



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DE MARCADORES
MOLECULARES DE RECEPTIVIDAD
ENDOMETRIAL EN PACIENTES CON
INFERTILIDAD PRIMARIA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Antonio de Jesús Paz Martínez



**DIRECTOR DE TESIS:
Doctor Luis Felipe Montaña
Estrada**

Cd. Universitaria, D. F. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno:
Paz
Martínez
Antonio de Jesús
5513804626
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
410030936
2. Datos del tutor:
Doctor
Luis Felipe
Montaño
Estrada
3. Datos del sinodal presidente:
Doctor
Marco Antonio
Cerbón
Cervantes
4. Datos del sinodal vocal:
Doctora
Teresa Imelda
Fortoul
van der Goes
5. Datos del sinodal suplente:
Maestro en ciencias
Alfonso José
Vilchis
Peluyera
6. Datos del sinodal suplente:
Maestro en ciencias
Miguel Ángel
Palomino
Garibay
7. Datos del trabajo escrito
Evaluación de marcadores moleculares de receptividad endometrial en pacientes con infertilidad primaria
42 p
2014

DEDICATORIA

**A mis amados padres:
Ma. Guadalupe Martínez García
Antonio Paz Vázquez
¡Son los mejores!**

Las mejores cosas que aprendí de ustedes, no han sido cosas que dijeron, sino cosas que hicieron por mí y por mis hermanos.

Agradecimientos

Al Dr. Luis Felipe Montaña por todas las cosas buenas que me ha enseñado, tanto académicamente como en la vida del día a día, es una gran persona y lo quiero mucho, gracias por sus consejos y apoyo.

A la Dra. Erika Rendón Huerta por su paciencia, tiempo y ser mi mamá académica. Gracias por preocuparse por mí, la confianza, la presión, que yo confieso, siempre he necesitado, la quiero.

Al Doctor Héctor Salvador Godoy Morales, Jefe de la Unidad de Medicina Reproductiva del Hospital Ángeles del Pedregal por su valioso apoyo para la realización de esta tesis así como a José Manuel Lozano Sánchez, médico residente que me apoyo en todo momento.

A la técnico Académico Raquel Guerrero Alquicira del Laboratorio de Técnicas Histológicas de la Facultad de Medicina por su valioso apoyo sin el cual no se hubiese podido realizar esta tesis.

A la Dra. Paty Ramos por sus enseñanzas en clase y todo el apoyo en su taller, aunque no fui un muy buen alumno aprendí mucho de usted.

A Beatriz Hernández Téllez del Laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos por su paciencia y ayuda para poder sacar las fotografías de mis inmunohistoquímicas.

A Atzin Itzel Mora Hernández y su familia, sinceramente agradezco todo lo que me enseñaste e hiciste por mí.

Mis hermanos a los cuales quiero tanto y en quienes siempre estoy pensando: Laurita, Claudita, Dianita, Luisito, Oscarito, Brendita y Paquito.

A mis compañeros de laboratorio por sus enseñanzas, paciencia, amistad, buenos momentos (¡la fiesta!) que hemos tenido y espero sigamos teniendo: Anita, Christian, Bere, Jane, Monse, Rous, Pris, Jaz, Paco, Diego, Dany, Ceci, C. Elena (Ceci!!). Los quiero.

A todos mis amigos de la hermosísima Facultad de Ciencias que hicieron mi paso por la universidad una gran aventura, llena de diversión, aprendizaje y filosofía barata. Los quiero, espero que sigan en mi vida y yo en la suya. Marco, Sebastián, José, Gaby, Bere, Ana Laura, Fátima, Montse, Alejandra, Sandra, Fany, Vicente, Yoko.

Valeria y Emilio Petrone, Esteban, Emilio Mora, Ana Flores, Vanessa, Alex, Chucky, Alonso, Jerónimo, Mariana, Emiliano Mega, Mar, Cipactli, Matiss y Paola (1, 2, 3...¡Diversión!).

Mis amigos del museo Universum, de la sala de salud y sexualidad porque me han hecho expandir mi visión: Amelia, Adrián, Carla, Susana, Toño y Adriana.

Elian, Erick, Pote, Grillo, Misa, Fabian, Miri, Christian, Chata, Nidia, Salma, Anahí...hemos crecido y es genial que sigamos juntos después de tanto tiempo.

Olaf, Cesar, Vicente Muñoz y Daniel...ustedes son un buen regalo que Chapingo me dio.

A la Universidad Autónoma Chapingo, porque me dio bases, visión y experiencias muy importantes para poder llegar a la UNAM.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma mater.

Abreviaturas

aa	aminoácidos
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
DAB	Diaminobencidina
EGF	Epidermal growth factor (factor de crecimiento epidermal)
FAK	Focal adhesión kinase (cinasa de adhesión focal)
FIV	Fertiización <i>in vitro</i>
HB-EFG	Heparin-binding EGF- like growth factor (Factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina)
HRP	Horseradish peroxidase (peróxidasa de rábano)
Ig	Inmunoglobulina
IGFBP1	Insulin-like growth factor-binding protein 1 (Proteína ligadora del factor de crecimiento similar a insulina 1)
IHC	Immunohistochemistry (inmunohistoquímica)
IL	Interleucina
LIF	Leukemia inhibitory factor (Factor inhibidor de leucemia)
LIFR	Leukemia inhibitory factor receptor (receptor del factor inhibidor de leucemia)
IMC	Índice de masa corporal
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (Proteín cinasa activada por mitógenos)
MDCK	Madin-Darby canine kidney (línea celular riñon canino Madin-Darby)
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinasas de matriz
MUPP-1	Multi-PDZ domain protein (Proteínas con dominios PDZ)
NK	Natural Killer (células asesinas naturales)
PAI1	Plasminogen activator inhibitor-1 (Inhibidor del activador del plasminógeno-1)
PALS-1	Protein asociated with Lin-7 (proteína asociada a Lin-7)
PBS	Phosphate buffered saline (Buffer de fosfato salino)
STAT	Signal transducers and activators of transcription (Transductor de señales y activadores de transcripción)
TNF	Tumoral necrosis factor (Factor de necrosis tumoral)
TRA	Técnicas de reproducción asistida
UE	Uniones estrechas
ZO	Zonula occludens (unions ocluyentes)

ÍNDICE

1.0	Resumen	1
2.0	Introducción	
	2.1 Infertilidad	2
	2.2 El embrión	3
	2.3 ¿Qué es el endometrio?	4
	2.4 Implantación	
	2.4.1 Cambios en el epitelio luminal en preparación para la implantación	5
	2.4.2 Aposición	6
	2.4.3 Adhesión	7
	2.4.4 Penetración	7
	2.5 Evaluación de la receptividad endometrial	9
	2.6 Claudina	10
	2.7 Integrinas	13
	2.8 LIF	14
3.0	Hipótesis	15
4.0	Objetivos	16
	4.1 Objetivo general	16
	4.2 Objetivos Particulares	16
5.0	Justificación	17
6.0	Materiales y métodos	18
	6.1 Anticuerpos	18
	6.2 Obtención de muestras	18
	6.3 Técnica de inmunohistoquímica	19
	6.4 Interpretación	22
	6.5 Estadística	22
7.0	Resultados	23
	7.1 Grupo de estudio	23
	7.2 Expresión de claudinas	24
	7.3 Correlaciones en el grupo que logro el embarazo	25
	7.4 Correlaciones en el grupo que no logró el embarazo	26
	7.5 Intensidad de la marca	26
	7.6 Imágenes	27
8.0	Discusión	33
9.0	Apéndices	
	9.1 Soluciones	33
	9.1.1 PBS 10X a pH 7.0 (Solución stock)	33
	9.1.2 PBS 1X a pH 7.0 para lavados	33
	9.1.3 PBS-Tween 0.2% para lavados	33
	9.1.4 Buffer de citratos	34
	9.1.5 PBS-Tritón 0.2%	34
	9.1.6 PBS-albúmina 2%	34

