estroma indiferenciado) según se muestra en las figuras 15 y 16. En el caso de las reabsorciones resultantes del tratamiento con 1 mg de ONA medimos, únicamente, el diámetro y el área de los SIs ya que no presentaron diferenciación a las

distintas zonas deciduales. Para cuantificar el número de SIs definimos como un SI a toda implantación exitosa. Considerando una implantación exitosa: al correcto desarrollo de las dos primera etapas de la implantación (Enders y Schlafke, 1967), la yuxtaposición (apposition) y la reacción de adhesión (adhesion o attachment), y al comienzo de la tercer etapa, la penetración, sin hacer distinción según la calidad de la decidua resultante. De esta manera, el número de SIs observados por rata preñada no varió entre los distintos tratamientos (Figura 16B). Este resultado concuerda con lo esperado dado que el cronograma de tratamiento no interfiere con la implantación del blastocisto (Figuras 2 y 14A). Los SIs de ratas tratadas con ONA solo o en combinación con ICI presentaron un diámetro y área total significativamente menor que los SIs de ratas tratadas con el vehículo. ICI no produjo diferencias en los parámetros analizados en relación a las muestras vehículo. Con respecto a las proporciones de las distintas zonas deciduales, no se observaron variaciones significativas entre los tratamientos y el vehículo. La zona de estroma indiferenciado (EI) presentó, sin embargo, una tendencia a aumentar su tamaño en las muestras de ratas tratadas con ICI y ONA+ICI con respecto a los SIs vehículo (Figura 16B).

A



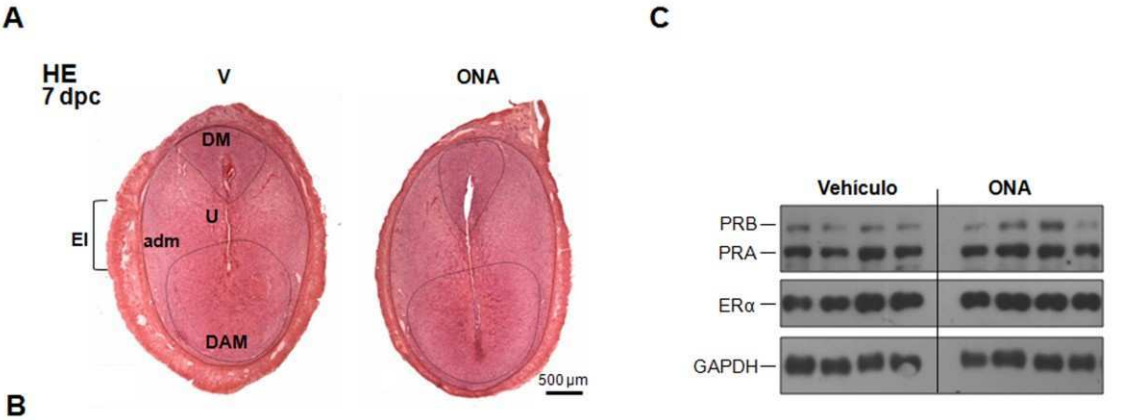
B

	Vehículo	ONA	ICI	ONA+ICI
# SIs/rata	11 ± 4	13 ± 1	12 ± 4	13 ± 2
# Reabsorciones	0/12	12/12	0/12	3/12[b]
Diámetro (mm)	3.6 ± 0.3	2.4 ± 0.4[a]	3.1 ± 0.4	2.7 ± 0.3[a]
Area (mm^2)	7.1 ± 1.1	4.0 ± 0.7[a]	6.0 ± 1.4	4.4 ± 0.5[a]
DM (%)	15.0 ± 1.8	-	11.4 ± 3.8	12.4 ± 1.0[ns]
DAM (%)	37.3 ± 1.1	-	33.9 ± 3.0	37.4 ± 3.4[ns]
EI (%)	47.6 ± 1.8	-	54.8 ± 6.8	52.1 ± 3.8[ns]

Figura 16. Efecto del tratamiento temprano con los antagonistas del RP y el RE sobre la morfología de los SIs. La morfología de los SIs de ratas tratadas tempranamente con el antagonista del RP, Onapristona (ONA), con el antagonista del RE, ICI182.780 (ICI), o su combinación (ONA+ICI) fue analizada en el día 7 pc por tinción con HE en cortes transversales de los mismos. Se cuantificaron las distintas áreas de la decidua. **A)** La figura muestra las imagenes de tinción con HE de un SI representativo para cada tratamiento (Vehículo, ONA, ICI y ONA+ICI). **B)** Cuantificación de las distintas áreas

deciduales. La tabla muestra el número de SIs/rata/tratamiento; el número de reabsorciones/tratamiento; el promedio ± SD del área, la longitud y el porcentaje de área correspondiente a cada zona decidual relativo al área total de la decidua. Las líneas negras muestran la delimitación de las áreas cuantificadas. Los SIs analizados se muestran en la Figura 15. HE, tinción con hematoxilona y eosina; DM, decidua mesometrial; DAM, decidua antimesometrial; U, zona de unión entre M-AM; EI, estroma indiferenciado; adm, área adyacente al miometrio; mio, miometrio. **a**, diferencia estadística Vehículo v. tratamientos; **b**, diferencia estadística ONA v. ONA+ICI; **ns**, sin diferencia estadística Vehículo v. tratamientos; **-**, desarrollo de la decidua no observable. Barra: 1000 µm. $P < 0.05$;

Las reabsorciones causadas por la administración de ONA son un resultado robusto acerca de la importancia de P_4 en el establecimiento de la preñez. Sin embargo, consideramos que la morfología que se observa en el día 7 pc luego del tratamiento con ONA excede la acción directa de este antagonista. Para comprender mejor la función de P_4 durante el desarrollo decidual redujimos la dosis de ONA a la mitad (0.5 mg/día) y la administramos según el mismo esquema de tratamiento temprano (Figura 14A). El tratamiento con esta dosis baja de ONA no interfirió con el desarrollo de las diferentes áreas de la decidua (Figura 17A) y los parámetros medidos (diámetro, área total y proporciones de la DAM, la DM y el EI) no se modificaron en relación a los SIs de ratas tratadas con el vehículo (Figura 17B). Estos resultados muestran que la acción de ONA sobre el desarrollo decidual es dosis-dependiente.



B

	Vehículo	ONA
# SIs/rata	11 ± 4	16 ± 1
# Reabsorción	0/12	0/12
Diámetro(mm)	3.6±0.3	3.6 ± 0.1
Area (mm^2)	7.1 ± 1.1	6.8 ± 0.2
DM (%)	15.0 ± 1.8	14.8 ± 1.8
DAM (%)	37.3 ± 1.1	40.9 ± 3.0
EI (%)	47.6 ± 1.8	44.5 ± 4.9

Figura 17. Efecto del tratamiento temprano con baja dosis del antagonista del RP. Ratas preñadas fueron inyectadas de manera subcutánea con 0.5 mg/día del antagonista del RP, Onapristona (ONA) durante los días 5 y 6 pc. Las ratas control fueron inyectadas con aceite (Vehículo). Los SIs fueron colectados en el día 7 pc. **A)** La morfología de los SIs fue analizada por tinción de cortes en parafina con HE. Las distintas áreas de la decidua fueron cuantificadas. La figura muestra las imagenes de un SI

representativo para cada tratamiento. **B)** Cuantificación de las distintas áreas deciduales. La tabla muestra el número de SIs/rata/tratamiento; el número de reabsorciones/tratamiento; El promedio ± SD del área, la longitud y el porcentaje de área correspondiente a cada zona decidual relativo al área total de la decidua. Las líneas negras muestran la delimitación de las áreas cuantificadas. **C)** *Western blot* de extractos proteicos de los SIs. Se analizó la expresión del RPA, RPB, REα, GAPDH, pERK, ERK2 con anticuerpos específicos. Se muestra una imagen representativa para cada proteína. HE, tinción con hematoxilina eosina; DM, decidual mesometrial; DAM, antimesometrial; U, zona de unión entre M-AM; EI: estroma indiferenciado; adm, área adyacente al miometrio; mio, miometrio. Barra: 500 µm.

En conjunto, confirmamos que la administración temprana de los antagonistas nos permite estudiar la acción de los receptores de hormonas esteroideas en el desarrollo decidual. El tratamiento temprano con ONA y/o ICI generó fenotipos muy específicos. Observamos que el bloqueo de la señalización mediada por el RP resulta en un fenotipo deletéreo para el desarrollo de la preñez. Este drástico efecto de 1 mg de ONA es revertido en presencia del antagonista del receptor de estradiol, sugiriendo una interacción entre las vías de señalización de ambos receptores. Además, los efectos de ICI proponen un papel para el E_2 en el desarrollo angiogénico de la decidua.

2.1.1.2 Acción del RP y el RE sobre la proliferación y la diferenciación decidual

El correcto desarrollo de la decidua depende de la coordinación entre **la proliferación y la diferenciación** del epitelio y el estroma uterino. Para caracterizar el efecto de la falta de acción de las hormonas esteroideas sobre la decidualización estudiamos las variaciones de la expresión de conocidos marcadores de proliferación (PCNA) y diferenciación (DES, CCND3, CX43 y PRL8A2) frente a los distintos tratamientos con los antagonistas.

Para estudiar el efecto de los antagonistas del RP y el RE sobre la proliferación decidual evaluamos la expresión proteica del antígeno nuclear de células en proliferación, **PCNA**, mediante *western blot* (Laskey, Fairman y col., 1989). Los niveles proteicos de PCNA fueron significativamente menores en las muestras de SIs en proceso de reabsorción de ratas tratadas con 1 mg de ONA en comparación con ratas tratadas con el vehículo (Figura 18). Los tratamientos con ICI y ONA+ICI mostraron una leve disminución en los niveles de expresión de PCNA en relación a los SIs de ratas tratadas con el vehículo. Con respecto a los tratamientos con ONA e ICI por separado, los resultados obtenidos para los niveles de expresión de PCNA concuerdan con los tamaños de los SIs correspondientes (Figura 16B). En cambio, los niveles de PCNA de las muestras de ratas tratadas con la combinación de ONA+ICI no se condicen con la significativa disminución del diámetro y el área de la decidua observados (Figura 16B).

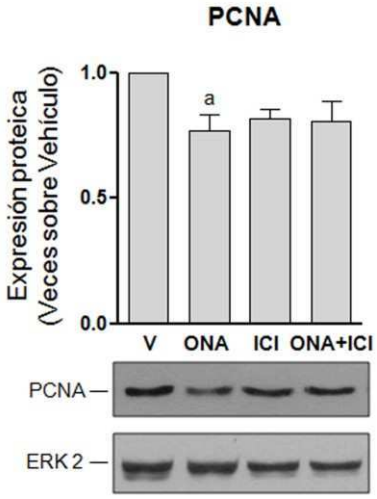


Figura 18. Efecto del tratamiento temprano con los antagonistas del RP y el RE sobre la expresión de PCNA, marcador de proliferación. *Western blot* de extractos proteicos de SIs de ratas tratadas tempranamente con el antagonista del RP, Onapristona (ONA), con el antagonista del RE, ICI182.780 (ICI), o su combinación (ONA+ICI). Las ratas control fueron inyectadas con aceite (Vehículo). Los SIs fueron colectados en el día 7 pc. Para cada tratamiento los valores de unidades arbitrarias (UA) de las intensidades de las bandas de los *western blots* de PCNA se relativizaron por los niveles de la proteína control ERK2. Estos valores fueron luego normalizados por los valores obtenidos en SIs tratados con el vehículo. Los valores del gráfico representan la media de las veces de cambio ± DS de tres muestras independientes. La figura muestra una imagen de un *western blot* representativo. La dosis de ONA que se muestra en el *western blot* corresponde a 1 mg. $P < 0.05$; a, diferencia estadística v. Vehículo; b, diferencia estadística v. 1 mg ONA c, diferencia estadística v. ICI.

Para evaluar el efecto de los tratamientos con ONA e ICI sobre el grado de diferenciación de la decidua analizamos las variaciones en la expresión de 4 marcadores de diferenciación: **Desmina, CCND3, Conexina 43 y *Prl8a2*** (Figura 19). DESMINA y CCND3, son los marcadores cuya cinética de expresión caracterizamos previamente (Figura 12). La CONEXINA 43 (CX43) es un componente de las uniones celulares gap y una proteína relacionada al proceso de decidualización (Grümmer y Winterhager, 2008). Grümmer y col. describieron que su expresión está regulada positivamente por E_2 (Grummer, Chwalisz y col., 1994). La PRL8A2 es una proteína relacionada a prolactina con alta expresión en decidua (Rasmussen, Orwig y col., 1997). Este último marcador permite, además, el análisis de la capacidad endocrina de la decidua y ha sido descripto como un factor crítico para la adaptación de la preñez frente a situaciones de estrés (Alam, Konno y col., 2007). Los niveles proteicos de DESMINA, CCND3 y CX43 se evaluaron por *western blot*, mientras que los niveles de ARNm de *Prl8a2* se evaluaron mediante qRT-PCR.

El tratamiento con 1 mg de ONA produjo una disminución en los niveles de los cuatro marcadores analizados en relación a las muestras tratadas con el vehículo. El tratamiento combinado de ONA+ICI generó una disminución en la expresión proteica

de DESMINA y CCND3 menos marcada que la observada en los SIs tratados con ONA solo (Figura 19). ICI redujo levemente los niveles de DESMINA y CCND3, y disminuyó significativamente los niveles de CX43 con respecto a los obtenidos en las muestras de ratas tratadas con el vehículo. El transcripto de *Prl8a2*, se indujo fuertemente en respuesta el tratamiento con ICI solo o en combinación con ONA referidos al tratamiento con el vehículo.

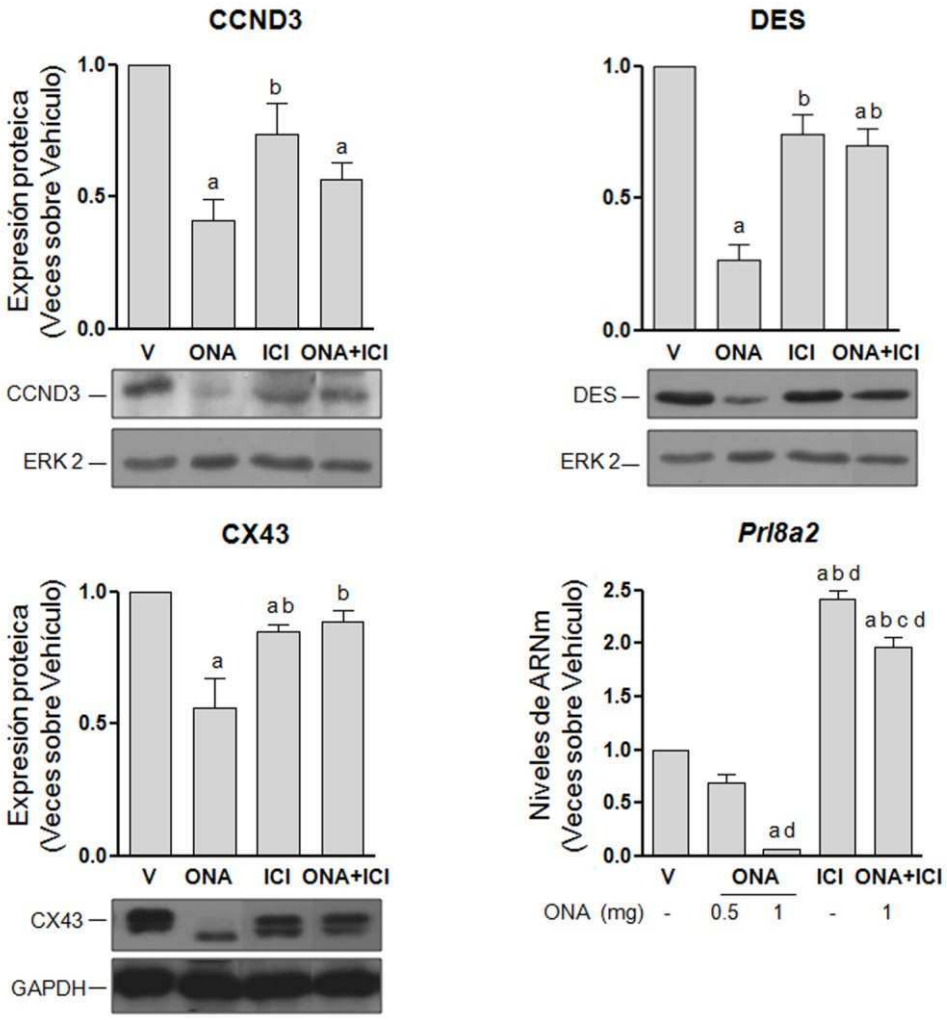


Figura 19. Efecto del tratamiento temprano con los antagonistas del RP y el RE sobre la diferenciación del estroma endometrial. *Western blot* y cuantificación de ARNm mediante PCR en tiempo real de extractos de SIs de ratas tratadas tempranamente con el antagonista del RP, Onapristona (ONA), con el antagonista del RE, ICI182.780 (ICI), o su combinación (ONA+ICI). Las ratas control fueron inyectadas con aceite (Vehículo). Los SIs fueron colectados en el día 7 pc. Para cada tratamiento los valores de unidades arbitrarias (UA) de las intensidades de las bandas de los *western blots* de DESMINA, CCND3 y CX43 se relativizaron por los niveles de la proteína control ERK2 o GAPDH, según se indica. Estos valores fueron luego normalizados por los valores obtenidos en SIs vehículo. Los fentogramos (fg) de ARNm de *Prl8a2* relativos a los valores correspondientes a *β-Actina* fueron divididos por el nivel de expresión de mensajero de las muestras Vehículo. Los valores del gráfico representan la media de las veces de cambio ± DS de tres muestras independientes. La figura muestra la imagen de un *western blot* representativo. La dosis de ONA que se muestra en el *western blot* corresponde a 1 mg. V, Vehículo. P <

0.05; a, diferencia estadística v. Vehículo; b, diferencia estadística v. 1 mg ONA; c, diferencia estadística v. ICI; d, diferencia estadística v. 0.5 mg ONA.

En resumen, en general los niveles de los marcadores de proliferación y diferenciación analizados se correlacionan con las morfologías observadas para cada tratamiento. En el tratamiento con ONA+ICI, si bien los SIs son de menor tamaño, las proporciones de las distintas áreas se mantienen iguales a los SIs de ratas vehículo. Podemos concluir que el rescate de la preñez producido por el tratamiento conjunto de ONA+ICI genera SIs con un desarrollo decidual subóptimo en relación a su tamaño y al grado de diferenciación que observamos.

2.1.1.3 Acción del RP y el RE sobre la angiogénesis decidual

El **desarrollo angiogénico** de la decidua es otro evento clave en el correcto establecimiento y avance de la preñez, ya que vincula la circulación sanguínea de la madre con la del embrión en desarrollo. Debido a la desorganización de vasos que observamos en la morfología de los SIs de ratas tratadas con ICI estudiamos la expresión de marcadores del desarrollo vascular en los SIs resultantes de cada tratamiento.

Comenzamos evaluando las variaciones en la expresión de dos moléculas claves para la formación de vasos, **FGF-2** (Montesano, Vassalli y col., 1986) y ***Vegfa*** (Ferrara, 1999), mediante *western blot* y qRT-PCR, respectivamente (Figura 20). El tratamiento con 1 mg ONA produjo un aumento en la expresión de ambos factores en relación a los niveles de las ratas tratadas con el vehículo. Los altos niveles de FGF-2 y *Vegfa* que observamos en los SIs de ratas con 1mg de ONA podrían estar relacionados con el proceso de reorganización del útero que está ocurriendo en las reabsorciones y no necesariamente representar la acción directa del antagonista. La acción de ICI aumentó los niveles proteicos de FGF-2 respecto de lo observado en las ratas tratadas con el vehículo. Este aumento de FGF-2 no lo observamos en presencia del tratamiento conjunto de ONA+ICI. El transcripto de *Vegfa* se indujo en respuesta al tratamiento combinado de los antagonistas, aunque fue significativamente menor al observado en presencia de 1 mg de ONA únicamente.

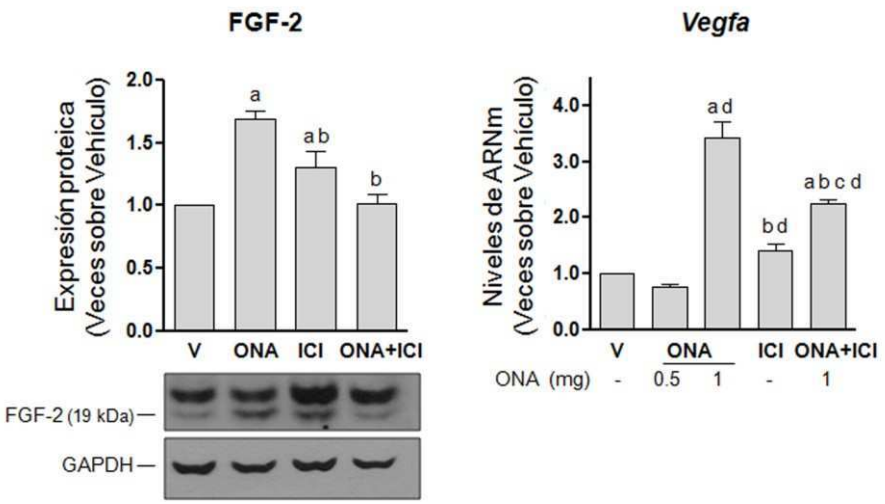


Figura 20. Efecto del tratamiento temprano con los antagonistas del RP y el RE sobre la angiogénesis en la decidua. *Western blot* y cuantificación de ARNm mediante PCR en tiempo real de extractos de SIs de ratas tratadas tempranamente con el antagonista del RP, Onapristona (ONA), con el antagonista del RE, ICI182.780 (ICI), o su combinación (ONA+ICI). Las ratas control fueron inyectadas con aceite (Vehículo). Los SIs fueron colectados al día 7 pc. Para cada tratamiento los valores de unidades arbitrarias (UA) de las intensidades de las bandas de los *western blots* de FGF-2 se relativizaron por los niveles de la proteína control GAPDH. Estos valores fueron luego normalizados por los valores obtenidos en SIs vehículo. En el gráfico de barra para *Vegfa,* los fentogramos (fg) de ARNm de *Vegfa* relativos a los valores correspondientes a *β-Actina* fueron divididos por el nivel de expresión de mensajero de las muestras Vehículo. Los valores del gráfico representan la media de las veces de cambio ± DS de tres muestras independientes. La figura muestra la imagen de un *western blot* representativo. La dosis de ONA que se muestra en el *western blot* corresponde a 1 mg. V, Vehículo. $P < 0.05$; a, diferencia estadística v. Vehículo; b, diferencia estadística v. 1 mg ONA; c, diferencia estadística v. ICI; d, diferencia estadística v. 0.5 mg ONA.

Para visualizar de manera localizada los cambios a nivel de la vascularización realizamos una inmunodetección de **CD31**, marcador de células endoteliales (DeLisser, Newman y col., 1993), en cortes transversales de los SIs (Figura 21). Las muestras de los SIs provenientes de ratas tratadas con ICI presentaron una mayor expresión de CD31. En fotos con mayor aumento de las tinciones con HE de los SIs de ratas tratadas con ICI observamos vasos dilatados y la presencia de lagunas sanguíneas, confirmando la desorganización vascular (Figura 15 y 21). El tratamiento con ONA+ICI mostró una menor expresión de CD31 en relación a los SIs de ratas tratadas con el vehículo (Figura 21).

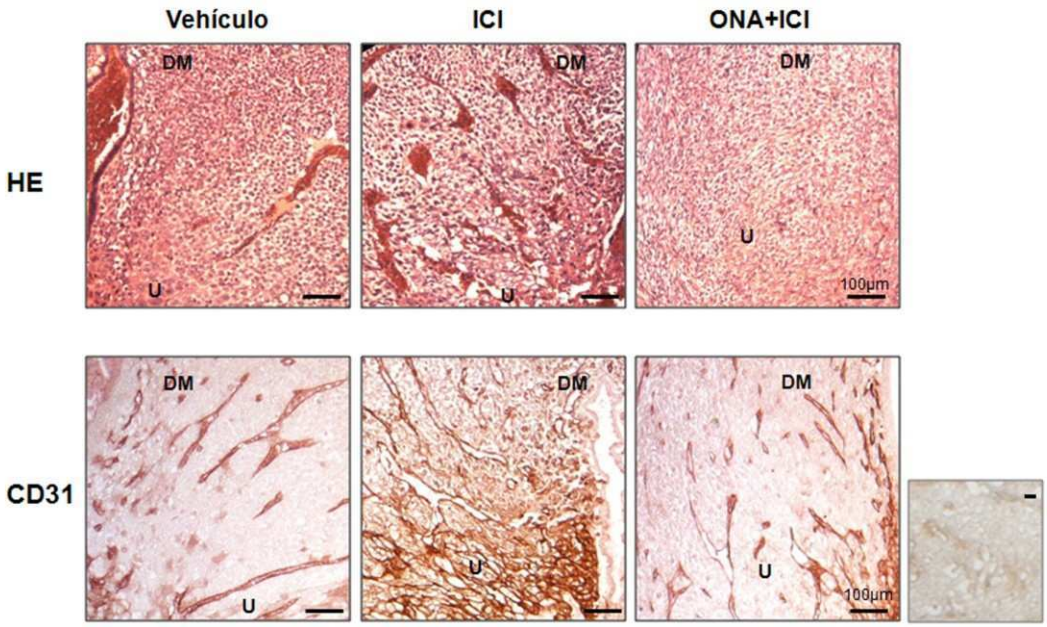


Figura 21. Efecto del tratamiento temprano con los antagonistas del RP y el RE sobre la formación de vasos. La formación de vasos de los SIs fue analizada por tinción de cortes transversales con HE y por inmunodeteción con anticuerpo especifico anti-CD31 en SIs de ratas preñadas y tratadas tempranamente con el antagonista del RE ICI182.780 (ICI) solo, o en combinación con el antagonista del RP, Onapristona (ONA+ICI). Los SIs fueron colectados en el día 7 pc. Los paneles superiores muestran imagenes de tinción con HE de un SI representativo para cada tratamiento (Vehículo, ICI y ONA+ICI). Los paneles inferiores muestran los resultados de la localización de CD31. En ambos casos la imagen se restringe a la zona DM y U de la decidual. DM, decidua mesometrial; U, zona de unión entre M-AM. Barra: 500 µm.

En resumen, corroboramos que la desorganización de vasos observada en las muestras de ratas tratadas con ICI se correlaciona con una señal de CD31 y con un pronunciado aumento en la expresión de FGF-2. FGF-2 sería un factor importante en la desorganización vascular resultante del tratamiento con ICI. En relación a las muestras del tratamiento con 1 mg de ONA, los niveles altos de expresión de FGF-2 y Vegfa que observamos estarían relacionados con el proceso de reorganización del útero que está ocurriendo en las reabsorciones y no necesariamente representar un efecto directo del antagonista. Las muestras de ONA+ICI tienen menor señal de CD31 y niveles de expresión de FGF-2 comparables a las muestras tratadas con el vehículo.

2.1.1.4 Vías de señalización moduladas por la acción de los antagonistas del RP y el RE

Nuestro siguiente paso fue explorar las **vías de señalización** relacionadas al proceso de diferenciación decidual que estarían moduladas por la acción de los antagonistas. Analizamos mediante *western blot* los niveles del RPA, RPB y REα (Figuras 22 y 17C), por qRT-PCR los niveles de *Hand2* y *Bmp2* (Figura 23); y mediante *western blot* e IHQ los niveles y la localización de pERK (Figura 24).

Comenzamos por evaluar las variaciones en los niveles de **expresión de los receptores de P_4 y E_2**, principales mediadores de la acción hormonal y blanco de los antagonistas utilizados (Figuras 22 y 17C). Las reabsorciones inducidas por el tratamiento con la dosis de 1 mg de ONA y los SIs de ratas tratadas con ICI mostraron una reducción significativa en los niveles del RPA, RPB y REα en relación a las ratas tratadas con el vehículo (Figura 22). El tratamiento combinado de ONA+ICI recuperó los niveles de los RPA y B a niveles comparables con los niveles de las ratas tratadas con el vehículo. En cambio, la expresión del REα disminuyó en respuesta al tratamiento con ONA+ICI en relación a los niveles de ratas tratadas con el vehículo, sin embargo, en comparación con los niveles obtenidos del tratamiento con los antagonistas administrados de manera individual mostró una recuperación significativa (Figura 22).

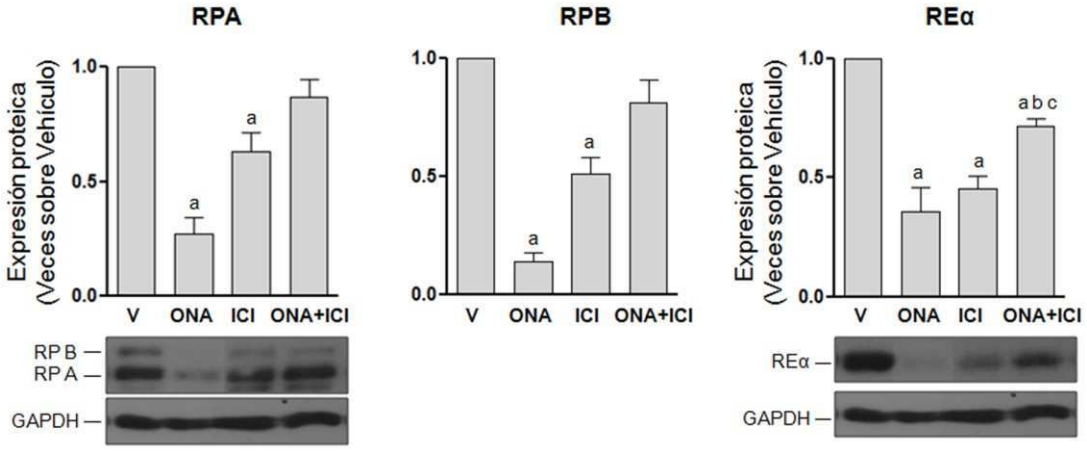


Figura 22. Efecto del tratamiento temprano con los antagonistas del RP y del RE sobre la expresión del RP y del RE. *Western blot* de extractos proteicos de SIs de ratas tratadas tempranamente con el antagonista del RP, Onapristona (ONA), con el antagonista del RE, ICI182.780 (ICI), o su combinación (ONA+ICI). Las ratas control fueron inyectadas con aceite (Vehículo). Los SIs fueron colectados en el día 7 pc. Para cada tratamiento los valores de unidades arbitrarias (UA) de las intensidades de las bandas de los *western blots* del RPA, RPB y REα se relativizaron por los niveles de la proteína control GAPDH. Estos valores fueron luego normalizados por los valores obtenidos en SIs tratados con el vehículo. Los valores del gráfico representan la media de las veces de cambio ± DS de tres muestras independientes. La figura muestra una imagen de un *western blot* representativo. La dosis

de ONA que se muestra en los *western blots* corresponde a 1 mg. V, Vehículo. P < 0.05; a, diferencia estadística v. Vehículo; b, diferencia estadística v. 1 mg ONA; c, diferencia estadística v. ICI.

Luego estudiamos las variaciones en los niveles de ARNm de ***Bmp2*** (Lee, Jeong y col., 2007; Li, Kannan y col., 2007) y ***Hand2*** (Huyen y Bany 2011), genes previamente descriptos en las vías de señalización dependientes del RP durante la decidualización (Figura 23). Los niveles del transcripto de *Bmp2* disminuyeron significativamente en respuesta a las dosis de 0.5 y 1 mg de ONA en concordancia con su descripta regulación positiva por P_4. Los animales tratados con ICI no presentaron variaciones, mientras que el tratamiento de ONA+ICI aumentó la expresión de *Bmp2* en relación a todos los demás tratamientos. De manera similar, los niveles de ARNm de *Hand2* disminuyeron en respuesta a los tratamientos con ONA en relación a los demás tratamientos (Figura 23). ICI no produjo variaciones y el tratamiento combinado de ONA+ICI indujo significativamente la expresión del transcripto de *Hand2* respecto a los demás tratamientos.

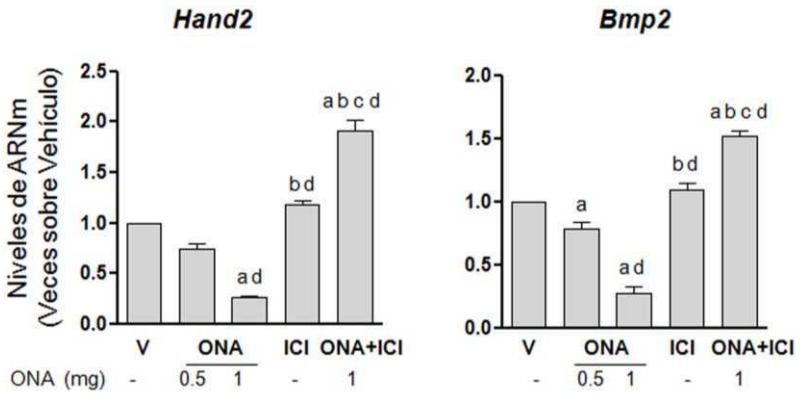


Figura 23. Efecto del tratamiento temprano con los antagonistas del RP y el RE sobre sus vías de señalización. Cuantificación de ARNm mediante PCR en tiempo real de extractos de SIs de ratas tratadas tempranamente con el antagonista del RP, Onapristona (ONA), con el antagonista del RE, ICI182.780 (ICI), o con su combinación (ONA+ICI). Las ratas control fueron inyectadas con aceite (Vehículo). Los SIs fueron colectados en el día 7 pc. En los gráficos de barra los fentogramos de ARNm de *Hand2* y *Bmp2* relativos a los valores correspondientes a *β-Actina* fueron divididos por el nivel de expresión de mensajero de las muestras vehículo correspondientes. Los valores del gráfico representan la media de las veces de cambio ± DS de tres muestras independientes. P < 0.05; a, diferencia estadística v. Vehículo; b, diferencia estadística v. 1 mg ONA; c, diferencia estadística v. ICI; d, diferencia estadística v. 0.5 mg ONA.

Dada la relación existente entre las vías de señalización de los receptores de hormonas esteroideas y la activación de ERK (Vallejo, Ballaré y col., 2005; Vallejo, 2009) analizamos el efecto del tratamiento temprano con los antagonistas del RP y el RE sobre los niveles y la localización de pERK (Figura 24). Mediante *western blot*

observamos que la administración de ONA, a baja y alta dosis, y, en menor medida, ICI inhibieron la activación de ERK (Figura 17C y 24A). El tratamiento conjunto de ONA+ICI aumentó los niveles de pERK llevándolos a niveles comparables a los obtenidos en las ratas tratadas con el vehículo (Figura 24A).

A continuación analizamos la localización de pERK mediante IHQ. El tratamiento con ICI redujo drásticamente la señal observada en la ZDP y en la zona U de los SIs tratados con el vehículo. Encontramos sólo algunos núcleos aislados con señal positiva de pERK en dichas zonas (Figura 11 y 24A). La IHQ de los SIs de los animales tratados con ONA+ICI presentaron una fuerte señal en las células en contacto con el embrión (ZDP), en el estroma peri-luminal a lo largo del epitelio uterino y en los núcleos de las células de la zona U, aunque de manera más aislada en relación a la señal observaba en los SIs de ratas tratadas con el vehículo (Figura 11 y 24A).

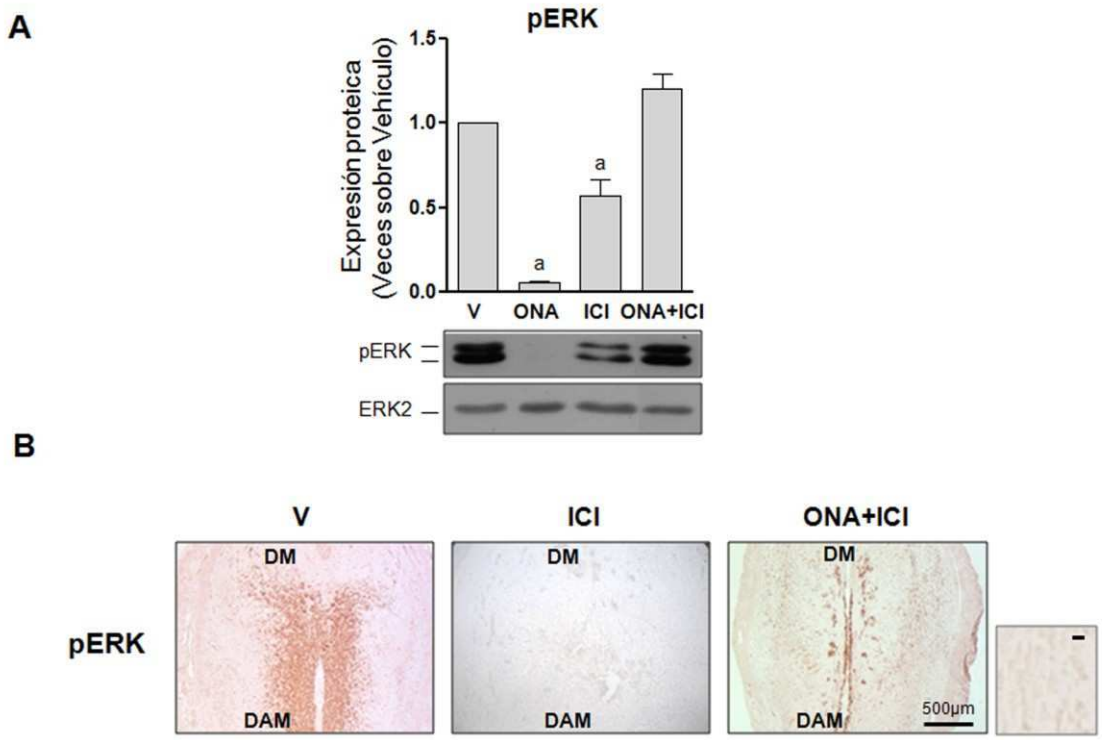


Figura 24. Efecto del tratamiento temprano con los antagonistas del RP y el RE sobre la expresión y la localización de la forma activa de ERK. Ratas preñadas fueron tratadas tempranamente con el antagonista del RP, Onapristona (ONA), con el antagonista del RE, ICI182.780 (ICI), o su combinación (ONA+ICI). Las ratas control fueron inyectadas con aceite (Vehículo). Los SIs fueron colectados en el día 7 pc. La activación de ERK fue analizada por *western blot* e inmunohistoquímica. **A)** Niveles de activación de ERK. Para cada tratamiento los valores de unidades arbitrarias (UA) de las intensidades de las bandas de los *western blots* de pERK se relativizaron por los niveles de la proteína control ERK2. Estos valores fueron luego normalizados por los valores obtenidos en SIs vehículo. Los valores del gráfico representan la media de las veces de cambio ± DS de tres muestras independientes. La figura muestra una imagen de un *western blot* representativo. La dosis de ONA que se muestra en el *western blot* corresponde a 1 mg. P

< 0.05; a, diferencia estadística v. Vehículo. **B)** Localización de ERK activado. Cortes en parafina de SIs fueron analizados por inmunohistoquímica con anticuerpo específico anti-pERK. Los controles de especificidad se realizaron omitiendo el anticuerpo primario. V, Vehículo; DM, decidua mesometrial; DAM, decidua antimesometrial. Barra: 500 µm.

Concluimos, que el desarrollo subóptimo de los SIs de ratas tratadas con ONA+ICI está asociado a la recuperación de los niveles del RPA, el RPB, el REα y pERK en relación a las muestras tratadas con los antagonistas por separado. Sugerimos que la recuperación del nivel de receptores y de la activación de ERK sería responsable del rescate de la preñez producido. Por otro lado, el tratamiento temprano con ONA+ICI aumenta los niveles de moléculas claves para el desarrollo de la decidua como Hand2 y Bmp2 en relación al tratamiento con vehículo. En relación al tratamiento con ICI, la ausencia de pERK en la zona U de estas muestras indicaría una función de ERK en el correcto desarrollo vascular.

2.1.1.5 ICI rescata parcialmente de la acción deletérea de ONA

Nos preguntamos si los SIs que mostraron un desarrollo subóptimo en el día 7 pc en respuesta al tratamiento con ONA+ICI, eran capaces de continuar su desarrollo y llevar la preñez a término. Para contestar esta pregunta analizamos el **desarrollo de SIs a diferentes tiempos post-coito** (10, 14 y 20 dpc) luego de la administración temprana de ONA+ICI (Figura 14B).

El análisis macroscópico de los úteros y sus correspondientes SIs (Figura 25) mostró que en el día 10 pc, en concordancia con lo observado en el día 7 pc (Figura 15 y 16), los SIs de ratas tratadas con ONA+ICI fueron de menor tamaño que los SIs de ratas tratadas con vehículo (Figura 25 y Figura 26). En el día 14 pc los SIs de ratas tratadas con ONA+ICI mantuvieron el mismo tamaño que en el día 10 pc, indicando un freno o un retroceso en el desarrollo. En el día 20 de preñez los SIs redujeron notablemente su tamaño en relación a lo observado en los días 10 y 14 pc (Figura 25).

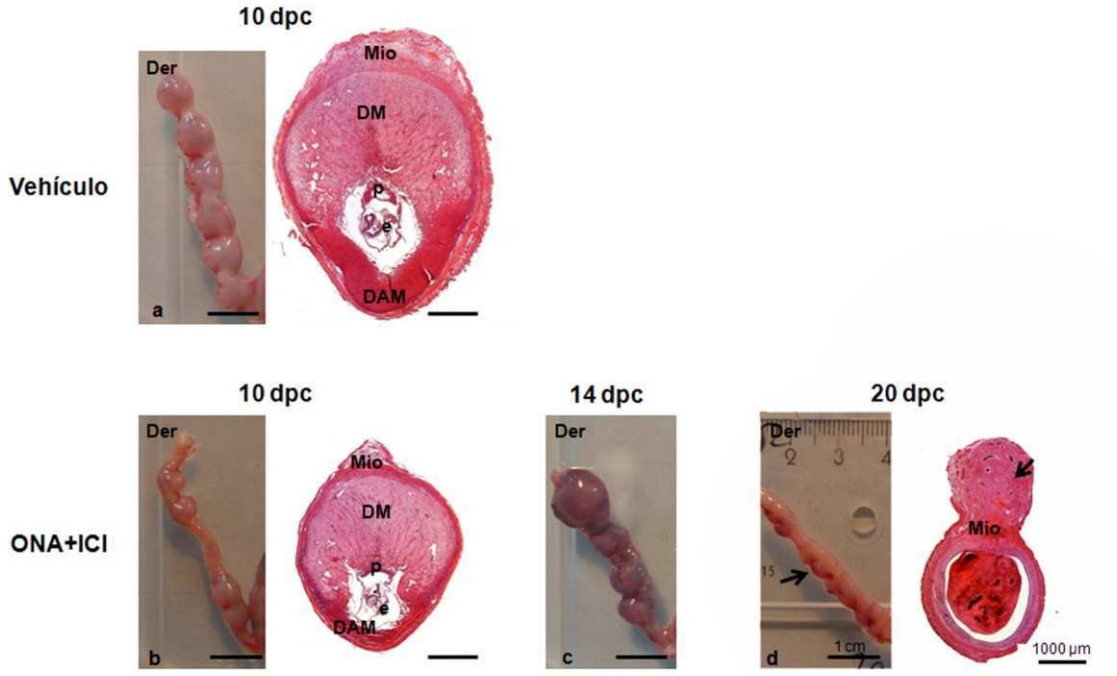
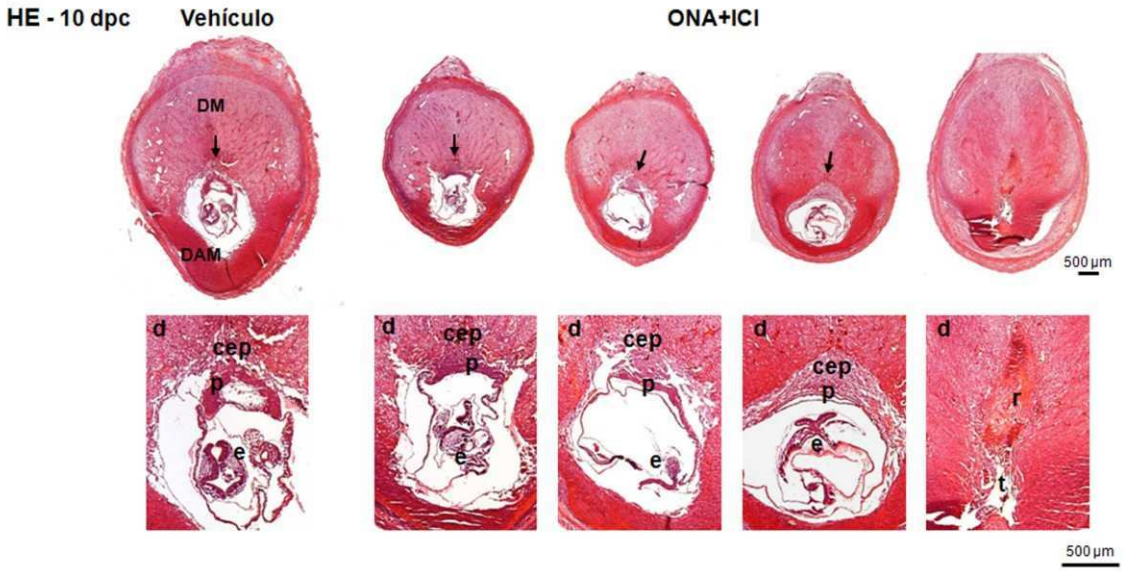


Figura 25. Efecto del tratamiento temprano con los antagonistas del RP y el RE sobre el avance de la preñez. Ratas preñadas fueron tratadas tempranamente con el antagonista del RP, Onapristona (ONA), en combinación con el antagonista del RE, ICI182.780 (ICI). Las ratas control fueron inyectadas con aceite (Vehículo). Los SIs fueron colectados en los días 10, 14 y 20 pc. La morfología de los úteros fue analizada por tinción de cortes transversales con HE. Se muestran imágenes de los úteros enteros y a su izquierda, las imágenes obtenidas por tinción con HE de un SI representativo para cada tratamiento y tiempo analizados. Der, cuerno uterino derecho; Izq, cuerno uterino izquierdo; DM, decidua mesometrial; DAM, decidua antimesometrial; U, zona de unión entre M-AM; adm, área adyacente al miometrio; Mio, miometrio; p, placenta; e, embrión. La flecha indica el crecimiento externo al miometrio en el extremo mesometrial. Barra útero: 1cm, barra SI: 1000 µm.

A continuación analizamos la **morfología** de los SIs en cortes transversales de los SIs teñidos con HE (Figura 26). En las muestras del día 10 pc cuantificamos el área total de la decidua y confirmamos una reducción significativa en el tamaño de los SIs de los animales tratados con ONA+ICI en relación a los SIs de ratas tratadas con el vehículo. En los SIs del día 10 pc de ratas tratadas con el vehículo observamos una decidua mesometrial con gran desarrollo de vasos, una decidua antimesometrial compacta y en retroceso, y desarrollo placentario y embrionario (Figura 9 y 26). En este mismo día todos los SIs de ratas tratadas con ONA+ICI analizados (7/7SIs/3ratas) presentaron desarrollo decidual, aunque no en todos los casos distinguimos la misma organización de las zonas de la decidua que presentaron los animales tratados con el vehículo (Figura 26). La organización y el grado de vascularización varió entre las muestras de ONA+ICI, y con respecto a los SIs de las ratas tratadas con el vehículo (Figura 26 y 27). En los SIs de ratas tratadas con ONA+ICI, la DAM prácticamente estuvo ausente y en el 71,4% (5/7SIs/3ratas) de los SIs hubo desarrollo del cono ecto-

placentario y presencia de células trofoblásticas gigantes. Un número aún más reducido (42,9% - 3/7SIs/3ratas) presentó desarrollo placentario y embrionario, aunque el grado de proliferación y diferenciación fue variable entre los distintos SIs analizados. Las placentas de los SIs tratados con ONA+ICI fueron más pequeñas que las placentas de los animales tratados con el vehículo. En algunos casos observamos defectos en la orientación de la placenta en la decidua. (Figura 26).