9.1.7 PBS-albúmina 1%	34
10.0 Bibliografía	35

1.0 Resumen

El embarazo comprende las fases de: fertilización, implantación, decidualización, placentación y el parto. El éxito de cada evento es crucial para poder avanzar al siguiente. En la concepción natural, la máxima probabilidad de que se logre un embarazo exitoso en un ciclo menstrual determinado se limita apenas al 30%. Sólo del 50 al 60% de todas las concepciones avanzan más allá de las 20 semanas de gestación, principalmente debido a fallas en la implantación. El endometrio es el órgano que participa activamente en la implantación del blastocisto, pero su evaluación es únicamente histológica. Esto último limita la habilidad de reconocer con certeza si se encuentra en la ventana de implantación o, en el caso de utilizar técnicas de reproducción asistida, si está apto para hacer una exitosa transferencia de blastocistos. De ahí que nuestro objetivo fue identificar marcadores que permitan evaluar con más precisión la expresión de proteínas endometriales que favorezcan la implantación exitosa del trofoblasto en mujeres con infertilidad primaria. Entre los marcadores que se analizaron y están bastante documentados, se encuentran la integrina $\alpha\beta3$ y LIF (Leukemia Inhibitory Factor). Ya que el endometrio es un órgano constituido por células epiteliales, decidimos evaluar la funcionalidad del mismo a través de la expresión de claudinas, proteínas que forman las uniones estrechas y mantienen la polaridad celular, regulan el intercambio de iones entre las células y activan metaloproteinasas de matriz, las cuales son importantes para la implantación del blastocisto. Se analizaron muestras de endometrio de 8 mujeres control y 24 mujeres diagnosticadas con infertilidad primaria, las cuales fueron sometidas a estimulación ovárica y técnicas de reproducción asistida. Las muestras se procesaron por la técnica histológica convencional y se realizó la técnica de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos contra Cld-1, -2, -5, -6, anti-LIF y anti-integrina $\alpha\beta3$. Se analizaron las muestras por tres observadores independientes y se buscaron correlaciones con la prueba estadística P de Spearman. Un valor menor a 0.05 se consideró significativo. Los resultados demostraron una correlación positiva entre la expresión de la integrina $\alpha\beta3$ y la claudina-5 ($p=0.018$), en el endometrio de las mujeres con infertilidad primaria que lograron embarazarse. La correlación más importante fue la observada entre la expresión de Claudina 6 y la Claudina 1 ($p<0.0003$). La expresión de Claudina 1, 2, 5 y LIF fue significativamente mayor en el subgrupo de mujeres que no logró el embarazo. Se encontró que no hubo positividad en el 100% de las células de los epitelios de los marcadores que se evaluaron. Esta poca positividad fue relativamente más notoria en el grupo de mujeres infértiles, independientemente de si lograron embarazarse o no. En conclusión, creo los resultados aportan conocimiento a la necesidad de identificar nuevos marcadores que permitan definir si el endometrio de las mujeres infértiles realmente es funcional para la recepción exitosa y duradera del blastocito, ya sea que se originó de manera natural o por técnicas de reproducción asistida.

2.0 Introducción

2.1 Infertilidad

El embarazo es un proceso complejo que comprende varias fases como la fertilización, implantación, deciduización, placentación y el parto. El éxito de cada evento es crucial para poder avanzar al siguiente. En la concepción natural, la máxima probabilidad de que se logre un embarazo exitoso en un ciclo menstrual determinado se limita apenas al 30%. Sólo del 50 al 60% de todas las concepciones avanzan más allá de las 20 semanas de gestación y entre los embarazos que son perdidos las fallas en la implantación son la principal causa, alcanzando un aproximado del 75%. (1,2).

La implantación sólo puede ocurrir en un intervalo limitado de tiempo, que es cuando la competencia del blastocisto se sincroniza con el estado receptivo del útero, lo cual se conoce como ventana de implantación. La implantación exitosa depende entonces de la calidad del blastocisto, la receptividad del endometrio y la correcta comunicación entre ellos.

Estos eventos son regulados por progesterona y estrógeno ovárico. La evidencia ha mostrado que se necesita también la producción local de moléculas señalizadoras como citocinas, factores de crecimiento, factores de transcripción homeobox, mediadores lipídicos y genes morfogénicos, los cuales funcionan a través de interacciones autócrinas, parácrinas y yuxtácrinas. Sin embargo, aún no se conoce de manera detallada el orden cronológico y las vías de señalización que gobiernan las interacciones entre el embrión y el útero (2, 3).

1 de cada 4 parejas en todo el mundo sufren de infertilidad, de las cuales 39.5% sufren infertilidad primaria (4). La infertilidad primaria se define como la incapacidad de concebir después de al menos un año de coito sin protección mientras que la infertilidad secundaria es la incapacidad de concebir después de un año de mantener coito sin protección, cuando ya ha sido posible concebir anteriormente (5).

Las principales causas de infertilidad en mujeres son desórdenes ovulatorios (25%), endometriosis (15%), adhesiones pélvicas (15%), bloqueo de las trompas de Fallopio (11%), otras anomalías de las trompas (11%) debido a enfermedad inflamatoria pélvica e hiperprolactinemia (7%) (71).

La obesidad y el sobrepeso son causantes principales de la modificación en el eje hipotálamo-pituitario y en la función de las gónadas, por lo que son parte de los desórdenes ovulatorios. Esto se debe a que las adipocinas como leptina, adiponectina, y resistina son capaces de causar modificaciones en este eje. Además el tracto reproductivo está estrechamente coordinado con el balance de energía, por lo cual las anomalías metabólicas pueden derivar en el desarrollo de patologías como el síndrome de ovario

poliquístico (PCOS) que es el desorden metabólico más común en mujeres afectando un 5-10% de las mujeres en edad reproductiva (72).

La forma de saber si una persona tiene sobrepeso u obesidad, es a través del índice de masa corporal (IMC), que es una asociación entre el peso y la talla y se determina dividiendo el valor de la masa de un individuo entre el cuadrado de su peso ($IMC = \frac{masa}{peso^2}$). Un IMC de 23 se considera normal, mientras que un IMC de 25 se considera sobrepeso. Diversos estudios han demostrado que mujeres con un IMC por encima de 25 muestran una reducción en su fertilidad (35).

2.2 El embrión

El embrión es la célula totipotencial que se origina después de que el óvulo es fecundado por el espermatozoide y este sólo es capaz de implantarse en el endometrio en la etapa de blastocisto, que es la etapa que prosigue a la mórula (Figura 1 y 2), la cual se caracteriza por la presencia de un blastocele (cavidad llena de fluido) y la existencia de dos tipos celulares, la masa celular interna (células pluripotenciales que darán origen al embrión propiamente dicho) y el trofocitotermo que forma las estructuras extraembrionarias fundamentales para el desarrollo como son la placenta, saco vitelino, y el cordón umbilical (6, 7).

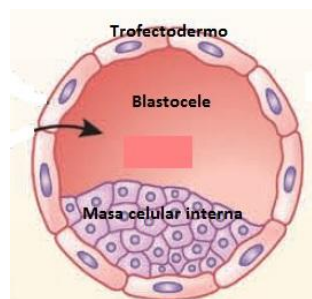


Figura 1. Diferenciación del embrión. Se muestran las etapas por las que transita el embrión, desde el cigoto hasta el blastocisto que es cuando es capaz de implantarse en el endometrio receptivo (Tomado de Wang et al., 2006).

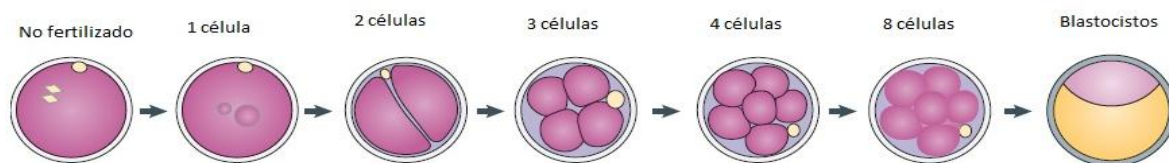


Figura 2. El blastocisto. Se muestran las partes que conforman al blastocisto: la masa celular interna, el blastocelo y el trofocitotermo (Modificado de Wang et al., 2006).

2.3 ¿Qué es el endometrio?

El endometrio es el recubrimiento interno del útero de mamíferos donde el blastocisto se implanta. Es una capa muy vascularizada constituida por a) una capa superficial de epitelio cilíndrico simple (células ciliadas y secretoras), b) glándulas endometriales que se desarrollan como invaginaciones del epitelio superficial y c) el estroma endometrial, una región muy gruesa de lámina propia (tejido conjuntivo). Además, el endometrio cuenta con una población de células del sistema inmune residentes. El endometrio se divide en dos capas o estratos:

- a) Estrato funcional: es una capa superficial gruesa que se descama durante la menstruación e incluye una gran parte de las glándulas.
- b) Estrato basal: es una capa profunda y permanente en la que proliferan y se regeneran las glándulas y los demás elementos de la capa funcional después de cada menstruación.

En cuanto a vascularización, el útero es irrigado por ramas de la arteria ilíaca interna denominadas arterias uterinas de las cuales nacen las arterias arciformes, dispuestas en forma circular en el miometrio y que dan origen a las arterias radiales las cuales penetran profundamente en el miométrio. Antes de llegar al endometrio se dividen en dos tipos de arteriolas: las arteriolas rectas que terminan en el estrato basal suministrando los materiales necesarios para la regeneración del estrato funcional y las arteriolas espiraladas que penetran en el estrato funcional y cambian notablemente durante el ciclo menstrual (Figura 4). El útero es drenado por las venas uterinas (8).

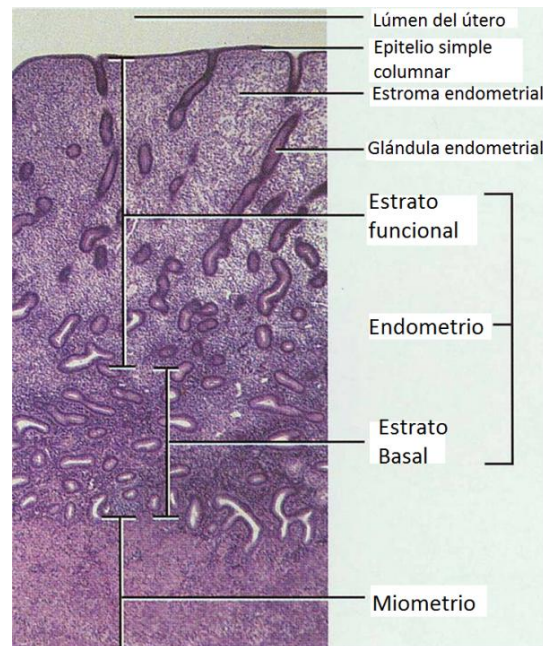


Figura 3. Histología del endometrio. Se muestra un corte histológico de endometrio y sus diferentes estratos: miometrio, estrato basal, estrato funcional. También se muestran las glándulas estromales, el epitelio columnar simple, el estroma y el lumen del útero. (Tomado de Tortora et al., 2006).

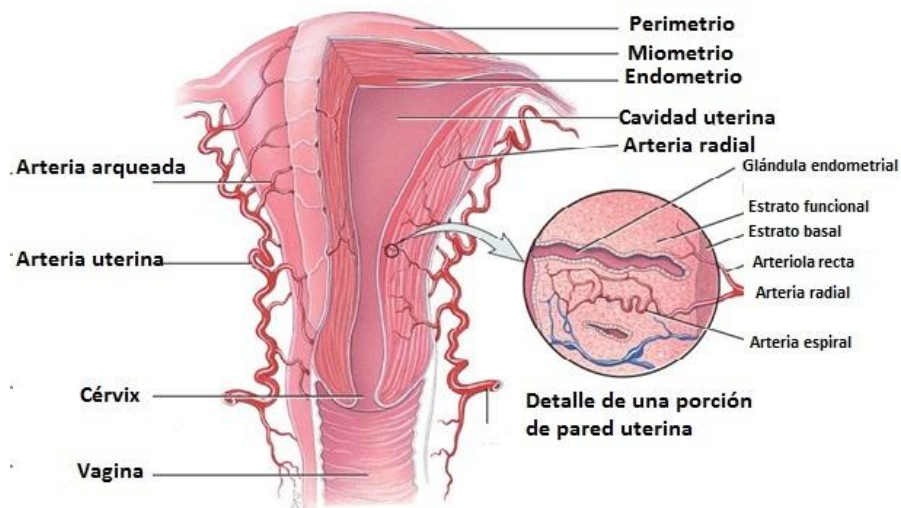


Figura 4. Vascularización del útero, se muestra especial énfasis en las arterias que irrigan al endometrio, a saber las arteriolas espiraladas y arteriolas rectas (Tomado de Tortora et al., 2006).

2.4 Implantación

El objetivo de la implantación es asegurar que las células del trofoblasto se anclen firmemente al estroma endometria; es importante mencionar que existen tres tipos de implantación (6). Para que la implantación ocurra, el embrión debe estar viable y presente en la cavidad uterina durante la ventana de implantación que es durante la fase secretora media, después de lo cual el endometrio y el embrión necesitan lograr una compleja comunicación cruzada o “cross-talk”. En el humano este proceso frecuentemente falla y se considera un reflejo de la alta tasa de anomalías cromosómicas observadas en embriones humanos. En las técnicas de reproducción asistida, la alta tasa en la falla de implantación que ocurre después de la transferencia de embriones clasificados con buena calidad es una fuente de frustración para las pacientes y sus parejas (3).

2.4.1 Cambios en el epitelio luminal en preparación para la implantación.

Las superficies epiteliales apicales normalmente no son adhesivas, pero aun así durante la implantación, la interacción entre el trofotodermo y el epitelio luminal uterino existe. Esto sugiere que hay una transición de un endometrio pre-receptivo a un endometrio receptivo lo cual requiere cambios fundamentales en la organización celular epitelial. La polaridad apical-basal del epitelio luminal se vuelve menos marcada, las células se aplastan y pierden los microvellos, lo que ocasiona que las superficies basal y apical se vuelvan similares. Hay una redistribución de las moléculas que se encuentran normalmente en la membrana basal hacia la membrana lateral o apical, por ejemplo sindecano en ratón y redistribución lateral y apical de la cadherina en rata. Cambios en las moléculas adhesión célula-célula reflejan esta transición fenotípica, Los estrógenos inducen la degradación de E-cadherina en el día 4.5 de embarazo, hay una redistribución y regulación a la baja en las proteínas

desmosomales y un cambio en la distribución y complejidad de las uniones adherentes en sus vías de señalización. La habilidad de las líneas celulares epiteliales humanas para soportar la adhesión del embrión se correlaciona con su polaridad reducida y expresión apical de moléculas de adhesión celular expresadas normalmente de manera baso-lateral (69).

Debido a que la aposición y la adhesión ocurren de manera natural en todos los mamíferos, un cambio en la organización del epitelio luminal en la implantación podría ser general, independientemente de las diferencias en los mecanismos de control y el subsecuente comportamiento del trofoblasto (69).

El proceso de implantación ha sido dividido en tres etapas por Enders y Schlafke: aposición, adhesión y penetración. La aposición es la fase en la que las células del trofotodermo embrionario se adosa estrechamente al epitelio uterino luminal, esto es seguido por la fase de adhesión en la cual la asociación entre el trofotodermo y el epitelio luminal es suficientemente íntima como para resistir la dislocación del blastocisto por lavado del lumen uterino. La etapa de penetración implica la invasión del epitelio luminal por el trofotodermo (9).

2.4.2 Aposición

En roedores hay un edema generalizado en el estroma que conlleva a un cierre luminal que resulta en una intredigitación de las microvellosidades del trofoblasto y el epitelio luminal. El cierre luminal ocurre en úteros con embarazo y con pseudoembarazos por lo que no requiere la presencia del blastocisto, la progesterona por otro lado si es indispensable. Esto es apoyado por la ausencia de cierre luminal en ratonas embarazadas que no tienen la proteína de unión-4 FK506 (FKBP52) una co-chaperona que es requerida para una función apropiada de la progesterona en el útero. La expresión de *Fkbp52* se traslapa con la del receptor de progesterona (RP) antes de la reacción de adhesión, y las hembras *Fkbp52*^{-/-} muestran fallas en la implantación y una regulación a la baja de los genes responsables de progesterona *Areg* (que codifica para anfiregulina), *Hoxa10* y *Ihh* en el útero. De cualquier manera, aunque la preparación de progesterona vía RP es esencial para el cierre luminal y la aposición, la adhesión del blastocisto no puede ocurrir a menos que el útero preparado por progesterona se exponga a estrógenos (9).

La vía de señalización es inicializada por HB-EGF y es un marcador temprano de comunicación cruzada entre el embrión y el útero. *Hefgl* se expresa en el epitelio luminal del ratón en el sitio de aposición del blastocisto horas antes de la adhesión. HB-EGF se produce como un factor soluble y también en forma transmembranal. La evidencia molecular y genética muestra que modifica la función embrionaria como un factor parácrino o yuxtácrino al interactuar con con ErbB1 y/o ErbB4, el cual es expresado la superficie celular del blastocisto. La mayoría de los ratones *Hefgl*^{-/-} mueren

prenatalmente y en la vida postnatal temprana debido a defectos cardiacos lo cual evita una examinación del fenotipo de implantación (9).

Los blastocistos competentes para la implantación que también expresan *Hegfl* inducen la expresión del gen en el útero de manera parácrina, este ciclo de auto-inducción es quizás el primer ejemplo de comunicación cruzada y el útero, iniciando la reacción de adhesión. HB-EGF también tiene un rol en la implantación en humanos. Su expresión es máxima en el endometrio receptivo y las células que lo expresan de manera transmembranal se adhieren al blastocisto que presenta ErbB4 en la superficie celular (9).