En el día 20 pc las tinciones con HE confirmaron la reabsorción de todos los sitios analizados. Observamos una masa celular sin diferenciación en el lumen del útero y conectada al mesometrio uterino. En el lado mesometrial externo del miometrio notamos un extraño crecimiento, probablemente, producto del proceso inflamatorio de regeneración del útero (Figura 25).



	V	ONA+ICI
# SIs/rata	12 ± 3	14 ± 3
Area decidua (mm²)	17.1 ± 0.7	9.8 ± 0.2[a]
Desarrollo[b]		
Decidua	7/7	7/7
Trofloblastos	7/7	5/7
Embrión + tejido ee	7/7	3/7[a]

Figura 26. Efecto del tratamiento temprano con los antagonistas del RP y el RE sobre el desarrollo de la decidua, la placenta y el embrión. Ratas preñadas fueron tratadas tempranamente con el antagonista del RP, Onapristona (ONA), en combinación con el antagonista del RE, ICI182.780 (ICI). Las ratas control fueron inyectadas con aceite (Vehículo). Los SIs fueron colectados en el día 10 pc. La figura muestra imagenes de tinción con HE de varios SIs para cada tratamiento. Los paneles inferiores muestran en detalle la zona de desarrollo de la placenta y el embrión (10x). **Tabla)** Análisis cualitativo y cuantitativo de SIs de 10 dpc. La tabla muestra el número de SIs/rata/tratamiento; el promedio ± SD del área total y el grado de desarrollo de los SIs analizados, expresado como el número de SIs con desarrollo de las diferentes estructuras analizadas sobre el total de SIs analizados. DM, decidua mesometrial; DAM, decidua antimesometrial; U, zona de unión entre M-AM; adm, área adyacente al miometrio; mio, miometrio; ee, extra-embrionario. Las flechas indican la orientación de la placenta. a, diferencia

estadística Vehículo v. ONA+ICI; b, número de SIs con desarrollo de las diferentes estructuras analizadas sobre el total de SIs analizados. Barra: 500 µm.

Como indicamos anteriormente, observamos que la localización de pERK se correlaciona con el desarrollo vascular en los días 7 y 8 pc. En el día 7 pc pERK se localiza en la zona de unión entre el M-AM, y en el día 8 pc la señal se desplaza hacia la decidua mesometrial, donde la formación de vasos comienza a tener lugar (Figura 11). Esta correlación se pierde en el día 10 pc, cuando la señal de pERK se limita a la zona en contacto con la placenta en desarrollo (Figura 11).

Con el objetivo de investigar una posible relación entre la activación de ERK, el grado de diferenciación decidual y la formación de vasos sanguíneos en la decidua analizamos mediante IHQ la localización de **pERK** y del marcador de células endoteliales **CD31** en los SIs de **10 dpc** tratados con ONA+ICI (Figura 27). La señal de CD31 tuvo un patrón de localización variado entre los distintos SIs de ratas tratadas con ONA+ICI (Figura 27, panel superior). Aquellos SIs con mayor desarrollo placentario tuvieron un patrón de vasos similar a las ratas tratadas con el vehículo. A pesar de esto, pERK siempre se localizó en coincidencia con la señal de CD31 en los SIs de ratas tratadas con ONA+ICI a diferencia de lo observado en los SIs de las ratas tratadas con el vehículo (Figura 27, panel inferior).

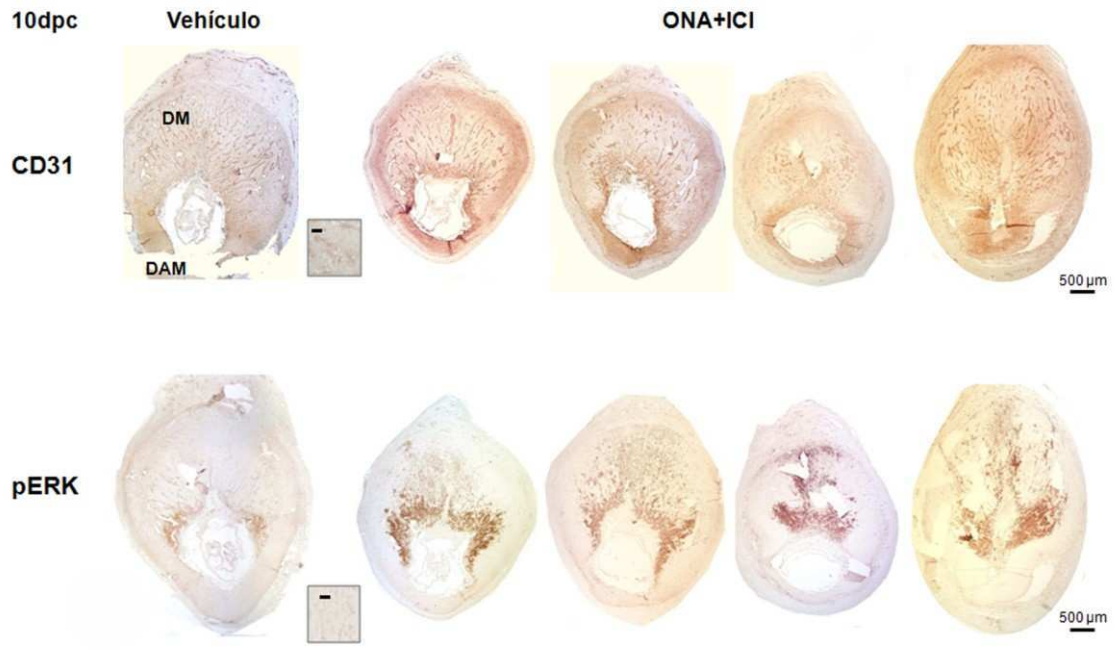


Figura 27. Relación entre la activación de ERK y la formación de vasos en SIs de 10 dpc. Inmunodetección con anticuerpo específico anti-CD31 y anti-pERK en SIs de ratas preñadas y tratadas tempranamente con el antagonista del RE ICI182.780 (ICI) solo o en combinación con el antagonista del RP, Onapristona (ONA+ICI). Los SIs fueron colectados en el día 10 pc. Los paneles superiores muestran

los resultados de la localización de CD31 y los inferiores la localización de pERK. DM, decidua mesometrial; DAM, decidua antimesometrial. Barra: 500 µm.

Los SIs tratados con ONA+ICI durante los días 5 y 6 pc, recuperaron los niveles del RP, REα y pERK y mostraron una sobre-expresión de factores claves para el desarrollo decidual. Sin embargo, el desarrollo subóptimo que se observa en el día 7 pc no es suficiente para llevar a término la preñez y los SIs se reabsorben entre los días 10 y 14 pc. Por otro lado, en el día 10 pc, en muestras tratadas con ONA+ICI la señal de pERK continúa correlacionando con la formación de vasos a diferencia de lo ocurrido en los SIs de ratas tratadas con el vehículo.

2.1.2 Efectos de la inhibición de la activación de ERK sobre el desarrollo temprano de la decidua

Debido a los antecedentes de nuestro laboratorio que relacionan la actividad de los receptores de hormonas esteroideas con la activación de ERK (Vallejo, Ballaré y col., 2005; Vallejo, 2009) y dado los resultados recién presentados que relacionan a pERK con la regulación hormonal *in vivo* y el desarrollo de la decidua, estudiamos el efecto de la **inhibición de la fosforilación de ERK** sobre la decidualización temprana. Administramos diferentes dosis de PD98059, inhibidor de MEK (Alessi, Cuenda y col., 1995), mediante la implantación de mini bombas osmóticas en el útero de ratas en el día 5 pc y colectamos las muestras al día 7 pc. Mediante este abordaje experimental suministramos PD en el lumen uterino de manera local y continua durante los días 5 y 6 pc. Utilizamos 3 concentraciones distintas de PD: 0 (1% DMSO, vehículo), 100 y 200 nM (Figura 28A). Analizamos los niveles de pERK resultantes de cada dosis de PD mediante *western blot* y observamos que la dosis de 100 nM PD fue la dosis efectiva para reducir de los niveles de activación de ERK en los SIs de 7 dpc en relación a los niveles de los SIs tratados con 1% DMSO (Figura 28B). Este resultado resultó llamativo ya que esperábamos una mayor disminución de la activación de ERK a dosis creciente de PD. Sin embargo, debido a la rapidez de la fosforilación y la desfosforilación de ERK, no podemos concluir que la dosis de 200 nM no haya sido efectiva a un tiempo no analizado.

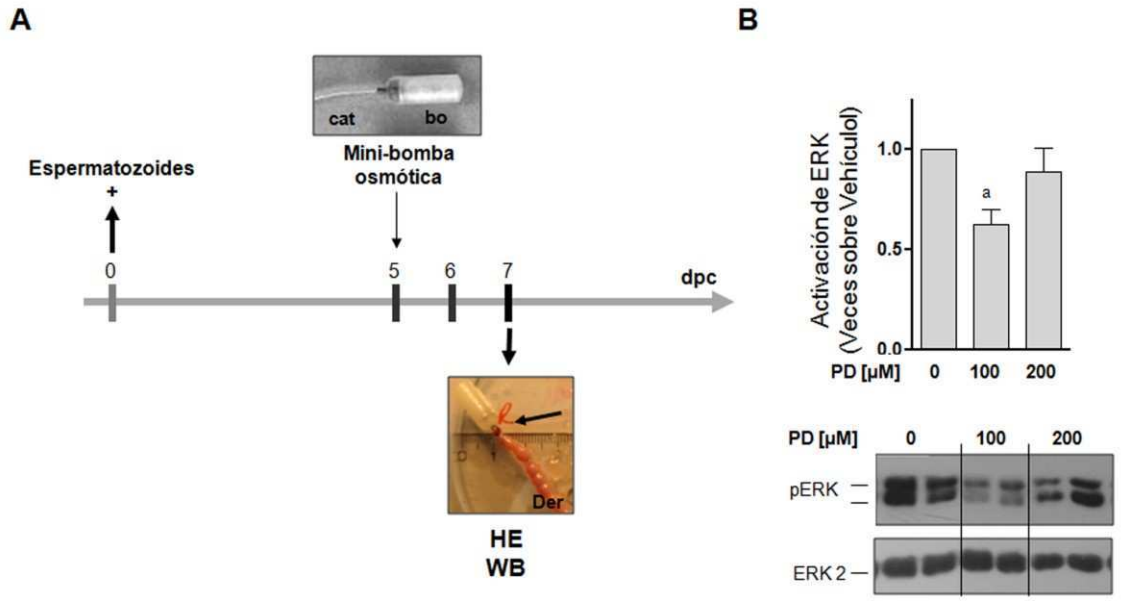
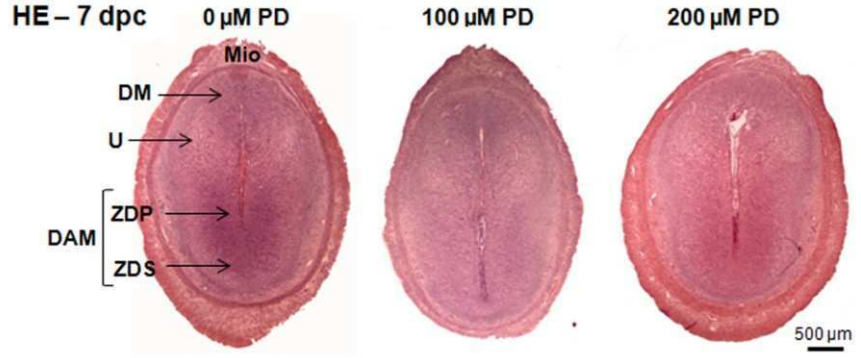


Figura 28. El tratamiento con el inhibidor específico de MEK. Minibombas osmóticas conteniendo 100 µl de una solución de 0 (vehículo), 100 o 200 µM del inhibidor específico de MEK, PD98059, fueron implantadas en el cuerno uterino derecho de ratas con 5 días de preñez. Los SIs fueron colectados en el día 7 pc y los extractos proteicos fueron analizados por *western blot*. **A)** Esquema del tratamiento con PD98059. **B)** Niveles de activación de ERK. Para cada dosis los valores de unidades arbitrarias (UA) de las intensidades de las bandas de los *western blots* de pERK se relativizaron por los niveles de la proteína control ERK2. Estos valores fueron luego normalizados por los valores obtenidos en SIs tratados con el vehículo. Los valores del gráfico representan la media de las veces de cambio ± DS de tres muestras independientes. La figura muestra una imagen de un *western blot* representativo. La dosis de ONA que se muestra en el western blot corresponde a 1 mg. Cat, catéter; bo, bomba osmótica; Der, cuerno uterino derecho. La flecha indica la unión bomba-útero. $P < 0.05$; a, diferencia estadística v. Vehículo.

Luego analizamos la **morfología** de los SIs por tinción con HE y cuantificamos el área total y las proporciones de las distintas zonas deciduales. A pesar de la disminución en los niveles de pERK, no observamos diferencias morfológicas entre las muestras tratadas con 100 nM de PD y las muestras vehículo (Figura 29). Tampoco percibimos alteraciones en la cantidad y localización vasos presentes.

A



B

PD [µM]	0	100	200
# SIs/rata	9 ± 5	12 ± 6	12 ± 1
Diámetro (mm)	3.4 ± 0.4	3.4 ± 0.2	3.5 ± 0.2
Area (mm^2)	6.6 ± 1.0	6.3 ± 0.5	7.4 ± 0.6
DAM (%)	40.5 ± 2.0	37.1 ± 2.7	38.1 ± 0.6
DM (%)	12.5 ± 2.5	12.4 ± 2.4	12.1 ± 0.6
EI (%)	47.1 ± 1.8	50.4 ± 4.9	49.8 ± 1.2

Figura 29. Efecto del tratamiento temprano con el inhibidor específico de MEK sobre la morfología de los SIs. Mini-bombas osmóticas conteniendo 100 µl de una solución de 0 (vehículo), 100 o 200 µM del inhibidor específico de MEK, PD98059 fueron implantadas en el cuerno uterino derecho de ratas con 5 días de preñez. La morfología de los SIs fue analizada por tinción con HE en cortes transversales. Las distintas áreas de la decidua fueron cuantificadas. **A)** La figura muestra imagenes de tinción con HE de un SI representativo para cada tratamiento. **B)** Cuantificación de las áreas deciduales de SIs mostrados en A. La tabla muestra el número de SIs/rata/tratamiento; el promedio ± SD del área, la longitud y el porcentaje de área correspondiente a cada zona decidual dentro de cada SI relativo al área total de la decidua. DM, decidua mesometrial; DAM, decidua antimesometrial; U, zona de unión entre M-AM; adm, zona adyacente al miometrio; Mio, miometrio. Barra: 1000 µm.

La inhibición temprana de la activación de ERK no tiene un efecto significativo en el desarrollo de la decidua de SIs de 7 dpc. La activación de ERK comienza a incrementar en el día 6 pc, un día después del inicio del tratamiento temprano, y es máxima al día 8 pc. Estos datos sugieren que una inhibición más tardía resultaría más eficiente para el estudio del papel de ERK y su interacción con las vías de señalización del RP y el RE durante la decidualización.

2.2. Decidualización tardía

El tratamiento tardío (días 6 y 7 pc) con ONA e ICI, solos y en combinación reduce la extensión de las distintas áreas diferenciadas de la decidua de los sitios de implantación analizados en el día 8 pc (Vallejo, 2009; Vallejo, Mestre-Citrinovitz y col., 2011). Estos mismos resultados muestran que la expresión del RPA, RPB y REα y la activación de ERK son mayores en el día 8 pc en relación a los días anteriores de la cinética de preñez. Teniendo en cuenta estos resultados y los obtenidos por la administración temprana de PD extendimos nuestro análisis del efecto de los antagonistas ONA e ICI y del inhibidor de MEK sobre el desarrollo tardío de la decidua. El protocolo de administración que utilizamos se muestra en la figura 30.

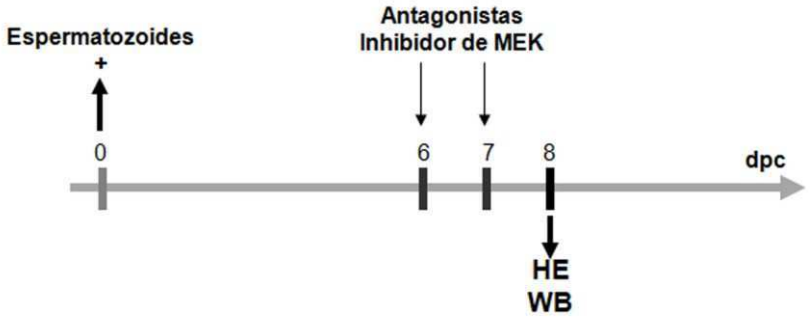


Figura 30. Tratamiento tardío de ratas preñadas con los antagonistas del RP y el RE o el inhibidor de MEK. Ratas preñadas fueron inyectadas con el antagonista del RP, Onapristona (ONA), con el antagonista del RE, ICI182.780 (ICI), o su combinación (ONA+ICI) o PD98059 durante los días 6 y 7 pc. Las inyecciones con antagonistas fueron administradas vía subcutánea y las de PD vía intraperitoneal. Las ratas control del tratamiento con antagonistas no fueron inyectadas y las ratas control del tratamiento con PD fueron inyectadas con DMSO (Vehículo). Los SIs fueron colectados en el día 8 pc y embebidos en parafina para estudios histológicos o congelados en nitrógeno líquido para el análisis de expresión proteica y de ARNm. dpc, días post-coito; HE, tinción con hematoxilina-eosina; WB, *western blot*.

2.2.1 Interacción entre las vías de señalización del RP y el RE en la decidualización tardía

Los tratamientos tardíos con los antagonistas redujeron los niveles proteicos del RPA, el RPB y el REα (Vallejo, 2009). Estudiamos, entonces, los efectos de los antagonistas sobre la localización de los receptores RP y RE y de pERK en SIs de 8 dpc de ratas tratadas siguiendo el protocolo tardío de administración (Figuras 30 y 31).

Los resultados de IHQ mostraron una distribución para RP, REα, REβ y pERK igual a la observada en los SIs de ratas no tratadas (Figuras 10, 12 y 31). La señal del RP fue exclusivamente citoplasmática en la zona de la decidua antimesometrial y nuclear tanto en las células indiferenciadas de la zona U como en la región de la DM. REβ presentó el mismo patrón que RP. La señal del REα fue homogénea en toda la decidua, con localización nuclear en la zona de la DM y en las células indiferenciadas de la zona de U, y localización tanto citoplasmática como nuclear en las células de la DAM. La localización de pERK fue nuclear y restringida a las células indiferenciadas de la zona U (Figura 31).

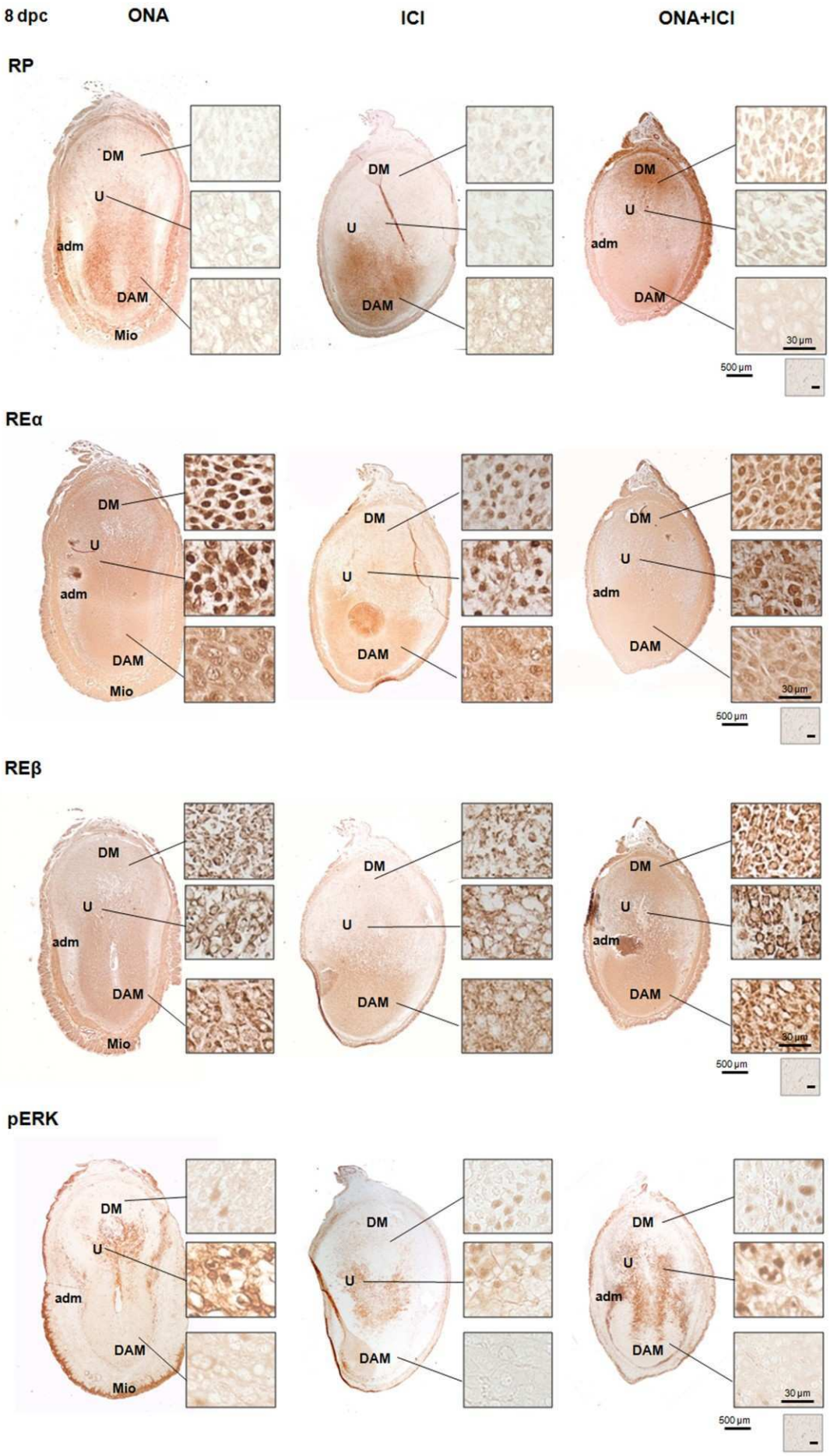

8 dpc
ONA
ICI
ONA+ICI
RP
REα
REβ
pERK
DM
U
adm
DAM
Mio
30 µm
500 µm

Figura 31. Localización del RP, el REα, el REβ y pERK en sitios de implantación de rata con 8 días de preñez tratadas tardíamente con ONA e ICI. Cortes transversales de SIs de 8 dpc de ratas tratadas tardíamente con el antagonista del RP, Onapristona (ONA), con el antagonista del RE, ICI182.780 (ICI), o su combinación (ONA+ICI) fueron analizados por inmunohistoquímica con anticuerpos específicos anti-RP, anti-REα, anti-REβ o anti-pERK. La figura muestra el SI completo y a la izquierda se muestran detalles de las distintas áreas de la decidua (10X). Los controles de especificidad se realizaron omitiendo el anticuerpo primario. DM, decidua mesometrial; DAM, decidua antimesometrial; U, zona de unión entre M-AM; adm, zona adyacente al miometrio; Mio, miometrio. Barra: 500 µm; barra detalles: 30 µm.

En resumen, la acción tardía de los antagonistas no modifica la localización de los receptores ni la de pERK en los SIs de 8 dpc. El efecto de ONA e ICI sobre la regulación del RP, REα y pERK estaría limitado a los niveles de expresión de los receptores y a la activación de ERK.

Con el objetivo de evaluar el nivel de **diferenciación decidual** de los SIs de ratas tratadas con ONA e ICI de manera tardía analizamos los niveles de DESMINA y CCND3 mediante *western blot*. Para este análisis tuvimos en cuenta que en el día 8 pc la expresión de DESMINA y CCND3 comienza a decaer en coincidencia con el proceso de retroceso de la DAM que acompaña al crecimiento del embrión (Figuras 9 y 12).