2.4.3 Adhesión

Numeras glicoproteínas y ligandos carbohidratos y sus receptores son expresados en el epitelio luminal y el trofoblasto alrededor del tiempo de implantación. Las moléculas más importantes son: integrinas, selectinas, galectinas, proteoglicanos de heparán sulfato, mucina-1, caderinas y el complejo trofinina-tastina-bystina. En el útero humano la integrina $\alpha_v\beta_3$ se localiza en el epitelio luminal en la fase receptiva y que una expresión aberrante se correlaciona con infertilidad y pérdida recurrente del embarazo. La Señalización desencadenada por la selectina también es importante ya que mientras los ligandos oligosacaridicos de las selectinas son expresados en el epitelio luminal receptivo, las moléculas de L-selectina son presentadas en la superficie celular de las células del trofoblasto. Lo que es más importante, es que esferas cubiertas con ligandos específicos de selectinas se adhieren a las células del trofoblasto y que células del trofoblasto aisladas se unen preferencialmente a la superficie del epitelio uterino. Estos hallazgos indican que el sistema de adhesión de la selectina constituye un paso inicial en la implantación humana. Por otro lado, hay una fertilidad aparentemente normal en ratones que carecen de L-selectina, lo cual indica variación especie-específica en la cascada de adhesión durante la implantación. LIF también parece jugar un papel importante ya que los ratones LIF^{-/-} muestran una falta de HB-EGF y una expresión aberrante de ciclooxigenas-2 (*Cox2*) durante el tiempo anterior a la adhesión (9).

2.4.4 Penetración

Un evento clave en la implantación es un incremento endometrial de la permeabilidad vascular en el sitio de adhesión y penetración. Este proceso está relacionado con la acción de prostaglandinas (PGs). COX1 y COX2 median la síntesis de PGs y están codificados por *Ptgs1* y *Ptgs2*, respectivamente. La expresión de *Ptgs2* es única en el útero de ratón y muestra expresión en el epitelio luminal y las células estromales que rodean el sitio de adhesión. Se especula que el HB-EGF que es producido en el útero y embrión induce la expresión uterina de *Ptgs2*. Las hembras *Ptgs2*^{-/-} son infértiles con ovulación, fertilización, implantación y decidualización defectuosas. La prostaciclina derivada de COX2 (PGI₂) es la prostaglandina primaria que es producida en el sitio de implantación, y los defectos en la

implantación en las hembras *Ptgs2*^{-/-} es mejorada con la administración de PGI₂. La evidencia muestra que PGI₂ participa en implantación a través de la activación del proliferador del peroxisoma activado por el receptor-δ (PPARδ), cuya expresión se traslapa con la de *Ptgs2* en el sitio de implantación. Por otro lado, dependiendo del fondo genético, COX1 puede compensar a COX2 para mejorar la infertilidad en hembras *Ptgs2*^{-/-}. *Cox2* también es expresada en útero y/o blastocisto durante la implantación en muchas especies incluyendo primates lo cual indica que hay una función conservada para COX2 en la implantación (9).

La función de PG es además ilustrada por reducción en la fertilidad en ratones que carecen de fosfolipasa A_{2α} citoplásmica (*cPLA2α*), la cual genera un precursor para la síntesis de PG. La fertilidad comprometida se debe al aplazamiento en el tiempo de implantación, el cual deriva en un acomodamiento inapropiado del blastocisto, un desarrollo feto-placentar retardado y un tamaño de camada menor. Estos resultados revelan que el eje de señalización *cPLA2α*-COX2 es crucial para la implantación. La señalización por ácido lipofosfátidico (LPA), que pertenece al grupo de fosfolípidos también influencia la adhesión en el ratón al activar la proteína G acoplada al receptor LPA3. Como en los ratones *cPLA2α*^{-/-}, las hembras *lpA3*^{-/-} muestran una implantación aplazada y sus efectos asociados. El tratamiento de ratones tanto *cPLA2α*^{-/-} como de *lpA3*^{-/-} con PGs reanuda la implantación en tiempo, pero el apiñamiento de embriones persiste. Las similitudes fenotípicas entre los ratones deficientes de *lpA3* y *cPLA2α* y los niveles reducidos de COX2 en ratones *lpA3*^{-/-} identifica COX2 como una vía de señalización común (9).

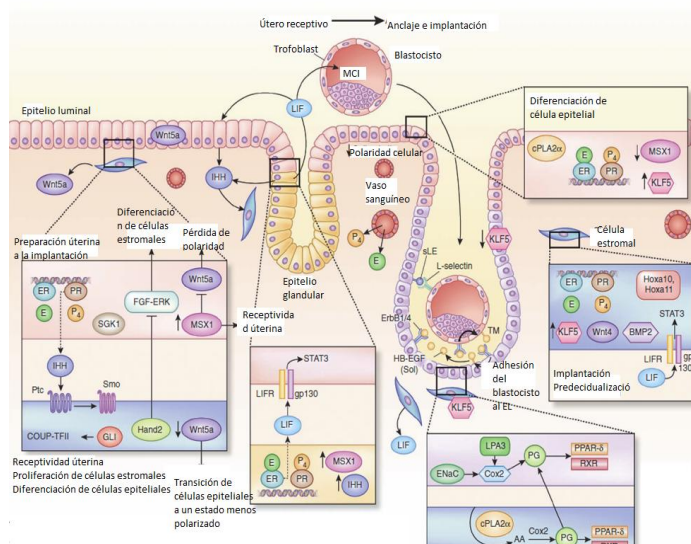


Figura 5 . Vías de señalización que se activan en la implantación. (Modificado de Cha et al., 2012).

2.5 Evaluación de la receptividad endometrial

La ventana de implantación es un periodo de 4-5 días durante el cual el tejido endometrial adquiere el estatus funcional receptivo que permite la adhesión e invasión del embrión.

El trabajo clásico de Noyes et al. (1950) fue el más citado en la literatura de la infertilidad durante algún tiempo ya que se usa para datar la biopsia endometrial (70). Actualmente, para la evaluación de la pareja infértil se requiere de una evaluación rutinaria de la histología del endometrio para servir a dos propósitos que son: 1) asegurarse de que la ovulación ha ocurrido, lo cual desencadena la formación del cuerpo lúteo y liberación de progesterona que induce cambios en las glándulas endometriales y 2) asegurarse que el fechado endometrial esté en asociación apropiada con la edad del embrión. En algunos casos, la datación del ciclo menstrual, que está basada en los criterios de Noyes, está atrasada con el ciclo menstrual real. Después se demostró que la prevalencia del endometrio “fuera de fase” en la población fértil es extremadamente alto (49%) y de hecho se encontró que es más probable (43%) encontrar en mujeres fértiles un endometrio “fuera de fase” que en mujeres infértiles (10). Con base en esta información se concluye que la evaluación histológica no aporta información significativa para el tratamiento de la pareja infértil.

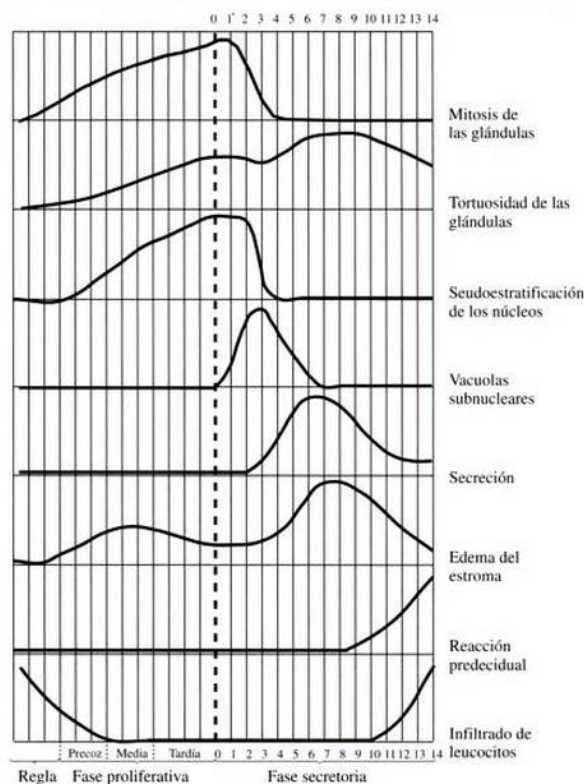


Figura 6. Datación histológica del endometrio según Noyes. Se muestran los parámetros valorables para realizar la datación. (Tomado de Botella, 1997 (73)).

Se están usando tecnologías genómicas, transcriptómicas y secretómicas para dilucidar las vías moleculares implicadas tratando de definir marcadores específicos, pero hasta la fecha no se tiene un marcador molecular de relevancia clínica que permita identificar un endometrio receptivo. Esto se debe probablemente al alto grado de redundancia molecular, por lo que seguramente un perfil de marcadores moleculares será de mayor valor clínico que un solo marcador.

La búsqueda de nuevos marcadores moleculares que puedan arrojar luz sobre la receptividad endometrial es apremiante, por lo cual en la presente tesis, me di a la tarea de investigar a las Claudinas en el endometrio, ya que estas proteínas han mostrado ser de valor diagnóstico en otras patologías como algunos tipos de cáncer y en la identificación de células troncales pluripotenciales (3, 11, 12).

2.6 Claudinas

Las Claudinas son proteínas integrales de membrana, pertenecen a una familia multigénica constituida por 24 isoformas en mamíferos y tienen un peso molecular de 21 a 28 kDa (13).

Estas proteínas tienen 4 dominios transmembranales, una secuencia amino terminal de 2 a 6 residuos de aa y una secuencia carboxilo terminal, ambas localizadas en el citosol. Tienen dos asas extracelulares separadas por un dominio intracelular de ~ 15 aa (figura 5). Las regiones citoplásmicas son diversas en secuencia y su longitud varía de 21 a 63 aa (13,14). La primera asa extracelular, que tiene de 49 a 52 residuos contiene una región altamente conservada (GLWxxC) que determina el flujo de iones y pequeñas moléculas a través de la vía paracelular. Además, se ha demostrado que sirve como correceptor para la entrada del Virus de la Hepatitis C en el caso de las Claudinas -1, -6 y -9. La segunda asa extracelular consta de 16 a 33 aa y se ha reportado que en las Claudinas -3 y -4 funciona como receptor de la enterotoxina de *Clostridium perfringens*. Por último, la secuencia carboxilo terminal funciona como anclaje para proteínas citoplásmicas tales como ZO-1,-2 y -3, proteínas con dominios PDZ (MUPP-1) y PALS-1, una proteína asociada a las uniones estrechas (14, 15).

Las Claudinas son proteínas clave en la estructura y funcionamiento de las uniones estrechas (UE) y su principal función es la de generar las hebras de las UE (16).

Las Claudinas pueden formar uniones homotípicas (el mismo tipo de Claudinas) y heterotípicas (Claudinas diferentes). Las Claudinas pueden interactuar con proteínas de la misma familia en la membrana plasmática de la misma célula (interacción cis) y entre las membranas de dos células adyacentes (interacción trans) (17). Las diferentes interacciones entre Claudinas dan lugar a la formación de poros paracelulares de diferentes diámetros que pueden ir desde los a los 50 Å. Las cargas presentes en los dominios extracelulares de estas proteínas permiten la discriminación entre aniones y cationes.

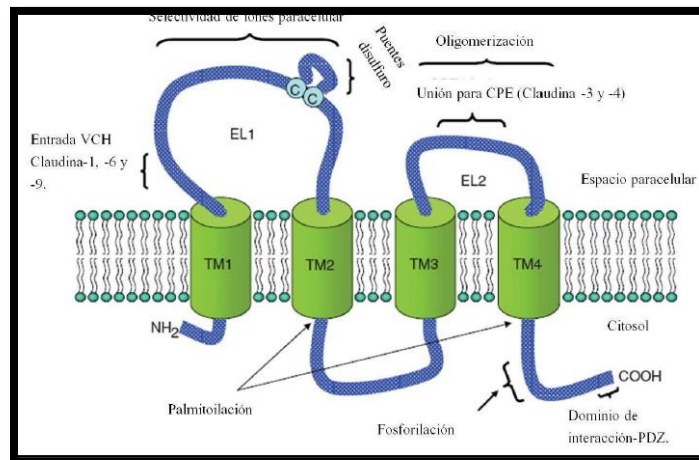


Figura 7. Estructura de las Claudinas (Morin P. J. y Lal-Nang M., 2009)

Se ha reportado que las Claudinas son las principales constituyentes de las uniones estrechas y reguladoras importantes de la permeabilidad paracelular, además se ha reportado que pueden sufrir modificaciones postraduccionales que pueden influir en su actividad, localización e interacciones con otras proteínas. La fosforilación de Claudinas puede inducir alteraciones en la permeabilidad paracelular para iones y moléculas no cargadas ya que éstas son moduladas por diferentes mecanismos de señalización (18).

La modulación de la estructura de las uniones estrechas se ha de mostrado que está implicada en la tumorigénesis e invasividad debido a la regulación a la alta o a la baja de las Claudinas en muchos tipos de tumores epiteliales. Por ejemplo, la sobreexpresión de Claudina -3 y -4 se encontró en cáncer de ovario y endometrial (19, 20) células humanas epiteliales de ovario se asocia con una invasividad y supervivencia celular in vitro (21). Las Claudinas también han mostrado modificar la invasividad debido a la activación de metaloproteinasas de matriz (MMPs) (22).

La expresión de Claudinas puede ser regulada por diversas moléculas como factores de crecimiento y citocinas, dando una respuesta diferencial que depende de la combinación del estímulo y del tipo de Claudina. Se ha encontrado, por ejemplo, que en monocapas de células epiteliales renales tratadas con el factor de crecimiento epidermal (EGF), la expresión de Claudina -3 y -4 se incrementa mientras que la de claudina-2 disminuye. Estos cambios fueron mediados por la activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (18, 23).

Respecto a la importancia de las Claudinas en la implantación, se ha reportado que una fuerte inmunotinción de claudina-4 se asocia con la incapacidad de establecer un embarazo después de una fertilización in vitro (FIV), mientras que una débil inmunotinción asociada a una fuerte inmunotinción de LIF es un buen predictor de embarazo exitoso (24). Sin embargo no se han investigado otras Claudinas en el endometrio.

Respecto a cuáles son las integrinas que se pueden encontrar en el endometrio de mujeres normales, estudios usando microarreglos, muestran que éstas varían durante el ciclo menstrual (Fig. 6), siendo las Claudinas -3, -4 y -7 las que más fuertemente asociadas están con la fase del ciclo menstrual (25), mientras que se han observado por inmunohistoquímica las Claudinas -1,-2,-3,-4,-5 y -7, siendo las Claudinas -1,-2, -3 y -5 (Fig. 7) las que mayor variación presentan dentro del ciclo menstrual (26).

Por otro lado, al ser constituyentes de los epitelios al formar las uniones estrechas y como se ha mencionado anteriormente, son una de las piezas clave que cambian para recibir al blastocisto, se decidió investigar el papel que pueden estar ejerciendo en el endometrio.

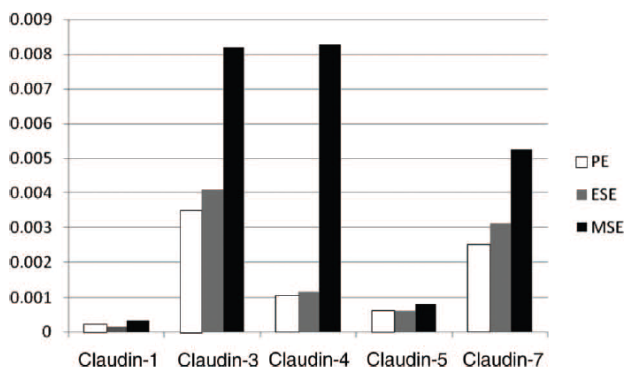


Figura 8. Variación en la expresión de Claudinas en el endometrio durante el ciclo menstrual mediante microarreglos. Se observa que claudina-3, -4 y -7 están fuertemente asociadas a la fase del ciclo menstrual. PE, fase proliferativa; ESE, fase secretoria temprana; MSE, fase secretoria media. (Tomado de Gaetje, et al., 2008)

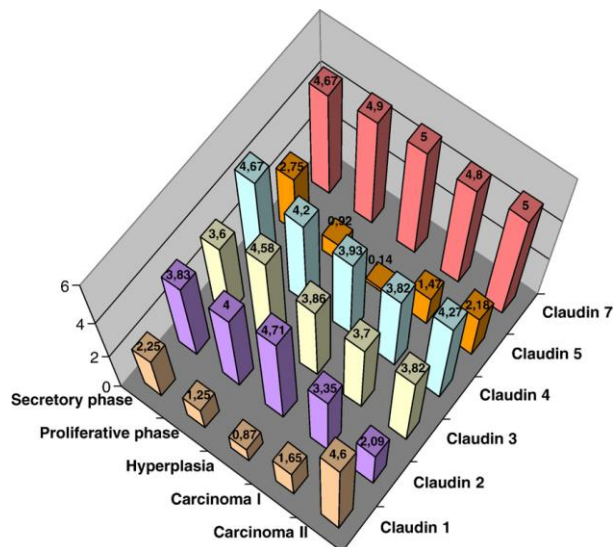


Figura 9. Expresión de Claudinas en el endometrio en las dos fases del ciclo menstrual y en hiperplasia, carcinoma tipo I y carcinoma tipo II. Nótese que las Claudinas que más variación presentan en las fases del ciclo menstrual son claudina-1, -2, -3 y -5. (Tomada de Sobel et al., 2006).

2.7 Integrinas

Las integrinas son una gran familia de receptores transmembranales heterodiméricos que se encuentran de manera ubicua a veces en altos números y median la adhesión célula-célula así como adhesión de las células a proteínas de la matriz extracelular (MEC). El ensamble de dieciocho subunidades alfa y ocho subunidades beta da origen a 24 distintos heterodímeros que tienen expresión célula específica y traslape en la especificidad de sustratos. Cada subunidad contiene un largo dominio extracelular N-terminal, un dominio transmembranal de un solo pase, y un dominio citoplásmico C-terminal (27, 28, 29).