El tratamiento tardío con ONA+ICI disminuyó los niveles de CCND3 en el día 8 pc al igual que lo observado en el día 7 pc con el tratamiento temprano (Figuras 32 y 19). Los tratamientos con ONA e ICI por separado no influyeron en la expresión de CCND3. Por otro lado, los niveles de DESMINA aumentaron significativamente en respuesta al tratamiento tardío con ONA en relación a los niveles de las ratas tratadas con el vehículo (Figura 32). Datos previos del laboratorio indicaban que los SIs de 8 dpc de animales tratados con ONA tardíamente tienen un miometrio más extenso que el de los SIs de las ratas no tratadas (NT) (Vallejo, 2009). Debido a que DESMINA tiene una alta expresión en músculo, el aumento que observamos en los SIs de ratas tratadas con ONA se debería en parte a su expresión en el miometrio (Paulin y Li 2004; Korgun, Cayli y col., 2007). El tratamiento tardío con ICI no produjo variaciones en la expresión de DESMINA y en la combinación con ONA aumentó levemente en relación a las muestras NT. Este aumento en los niveles de DESMINA muy probablemente sea resultado de un proceso de diferenciación o de regresión de la DAM retrasado respecto del desarrollo en las ratas NT (Figura 32).

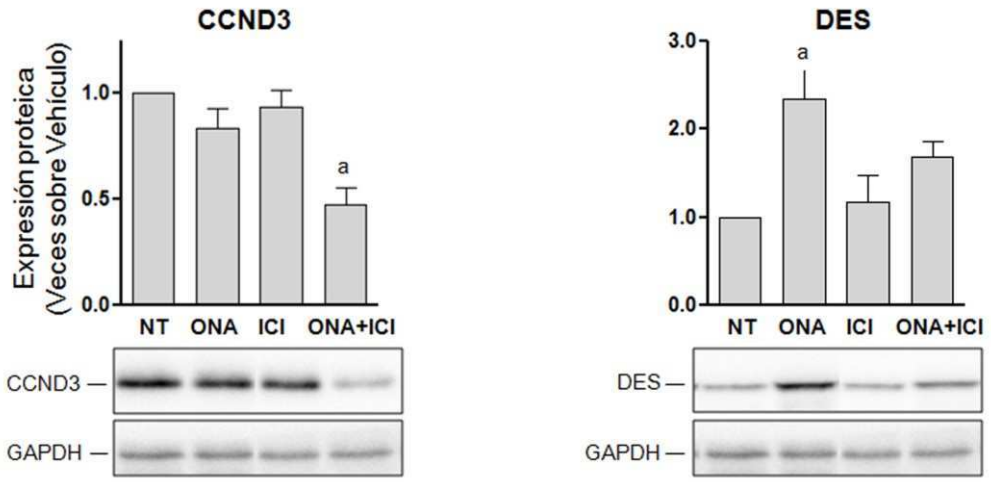


Figura 32. Efecto del tratamiento tardío con los antagonistas del RP y el RE sobre la diferenciación del estroma endometrial. *Western blot* de SIs de ratas tratadas tardíamente con el antagonista del RP, Onapristona (ONA), con el antagonista del RE, ICI182.780 (ICI), o su combinación (ONA+ICI). Las ratas control no fueron tratadas (NT). Los SIs fueron colectados en el día 8 pc. Para cada tratamiento los valores de unidades arbitrarias (UA) de las intensidades de las bandas de los *western blots* de DESMINA y CCND3 se relativizaron por los niveles de la proteína control GAPDH. Estos valores fueron luego normalizados por los valores obtenidos en SIs NT. Los valores del gráfico representan la media de las veces de cambio ± DS de tres muestras independientes. La figura muestra una imagen de un *western blot* representativo. V, Vehículo. $P < 0.05$; a, diferencia estadística v. NT.

Por lo tanto, el grado de diferenciación, medido por los niveles de marcadores de diferenciación, de los SIs de 8 dpc de ratas tratadas tardíamente con los antagonistas del RP y el RE se correlaciona con las morfologías observadas previamente en el laboratorio. En relación al tratamiento con ICI, la administración temprana y tardía tuvieron el mismo efecto en el grado de diferenciación, no encontrándose variaciones de DESMINA y CCND3 respecto a los animales no tratados. Los SIs tratados tardíamente y tempranamente con ONA+ICI presentaron una diferencia en los niveles de DESMINA en relación a los SIs NT. DESMINA no mostró variaciones en el tratamiento tardío, mientras que disminuyó en las muestras del tratamiento temprano. Esta diferencia se debería a que el tratamiento tardío resultaría ineficiente para bajar DESMINA que ya se encuentra en el día su nivel máximo en el día 6 pc.

2.2.2 Efectos de la inhibición de de la activación de ERK sobre el desarrollo tardío de la decidua

A diferencia del tratamiento temprano con ONA e ICI, el tratamiento temprano con el **inhibidor de MEK** tuvo un efecto nulo en la proliferación y diferenciación de los SIs de 7 dpc (Figuras 28 y 29). Por otro lado, observamos mediante IHQ que pERK

tiene una localización más extendida en los días 7 y 8 pc que en el día 6 pc (Figura 10).

En consecuencia, evaluamos el efecto de la inhibición de MEK sobre el **desarrollo decidual tardío**. Siguiendo el mismo esquema que para el tratamiento tardío con los antagonistas del RP y el RE, inyectamos 5 mg de PD98059/día en ratas preñadas durante los días 6 y 7 pc (Figura 30). En principio observamos que el tratamiento tardío con PD fue efectivo en reducir los niveles de activación de ERK en los SIs del día 8 pc con respecto a los niveles de las ratas tratadas con el vehículo (Figura 33).

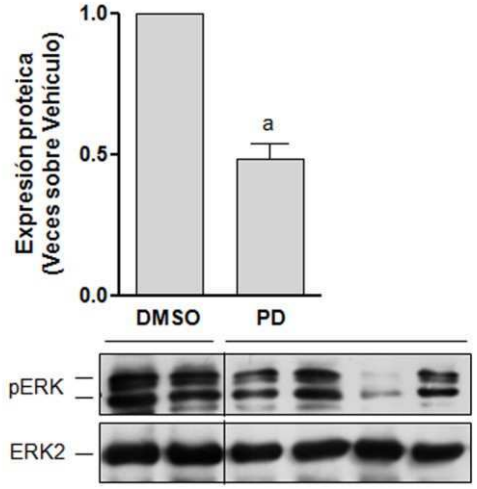


Figura 33. Tratamiento tardío con el inhibidor específico de MEK. Niveles de activación de ERK. Ratas preñadas fueron inyectadas de manera intraperitoneal con 5 mg/día PD98059 durante los días 6 y 7 pc. Las ratas control fueron inyectadas con DMSO (Vehículo). Los SIs fueron colectados en el día 8 pc. Para cada tratamiento los valores de unidades arbitrarias (UA) de las intensidades de las bandas de los *western blots* de pERK se relativizaron por los niveles de la proteína control ERK2. Estos valores fueron luego normalizados por los valores obtenidos en SIs vehículo. $P < 0.05$; a, diferencia estadística v. Vehículo.

Los SIs tratados con 5 mg de PD fueron de menor tamaño que los SIs de ratas inyectadas con DMSO (vehículo). Las cuantificaciones del diámetro (longitud M-AM) de los SIs confirmó la reducción de tamaño con respecto a los SIs de los animales tratados con el vehículo (Figura 34A). Al estudiar la morfología de la decidua en cortes transversales de los SIs teñidos con HE observamos una reducción de la extensión del tejido decidual, tanto en la zona de la DAM como en la DM (Figura 34B). Debido a la menor extensión de la DAM la zona adyacente al miometrio (adm) aumentó su extensión en proporción. En la zona U observamos mayor compactación celular que en los SIs de ratas tratadas con el vehículo. Cortes seriados del sitio de implantación evidenciaron una completa reacción de cierre del lumen uterino (Figura 34B).

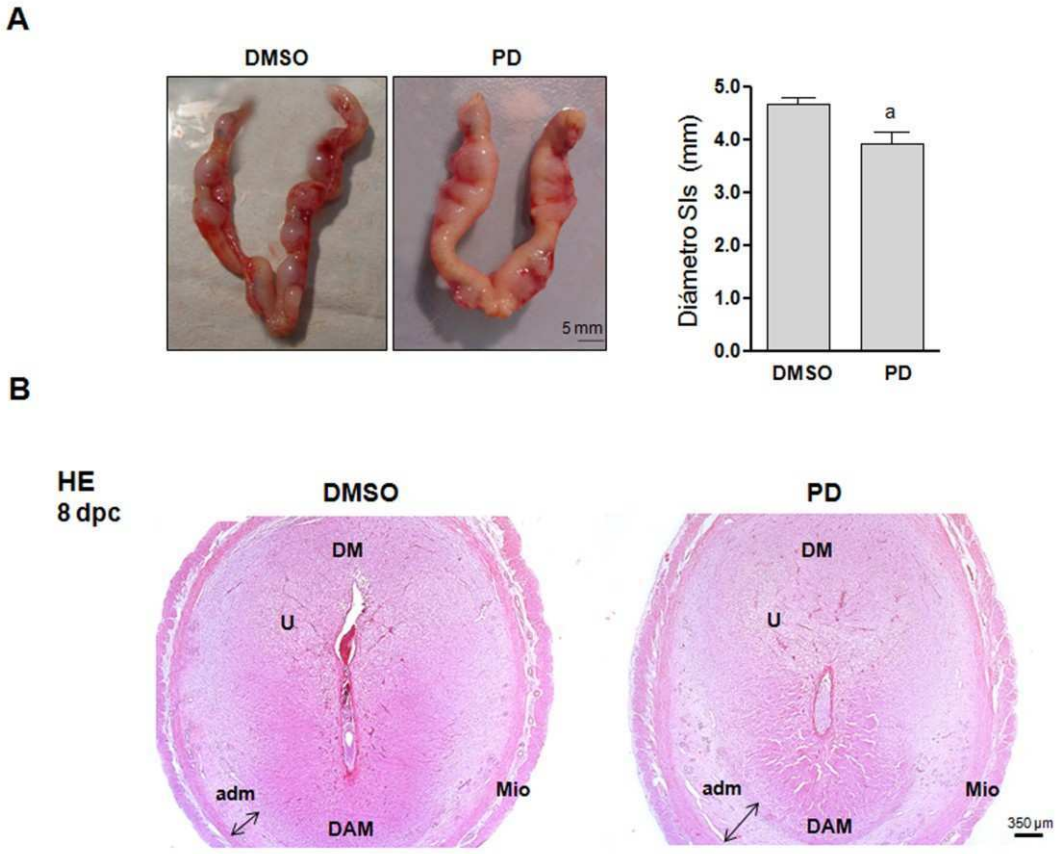


Figura 34. Efecto morfológico del tratamiento tardío con el inhibidor específico de MEK. Análisis morfológico de úteros y SIs de ratas preñadas inyectadas de manera subcutánea con 5 mg/día de PD98059 durante los días 6 y 7 pc. Las ratas control fueron inyectadas con DMSO (Vehículo). Los SIs fueron colectados en el día 8 pc y embebidos en parafina para estudios histológicos o congelados en nitrógeno líquido para el análisis de expresión proteica y de ARNm. **A) Úteros** enteros y grafico mostrando la cuantificación del diámetro de los SIs. **B)** La morfología de los SIs fue analizada por tinción con HE de cortes transversales, las distintas áreas de la decidua fueron cuantificadas. La figura muestra imagenes de tinción con HE de un SI representativo para cada tratamiento (PD o DMSO). dpc, días post-coito; HE, tinción con hematoxilina-eosina; WB, western blot, DM, decidua mesometrial; DAM, decidua antimesometrial; U, zona de unión entre M-AM; adm, zona adyacente al miometrio; Mio, miometrio. Barra: 1000 µm.

La activación de ERK regulada por la administración temprana de los antagonistas (Figuras 14A y 24), sugiere la existencia de una regulación reciproca. Para estudiar esta relación analizamos por *western blot* los niveles proteicos del **RPA, el RPB, el REα y el REβ** en extractos de SIs de ratas tratadas tardíamente con PD o vehículo (Figura 30 y 35). El tratamiento con PD disminuyó significativamente los niveles del REα pero no del REβ, mientras que los niveles del RPA y B disminuyeron levemente en relación a las ratas tratadas con el vehículo.

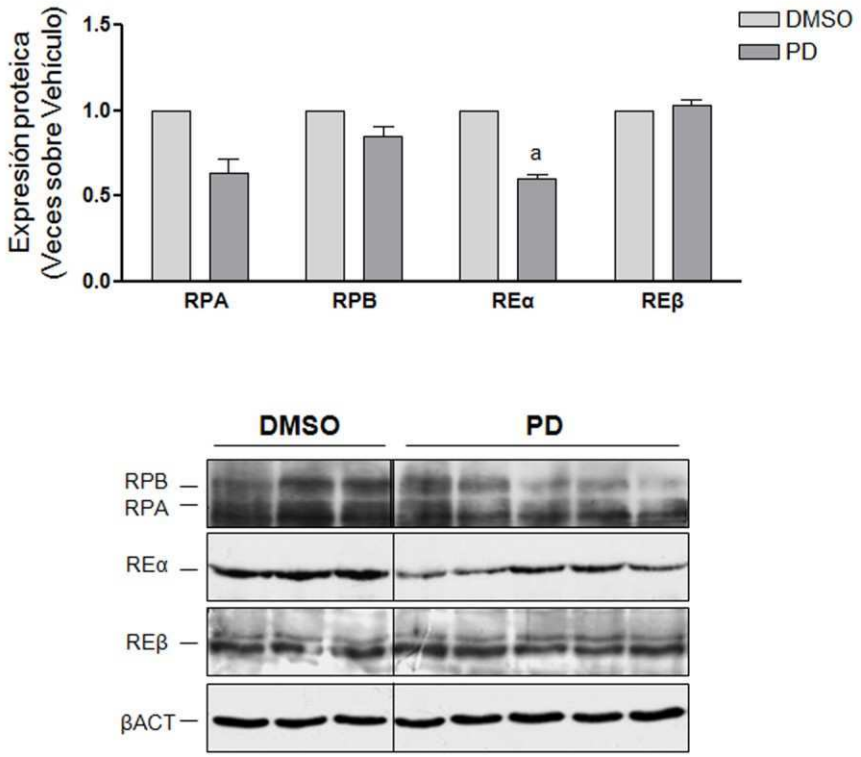


Figura 35. Efecto del tratamiento tardío con el inhibidor específico de MEK sobre la expresión del RP y el RE. *Western blot* de extractos proteicos de SIs de ratas tratadas tardíamente con 5 mg/día de PD98059 durante los días 6 y 7 pc. Las ratas control fueron inyectadas con DMSO (Vehículo). Los SIs fueron colectados en el día 8 pc. Para cada tratamiento los valores de unidades arbitrarias (UA) de las intensidades de las bandas de los *western blots* del RPA, RPB, REβ y REα se relativizaron por los niveles de la proteína control β-ACT. Estos valores fueron luego normalizados por los valores obtenidos en SIs tratados con el vehículo. Se muestra una imagen de *western blot* representativa. $P < 0.05$; a, diferencia estadística v. Vehículo.

Concluimos que la inhibición tardía de la activación de ERK, a diferencia de la inhibición temprana, tiene un efecto en el desarrollo de la decidua. La disminución en los niveles de pERK afecta la extensión de las zonas diferencias de la decidua, aumenta la diferenciación de la zona U y la reacción de cierre de los sitios de implantación en formación. Estos resultados funcionales sugieren distintos papeles para pERK en relación a su diferente localización en los SIs de 8 dpc.

- La presencia de pERK en la zona U y la mayor compactación de esta zona luego del tratamiento con PD, indican una función de ERK en la regulación del mantenimiento de un estado indiferenciación en la zona U. El estado indiferenciado, no compacto, sería necesario para el correcto desarrollo vascular.

- La presencia de pERK en la DM refuerza un papel de ERK en el desarrollo vascular de la decidua.

- La presencia de ERK en el borde de la DAM y la menor extensión de la misma en respuesta al tratamiento con PD marcan la importancia de ERK en la limitación del desarrollo de la DAM.

Por otro lado, al igual que el tratamiento con ICI regula la activación de ERK durante la decidualización, la regulación reciproca también fue detectada. Sin embargo, ICI regula la activación de ERK tempranamente, mientras que la regulación inversa se da tardíamente.

2.3. Conclusiones parciales

El **tratamiento temprano** con ONA e ICI permite estudiar la interacción entre las vías de señalización del RP y el RE durante la decidualización:

- La administración temprana de ICI revela el papel del E_2, mediada por su unión al RE, en la organización vascular de la decidua.
- La dosis de 1 mg de ONA resulta deletérea para el desarrollo de la preñez temprana.
- La administración de ONA+ICI:
    - Rescata la reabsorción de los SIs producida por 1 mg de ONA revelando que la ausencia de actividad del RP resulta más nociva para el desarrollo de la preñez que la disminución conjunta de las vías de señalización del RP y el RE. Estos resultados destacan la importancia del correcto balance de actividades del RP y el RE durante el desarrollo de la decidua y el establecimiento de la preñez temprana.
    - Este rescate genera una decidua morfológicamente normal pero con un desarrollo subóptimo incapaz de llevar el desarrollo de la preñez a término más allá de los días 10-14 pc. Este estado subóptimo es evidenciado en el día 7 pc por un menor tamaño de los SIs y la disminución de DESMINA y CCND3 en relación a los SIs de las ratas vehículo. Por otro lado la administración de ONA+ICI recupera de los niveles del RPA, RPB, REα, CX43, PCNA y pERK en relación a los tratamientos con ONA e ICI por separado. Por último, ciertos genes claves en la señalización del PR y el RE aumentan en respuesta al tratamiento conjunto: *Hand2*, *Bmp2* y *Prl8a2*.

El **tratamiento tardío** con PD98059 permite estudiar el papel de ERK activado durante la decidualización. La inhibición tardía de la activación de ERK afecta la extensión de la decidua y la reacción de cierre de los sitios de implantación en formación. En cuanto a la regulación reciproca de las vías de señalización de las hormonas esteroideas ováricas, pERK regula positivamente la expresión del REα.

Capítulo 3: CSD-C2: papel durante la decidualización y regulación por hormonas esteroideas ováricas

En nuestro laboratorio hemos caracterizado el patrón de expresión génica durante la diferenciación *in vitro* inducida por SFB-ch de las células UIII, mediante micro-arreglos de ADNc (Vallejo, Maschi y col., 2010). Dichos estudios mostraron a *Csd-c2* como el gen más sobre-regulado. Su sobre-expresión fue validada en el modelo de diferenciación *in vitro* de las células UIII y en la decidualización *in vivo* (úteros de ratas no preñadas v. SIs de 8 dpc) mediante PCR semicuantitativa (Vallejo, Maschi y col., 2010). De estos resultados surge nuestro interés por la función de CSD-C2 en el útero, donde fuimos los primeros en describir su expresión.

3.1 Expresión y regulación hormonal de *Csd-c2* durante la decidualización *in vitro*

Para estudiar la expresión de *Csd-c2* y su **regulación por hormonas esteroideas** ováricas realizamos inicialmente un abordaje *in vitro* utilizando la línea celular UIII, donde previamente describimos la expresión de *Csd-c2* (Vallejo, Maschi y col., 2010). Las células UIII se trataron en presencia de 10^{-8} M de la progestina sintética R5020 (R) y 10^{-8} M de estradiol (E_2), solos o en combinación (R+E), y 100 nM del factor de crecimiento epidérmico (EGF), previamente descripto como inductor de la decidualización en células endometriales *in vitro* (Taga, Sakakibara y col., 1995). Analizamos por RT-PCR semicuantitativa la expresión de *Desmina* y de *Csd-c2*. Dos días de tratamiento con EGF aumentaron la expresión de *Desmina* y *Csd-c2* en relación al día cero de cultivo (T0), Dicho aumento fue reforzado en el día 4 de tratamiento (Figura 36A). Los niveles de *Desmina* y *Csd-c2* también aumentaron en el día 2 de tratamiento con R, E_2 y R+E (Figura 36B). Los tratamientos con 10% de SFB-libre de esteroides (SFB-ch) y con etanol (OH, vehículo) disminuyeron los niveles de los ARNm respecto al T0 (Figura 36A). Los estímulos hormonales resultaron más eficientes que 10% SFB-ch para inducir la expresión de Desmina y Csd-c2 en las células UIII en el día 2 de cultivo.

Debido a la disminución en el nivel de los receptores de hormonas esteroideas que suele ocurrir de manera espontánea en células con un alto número de pasajes (Nishida 2002), analizamos la respuesta a hormonas en los primeros pasajes de una línea celular de endometrio uterino. Esta línea fue obtenida en nuestro laboratorio a partir de cultivos primarios de células endometriales de rata. A estas células las

denominamos UIII-like y se encuentran en proceso de caracterización. Tratamos a las células UIII-like con R+E, EGF y 10% de SFB-ch. Observamos que en el T0 de cultivo los niveles de *Desmina* y *Csd-c2* fueron altos en relación a sus niveles en el día 2 del tratamiento con etanol (OH, vehículo). Los tratamientos con R y E_2 de manera conjunta (R+E) o con EGF, al igual que lo observado en las células UIII, fueron más efectivos que 10% de suero para aumentar los niveles de *Desmina* en el día 2 de cultivo en relación a los niveles del cultivo con OH. Los niveles de *Desmina* disminuyeron en el día 4 en presencia de R+E mientras que el estimulo con EGF mantuvo sus niveles altos y, el tratamiento con 10% de suero produjo un aumento de su expresión en relación al día 2 de cultivo (Figura 36B). Los niveles de *Csd-c2* aumentaron en el día 2 en presencia de OH en un mayor nivel que los demás estímulos. La presencia de 10% SFB-ch disminuyó fuertemente sus niveles en relación al T0 y a los demás tratamientos en el día 2 de cultivo. En el día 4 observamos las mismas variaciones en la expresión de *Csd-c2* que en el día 2 de cultivo. Los aumentos en los niveles de ambos ARNm en respuesta a OH indicarían un proceso de diferenciación espontáneo. La diferenciación espontánea también fue previamente descripta para las células UIII (Prigent-Tessier, Barkai y col., 2001).

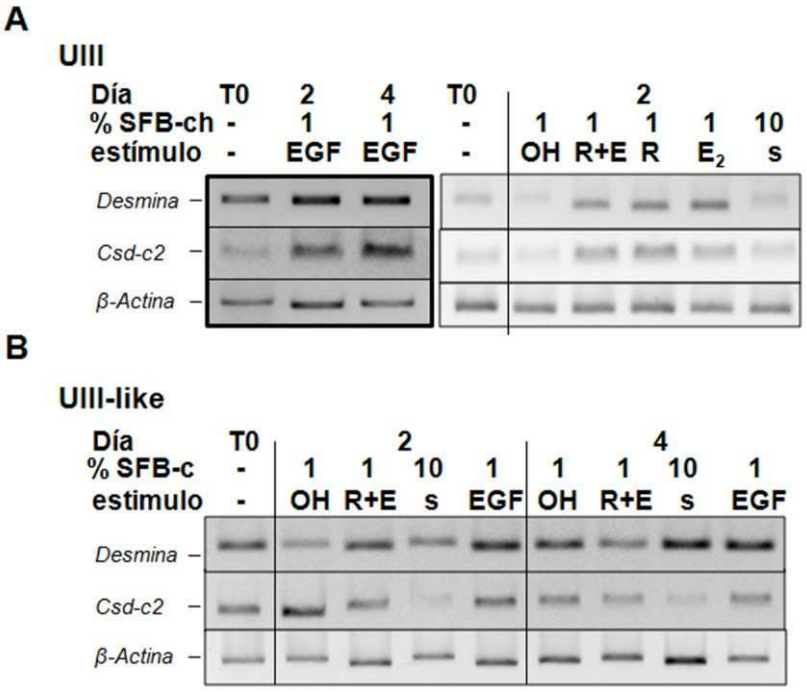


Figura 36. La expresión de *Csd-c2* y su regulación por las hormonas esteroideas ováricas y EGF *in vitro*. Las células se incubaron en medio con 1% o 10% de suero charcolizado y se estimuló con EGF 100 nM, etanol (OH - Vehículo), R5020 10^{-8}M (R), con Estradiol 10^{-8}M (E) o R10^{-8}M + E10^{-8}M (R+E) según se indica. Los tratamientos fueron continuos por 0 (T0), 2 o 4 días. La figura muestra las imágenes representativas de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio con los resultados de PCR a tiempo

final para los genes de *Desmina*, *Csd-c2* y *β-Actina* (control de carga). **A)** Células UIII. **B)** Células UIII-like, cultivos primarios.