Las integrinas son únicas en su capacidad para funcionar como moléculas señalizadoras bidireccionales. En la señalización de adentro hacia afuera (“inside-out”), un activador intracelular como talina se une a la cola citoplásmica de la subunidad β lo cual ocasiona cambios conformacionales que resultan en un incremento en la afinidad por ligandos extracelulares (activación de la integrina). Estas señales “inside-out” controlan la fuerza de la adhesión y permiten interacciones lo suficientemente fuertes entre las integrinas y proteínas de la MEC para permitir que las integrinas transmitan la fuerza requerida para la migración celular y el remodelado y ensamblaje de la MEC. Las integrinas también se comportan como receptores tradicionales al transmitir información hacia las células mediante la señalización de afuera hacia adentro (“outside-in”). La unión de las integrinas con sus ligandos extracelulares cambia la conformación de la integrina y debido a que muchas de los ligandos son multivalentes contribuye al agrupamiento de integrinas. La combinación de tales eventos conduce señales intracelulares que controlan la polaridad celular, estructura del citoesqueleto, expresión de genes, supervivencia celular y proliferación (Figura 8). Es importante mencionar que aunque estos procesos se mencionan separados, están generalmente ligados, por ejemplo, la activación de una integrina puede incrementar la unión de ligando resultando en una señal “outside-in”. De manera inversa la

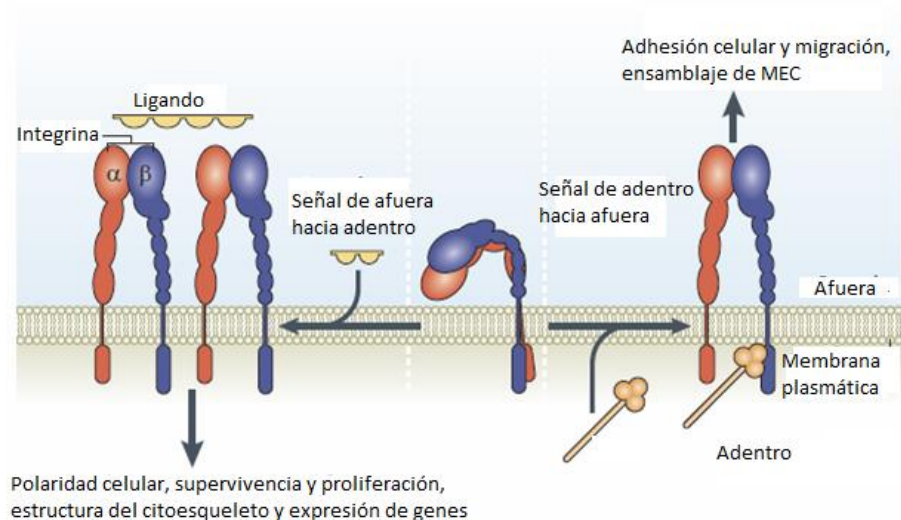


Figura 10. Funciones de las integrinas de Shattil et al., 2010

unión de ligando puede generar señales que causen señales “inside-out” (30).

Las integrinas están íntimamente asociadas con el citoesqueleto a través del dominio citoplásmico de la subunidad beta. El complejo puede unir diversas proteínas del citoesqueleto como α -actina, paxilina, talina, tenasina y vinculina. Estas proteínas se agregan formando sitios de adhesión focal los cuales, aparte de actuar como anclaje para la F-actina, contienen complejos de señalización que incluyen la cinasa de adhesión focal (FAK, focal adhesion kinase), la cinasa unida a integrina $\beta 1$ una serina/treonina proteína cinasa. Los sitios de adhesión focal además pueden interactuar con proteínas intracelulares como lo son moléculas de la vía MAPK, GTPasa pequeñas (ras y rho), cinasas de lípidos y fosfolipasa C (31).

En cuanto a las integrinas y su importancia en el embarazo se han realizado estudios donde se determinó que en el endometrio se expresan las integrinas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$. La integrina $\alpha v\beta 3$ ha mostrado tener especial relevancia en la implantación del blastocisto. Su expresión, detectada por inmunohistoquímica, y la de su ligando osteoponina coincide con la ventana de implantación y es la primera en interactuar con el trofoblasto. La expresión aberrante de esta integrina ha sido asociada a la infertilidad inexplicable y otros desordenes ginecológicos como endometriosis y síndrome de ovario poliquístico. Bajos niveles de ARNm de integrina en el día 21 se ha asociado con una tasa de implantación 50% más baja que niveles normales (32).

2.8 LIF

LIF o factor inhibidor de leucemia (Leukemia Inhibitory Factor), es una citocina pleitrópica perteneciente a la familia de IL-6 que es considerada como una de las citocinas esenciales para llevar a buen término el embarazo en humanos. Inicialmente fue identificada como una citosina que tiene la capacidad de inhibir la proliferación de células de leucemia mieloide de ratón e inducir su diferenciación hacia macrófagos. En humanos es producido por células endometriales, fibroblastos, hepatocitos, osteoblastos, monocitos, macrófagos, células T, etc. LIF controla la receptividad uterina para la implantación de blastocistos, el comportamiento del trofoblasto al promover la proliferación, invasión y diferenciación. En el endometrio tanto células epiteliales luminales como glandulares expresan LIF, siendo el epitelio glándular el que presenta mayor expresión teniendo su pico más alto durante la fase secretora/postovulatoria del ciclo menstrual. La expresión del receptor de LIF (LIFR) es mayor en las células epiteliales endometriales que en las células epiteliales glandulares. Después de la fijación del blastocisto al endometrio, las células del trofoblasto comienzan a expresar LIF que puede influenciar sus funciones de manera autócrina. Cuando LIF se une a su recepto, se activa la cascada de señalización de STAT y RAS/MAPK en el trofoblasto (33).

3.0 Hipótesis

Se encontrará una diferencia entre mujeres con infertilidad primaria que se embarazaron, las que no se embarazaron y mujeres fértiles en la expresión de integrina $\alpha\beta3$ y LIF en mujeres, mientras que sólo algunas Claudinas mostrarán diferencia ya que algunas son constitutivas y estas diferencias se corresponderán con la capacidad de lograr un embarazo clínico al someterse a Tecnologías de Reproducción Asistida (TRA).

4.0 Objetivos

4.1 Objetivo general.

Determinar en mujeres infértiles bajo tratamiento de estimulación ovárica con esquemas hormonales y técnicas de reproducción asistida bien definidos, la presencia de diferencias en la expresión de proteínas y compararlas con mujeres fértiles.

4.2 Objetivos particulares

Analizar los niveles de las proteínas en muestras de endometrio de mujeres con infertilidad primaria por medio de la técnica de inmunohistoquímica.

Determinar las diferencias en los porcentajes de expresión e intensidad de la marca generada por inmunistoquímica entre mujeres control, mujeres que lograron embarazarse y mujeres que no embarazaron mediante la prueba estadística P de Spearman.

Correlacionar los datos clínicos disponibles con los datos obtenidos de las inmunohistoquímicas.

5.0 Justificación

A pesar del conocimiento que las técnicas de reproducción asistida (TRA) han aportado acerca del proceso de reproducción humana y que han logrado resolver ciertos casos de infertilidad, las tasas de implantación son bajas incluso en ciclos naturales y es el principal factor limitante para lograr un embarazo usando TRA. Se sabe que una implantación exitosa requiere una interacción sincronizada de señales endócrinas, autócrinas y parácrinas entre el blastocito y el endometrio, sin embargo no se conocen claramente cuáles son las citocinas, quimiocinas o factores de crecimiento que intervienen en generar un endometrio funcional.

De ahí la importancia de la búsqueda de nuevos marcadores moleculares que permitan identificar el estado ideal del endometrio para transferir el blastocisto y aumentar las posibilidades de implantación en mujeres infértiles.

6.0 Materiales y Métodos

6.1 Anticuerpos

En la siguiente tabla se muestran los anticuerpos que se usaron, el proveedor y la dilución:

Primarios monoclonales	Dilución	Proveedor
Conejo anti-Claudina-1	1:50	GeneTex
Conejo anti-Claudina -2	1:50	Invitrogen
Cabra anti-Claudina -6	1:200	Santa Cruz, Biotechnology, Inc.
Ratón anti-Integrina $\alpha\beta3$	1:150	Abcam
Primarios policlonales		
Conejo anti LIF	1:50	GeneTex
Conejo anti Claudina-5	1:75	Invitrogen

Se usó el Kit LSAB + System-HRP (DAKO) el cual contiene bloqueador de peroxidasa endógena, anticuerpo secundario biotilado anti conejo, anti ratón y anti cabra. Contiene estreptavidina y solución sustrato-cromógeno.