En resumen, la decidualizacíon in vitro de las células UIII es inducida por EGF de manera más temprana que por los demás estímulos analizados. El estímulo con hormonas solas y en combinación hasta el día 2 de cultivo fue más eficiente para aumentar la expresión de Desmina y Csd-c2 que el tratamiento con 10% suero libre de esteroides. Las células UIII-like, mostraron una respuesta a R+E y a EGF aumentando los niveles de ambos ARNm analizados. Sin embargo, estas últimas células parecen diferenciar espontáneamente más rápido que las células UIII.

3.2 Expresión, regulación y función de CSD-C2 durante la decidualización *in vivo*

Resultados previos del laboratorio mostraron que los niveles de ARNm de *Csd-c2* aumentan *in vivo* en los SIs de 8 dpc en relación a su expresión en úteros de ratas no preñadas (Vallejo, Maschi y col., 2010).

3.2.1 Expresión de CSD-C2 durante la decidualización *in vivo*

Nos propusimos, por lo tanto, caracterizar la **expresión de CSD-C2 durante el desarrollo decidual**. Evaluamos por *western blot* los niveles proteicos de CSD-C2 en distintos días de la cinética de preñez temprana. Los niveles de CSD-C2 aumentaron desde día cero de preñez (ratas no preñadas - NP) hacia el día 8 pc acompañando el desarrollo de la decidua (Figura 37A). A continuación analizamos la localización de CSD-C2 en SIs de 8 dpc mediante IHQ con un anticuerpo específico. CSD-C2 se localizó en el M, el AM y en la zona U (Figura 37B). A nivel subcelular su expresión fue tanto nuclear como citoplasmática en la zona U y en la DAM, con excepción de algunos núcleos que no mostraron señal positiva. La señal de CSD-C2 en la DM fue mayormente nuclear.

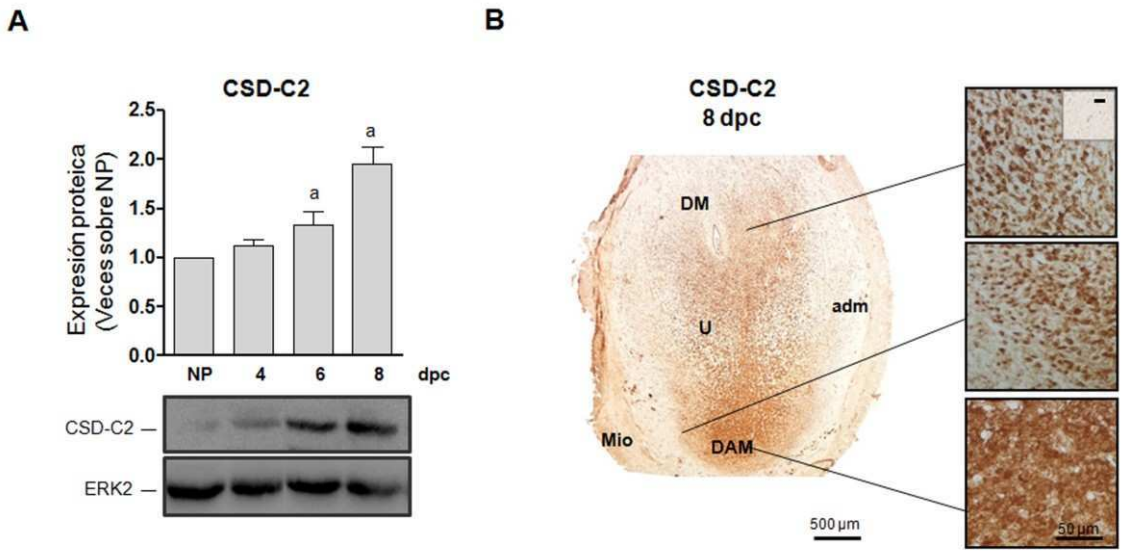


Figura 37. Expresión de CSD-C2 durante el desarrollo decidual. A) Cinética de la expresión de CSD-C2 durante la preñez. Para cada punto de la cinética (NP, 4, 6 y 8 dpc) de preñez los valores de unidades arbitrarias (UA) de las intensidades de las bandas de los *western blots* de CSD-C2 se relativizaron a los niveles de la proteína control ERK2. Estos valores fueron luego normalizados por los valores obtenidos en úteros de hembras no preñadas (NP). Los valores del gráfico representan la media de las veces de cambio ± DS de tres muestras independientes. $P < 0.05$; a, diferencia estadística v. NP. La figura muestra una imagen representativa. **B)** Cortes transversales de SIs de 8 dpc fueron analizados por inmunohistoquímica con anticuerpos específicos anti-CSD-C2. La figura muestra el SI completo y detalles de mayor aumento (20x) de las distintas áreas de la decidua. Los controles de especificidad se realizaron omitiendo el anticuerpo primario. DM, decidua mesometrial; DAM, decidua antimesometrial; U, zona de unión entre M-AM; adm, área adyacente al miometrio; Mio, miometrio. Barra: 500 µm; barra detalles: 50 µm.

3.2.2 Regulación hormonal de la expresión de CSD-C2 durante la decidualización *in vivo*

Debido a que la expresión de *Csd-c2* está regulada por las hormonas esteroideas ováricas *in vitro* (Figura 36), analizamos su **regulación por P_4 y E_2** durante la decidualización *in vivo*. Evaluamos los niveles de ARNm mediante qRT-PCR en las muestras de SIs de 7 dpc de ratas tratadas tempranamente con los antagonistas (Figuras 14A y 38). El tratamiento con 0.5 mg de ONA redujo los niveles de *Csd-c2* mientras que la dosis de 1 mg de ONA (reabsorciones) y 0,5 mg de ICI no causaron modificaciones respecto a las muestras de ratas tratadas con el vehículo. La combinación de ONA+ICI, aumentó los niveles de ARNm de *Csd-c2* respecto a los demás tratamientos (Figura 38A).

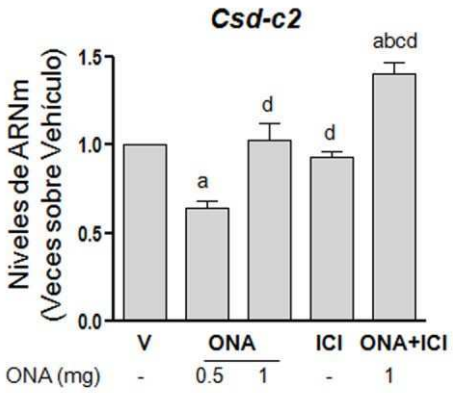


Figura 38. Efecto de la administración de los antagonistas del RP y el RE sobre la expresión de *Csd-c2* en los SIs. Cuantificación de ARNm mediante PCR en tiempo real de SIs de ratas tratadas tempranamente con el antagonista del RP, Onapristona (ONA), con el antagonista del RE, ICI182.780 (ICI), o su combinación (ONA+ICI). En los gráficos de barra los fentogramos de ARNm de *Csd-c2* relativos a los valores correspondientes a *β-Actina* fueron divididos por el nivel de expresión de mensajero de las muestras vehículo correspondientes. Los valores del gráfico representan la media de las veces de cambio ± DS de tres muestras independientes. $P < 0.05$; a, diferencia estadística v. Vehículo; b, diferencia estadística v. 1 mg ONA; c, diferencia estadística v. ICI; d, diferencia estadística v. 0.5 mg ONA.

La expresión de CSD-C2 in vivo acompaña el desarrollo de la decidua y su expresión a nivel de ARNm es regulada positivamente por P_4. Asimismo, notamos que su regulación hormonal in vivo difiere de la observada in vitro. Las diferencias en la regulación por hormonas esteroideas encontradas in vitro e in vivo, pueden deberse a la diferencia de complejidad de los modelos de estudio.

3.2.2 Evaluación de la relevancia biológica de CSD-C2

Dada la relación entre la expresión de CSD-C2, el avance de la preñez y la regulación hormonal *in vivo* e *in vitro* nos propusimos estudiar la posible **relevancia biológica de CSD-C2 en el útero**. Para ello nos centramos en el estudio de los fenotipos deciduales asociados a la pérdida de función de CSD-C2 durante la preñez temprana. Administramos de manera intrauterina (IU) ARNs pequeños de interferencia (ARNpi) específicos contra *Csd-c2*. Las inyecciones fueron administradas bajo anestesia la mañana del día 5 pc (Figura 39A). Para cubrir un rango mayor de efectividad del tratamiento con ARNpi y aprovechando la característica bicornea del útero de la rata, probamos dos concentraciones de ARNpi en paralelo. En el cuerno uterino derecho inyectamos 100 ul de una solución 100 nM y en el izquierdo una solución 10 nM de ARNpi específico contra *Csd-c2*. Las ratas Vehículo fueron inyectadas con las mismas dosis de ARNpi inespecífico (NE). Además, probamos dos

agentes de transfección diferentes, Interferina y Oligofectamina. Colectamos los SIs en el día 7 pc y analizamos por *western blot* los niveles de expresión de CSD-C2. Observamos que, independientemente de la concentración de ARNpi (10 o 100 nM) o del agente de transfección (Interferina u Oligofectamina) utilizado, los niveles de CSD-C2 disminuyeron únicamente en los SIs tratados con la solución de ARNpi específico (Figura 39B y C). Continuamos los subsiguientes estudios con los SIs de los cuernos tratados con 100 nM de ARNpi.

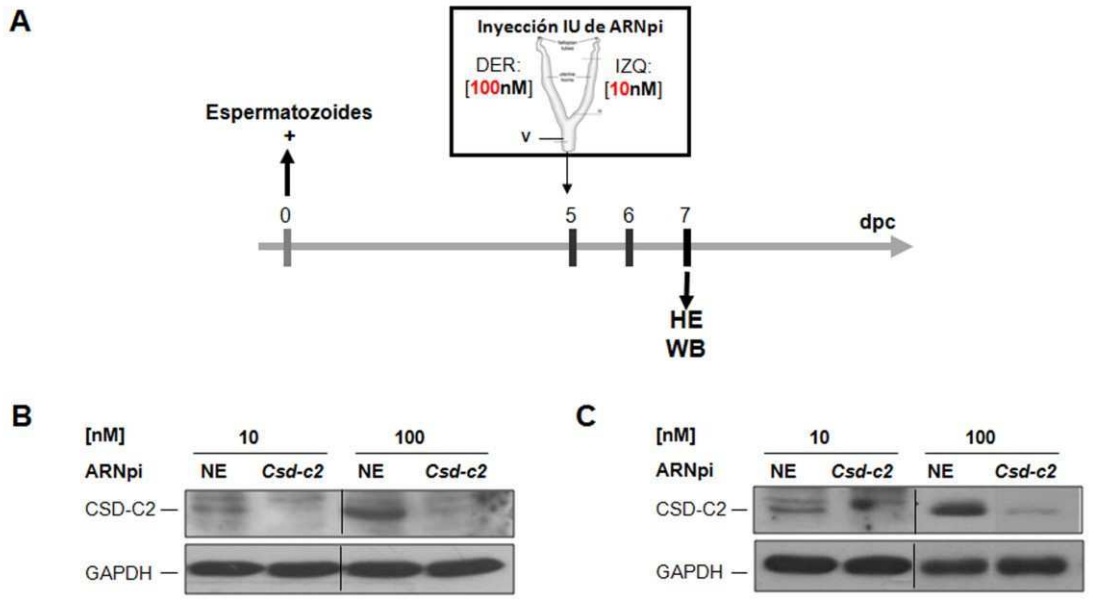
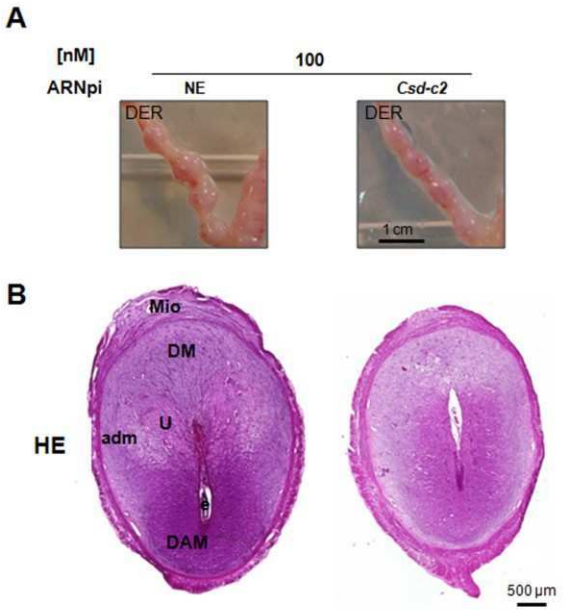


Figura 39. Efecto del tratamiento con ARN pequeño de interferencia contra *Csd-c2* sobre los niveles proteicos de CSD-C2. A) Esquema del tratamiento con ARN pequeño de interferencia. Ratas con 5 días de preñez fueron inyectadas en ambos cuernos uterinos con 100 µl de una solución 10 nM (cuerno izquierdo) y 100 nM (cuerno derecho) de ARNpi específico contra CSD-C2 o inespecífico (NE). Los SIs fueron colectados en el día 7 pc y los extractos proteicos fueron analizados por *western blot.* **B)** Niveles de CSD-C2 de muestras tratadas con ARNpi utilizando Interferina como agente de transfección. **C)** Niveles de CSD-C2 de muestras tratadas con ARNpi utilizando Oligofectamina como agente de transfección. En todos los casos se utilizó GAPDH como control de carga. Se muestra una imagen representativa. IU, intrauterina; DER, cuerno uterino derecho; IZQ, cuerno uterino izquierdo; v, vagina.

Los úteros inyectados con el **ARNpi específico para *Csd-c2* e Interferina** como agente de transfección presentaron SIs más pequeños, con menor diámetro y área decidual, respecto a los sitios de ratas inyectadas con ARNpi NE (Figura 40). En el análisis morfológico de los SIs teñidos con HE observamos un alargamiento de la zona DAM hacia el mesometrio, una DM prácticamente sin desarrollo y ausencia de desarrollo de vasos en la zona U (Figura 40 B). El porcentaje del área indiferenciada no presentó diferencias significativas entre tratamientos a pesar que las áreas diferenciadas si lo hicieron (Figura 40B).

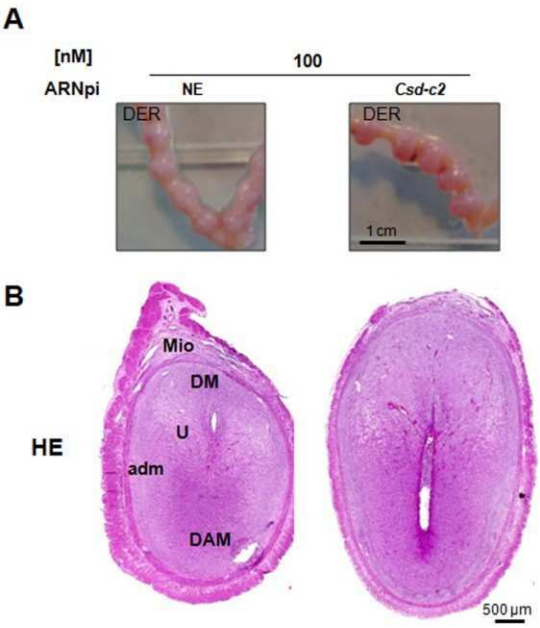


	Interferina	
ARNpi	**NE**	***Csd-c2***
# ISs/rata	14±1	11±3
Diámetro (mm)	4.3 ± 0.1	3.7 ± 0.1[a]
Area (mm²)	10.4 ± 1.1	8.6 ± 0.2[a]
DAM (%)	37.3 ± 1.1	48.8 ± 5.6[a]
DM (%)	16.7 ± 2.2	4.0 ± 0.8[a]
EI (%)	46.1 ± 1.5	47.2 ± 5.7

Figura 40. Efecto del tratamiento con ARNpi específico contra CSD-C2 utilizando Interferina como agente de transfección sobre la morfología de los SIs. A) Imagen de los cuernos uterinos derechos correspondientes al día 7 de preñez provenientes de ratas tratadas intrauterinamente con 100 µl de una solución 100 nM de ARNpi contra CSD-C2 o NE utilizando Interferina como agente de transfección. **B)** Cortes en parafina teñidos con HE de un SI representativo para cada tratamiento con ARNpi. **Tabla**. Cuantificación de las distintas áreas deciduales. La tabla muestra el número de SIs/rata/tratamiento; el promedio ± SD del área, la longitud y el porcentaje de área correspondiente a cada zona decidual relativo al área total de la decidua. DAM, decidua antimesometrial; DM, decidua mesometrial; U, zona de unión AM-M; adm, área adyacente al miometrio; Mio, miometrio; EI, estroma indiferenciado. DER, cuerno uterino derecho; NE, ARNpi inespecífico. Barra en A = 1cm, barra en B = 500µm.

Los SIs de las ratas tratadas con **ARNpi y Oligofectamina** como agente de transfección presentaron una morfología distinta a la observada utilizando Interferina. Los SIs de los úteros inyectados con el ARNpi específico contra *Csd-c2* y oligofectamina tuvieron un diámetro y área total mayores en relación con a los SIs de ratas tratados con el ARNpi NE (Figura 41). En cortes transversales de los SIs teñidos con HE observamos un área total mayor y un desarrollo más avanzado de la decidua que en los SIs tratados con ARNpi NE. En cuanto a las proporciones, la DAM no mostró diferencias significativas a pesar de presentar un área mayor que los SIs de ratas tratadas con ARNpi NE. Esto se debe a que el área total de los SIs también resultó mayor. Las demás zonas presentaron diferencias significativas: la proporción de la DM resultó de mayor, y la zona de unión (U) presentó mayor desarrollo de vasos que los SIs tratados con ARNpi NE (Figura 41B). La proporción de la zona de células indiferenciadas resultó menor en los SIs de ratas tratadas con ARNpi específico que

en los SIs de las tratadas con ARNpi NE. El embrión, por otro lado, contuvo un cono ecto-placentario más extendido en presencia del ARNpi específico (Figura 41).



	Oligofectamina	
ARNpi	**NE**	***Csd-c2***
# ISs/rata	14±1	11±3
Diámetro (mm)	3.9 ± 0.9	4.8 ± 0.1[a]
Area (mm²)	7.5 ± 0.4	11.9 ± 0.5[a]
DAM (%)	41.8 ± 2.0	41.1 ± 3.1
DM (%)	12.6 ± 2.3	20.5 ± 2.6[a]
EI (%)	45.7 ± 1.6	38.4 ± 4.9[a]

Figura 41. Efecto del tratamiento con ARNpi específico contra CSD-C2 utilizando Oligofectamina como agente de transfección sobre la morfología de los SIs. A) Imagen de los cuernos uterinos derechos correspondientes al día 7 de preñez provenientes de ratas tratadas intrauterinamente con 100 µl de una solución 100 nM de ARNpi contra CSD-C2 o NE utilizando Oligofectamina como agente de transfección. **B)** Cortes en parafina teñidos con HE de un SI representativo para cada tratamiento con ARNpi. **Tabla**. Cuantificación de las distintas áreas deciduales. La tabla muestra el número de SIs/rata/tratamiento; el promedio ± SD del área, la longitud y el porcentaje de área correspondiente a cada zona decidual relativo al área total de la decidua. DAM, decidua antimesometrial; DM, decidua mesometrial; U, zona de unión AM-M; adm, área adyacente al miometrio; Mio, miometrio; EI, estroma indiferenciado. DER, cuerno uterino derecho; NE, ARNpi inespecífico. Barra en A = 1cm, barra en B = 500µm.

Si bien los ensayos de pérdida de función mostraron resultados diferentes según el agente de transfección utilizado, en ambos casos la ausencia de Csd-c2 llevó a un aumento en la extensión de las zonas diferenciadas. En el caso de Interferina dicho aumento fue únicamente en la DAM, mientras que con Oligofectamina tanto la DAM como la DM presentaron mayor tamaño y desarrollo. En conjunto, estos resultados indican un papel de CSD-C2 como un factor limitante del desarrollo decidual.

3.2.3 Capacidad de CSD-C2 uterino para unirse a sus ARNm blancos

Por último, en colaboración con el laboratorio de la Dra. Di Liegro primer grupo en describir a CSD-C2 (Castiglia, Scaturro y col., 1996), realizamos ensayos *in vitro* de

unión de la proteína CSD-C2 uterina al ARNm de la Histona H3.3. El grupo de la Dra. Di Liegro describió a la histona H3.3 como uno de los ARNm blanco de CSD-C2 en cerebro (Nastasi, Scaturro y col. 1999). Nuestro resultados mostraron que la proteína CSD-C2 presente en los SIs de 7 días de preñez fue incapaz de unirse *in vitro* al ARNm de la histona H3.3 mientras que la proteína presente en el cerebro de rata si se unió (Figura 42).

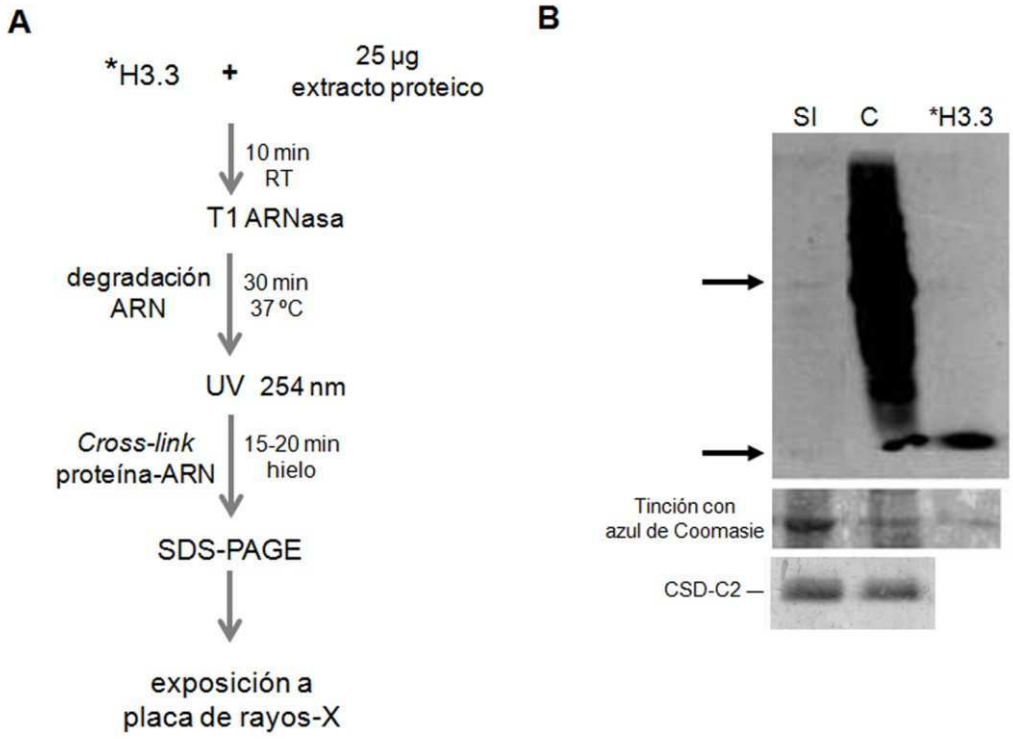


Figura 42. CSD-C2 es inefectiva para unirse *in vitro* al ARNm de H3.3. A) Esquema de protocolo seguido para el ensayo de protección contra la RNasa T1 con muestras de SIs rata del día 7 pc y de cerebro. Entre 25 y 50 µg de extractos proteicos de SIs de ratas de 7 dpc fueron incubados con el ARNm de la histona H3.3 marcado radioactivamente. Luego se incubó a 37ºC durante 30 min con la ARNasa T1 y posteriormente se trató las muestras con luz UV. Los extractos resultantes fueron analizados en gel de poliacrilamida desnaturalizante con SDS (SDS-PAGE). Los geles se revelaron por autoradiografía. **B)** Resultado del ensayo de unión descripto en A. Las calles corresponden a las siguientes muestras: 1, SI de 7 dpc; 2, control positivo: extracto de cerebro de rata; 3, control: H3.3 radioactiva. El control de carga corresponde a la imagen de proteínas totales obtenida mediante tinción del gel de acrilamida con azul de Coomasie. Se muestran los niveles correspondientes a CSD-C2 previo al ensayo.

Por lo tanto, CSD-C2 de origen uterina no pudo unirse in vitro al mensajero de H3.3, un conocido ARNm blanco en cerebro. Proponemos que existirían otros genes blanco no descriptos para la proteína CSD-C2 uterina que tendremos que investigar en el futuro.

3.3 Conclusiones parciales

Las células UIII y las células las UIII-like aumentan los niveles de expresión de *Desmina* y *Csd-c2* en respuesta al tratamiento con EGF y R+E.

La expresión de CDS-C2 in vivo acompaña el desarrollo de la decidua y sus niveles de ARNm son regulados por las hormonas esteroideas ováricas, en particular de manera positiva por P_4.

CSD-C2 uterina estaría relacionada con la inhibición de la proliferación de las células deciduales.

El ARNm de H3.3 no sería blanco de la CSD-C2 expresada en el útero, o existirían inhibidores en el extracto del día 7 pc que impedirían esta unión.

DISCUSIÓN

Localización del RP, el REα, el REβ y ERK activado en la decidua

Los receptores de las hormonas esteroideas ováricas se localizaron en toda la decidua de los SIs de 8 dpc, sin embargo presentaron distinta distribución subcelular en cada área. Observamos la presencia del RP y el REβ únicamente en el citoplasma de las células de la decidua antimesometrial (DAM), mientras que en las células de la decidua mesometrial (DM) los receptores se localizaron en el citoplasma y el núcleo. Debido a que en el día 8 pc la DAM completó su desarrollo y la DM continúa en formación, el cambio en la localización subcelular de estos receptores, del núcleo al citoplasma, correlaciona con la diferenciación avanzada de las células en la DAM respecto a la DM. Por otro lado, la presencia del RP, el REα y el REβ en un mismo compartimiento posibilitaría la acción conjunta de los receptores.

La zona de unión entre M-AM (U) y la zona adyacente al miometrio (adm) no diferencian a pesar de la presencia de los receptores hormonales. En el área U y en el borde de la DAM, límite con la zona adm, se encontró una señal nuclear fuerte de ERK activado en el día 8 pc, además de la presencia de los receptores estudiados. Esta localización conjunta en una misma área de la decidua sugiere una función de pERK como factor limitante de la diferenciación en esa zona.

La DM en el día 8 pc presenta pERK y los receptores de hormonas estudiados. Esta zona se diferencia y es donde la formación de vasos tiene lugar. La señal de pERK en la zona U y la zona DM sugiere un papel de ERK durante la angiogénesis decidual.

Por otro lado, en nuestro laboratorio se describió que el RP unido a la progestina R5020 puede interaccionar con el REβ, activando las vías ERK y AKT en el citoplasma y, de esta manera, regular la proliferación de las células UIII (Vallejo, Ballaré y col., 2005). Los resultados de presentados en esta tesis sugieren que en las células no decidualizadas de la zona U y en las células diferenciadas de la zona DM se conectarían las vías de señalización de los receptores de hormonas esteroideas con la vía de ERK.

Resultados previos del laboratorio mostraron que los niveles de proteína de estos receptores disminuyeron en distinto grado dependiendo del tratamiento tardío con los antagonistas (Vallejo, 2009; Vallejo, Mestre-Citrinovitz y col., 2011). Sin embargo, la distribución regional de PR, REβ, REα y pERK que observamos en los SIs de 8 dpc de ratas vehículo no varió en presencia de los antagonistas de Progesterona y Estradiol. Concluimos entonces que los efectos de los antagonistas sobre el RP, el

REβ y el REα estarían limitados a la regulación de los niveles de expresión y no influirían en la distribución de los mismos.

Efectos morfológicos de la acción de los antagonistas del RP y el RE

El tratamiento temprano[iii] con el antagonista del receptor de progesterona en dosis alta (1 mg) produjo los efectos más drásticos a nivel morfológico. Los sitios de implantación no tuvieron desarrollo decidual y estaban en proceso de reabsorción. Estos resultados respaldan el papel de la P_4 como la principal hormona en llevar adelante el programa de desarrollo decidual y el avance de la preñez (Lydon, DeMayo y col., 1995). Una dosis menor de ONA (0.5 mg)no produjo cambios significativos en la morfología de los SIs. Resultados previos del laboratorio (Vallejo, 2009) demostraron que dosis altas de ONA (1 mg) administradas tardíamente (días 6 y 7 pc en vez de 5 y 6 pc) provocan un efecto morfológico más drástico que una baja dosis de ONA (0.5 mg) administrada tempranamente. En ninguno de estos casos se siguió el desarrollo de la preñez más allá de los días 7 u 8 pc, por lo tanto no se tiene información acerca del porcentaje y la calidad de los SIs que llegan a término para cada tratamiento.

En base a estos resultados se puede inferir que hay un nivel mínimo de actividad del RP, asociado a un límite temporal, necesario para que la preñez se establezca. Proponemos dos posibles modelos para la relación dosis ONA / día post-coito de administración de la droga (Figura 43). En primer lugar, la existencia de un **umbral de dosis-tiempo** por encima del cual la decidualización no progresa y todos los SIs se reabsorben luego de la administración de ONA. En cambio, por debajo de ese umbral la preñez continúa su curso a término (Figura 43A). De manera alternativa, proponemos la existencia un **gradiente** de dosis de ONA en relación al tiempo de administración asociado a un continuo de resultados que van desde el desarrollo normal del embrión a la reabsorción (Figura 43B). Este gradiente quedaría encerrado entre dos curvas:

- una **curva de umbral de preñez**, por debajo de la cual la preñez no se afecta, mientras que por encima de la misma el desarrollo de la decidua es variable y el desarrollo de la preñez se no es óptimo.

- una **curva de umbral de reabsorción,** similar a la descripta para el modelo del umbral, que separa el desarrollo deletéreo del desarrollo variable de la decidua.

[iii] Siempre que se habla de **tratamiento temprano** se refiere al tratamiento de las hembras preñadas a partir del **día 5 pc** (esquema en Figuras 14, 28A y 39A). El **tratamiento tardío** en cambio se refiere al tratamiento a partir del **día 6 pc** (esquema en Figura 30).

De esta manera, este último modelo integra el concepto del modelo de la Figura 43A. Chwalisz y col., utilizando una dosis de 0.3 mg ONA administrada durante los días 5, 6, y 7 pc, describieron un efecto marginal de ONA sobre el desarrollo de la preñez. Analizaron los SIs en los días 8 y 18 pc. Los SIs de 8 dpc presentaron una menor extensión de la decidua y, algunos SIs, embriones necróticos. En el día 18 pc observaron que el número de SIs disminuyó y los embriones presentaron en peso menor en relación a las ratas tratadas con el vehículo (Chwalisz, Winterhager y col., 1999). Suponiendo que los embriones obtenidos por Chwalisz no presentaron anomalías en su desarrollo, estos resultados respaldarían al modelo esquematizado en la Figura 43A e indican que la acción de ONA sobre el establecimiento y avance de la preñez sería sitio de implantación-específica y no general sobre todos los SIs de la misma rata tratada.

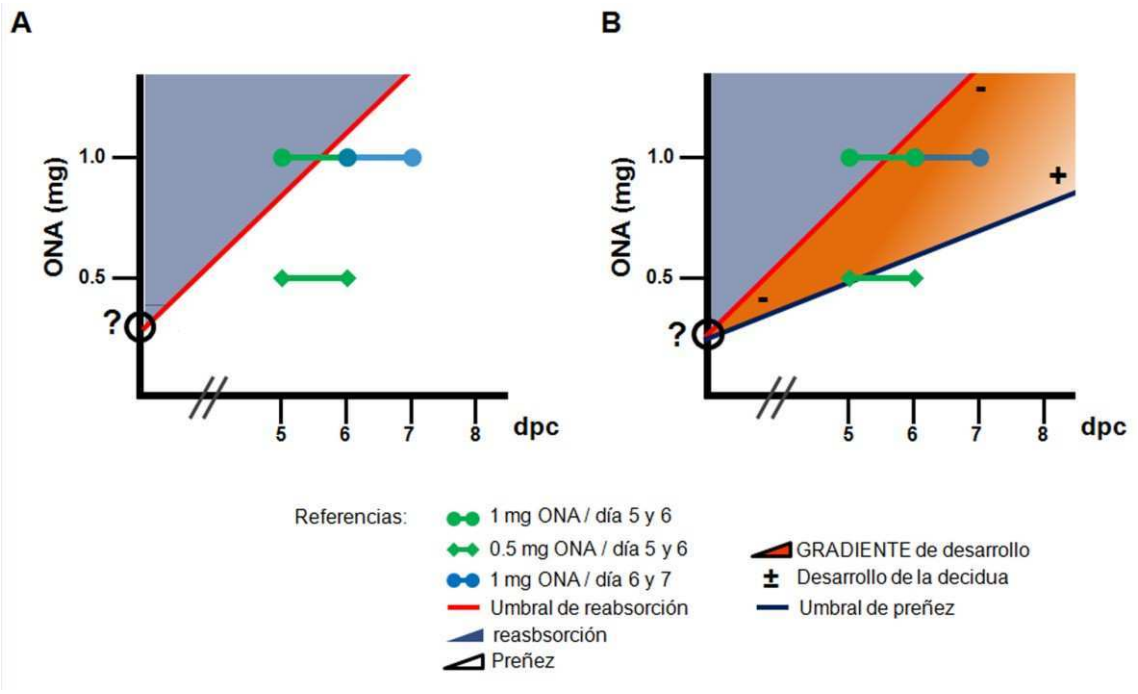


Figura 43. Modelos propuestos del efecto de ONA sobre el desarrollo de la preñez. A) Modelo del umbral. **B)** Modelo del gradiente. Nuestros resultados no nos permiten aproximar un tipo de función matemática para el comportamiento del desarrollo decidual en respuesta a las dosis de ONA y al tiempo de administración. Las rectas que se muestran son esquemáticas.

En cuanto al análisis de las reabsorciones, la morfología observada sería el resultado de un desarrollo anómalo, producido por la administración de 1 mg de ONA, concomitante con un proceso avanzado de reabsorción, que regenera al endometrio uterino a su estado no preñado. Debido a que el fenotipo observado excedería la mera

ausencia de la actividad del RP, consideramos que esta posible combinación de procesos es un factor importante a tener en cuenta en las interpretaciones de los niveles proteicos y de expresión de ARNm obtenidos en los SIs de 7 dpc de ratas tratadas con 1 mg de ONA.

El tratamiento temprano con ONA+ICI, sorprendentemente, revirtió el efecto drástico observado por el tratamiento con ONA en alta dosis. En cortes transversales del día 7 pc observamos sitios de implantación de menor tamaño pero con diferenciación del estroma a las distintas áreas deciduales en comparación a los SIs vehículo. Estos resultados indican que por más que la acción de ambos receptores esté bloqueada por sus respectivos antagonistas la actividad residual sería suficiente para un desarrollo de la decidua reducido pero apropiado. De esta manera, la ausencia de actividad del RP y el RE resultó menos deletérea que el bloqueo del RP solo. La variable que difiere entre los dos tratamientos es, en un caso, la disminución de la actividad de ambos receptores y, en el otro, la acción del RE en ausencia o baja actividad del RP. Este resultado respalda la idea de que no solo la ausencia de actividad del RP resulta en una desregulación del programa de decidualización dependiente de la progesterona, sino que la acción remanente del E_2 aporta al efecto deletéreo contra la preñez. Previamente, se ha descripto que la P_4 influye en la regulación negativa de la acción del RE (Conneely, Mulac-Jericevic y col., 2002; Kurihara, Lee y col., 2007; Li, Kannan y col., 2011). Por lo tanto, una hiperactividad del RE podría potenciar el desarrollo anormal de la decidua que lleva a la pérdida de la preñez.

El tratamiento temprano con el antagonista del receptor de estradiol produjo efectos más leves a nivel morfológico en comparación con los tratamientos con ONA (1 mg) solo o en combinación con ICI. Los sitios de implantación presentaron un tamaño normal y la decidua mostró diferenciación a las distintas áreas. Nuevamente reforzamos la idea de la P_4 como la principal hormona en dirigir el desarrollo decidual (Lydon, DeMayo y col., 1995). Por otro lado, el efecto más evidente de la acción de ICI correspondió a la desorganización de los vasos en la zona del mesometrio. Los modelos experimentales de ratones salvajes o *knockout* para REα (REKO) ovariectomizados (ovx) han sido extensamente utilizados para estudiar el papel del estradiol en el desarrollo de la decidua. En particular Curtis y col., utilizando ratones ovx tratados con P_4, y Law y col., utilizando ratones ovx tratados con P_4 e ICI182.780 + E_2, llegaron a resultados contradictorios respecto a la función de E_2 más allá de las primeras etapas de la implantación (Curtis, Clark y col., 1999; Paria, Tan y col., 1999). Estas contradicciones llevaron a Das y col. a ahondar en la investigación del papel del

estradiol durante la decidualización. Utilizando ratones ovx de manera posterior a la reacción de adhesión del blastocisto al epitelio uterino, observaron que el estradiol de origen ovárico no participa en la diferenciación decidual (Das, Mantena y col., 2009). Sin embargo, administrando a estos ratones ovx un inhibidor de la síntesis de E_2 determinaron que la producción *de novo* de E_2 en la decidua es crítica para la decidualización y la correcta angiogénesis de los sitios de implantación (Das, Mantena y col. 2009). Nuestros resultados suman evidencia para asociar la función de E_2 a la angiogénesis durante la decidualización.

Efectos de la acción de los antagonistas del PR y el RE sobre la expresión de marcadores de decidualización

En cuanto a la regulación hormonal de PCNA en la decidua, Ogle y col., estudiaron la proliferación durante el desarrollo del mesometrio decidual en ratas ovx y posteriormente tratadas con E_2, P_4 o E_2+P_4 y determinaron que la expresión de PCNA es dependiente, sólo, de la acción de la P_4 (Ogle, George y col. 1998). Mientras que la acción del E_2 sobre la proliferación endometrial estaría restringida al epitelio (Dey, Lim y col. 2004; Tong, Niklaus. y col. 2008).

En cuanto a nuestros resultados, las muestras de SIs en reabsorción en el día 7 pc mostraron baja expresión de PCNA en concordancia con su menor tamaño y la falta de desarrollo decidual, el cual involucra gran proliferación celular. Estos resultados están en concordancia con lo descripto por Ogle y col. (Ogle, George y col. 1998).

Las muestras de SIs de ratas tratadas con ICI tuvieron una leve disminución de los niveles de PCNA en correlación con la disminución del tamaño observado y en concordancia con su función en la estimulación de la proliferación del epitelio durante los primeros días post-coito y no del estroma endometrial (Tong, Niklaus. y col. 2008).

Para nuestra sorpresa, el tratamiento con ONA+ICI no produjo una diferencia significativa en la expresión de PCNA en relación al tamaño observado. El primer evento durante el desarrollo decidual que ocurre en el estroma endometrial es la proliferación celular en respuesta a los estímulos hormonales. Luego de la cual ocurre la diferenciación celular específica de cada área. Claramente, la ausencia de acción de P_4 y E_2 disminuyó la proliferación en las muestras de ONA+ICI, sin embargo los niveles de PCNA observados en el día 7 pc no lo reflejan. Esta discrepancia entre los tamaños observados y los niveles de PCNA detectados en las muestras de ONA+ICI, se debería a una recuperación de los niveles de PCNA comparables a los normales

ocurrida luego de una reducción no detectada al tiempo de análisis. . Esta recuperación de los niveles de PCNA permitiría que los SIs continúen creciendo hacia el día 10 pc como observamos.

Las fallas en el proceso de diferenciación decidual se vieron reflejadas en las variaciones de los niveles de expresión de genes cuyos productos han sido previamente relacionados con la decidualización. Entre ellos encontramos marcadores estructurales clásicos, indicadores del estado endócrino de la decidua y moléculas claves para la formación de la decidua. En particular nosotros nos centramos en el análisis de CCND3 (Tan, Raja y col. 2002), DESMINA (Glasser y Julian 1986), CX43 (Laws, Taylor y col. 2008) y *Prl8a2* (Rasmussen, Orwig y col. 1997).

En general los niveles de expresión de los marcadores analizados correlacionaron con las morfologías observadas en cada tratamiento. Los niveles bajos de todos los marcadores en las muestras tratadas con ONA en alta dosis correlacionan con la ausencia de desarrollo decidual.

Los niveles proteicos de DESMINA y CCND3, que aumentaron acompañando el progreso de la decidualización, disminuyeron con todos los tratamientos. Esto indica un menor grado de diferenciación decidual en presencia de los antagonistas. ICI disminuyó en menor medida la expresión de DESMINA y CCND3 en relación al tratamiento con ONA o a la combinación de ambos antagonistas en concordancia con el buen desarrollo de la decidua observado. En las muestras tratadas con ONA+ICI, pese a presentar diferenciación a las distintas áreas de la decidua, los niveles de ambos marcadores fueron más bajos que en las muestras vehículo, indicando un desarrollo decidual de menor calidad, subóptimo.

Los niveles de expresión de CX43, factor clave para el desarrollo decidual (Laws, Taylor y col. 2008), disminuyeron en respuesta al tratamiento con ICI en coherencia con la descripta dependencia de E_2 para la expresión de esta proteína (Grummer, Chwalisz y col. 1994). CX43 ha sido relacionada previamente con la angiogénesis de la decidua (Laws, Taylor y col. 2008; Winterhager, Gellhaus y col. 2013). Su baja expresión en las muestras de ratas tratadas con ICI correlaciona con el desarreglo en la formación de vasos observado.

Las muestras de ratas tratadas con ONA+ICI recuperaron la expresión de CX43 a niveles comparables con las muestras vehículo, indicando que la formación de uniones gap entre las células de la decidua no estaría alterada en presencia de ambos antagonistas. Por otro lado, las vías de señalización célula a célula en las que participa CX43 y que resultan importantes para el desarrollo decidual podrían no estar

afectadas permitiendo el menor, pero adecuado, desarrollo observado (Grümmer y Winterhager 2008).

En respuesta a los tratamientos con ICI, ya sea solo o combinado con ONA, *Prl8a2* estuvo fuertemente sobre-expresado, comportándose de manera diferente a los demás marcadores analizados. La baja actividad del RP y el RE durante el establecimiento de la preñez genera una situación crítica en el endometrio en proceso de decidualización. La elevada expresión de *Prl8a2* en respuesta a la baja actividad del RE y RP refuerza su importancia en la adaptación de la preñez frente a agentes o situaciones estresantes (Alam, Konno y col. 2007).

De estos resultados notamos que los marcadores de diferenciación analizados se comportan de manera diferente en respuesta al tratamiento de ONA+ICI. Aquellos marcadores relacionados con la estructura o morfología de los SIs como DESMINA y CCND3 se encuentran disminuidos en respuesta al tratamiento conjunto de los antagonistas indicando un desarrollo decidual subóptimo. Sin embargo aquellos marcadores más relacionados con las vías de señalización necesarias para llevar adelante el proceso de decidualización como CX43 y PRL8A2 presentan niveles iguales o mayores que las ratas tratadas con el vehículo. Proponemos a estos dos últimos marcadores como factores necesarios para el desarrollo decidual observado en las muestras de ratas tratadas con ONA+ICI.

Efectos de la acción de los antagonistas del PR y el RE sobre la angiogénesis

El efecto de la ausencia de actividad de P_4 y E_2 a través de sus receptores clásicos sobre la angiogénesis fue evaluado morfológicamente, por HE e inmunodetección del marcador de células endoteliales CD31, y mediante el análisis de los niveles de expresión de dos moléculas claves para el desarrollo vascular, FGF-2 y VEGFA.

Los SIs en reabsorción no fueron analizados por IHQ para CD31, pero se midieron los niveles de FGF-2 y *Vegfa*. Luego del tratamiento con ONA en alta dosis, ambos factores proangiogénicos aumentaron su expresión en relación al vehículo y a los demás tratamientos. Estas moléculas serían importantes para la reorganización del útero que se estaría llevando a cabo en las reabsorciones.

Los SIs de ratas tratadas con ICI presentaron una gran desorganización a nivel de la formación de vasos en la zona del mesometrio. Este resultado fue acompañado por un amento de CD31 en la zona U, elevados niveles de FGF-2 y , *Vegfa* mostró una tendencia a estar más elevada con respecto a los niveles del vehículo. Laws y col.

han descripto que la ausencia total de CX43 en el útero correlaciona con una disminución en la expresión de FGF-2 y VEGFA, y un menor desarrollo vascular en la decidua (Laws, Taylor y col. 2008). Recientemente, Winterhager y col., utilizando un ratón con una mutación puntual en el gen de *Conexina43* (G60S), vieron que los niveles de expresión de CX43 y la formación de uniones gap disminuían respecto de lo observado en el ratón salvaje. A diferencia de lo descripto por Laws, esta disminución de CX43 observada por Winterhager correlaciona con una mayor expresión de moléculas claves para la neoangiogénesis, *Vegfa*, *Flt1*, *Kdr* y *Ffg2*, y con un aumento en la formación de vasos (Winterhager, Gellhaus y col. 2013). La diferencia entre estos dos estudios es que en el primer caso existe una completa ausencia de CX43 y, en el segundo, la expresión de una forma no funcional para la formación de uniones célula-célula pero probablemente capaz de funcionar como traductor de señales dentro de la célula (Gellhaus, Dong y col. 2004). En los resultados presentados en este trabajo no existe una correlación entre la expresión de CX43, FGF-2 y *Vegfa* en respuesta al tratamiento con ICI. Sugerimos que la expresión no coordinada de CX43, FGF-2 y *Vegfa* contribuiría a la desorganización que se observa a nivel vascular en las muestras de ratas tratadas con ICI.

Con respecto a la regulación de la expresión de los factores proangiogénicos estudiados, la expresión de FGF-2 ha sido previamente asociada a la estimulación por el RE (Hyder y Stancel 1999), sin embargo, otros reguladores de FGF-2 han sido descriptos en la decidua de rata, como por ejemplo PRL (Srivastava, Gu y col. 1998). PRL8A2 es secretada por las células deciduales del antimesometrio (Rasmussen, Orwig y col. 1997) y podría tener un efecto paracrino en la regulación de FGF-2 en el lado del mesometrio (Srivastava, Gu y col. 1998). Como se muestra en el presente trabajo, la expresión de ARNm de *Prl8a2* aumenta en los SIs tratados con ICI solo y en la combinación con ONA. Por lo tanto, es un posible regulador positivo de la expresión de FGF-2 en las muestras de ratas tratadas con ICI.

En respuesta al tratamiento conjunto con ONA+ICI, observamos una menor formación de vasos y un aumento en los niveles de *Vegfa* en relación a las muestras tratadas con el vehículo,. Kim y col., describieron en 2013, que la angiogénesis decidual está mayormente regulada por VEGFA secretada en respuesta a P_4 por las células que expresan el RP de la DAM (Kim, Park y col. 2013). En nuestros estudios, no sabemos si los niveles proteicos de VEFGA correlacionan con los niveles a nivel de ARNm. Sin embargo, a diferencia del tratamiento con ICI, donde FGF-2 tendría una función más importante en la formación/desorganización de vasos en la decidua, en las muestras de ratas tratadas con ONA+ICI *Vegfa* sería el factor responsable de la

formación de vasos. Sus mayores niveles de expresión compensarían del subdesarrollo vascular observado en el día 7 pc. Sugerimos que la condición de desarrollo subóptimo que presentan estos SIs que estimularía una mayor expresión de determinadas moléculas en relación al vehículo, entre ellas *Vegfa*. El aumento observado se debería a la condición de desarrollo subóptimo que presentan estos SIs que estimularía una mayor expresión de determinadas moléculas en relación al vehículo.

Efectos de la acción de los antagonistas del PR y el RE sobre la expresión de dichos receptores

Los tratamientos individuales con los antagonistas, ya sea del RP o el RE, resultaron en una significativa disminución en la expresión del RPA, RPB y REα. De esta manera se confirmó el efecto regulatorio de cada hormona sobre los receptores analizados (Graham y Clarke 1997; Conneely, Mulac-Jericevic y col. 2002).