Para la contratación de núcleos se utilizó CAT Hematoxilina (Biocare Medical). Para montar las laminillas se utilizó medio de montaje (Richard-Allan, Scientific, Thermo).

Cada anticuerpo se probó en un control positivo de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. También se estandarizaron las concentraciones para determinar cuál era la dilución más adecuada para realizar las inmunohistoquímicas en el endometrio.

6.2 Obtención de muestras

El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Ángeles del Pedregal. Las pacientes, evaluadas por los expertos de la Unidad de Reproducción Asistida bajo la dirección del Dr. Héctor Godoy, firmaron una carta de consentimiento informado. Se tomaron biopsias de 8 pacientes control, las cuales han probado ser fértiles (considerado así porque han tenido uno o más hijos en por lo menos dos años antes del presente estudio), no presentaban ningún problema relacionado con infertilidad y se presentaron por otros procedimientos como salpingoclasia. 24 mujeres infértiles primarias (incapaces de tener un embarazo después de un año de relaciones sexuales sin uso de preservativos ni anticonceptivos) que en el día 17 del mes previo a la transferencia de embriones tuvieron

un endometrio con un grosor de 10-12 mm evaluado por ecografía y que se ha reportado antes como un grosor adecuado del endometrio e indicador de receptividad, fueron sometidas a tratamiento de estimulación ovárica y TRA, todas tuvieron un ciclo simulado previo a la transferencia de embriones, se obtuvo una muestra de endometrio el día 17 de ese mismo ciclo menstrual. La edad de las pacientes se encontraba en un rango que va de los 30 a los 47 años con un promedio de 38 años. Las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4% y se incluyeron en parafina. Cortes de 4 micrómetros fueron utilizados para determinar la expresión de cld-1,-2,-5,-6, integrina $\alpha\beta3$ y LIF mediante inmunohistoquímica utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales específicos marcados con peroxidasa de rábano (HRP).

6.3 Técnica de inmunohistoquímica

Se utilizó el Kit DAKO LSAB+system HRP (k0679)

1.- Se desparafinaron y rehidrataron los cortes de tejido (Se rotularon las laminillas con lápiz punta diamante).

* Se verificó que alcoholes y xiloles estuviesen limpios, sin residuos de parafina

- a) Xilol por 10 minutos
- b) Xilol por 5 minutos
- c) Xilol/alcohol(100% o 96% y 1:1) por 5 minutos
- d) Alcohol 100% por 5 minutos
- e) Alcohol 100% por 5 minutos
- f) Alcohol 96% por 5 minutos
- g) Alcohol 96% por 5 minutos
- h) PBS 1X por 5 minutos

2.- Recuperación antigénica

Se colocaron laminillas en koplín inmersas en buffer de citratos pH 6, el koplín en un vaso de precipitados de 1L a baño maría cuidando no meter agua corriente en el koplín (3/4 del vaso), se calentó al horno de microondas por 2-3 minutos o hasta que se observaron cuerpos de nucleación en las laminillas. Se dejó enfriar por 30 minutos

3.- Lavado: se sumergió en PBS 1X eliminando los residuos y dejar 5 min con nuevo PBS 1X.

4.- Permeabilización

Se sumergieron en solución de tritón 0.2%

- Se secaron las laminillas alrededor del tejido
- Se delinearon las muestras de tejido con plumón hidrofóbico
- Se colocaron en una cámara húmeda (recipiente con sanitas húmedas cubiertas con plástico)
- Se cubrió todo el tejido con la solución
- Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda

5.-Bloqueo de peróxidasa endógena

Se agregó el bloqueador de peroxidasa alrededor del tejido y se dejó por 15 minutos

6.- Lavado: Se sumergió en PBS-Tween 0.02% y un último de 5 min con PBS-tween 0.02%

7.-Bloqueo

Se agregó solución de PBS-albúmina libre de IgG al 2% (30 mL de PBS +3 mg de albúmina)

- Se cubrió cada laminilla con la solución
- Se incubó en cámara húmeda por 30 minutos

8.- Lavado: Se sumergió en PBS-Tween 0.02% y un último de 5 min con PBS-tween 0.02%

9.- Incubación con anticuerpo primario

- Se diluyó el anticuerpo en solución de PBS-albúmina 1% (cada anticuerpo primario funciona a concentraciones diferentes por lo que se debe de titular)
- Se incubó por 2 horas a temperatura ambiente o 1 hora a 37°C o toda la noche a 4°C

La fórmula para conocer el volumen de anticuerpo que se debe de agregar es la siguiente:

$$V_{ab} = V_t / \text{dilución}$$

Donde:

V_{ab}: Volumen del anticuerpo que se agregará al PBS-albúmina 1%

Vt: Volumen total al que se llevara la solución de anticuerpo + PBS-albúmina 1%

Dilución: es la dilución a la cual se recomienda usar el anticuerpo o que se observó mejor respuesta después de titular

10.- Lavado: Se sumergió en PBS-Tween 0.02% y un último de 5 min con PBS-Tween 0.02%

11.- Incubación con anticuerpo 2°

- Se agregó biotina y se dejó incubando por 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente, esta contiene anticuerpo contra ratón, cabra, conejo, etc.

- Lavado: sumergir vigorosamente en PBS-Tween 0.02% y un último de 5 min con PBS-tween 0.02%

- Se agregó estreptavidina acoplada a HRP y se dejó incubando a temperatura ambiente en cámara húmeda por 30 minutos

12.- Revelado con DAB

Se preparó DAB en el momento de la siguiente manera:

- 980 µL de buffer + 20uL de DAB cromógeno para preparar 1 mL.

13.- Lavado: Se sumergieron en PBS-Tween 0.02% y un último de 5 min con PBS-tween 0.02%

Se vertieron los residuos en solución de hipoclorito (cloro comercial)

14.- Contratación de núcleos con hematoxilina de Hill

Se agregó hematoxilina cubriendo todo el tejido y se dejó durante 4 minutos. Se lavó la hematoxilina de la siguiente manera:

- Agua corriente
- Agua destilada
- PBS 1x
- Agua corriente

15.-Deshidratación de tejidos

- a) Alcohol 96% por 3 minutos
- b) Alcohol 100% por 3 minutos

- c) Alcohol 100% por 3 minutos
- d) Alcohol 96% por 3 minutos
- e) Xilol/alcohol (100% o 96% y 1:1) por 3 minutos
- f) Xilol por 10 minutos
- g) Xilol por 5 minutos

16.- Se montó con resina hidrofóbica

6.4 Interpretación

Las muestras fueron evaluadas por tres observadores experimentados que registraron las diferencias en intensidad y porcentaje de expresión de cada muestra por lo que al final se realizó un promedio de las tres mediciones, se tomaron fotografías con un microscopio Nikon eclipse 80i.

Las laminillas fueron evaluadas por tres observadores distintos a los cuales se les pidió que registraran en tres campos distintos, el porcentaje de células que expresaban la proteína en la laminilla, luego se sacó un promedio de los tres campos por muestra y con estos se hizo un promedio tomando en cuenta los registros de los tres observadores diferentes para cada proteína evaluada; se les pidió también que registrarán la intensidad de tinción de la marca (categorizándola en distintos patrones: negativo, débil, moderado y fuerte). Todos estos datos se anotaron. Este método ha sido usado por otros investigadores en el mismo tejido (24, 26).

6.5 Estadística

La base de datos se analizó con ayuda del programa estadístico JMP versión 10.02 de SAS. Se realizó un análisis univariado de integrina $\alpha\beta3$ y embarazo y un análisis multivariado de correlación entre las demás proteínas que se corroboró con p de Spearman, puesto que se utilizó estadística no paramétrica.

7.0 Resultados

7.1 Grupos de estudio

Las características generales tanto del grupo de estudio como el del grupo control mostró diferencias importantes. El grupo de estudio se subdividió en: aquellas que logro el embarazo y las que no. La edad promedio de las 24 pacientes que conformaron el grupo de estudio fue significativamente mayor que la del grupo control (38.2 vs 27.3 años) ($p < 0.05$).

Tabla 1. Característica de los grupos de estudio

Variable	Número de pacientes	Media \pm DE	Rango
Grupo control			
*Edad	8	27.37 \pm 4.3	22-34
*Menarca	8	13.42 \pm 1.71	12-17
*IMC	8	23.48 \pm 2.94	19.6-28.7
Grupo que logró embarazo			
Edad	10	37.6 \pm 4	32-45
*Menarca	10	12.6 \pm 1.1	11-14
IMC	10	23.67 \pm 3.7	19.2-30
Grupo que no logró embarazo			
Edad	14	38.71 \pm 4.5	30-47
*Menarca	14	13 \pm 1.29	11-15
IMC	14	25.94 \pm 1.29	21-34

*No en todos los casos se disponía de los datos completos.