Una de las funciones del E_2 en el útero es la inducción de la expresión del RP, lo cual lleva a una sensibilización de la respuesta a P_4 (Graham y Clarke 1997). Sin embargo, Curtis y col. mediante el uso de ratones *knockout* para REα (REKO) describieron que la ausencia del aumento del RP dependiente del REα no evita el desarrollo decidual en los ratones REKO (Curtis, Clark y col. 1999). Nuestros resultados concuerdan con la regulación positiva del RP por E_2. Los niveles del RP remanentes en los SIs de ratas tratadas con ICI, cuya expresión sería independiente de E_2, resultaron suficientes para coordinar el desarrollo decidual que presentan los SIs de ratas tratadas con ICI.

La administración conjunta de ambos antagonistas recuperó los niveles de las dos isoformas del RP a niveles comparables con los niveles de las ratas vehículo. En menor medida, el tratamiento conjunto produjo un aumento de los niveles del REα en comparación con los niveles en las muestras tratadas con los antagonistas de manera individual. Este fenómeno podría contribuir al rescate de las reabsorciones observado, permitiendo que la decidualización prosiga al mantenerse altos los niveles de los receptores y evitando que se vean afectadas sus vías de señalización.

Efectos de la acción de los antagonistas del RP y el RE sobre la expresión de moléculas dependientes del RP

Hand2 y *Bmp2* se han asociado a la regulación positiva por el RP (Bagchi, Li y col. 2005; Li, Kannan y col. 2007). A la luz de estos antecedentes y dada la baja expresión del RPA y RPB que presentaron las muestras tratadas con ICI, se esperaba una menor expresión de *Hand2* y *Bmp2*, sin embargo se observó lo opuesto. Como se indicó anteriormente, Curtis y col. describieron que el aumento de PR dependiente del REα es prescindible en el desarrollo decidual en los ratones REKO (Curtis, Clark y col. 1999). Por lo tanto la disminución del RP causada por ICI podría no repercutir negativamente en los niveles de expresión de *Hand2* y *Bmp2*. Por otro lado, otras vías de señalización podrían estar desreguladas a causa de la falta de actividad del RE, como por ejemplo COUP-TFII, factor clave para la implantación y decidualización que regula la vía de Wnt-Bmp2 (Kurihara, Lee y col. 2007), y llevar al aumento detectado para estas moléculas.

Otro punto interesante a destacar es que tanto *Hand2* y *Bmp2* han sido asociadas con la regulación positiva del desarrollo vascular. Yamagishi y col., buscando factores de transcripción involucrados en el desarrollo de vasos, sugirieron un posible papel de HAND2 en la regulación de la angiogénesis durante el desarrollo embrionario de ratón (Yamagishi, Olson y col. 2000). El factor de crecimiento BMP2 ha sido también estudiado en relación a la vasculogénesis embrionaria (Hogan 1996). Con respecto a la angiogénesis postnatal, se describió que BMP2 estimula la expresión de Id1 *in vitro*, factor de transcripción clave para la angiogénesis, y la formación de vasos en tumores xenotrasplantados a ratones *nude* (Raida, Clement y col. 2005). En particular, en la decidua la expresión de *Bmp2* en SIs de 7 dpc de ratones, detectada por hibridización *in situ*, se restringe a las células del mesometrio adyacentes a las células vasculares endoteliales sugiriendo un posible papel en la angiogénesis decidual (Ying y Zhao 2000). El elevado nivel de expresión de estas dos moléculas presentes en los SIs de 7 dpc de ratas tratadas con ICI podría estar relacionado con el anormal fenotipo vascular observado. Por otro lado, los altos niveles de *Hand2* tendrían relación con la sobre-expresión de *Prl8a2* observada. Sin embargo, la contribución de HAND2 a la regulación de la expresión de PRL no está aún del todo clara (Huyen y Bany 2011).

Los niveles bajos de *Hand2* y *Bmp2* detectados en respuesta al tratamiento con ONA eran esperados dado que la expresión de ambas moléculas ha sido previamente relacionada a la regulación por P_4 (Bagchi, Li y col. 2005; Li, Kannan y col. 2007). Se ha demostrado que HAND2 es uno de los mediadores del efecto de las hormonas esteroideas para el desarrollo de la preñez (Huyen y Bany 2011). Li y col., a través del uso de ratones *knockout* condicional para el gen del RP, demostraron que la ausencia

de la expresión de *Hand2* inducida por la falta de acción de P_4 conlleva a una continua estimulación de las vía del receptor de estradiol. La ausencia de HAND2 resulta en una mayor fosforilación y actividad del RE. La dominancia de la vía del RE estimula la expresión de FGFs (FGF-1, -2, -9 y -18), la proliferación de las células epiteliales y la continua expresión de MUC1, repercutiendo negativamente en la adhesión del blastocisto al epitelio uterino e inhibiendo la implantación (Li, Kannan y col. 2011). En concordancia con estos estudios, nosotros encontramos una baja expresión de *Hand2* y una alta expresión de FGF-2 en los SIs de ratas tratadas con ONA en alta dosis. Otras moléculas reguladas por RP han sido relacionadas a la modulación de la respuesta a RE durante la implantación del blastocisto, como por ejemplo COUP-TFII (Kurihara, Lee y col. 2007). Al igual que HAND2, COUP-TFII también participa el proceso de decidualización (Lee, Kurihara y col. 2010). Lee y col. demostraron que el tratamiento con ICI en ratones deficientes de COUP-TFII revierte las fallas en el establecimiento de la preñez, a la vez que, recupera los niveles de expresión de Wnt4 y Bmp2 (Lee, Kurihara y col. 2010). Estos resultados sumados al desarrollo subóptimo que observamos cuando ambos receptores tienen sus actividades disminuidas nos llevan a sugerir que la hiperactivación del RE contribuye fuertemente al fenotipo deletéreo observado en ausencia de actividad del RP.

La inactivación de ambos receptores, RP y RE, tiene un efecto positivo en la expresión de *Hand2* y *Bmp2*, superando la estimulación del tratamiento con ICI solo. Estos resultados indicarían un posible efecto compensatorio, de ¨rescate¨, a través de otras vías de señalización. Los altos niveles de *Vegfa* estarían también relacionados con este efecto compensatorio de rescate que proponemos.

Regulación hormonal de la activación de ERK y relación con la angiogénesis

La regulación hormonal de la activación de ERK sugiere la importancia de pERK para el desarrollo de la decidua. Los niveles altos de pERK en las muestras tratadas con ONA+ICI podrían ser, en parte, responsables del rescate de las reabsorciones inducidas por ONA que produce el tratamiento con ICI.

La zona U, zona especializada que separa las dos áreas de la decidua, no experimenta diferenciación decidual pese a la presencia de los receptores de E_2 y P_4. Esta zona parecería ser una estructura base importante para el desarrollo de la vasculatura decidual que mantendrá al embrión hasta la formación de una placenta funcional. La presencia de un tejido decidual compacto impediría el desarrollo angiogénico. La distribución de ERK activado en la zona de unión de la decidua del día

7 pc, su correlación con la localización de CD31, y su posterior avance hacia el mesometrio en el día 8 pc, hacia donde la vasculatura continúa su formación, refuerzan la posible relación de ERK con la angiogénesis. La disminución de pERK y su ausencia en la zona U de la decidua en respuesta al tratamiento con ICI contribuiría a la desorganización de la angiogénesis. Esta hipótesis está, además, respaldada por un trabajo de Thienel y col. en el cual describieron la colocalización de iNOS y pERK en las células endoteliales de los vasos de la zona U de la decidua (Thienel, Chwalisz y col. 2002). Por otro lado, la correlación entre la localización de pERK y CD31, observada en el día 7 pc, se pierde en el día 10 pc de ratas tratadas con el vehículo, donde se observa una localización antagónica, pero en los SIs de 10 dpc de ratas tratadas con ONA+ICI se mantiene. La presencia de ERK activado en estos SIs podría ser un indicio de un proceso de decidualización retrasado en relación a los SIs vehículo y/o estar compensando la ausencia de otras moléculas de señalización para el correcto desarrollo de la decidua mesometrial y la vasculatura.

Papel de ERK durante el desarrollo decidual

Los resultados de los tratamientos con el inhibidor de MEK indican que la activación de ERK tendría un papel más importante en el desarrollo decidual tardío. El tratamiento temprano con PD98059 administrado de manera contínua y local en el lumen uterino no tuvo efectos notorios en la morfología de los SIs en relación a los controles tratados con el agente vehículo (1% DMSO). Scherle y col. describieron que la decidualización artificial en ratón no estaría afectada por la inhibición temprana de la activación de ERK inducida por la administración sistémica de SL327 o U0126, ambos inhibidores de MEK (Scherle, Ma y col. 2000).

El tratamiento tardío sistémico con PD98059 produjo cambios importantes a nivel de la organización de la decidua en relación al vehículo. La inhibición más tardía de la activación de ERK redujo la extensión de la decidua mesometrial y antimesometrial mostrando un papel positivo de ERK en el crecimiento del tejido decidual. La inhibición de la activación de ERK, además, aumentó la diferenciación y compactación de la zona de unión entre el M-AM. Este fenotipo sugiere que el déficit en las vías de señalización dependientes de ERK llevan a un desbalance en la proliferación de las células de la decidua mesometrial y antimesometrial en favor de la diferenciación de las células de la zona U. La compactación observada a nivel de la zona U refuerza la hipótesis de la función de ERK limitando la diferenciación y

manteniendo la regionalización del proceso de decidualización. ERK, de este modo, gobernaría la distribución de los vasos en la decidua.

Los resultados obtenidos comparando el tratamiento temprano y tardío con PD son coherentes con la cinética de activación y de localización de ERK durante el desarrollo de la decidua. A pesar de que en conjunto estos resultados indican que la activación de ERK tendría un papel más importante en el desarrollo decidual tardío, debemos destacar que la diferencia observada entre el tratamiento temprano y tardío podría deberse a los diferentes métodos de administración de PD utilizados en cada protocolo. En el caso del tratamiento temprano el PD fue administrado continuamente, a una concentración constante, en el lumen uterino. De esta manera nos aseguramos que el inhibidor de MEK alcance el estroma uterino. En las inyecciones intraperitoneales aplicadas en el protocolo tardío, un gran volumen de droga se administró en el abdomen, donde se diluye hasta alcanzar una concentración desconocida. El PD llega al estroma uterino directamente por difusión a través de la cavidad abdominal (en este caso no hay una barrera de células epiteliales que le impidan el pasaje, como puede pasar con la administración localizada en el lumen uterino) o por sangre a través de la vena porta, posiblemente con pérdidas de la concentración de PD a nivel del hígado. Estas diferencias de acceso de la droga a su órgano blanco hacen que el uso de mini bombas osmóticas presente ventajas sobre la administración mediante inyección intraperitoneal. La ausencia de efectos observados a tiempo temprano podría deberse a que a nivel del útero las dosis de PD utilizadas en las mini bombas resultaron menores que la dosis utilizada en las inyecciones o que la administración continúa no resulta en un efecto tan drástico como la administración intraperitoneal.

En relación al efecto de la inhibición de la activación de ERK sobre la expresión de los receptores de hormonas esteroideas, la expresión del REα disminuyó con el tratamiento tardío con PD98059. La morfología observada con el tratamiento tardío con ICI (Vallejo 2009) resulta muy distinta a la que observamos en respuesta a la inhibición tardía de MEK. Sugerimos que los efectos en la decidualización que presentamos en este trabajo en respuesta al tratamiento tardío con PD98059 no estarían relacionados con la acción indirecta de la inhibición de la activación de ERK a través de la baja expresión del REα. Varios estudios indican que ERK regula a REα mediante fosforilación (Kato, Endoh y col. 1995; Murphy, Skliris y col. 2009), y en células de cáncer de mama la activación de ERK es capaz de regular los niveles de expresión del REα pero de manera opuesta a lo que nosotros describimos (Oh, Lorant y col. 2001). En el presente trabajo observamos la presencia del REα en los núcleos

de las células de la DAM en el día 8 pc, pero no de los otros receptores analizados. Esta localización específica de este receptor y su regulación dependiente de ERK indicarían que REα sería un posible mediador del efecto de ERK en relación a la extensión de la DAM. En resumen, nuestros resultados indican que la activación de ERK durante la decidualización es necesaria para regular los niveles de expresión del REα, mantener la capacidad proliferativa del estroma y limitar el proceso de diferenciación en regiones especificas del tejido decidual.

CSD-C2 y su papel durante la decidualización

Las morfologías observadas en los SIs luego de la transfección del ARNpi específico contra *Csd-C2* resultaron diferentes dependiendo del agente de transfección utilizado. Distintos agentes pueden transfectar con distinta eficiencia distintos tipos celulares. La decidualización involucra una gran variedad de tipos celulares que se van modificando y adquiriendo nuevas características a la vez que pierden otras. Sugerimos que los distintos agentes de transfección, Oligofectamina e Interferina, transfectaron con eficiencia variable distintas poblaciones de las células presentes en la decidua en formación. Causando, en consecuencia, un diferente acceso de los ARNpi a las células.

De todas maneras, los resultados obtenidos mostraron en ambos casos un incremento en el tamaño de las áreas diferenciadas de la decidua. Nuestra caracterización de CSD-C2 durante el establecimiento de la preñez en rata nos indica que esta novedosa proteína podría tener una función importante en el desarrollo de la decidua inhibiendo la proliferación decidual y, posiblemente, limitando la diferenciación de las células deciduales mesometriales y antimesometriales. En ausencia de CSD-C2 no se limitaría la proliferación y diferenciación de las distintas áreas, las cuales se extendieron en mayor proporción que en los SIs vehículo. Interferina actuaría solo sobre las células de la DAM, provocando la mayor extensión de esta zona. En cambio la oligofectamina afectaría también a las células de la DM generando cambios en ambas zonas de la decidua. Nastasi y col. asociaron previamente a CSD-C2 con la diferenciación terminal de cierto tipo de neuronas en rata (Nastasi, Scaturro y col., 1999), según lo que indican nuestros resultados, en útero CSD-C2 tendría un efecto más importante sobre la limitación de la proliferación y como efecto secundario un incremento en la diferenciación.

Por último, se ha descripto que CSD-C2 se regula por modificaciones post-traduccionales que podrían llegar a afectar su capacidad de unirse a sus ARNm

blanco. Bono y col. describieron que la acción de las hormonas tiroideas induce la sumoilación de CSD-C2 durante el desarrollo del cerebro en rata (Bono, Compagno y col. 2007). La sumoilación de CSD-C2 aumentaría su localización en el núcleo donde tendría una participación en las etapas más tempranas de metabolismo de ARNm. Por otro lado, CSD-C2 también es blanco de fosforilación (Nastasi, Scaturro y col. 1999; Auld, Campbell y col. 2005) y se ha postulado que solo la fracción más ácida de CSD-C2, probablemente la fosforilada, es la que tiene la capacidad de unirse a sus ARNm blanco descriptos (Nastasi, Scaturro y col. 1999). La falta de unión de CSD-C2 uterina al ARNm de la histona H3.3 que observamos estaría relacionado con las distintas modificaciones post-traduccionales que presenta CSD-C2 en útero en el día 7 pc y en cerebro o con la presencia de inhibidores de su interacción en los extractos proteicos. Por el momento solo se han descripto dos ARNm blanco de CSD-C2, H1° y H3.3, por lo que no podemos descartar la existencia de otros no identificados aún.

Hipótesis sobre preñez y adaptación

El correcto desarrollo de la preñez es lo que posibilita la conservación a aquellas especies que se reproducen sexualmente con fertilización interna. Por lo tanto, es lógico que un proceso tan importante tenga una fina regulación en el alcance de un resultado óptimo. La existencia de mecanismos redundantes que actúen frente a posibles fallas ocurridas a lo largo de la preñez posibilita un mayor número de nacimientos. Nuestros resultados muestran que la ausencia, durante los primeros días de preñez, de la acción de progesterona a través de su receptor clásico, el RP, no puede ser compensada con otras vías de señalización, resultando en la reabsorción de los SIs.

La administración conjunta del antagonista del receptor de estradiol, ICI182.780, y el antagonista del receptor de progesterona, Onapristona, produce un desarrollo decidual de condición subóptima. En el día 7 pc se observó una decidua de menor tamaño que en los SIs de ratas vehículo, que presentó todas las áreas deciduales y una marcada disminución de 2 de los 4 marcadores de diferenciación analizados, indicando el desarrollo de una decidua de menor calidad. Por otro lado, el efecto de los antagonistas no produjo cambios en los niveles del RPA, el RPB, mostró un leve aumento de pERK y un aumento de las moléculas importantes para el desarrollo decidual analizadas, *Bmp2* y *Hand2,* y de *Prl8a2*. Sobre las bases de estos resultados, creemos que la baja actividad de los receptores podría haber activado vías de rescate que derivaron en el aumento de las moléculas observadas. Sin embargo, la

sobre-expresión de estos agentes claves no alcanzó para lograr el rescate de la preñez a término.

La figura 44 muestra en un esquema de la relación entre los niveles de activación de las vías de activación del RP y el RE propuesta a partir de estos resultados. En ausencia de antagonistas y con los niveles adecuados de P_4 y E_2, el balance correcto de las acciones de dichas hormonas durante la preñez se mantendría y se llegaría a término. En presencia de ONA la actividad del RP baja y proponemos que en consecuencia se desregula la actividad del RE, aumentando sus vías de señalización. Un mecanismo posible es la ausencia de la inhibición que HAND2 produce sobre el RE. Estas vías de señalización activadas inadecuadamente sumadas a la ausencia de actividad del RP durante los días 5 y 6 pc llevarían a la pérdida de la preñez de manera temprana. La administración conjunta de ONA+ICI bloquearía la desregulación del RE y, debido a la situación no óptima de los niveles de actividad del RP y el RE, posiblemente activaría vías de ¨rescate¨ permitiendo un desarrollo subóptimo de la decidua. En nuestro estudio, este desarrollo no fue suficiente para llevar la preñez a término.

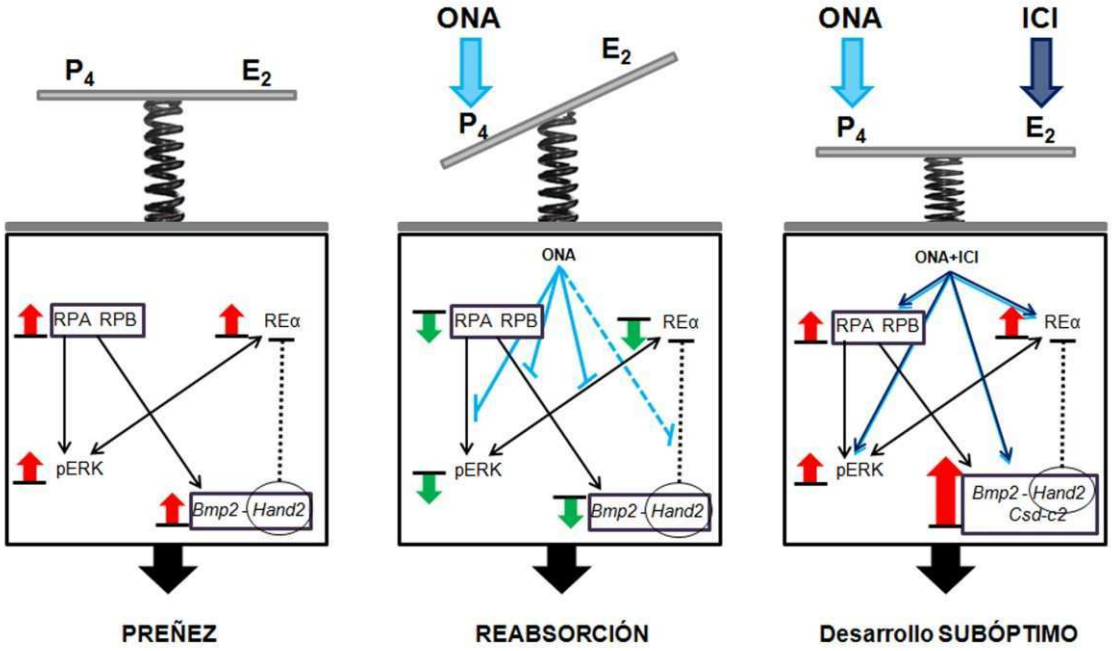


Figura 44. Modelos propuestos del efecto de 1 mg de ONA sobre el desarrollo temprano de la preñez y el rescate por ICI. Las flechas con línea llena indican las regulaciones descriptas por los resultados presentados en esta tesis; las flechas a rayas indican posibles regulaciones no comprobadas en esta tesis; la flecha punteada indica el mecanismo inhibitorio propuesto para la regulación de la actividad del RE. Hand2 regularía la actividad del RE durante el desarrollo decidual y la ausencia de esta regulación, debido a la administración de ONA, llevaría a aumento en la actividad del RE afectando tempranamente el avance de la preñez. Este efecto deletéreo es parcialmente rescatado por la administración conjunta de ONA+ICI, que restituye en balance de actividades entre el RP y el RE durante el desarrollo de la decidua y el establecimiento de la preñez.

CONCLUSIONES

La **ausencia de la actividad del RP** resulta en una **desregulación** del programa de decidualización dependiente de progesterona e influye en la desregulación de la acción del RE, potenciando un desarrollo anormal de la decidua que lleva a la pérdida de la preñez.

La disminución en la actividad de los receptores de progesterona y estradiol llevaría a la activación de **vías de rescate**, posiblemente mediadas por la activación de ERK y por el aumento de *Hand2* y *Bmp2*.

Al activarse, estas vías de rescate desarrollarían una **decidua subóptima**, incapaz de llevar la preñez a término. El bloqueo del RP y el RE al comienzo de la preñez, no puede ser revertido tardíamente.

La presencia conjunta del RPA, el RPB, el REβ y el REα en los núcleos de las células de la **decidua mesometrial** de los sitios de implantación de 8 pc indica una posible acción coordinada de los cuatro receptores en el desarrollo de esta área.

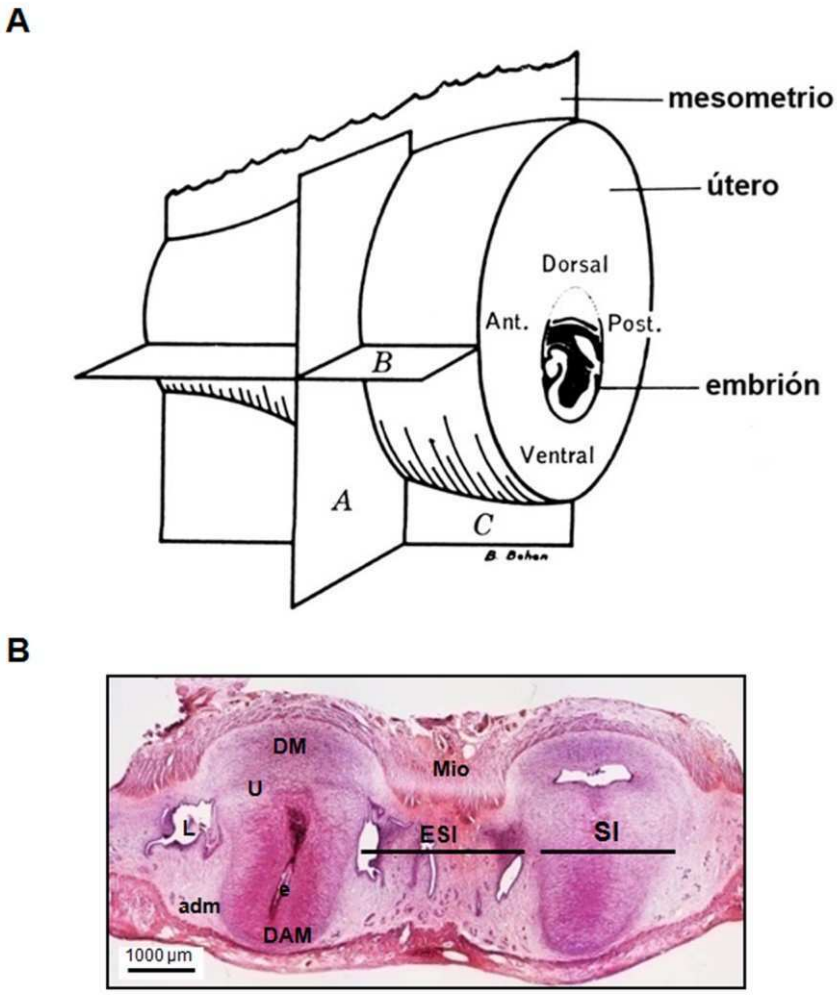
La presencia conjunta del RP, el RE y pERK en la zona de células indiferenciadas de la **zona de unión** entre la decidua mesometrial y antimesometrial en los sitios de implantación de 8 pc indica un papel de pERK en la limitación de la diferenciación a decidua de las células de esa zona.

La morfología observada en los SIs de 8 dpc luego del tratamiento tardío con PD98059 refuerza el **papel de pERK limitando la diferenciación** de las células de la zona U.

La regulación de los niveles del REα por pERK y los fenotipos observados luego del tratamiento temprano con el antagonista del RE y el tratamiento tardío con el inhibidor de MEK indican la importancia de estas dos moléculas para el correcto **desarrollo vascular** en la decidua.

La proteína **CSD-C2** tendría un papel importante inhibiendo la proliferación de las células estromales.

ANEXO



Anexo. Orientación de los ejes de corte de sitios de implantación. A) Esquema de un SI de rata con los distintos ejes de corte posibles. **C)** Imagen de corte frontal al embrión y sagital al útero de dos SIs de implantación contiguos. Ov, ovario; A, corte sagital al embrión - transversal al útero; B, corte transversal al embrión - horizontal al útero; C, corte frontal al embrión - sagital al útero; L, lumen uterino; DM, decidua mesometrial; DAM, decidua antimesometrial; U, zona de unión entre M-AM; adm, área adyacente al miometrio; Mio, miometrio. . ESI, zona entre-sitios de implantación; SI, sitio de implantación. Barra: 1000 µm.

Fe de erratas

1.

En la figura 12A describo una disminución en los niveles de expresión de CCND3 de manera posterior al día 7pc. Dicha disminución es una tendencia y no una diferencia estadísticamente significativa.

2.

En los gráficos de la figura 22:

> Los niveles de expresión de RPA y RPB de las muestras tratadas con ONA+ICI son significativamente diferentes a los niveles de RPA y RPB resultantes del tratamiento con ONA.

En el gráfico de la figura 24A:

> Los niveles de activación de ERK de las muestras tratadas con ONA+ICI son significativamente diferentes de los niveles de activación de ERK resultantes de los tratamientos con ONA e ICI por separado.
>
> Los niveles de activación de ERK de las muestras tratadas con ICI son significativamente diferentes a los niveles de activación de ERK resultantes del tratamiento con ONA solo.

REFERENCIAS

Alam, S. M., T. Konno, y col. (2007). "A uterine decidual cell cytokine ensures pregnancy-dependent adaptations to a physiological stressor." Development 134(2): 407-15.

Alessi, D. R., A. Cuenda, y col. (1995). "PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo." J Biol Chem 270(46): 27489-94.

Auld, G. C., D. G. Campbell, y col. (2005). "Identification of calcium-regulated heat-stable protein of 24 kDa (CRHSP24) as a physiological substrate for PKB and RSK using KESTREL." Biochem J 389(Pt 3): 775-83.

Bagchi, I. C., Q. Li, y col. (2005). "Use of the progesterone receptor antagonist RU 486 to identify novel progesterone receptor-regulated pathways in implantation." Semin Reprod Med 23(1): 38-45.

Ballare, C., G. Vallejo, y col. (2006). "Progesterone signaling in breast and endometrium." J Steroid Biochem Mol Biol 102(1-5): 2-10.

Bany, B. M. y J. C. Cross (2006). "Post-implantation mouse conceptuses produce paracrine signals that regulate the uterine endometrium undergoing decidualization." Dev Biol 294(2): 445-56.

Bell, S. (1983). "Decidualization: regionalization differentiation and associated." Oxf Rev Reprod Biol 1983; 5:220-271.

Bono, E., V. Compagno, y col. (2007). "Thyroid hormones induce sumoylation of the cold shock domain-containing protein PIPPin in developing rat brain and in cultured neurons." Endocrinology 148(1): 252-7.

Castiglia, D., A. Cestelli, y col. (1994). "H1(0) and H3.3B mRNA levels in developing rat brain." Neurochem Res 19(12): 1531-7.

Castiglia, D., M. Scaturro, y col. (1996). "PIPPin, a putative RNA-binding protein specifically expressed in the rat brain." Biochem Biophys Res Commun 218(1): 390-4.

Chomczynski, P. y N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem 162(1): 156-9.

Chwalisz K, Winterhager E, y col. (1999). "Synergistic role of nitric oxide and progesterone during the establishment of pregnancy in the rat." Hum Reprod 14(2):542-52.

Cohen, H., J. F. Pageaux, y col. (1993). "Normal rat uterine stromal cells in continuous culture: characterization and progestin regulation of growth." Eur J Cell Biol 61(1): 116-25.

Conneely, O. M., B. Mulac-Jericevic, y col. (2002). "Reproductive functions of progesterone receptors." Recent Prog Horm Res 57: 339-55.

Curtis, S. W., J. Clark, y col. (1999). "Disruption of estrogen signaling does not prevent progesterone action in the estrogen receptor alpha knockout mouse uterus." Proc Natl Acad Sci U S A 96(7): 3646-51.

Das, A., S. R. Mantena, y col. (2009). "De novo synthesis of estrogen in pregnant uterus is critical for stromal decidualization and angiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A 106(30): 12542-7.

Das, R. M. y L. Martin (1978). "Uterine DNA synthesis and cell proliferation during early decidualization induced by oil in mice." J Reprod Fertil 53(1): 125-8.

Das, S. K., H. Lim, y col. (1999). "Cyclin D3 in the mouse uterus is associated with the decidualization process during early pregnancy." J Mol Endocrinol 22(1): 91-101.

Ziegler, D., R. Fanchin, y col. (1998). "The hormonal control of endometrial receptivity: estrogen (E2) and progesterone." J Reprod Immunol 39(1-2): 149-66.

DeLisser, H. M., P. J. Newman, y col. (1993). "Platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31)." Curr Top Microbiol Immunol 184: 37-45.

Dey, S. (1996). " Implantation." Reproductive endocrinology, surgery and technology. New York 421–434.

Dey, S. K., H. Lim, y col. (2004). "Molecular cues to implantation." Endocr Rev 25(3): 341-73.

Di Liegro, C. M., G. Schiera, y col. (2013). "Identification in the rat brain of a set of nuclear proteins interacting with H1 degrees mRNA." Neuroscience 229: 71-6.

Di Paola, R., M. Galuppo, y col. (2010). "PD98059, a specific MAP kinase inhibitor, attenuates multiple organ dysfunction syndrome/failure (MODS) induced by zymosan in mice." Pharmacol Res 61(2): 175-87.

Dukes, M., D. Miller, y col. (1992). "Antiuterotrophic effects of a pure antioestrogen, ICI 182,780: magnetic resonance imaging of the uterus in ovariectomized monkeys." J Endocrinol 135(2): 239-47.

Edwards, D. P., M. Altmann, y col. (1995). "Progesterone receptor and the mechanism of action of progesterone antagonists." J Steroid Biochem Mol Biol 53(1-6): 449-58.

Evans, R. M. (1988). "The steroid and thyroid hormone receptor superfamily." Science 240(4854): 889-95.

Faus, H. y B. Haendler (2006). "Post-translational modifications of steroid receptors." Biomedicine & Pharmacotherapy 60 (2006) 520–528.

Ferrara, N. (1999). "Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor." J Mol Med (Berl) 77(7): 527-43.

Ferrara, N. (2004). "Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress." Endocr Rev 25(4): 581-611.

Enders AC y Schlafke S, 1967. A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. Am J Anat 120:185–226

Finn, C. A. (1975). "The uterus: Handbooks in reproductive biology."

Finn, C. A. y L. Martin (1969). "Hormone secretion during early pregnancy in the mouse." J Endocrinol 45(1): 57-65.

Finn, C. A. y L. Martin (1970). "The role of the oestrogen secreted before oestrus in the preparation of the uterus for implantation in the mouse." J Endocrinol 47(4): 431-8.

Fonseca, B. M., G. Correia-da-Silva, y col. (2013). "The Endocannabinoid System in the Postimplantation Period: A Role during Decidualization and Placentation." Int J Endocrinol 2013: 510540.

Fuller W. Bazer , T. L. O., Thomas E. Spencer (1998). "Endocrinology of the Transition from Recurring Estrous Cycles to Establishment of Pregnancy in Subprimate Mammals

Gellhaus, A., X. Dong, y col. (2004). "Connexin43 interacts with NOV: a possible mechanism for negative regulation of cell growth in choriocarcinoma cells." J Biol Chem 279(35): 36931-42.

Gibori, G., P. G. Jayatilak, y col. (1987). "Decidual luteotropin secretion and action: its role in pregnancy maintenance in the rat." Adv Exp Med Biol 219: 379-97.

Girling, J. E. y P. A. Rogers (2005). "Recent advances in endometrial angiogenesis research." Angiogenesis 8(2): 89-99.

Glasser, S. R. y J. Julian (1986). "Intermediate filament protein as a marker of uterine stromal cell decidualization." Biol Reprod 35(2): 463-74.

Graham, J. D. y C. L. Clarke (1997). "Physiological action of progesterone in target tissues." Endocr Rev 18(4): 502-19.

Grümmer, R. y E. Winterhager (2008). The Endometrium: Molecular, Cellular and Clinical Perspectives - John D. Aplin.

Grummer, R., K. Chwalisz, y col. (1994). "Regulation of connexin26 and connexin43 expression in rat endometrium by ovarian steroid hormones." Biol Reprod 51(6): 1109-16.

Gu, Y., M. J. Soares, y col. (1994). "Expression of decidual prolactin-related protein in the rat decidua." Endocrinology 135(4): 1422-7.

Gu, Y., R. K. Srivastava, y col. (1995). "Cell-specific expression of activin and its two binding proteins in the rat decidua: role of alpha 2-macroglobulin and follistatin." Endocrinology 136(9): 3815-22.

Hamai, Y., T. Fujii, y col. (1998). "Evidence for basic fibroblast growth factor as a crucial angiogenic growth factor, released from human trophoblasts during early gestation." Placenta 19(2-3): 149-55.

Hewitt, S. C. y K. S. Korach (2008). The Endometrium: Molecular, Cellular and Clinical Perspectives - John D. Aplin.

Hogan, B. L. (1996). "Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development." Genes Dev 10(13): 1580-94.

Huet-Hudson, Y. M., G. K. Andrews, y col. (1989). "Cell type-specific localization of c-myc protein in the mouse uterus: modulation by steroid hormones and analysis of the periimplantation period." Endocrinology 125(3): 1683-90.

Huyen, D. V. y B. M. Bany (2011). "Evidence for a conserved function of heart and neural crest derivatives expressed transcript 2 in mouse and human decidualization." Reproduction 142(2): 353-68.

Hyder, S. M. y G. M. Stancel (1999). "Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins." Mol Endocrinol 13(6): 806-11.

Hyder, S. M., G. M. Stancel, y col. (1996). "Uterine expression of vascular endothelial growth factor is increased by estradiol and tamoxifen." Cancer Res 56(17): 3954-60.

Jones, S. R., B. F. Kimler, y col. (2000). "Transit of normal rat uterine stromal cells through G1 phase of the cell cycle requires progesterone-growth factor interactions." Endocrinology 141(2): 637-48.

Kato, S., H. Endoh, y col. (1995). "Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase." Science 270(5241): 1491-4.

Kauffman, R. F. y H. U. Bryant (1995). " Selective estrogen receptor modulators." Drug News Perspect. 8.

Kim, M., H. J. Park, y col. (2013). "VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodelling during pregnancy." EMBO Mol Med 5(9): 1415-30.

Korgun, E. T., S. Cayli, y col. (2007). "Distribution of laminin, vimentin and desmin in the rat uterus during initial stages of implantation." J Mol Histol 38(4): 253-60.

Kurihara, I., D. K. Lee, y col. (2007). "COUP-TFII mediates progesterone regulation of uterine implantation by controlling ER activity." PLoS Genet 3(6): e102.

Kurita, T. y H. Nakamura (2008). The Endometrium: Molecular, Cellular and Clinical Perspectives - John D. Aplin.

Laskey, R. A., M. P. Fairman, y col. (1989). "S phase of the cell cycle." Science 246(4930): 609-14.

Laws, M. J., R. N. Taylor, y col. (2008). "Gap junction communication between uterine stromal cells plays a critical role in pregnancy-associated neovascularization and embryo survival." Development 135(15): 2659-68.

Lee, D. K., I. Kurihara, y col. (2010). "Suppression of ERalpha activity by COUP-TFII is essential for successful implantation and decidualization." Mol Endocrinol 24(5): 930-40.

Lee, K. Y., J. W. Jeong, y col. (2007). "Bmp2 is critical for the murine uterine decidual response." Mol Cell Biol 27(15): 5468-78.

Lee, K., J. Wang, y col. (2008). The Endometrium: Molecular, Cellular and Clinical Perspectives - John D. Aplin.

Li, Q., A. Kannan, y col. (2007). "Bone morphogenetic protein 2 functions via a conserved signaling pathway involving Wnt4 to regulate uterine decidualization in the mouse and the human." J Biol Chem 282(43): 31725-32.

Li, Q., A. Kannan, y col. (2011). "The antiproliferative action of progesterone in uterine epithelium is mediated by Hand2." Science 331(6019): 912-6.

Li, Q., A. Kannan, y col. (2007). "Bone morphogenetic protein 2 functions via a conserved signaling pathway involving Wnt4 to regulate uterine decidualization in the mouse and the human." J Biol Chem 282(43): 31725-32.

Lonard, D. M. y B. W. O'Malley (2006). "The expanding cosmos of nuclear receptor coactivators." Cell 125(3): 411-4.

Lydon, J. P., F. J. DeMayo, y col. (1995). "Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities." Genes Dev 9(18): 2266-78.

Ma, W., J. Tan, y col. (2001). "Adult tissue angiogenesis: evidence for negative regulation by estrogen in the uterus." Mol Endocrinol 15(11): 1983-92.

Mani, S. K., P. G. Mermelstein, y col. (2012). "Convergence of multiple mechanisms of steroid hormone action." Horm Metab Res 44(8): 569-76.

Martin, L., C. A. Finn, y col. (1973). "Hypertrophy and hyperplasia in the mouse uterus after oestrogen treatment: an autoradiographic study." J Endocrinol 56(1): 133-44.

Maruyama, T. y Y. Yoshimura (2008). "Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium." Endocr J 55(5): 795-810.

McKenna, N. J. y B. W. O'Malley (2002). "Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators." Cell 108(4): 465-74.

Metzger, D., S. Ali, y col. (1995). "Characterization of the amino-terminal transcriptional activation function of the human estrogen receptor in animal and yeast cells." J Biol Chem 270(16): 9535-42.

Mihailovich, M., C. Militti, y col. (2010). "Eukaryotic cold shock domain proteins: highly versatile regulators of gene expression." Bioessays 32(2): 109-18.

Montesano, R., J. D. Vassalli, y col. (1986). "Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A 83(19): 7297-301.

Moulton, B. C. y B. B. Koenig (1984). "Uterine deoxyribonucleic acid synthesis during preimplantation in precursors of stromal cell differentiation during decidualization." Endocrinology 115(4): 1302-7.

Murphy, L. C., G. P. Skliris, y col. (2009). "The relevance of phosphorylated forms of estrogen receptor in human breast cancer in vivo." J Steroid Biochem Mol Biol 114(1-2): 90-5.

Nastasi, T., M. Scaturro, y col. (1999). "PIPPin is a brain-specific protein that contains a cold-shock domain and binds specifically to H1 degrees and H3.3 mRNAs." J Biol Chem 274(34): 24087-93.

Nastasi, T., P. Muzi, y col. (2000). "Specific neurons of brain cortex and cerebellum are PIPPin positive." Neuroreport 11(10): 2233-6.

Nie, G., Y. Li, y col. (2005). "Serine protease HtrA1 is developmentally regulated in trophoblast and uterine decidual cells during placental formation in the mouse." Dev Dyn 233(3): 1102-9.

Nishida, M. (2002). "The Ishikawa cells from birth to the present." Hum Cell 15(3): 104-17.

Ogle, T. F., P. George, y col. (1998). "Progesterone and estrogen regulation of rat decidual cell expression of proliferating cell nuclear antigen." Biol Reprod 59(2): 444-50.

Oh, A. S., L. A. Lorant, y col. (2001). "Hyperactivation of MAPK induces loss of ERalpha expression in breast cancer cells." Mol Endocrinol 15(8): 1344-59.

Ornitz, D. M. y N. Itoh (2001). "Fibroblast growth factors." Genome Biol 2(3): REVIEWS3005.

Paria, B. C., J. Tan, y col. (1999). "Uterine decidual response occurs in estrogen receptor-alpha-deficient mice." Endocrinology 140(6): 2704-10.

Parr, M. y E. Parr (1989). " The implantation reaction R Wynn and W Jollie Biology of the uterus " Springer- Plenum Medical Book Company.

Paulin, D. y Z. Li (2004). "Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle." Exp Cell Res 301(1): 1-7.

Plaisier, M. (2010). "Decidualisation and angiogenesis." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 25(3): 259-71.

Plaks, V., V. Kalchenko, y col. (2006). "MRI analysis of angiogenesis during mouse embryo implantation." Magn Reson Med 55(5): 1013-22.

Prigent-Tessier, A., U. Barkai, y col. (2001). "Characterization of a rat uterine cell line, U(III) cells: prolactin (PRL) expression and endogenous regulation of PRL-dependent genes; estrogen receptor beta, alpha(2)-macroglobulin, and decidual PRL involving the Jak2 and Stat5 pathway." Endocrinology 142(3): 1242-50.

Raida, M., J. H. Clement, y col. (2005). "Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and induction of tumor angiogenesis." J Cancer Res Clin Oncol 131(11): 741-50.

Raimondi, L., M. D'Asaro, y col. (2003). "RNA-binding ability of PIPPin requires the entire protein." J Cell Mol Med 7(1): 35-42.

Rasmussen, C. A., K. E. Orwig, y col. (1997). "Dual expression of prolactin-related protein in decidua and trophoblast tissues during pregnancy in rats." Biol Reprod 56(3): 647-54.

Renaud, J. P. y D. Moras (2000). "Structural studies on nuclear receptors." Cell Mol Life Sci 57(12): 1748-69.

Resnitzky, D., M. Gossen, y col. (1994). "Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system." Mol Cell Biol 14(3): 1669-79.

Riley, D. J., E. Y. Lee, y col. (1994). "The retinoblastoma protein: more than a tumor suppressor." Annu Rev Cell Biol 10: 1-29.

Robinson-Rechavi, M., H. Escriva Garcia, y col. (2003). "The nuclear receptor superfamily." J Cell Sci 116(Pt 4): 585-6.

Roskoski, R., Jr. (2012). "ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation." Pharmacol Res 66(2): 105-43.

Rugh, R. (1994). "The Mouse: Its Reproduction and Development." Oxford Science Publications.

Salamonsen, L. A. (2008). "The Endometrium: Molecular, Cellular and Clinical Perspectives - John D. Aplin." 2nd ed.

Salleh, N. (2014). "Diverse Roles of Prostaglandins in Blastocyst Implantation." ScientificWorldJournal 2014: 968141.

Santen, R. J., A. Manni, y col. (1990). "Endocrine treatment of breast cancer in women." Endocr Rev 11(2): 221-65.

Scherle, P. A., W. Ma, y col. (2000). "Regulation of cyclooxygenase-2 induction in the mouse uterus during decidualization. An event of early pregnancy." J Biol Chem 275(47): 37086-92.

Schmid, P. C., B. C. Paria, y col. (1997). "Changes in anandamide levels in mouse uterus are associated with uterine receptivity for embryo implantation." Proc Natl Acad Sci U S A 94(8): 4188-92.

Sharkey, A. M., K. Day, y col. (2000). "Vascular endothelial growth factor expression in human endometrium is regulated by hypoxia." J Clin Endocrinol Metab 85(1): 402-9.

Shaul, Y. D. y R. Seger (2007). "The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions." Biochim Biophys Acta 1773(8): 1213-26.

Sherr, C. J. y J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." Genes Dev 13(12): 1501-12.

Smith, M. S., M. E. Freeman, y col. (1975). "The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy." Endocrinology 96(1): 219-26.

Smith, S. K. (2000). "Angiogenesis and implantation." Hum Reprod 15 Suppl 6: 59-66.

Srivastava, R. K., Y. Gu, y col. (1998). "Developmental expression and regulation of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in rat decidua and in a decidual cell line." J Mol Endocrinol 21(3): 355-62.

Taga, M., H. Sakakibara, y col. (1995). "Regulation of human decidual function by epidermal growth factor." Horm Res 44 Suppl 2: 23-9.

Tan, J., S. Raja, y col. (2002). "Evidence for coordinated interaction of cyclin D3 with p21 and cdk6 in directing the development of uterine stromal cell decidualization and polyploidy during implantation." Mech Dev 111(1-2): 99-113.

Tan, Y., M. Li, y col. (2004). "HB-EGF directs stromal cell polyploidy and decidualization via cyclin D3 during implantation." Dev Biol 265(1): 181-95.

Tessier-Prigent, A., R. Willems, y col. (1999). "Arachidonic acid induces differentiation of uterine stromal to decidual cells." Eur J Cell Biol 78(6): 398-406.

Thienel, T., K. Chwalisz, y col. (2002). "Expression of MAPkinases (Erk1/2) during decidualization in the rat: regulation by progesterone and nitric oxide." Mol Hum Reprod 8(5): 465-74.

Tong, W., A. Niklaus., y col. (2008). "The Endometrium: Molecular, Cellular and Clinical Perspectives - John D. Aplin." 2nd ed.

Tranguch, S., T. Daikoku, y col. (2005). "Molecular complexity in establishing uterine receptivity and implantation." Cell Mol Life Sci 62(17): 1964-73.

Tsai, M. J. y B. W. O'Malley (1994). "Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members." Annu Rev Biochem 63: 451-86.

Vallejo, G. (2009). Señalización “no genómica” del receptor de progesterona en el endometrio. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Vallejo, G., A. C. Mestre-Citrinovitz, y col. (2011). "Ovarian steroid receptors and activated MAPK in the regional decidualization in rats." Biol Reprod 84(5): 1063-71.

Vallejo, G., C. Ballare, y col. (2005). "Progestin activation of nongenomic pathways via cross talk of progesterone receptor with estrogen receptor beta induces proliferation of endometrial stromal cells." Mol Endocrinol 19(12): 3023-37.

Vallejo, G., D. Maschi, y col. (2010). "Changes in global gene expression during in vitro decidualization of rat endometrial stromal cells." J Cell Physiol 222(1): 127-37.

Vicent, G. P., C. Ballare, y col. (2008). "Convergence on chromatin of non-genomic and genomic pathways of hormone signaling." J Steroid Biochem Mol Biol 109(3-5): 344-9.

Wakeling, A. E., M. Dukes, y col. (1991). "A potent specific pure antiestrogen with clinical potential." Cancer Res 51(15): 3867-73.

Wang, H. y S. K. Dey (2006). "Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models." Nat Rev Genet 7(3): 185-99.

Winterhager, E., A. Gellhaus, y col. (2013). "Decidual angiogenesis and placental orientation are altered in mice heterozygous for a dominant loss-of-function Gja1 (connexin43) mutation." Biol Reprod 89(5): 111.

Yamagishi, H., E. N. Olson, y col. (2000). "The basic helix-loop-helix transcription factor, dHAND, is required for vascular development." J Clin Invest 105(3): 261-70.

Ying, Y. y G. Q. Zhao (2000). "Detection of multiple bone morphogenetic protein messenger ribonucleic acids and their signal transducer, Smad1, during mouse decidualization." Biol Reprod 63(6): 1781-6.

Yoshinaga, K. y C. E. Adams (1966). "Delayed implantation in the spayed, progesterone treated adult mouse." J Reprod Fertil 12(3): 593-5.