Sin embargo la edad no influyo en el éxito o fracaso del embarazo ya que ambos subgrupos mostraron una pequeña pero no significativa diferencia en la edad promedio (37.6 vs 38.7 años, respectivamente) (Tabla 1). Solamente hubo 1 paciente fuera del rango de edad considerada como “ideal” (22 hasta los 30 años) en el grupo control.

La diferencia en cuanto a la edad de la menarca no fue significativa entre los grupos sin embargo el índice de masa corporal de las pacientes del grupo de estudio que no lograron embarazarse si fue significativamente mayor que el de las mujeres que si lograron el embarazo y el grupo control (25.9 vs 23.6 y 23.4, respectivamente, $p < 0.05$).

La tabla 2 incluye la lista de los factores que se consideraron como responsables de la infertilidad en las pacientes del grupo de estudio. Fue interesante observar que el llamado factor masculino fue la anomalía común en el grupo de estudio, y que el llamado factor tubario junto con el factor masculino si fueron importantes en el subgrupo de mujeres que no logro el embarazo.

Tabla 2.- Factores asociados a la infertilidad

Características de las pacientes que lograron embarazo	Número de casos
Masculino	5
Baja respondedora	3
Edad	2
Endometriosis	2
Síndrome de ovario poliquístico	2
Factor Tubario	2
Miomas	1
Hiperprolactinemia	1
Hidrosalpix	1
Características de las pacientes que no lograron embarazo	Número de casos
Masculino	4
Factor Tubario	4
Edad	3
Síndrome de ovario poliquístico	2
Endometriosis	2
Baja respondedora	2
Baja reserva	2
Endocrino	1

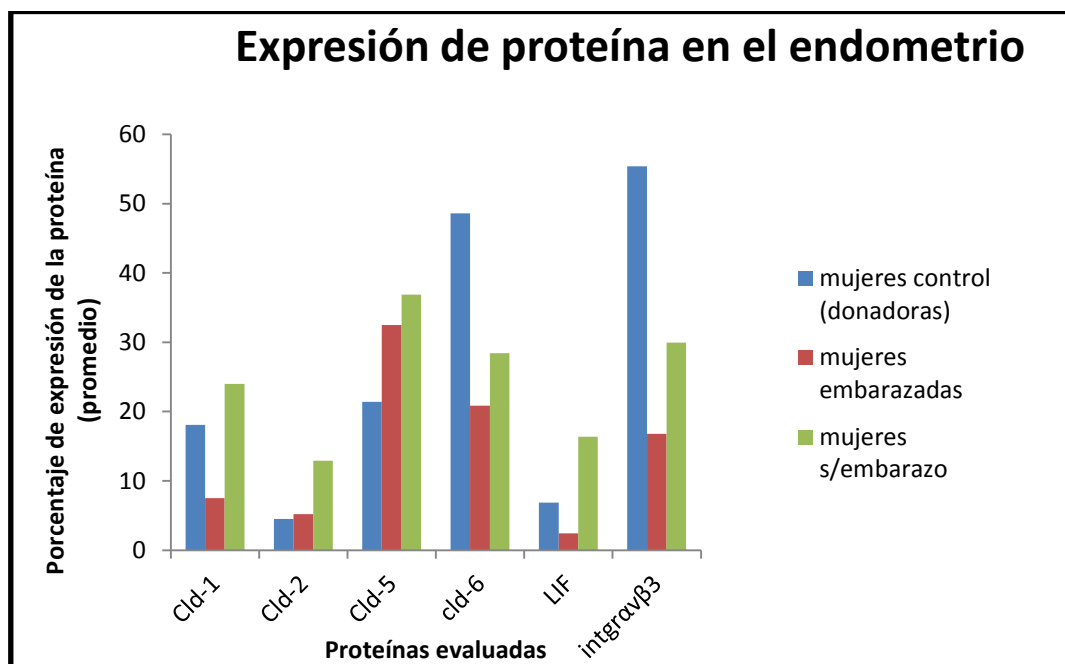
7.2 Expresión de Claudinas

La tabla 3 muestra el porcentaje promedio de expresión de las Claudinas que se evaluaron en ambos grupos.

Tabla 3.- Expresión de Claudinas

Promedios de porcentaje de proteína en endometrio						
Número de mujeres	Cld-1	Cld-2	Cld-5	Cld-6	Intgr $\alpha\upsilon\beta 3$	LIF
Mujeres control						
8	18.1	4.5	21.41	55.37	48.58	6.85
Mujeres embarazadas						
10	7.50	5.22	32.50	16.8	20.84	2.44
Mujeres s/embarazo						
14	24.00	12.91	36.86	37.43	28.44	16.38

Al graficar los resultados se observó que existe un rango de porcentaje de expresión de algunas Claudinas, en particular Claudina 5 y 6 así como integrina $\alpha\upsilon\beta 3$ en el cual se puede augurar con cierto grado de certeza el éxito del procedimiento (Grafica 1). A raíz de este análisis se decidió efectuar análisis multivariado y univariado de los resultados en busca de correlaciones que puedan indicar el desarrollo de un endometrio “apto” para el embarazo.



Gráfica 1. Se graficaron los porcentajes de expresión de claudinas-1,-2,-5,-6, de LIF y de la integrina $\alpha\upsilon\beta 3$.

7.3 Correlaciones en el grupo que logro el embarazo:

La expresión de Claudina 6 en el endometrio del grupo control fue de 55%, en las mujeres embarazadas fue de 16.8% y en las mujeres no embarazadas fue de 37.4% (un incremento del doble) esta diferencia entre grupos fue estadísticamente significativa ($p < 0.03$). La expresión de Claudina 1, 2, 5 y LIF fue significativamente mayor en el subgrupo de

mujeres que no logro el embarazo, sin embargo en relación a la expresión de integrina $\alpha\beta3$ también se observó un incremento comparativo entre el subgrupo que no logró el embarazo y el que sí, pero en relación al grupo control la expresión de integrina $\alpha\beta3$ fue considerablemente menor ($p < 0.05$). Sin embargo hubo una correlación positiva entre la expresión de la integrina $\alpha\beta3$ y la claudina-5 ($p=0.018$, valor de tablas de $.745$ y un $\alpha=.01$), en este grupo. La correlación más importante fue la observada entre la expresión de Claudina 6 y la Claudina 1 la cual fue estadísticamente muy significativa ($p < 0.0003$).

7.4 Correlaciones en el grupo que no logró el embarazo:

En este subgrupo se observaron correlaciones interesantes y de hecho inesperadas. La primera de ellas fue entre la expresión de Claudina 6 y Claudina 5 ($p=0.0063$ con un valor r de 0.646 y un $\alpha=.01$). La otra correlación positiva que nos llamó la atención fue la observada entre el porcentaje de expresión de LIF y Claudina 1 ($p=0.0409$, valor de r de 0.646 , y un $\alpha=.01$), así como la de LIF con Claudina 2 que mostró una correlación de manera inversa ($p=0.0012$, valor r de 0.646 , y un $\alpha=.01$).

7.5 Intensidad de la marca

Otro parámetro que se evaluó fue la reactividad de los epitelios a los diferentes marcadores. La tabla 4 muestra la enorme diversidad de respuesta en relación a la expresión de los marcadores.

Tabla 4.- Reactividad de los epitelios

Grupo control						
Respuesta	Claudina -1	Claudina -2	Claudina -5	Claudina -6	$\alpha\beta3$ 3	LIF
Negativo	3/8	2/8	1/8	0/8	0/8	4/8
Débil	1/8	2/8	1/8	1/8	1/8	2/8
Moderado	3/8	3/8	5/8	6/8	5/8	2/8
Fuerte	1/8	1/8	1/8	1/8	2/8	0/8

Mujeres con embarazo						
Respuesta	Claudina-1	Claudina-2	Claudina-5	Claudina-6	$\alpha\beta3$	LIF
Negativo	3/10	2/10	1/10	3/10	1/10	5/10
Débil	4/10	3/10	3/10	2/10	4/10	3/10
Moderado	3/10	5/10	5/10	5/10	5/10	2/10
Fuerte	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10

Mujeres sin embarazo						
Respuesta	Claudina-1	Claudina-2	Claudina-5	Claudina-6	$\alpha\beta3$	LIF
Negativo	1/14	5/14	3/14	1/14	2/14	4/14
Débil	4/14	1/14	2/14	3/14	3/14	3/14
Moderado	9/14	7/14	7/14	9/14	8/14	7/14
Fuerte	0/14	1/14	2/14	1/14	1/14	0/14

Llamó fuertemente la atención la ausencia de reactividad en el 100% de las células de los epitelios de los marcadores que se evaluaron. Esta pobre reactividad fue más notoria en el grupo de estudio, ya que en términos de porcentajes relativos, el grupo control fue en general más reactivo que el grupo en estudio (Figuras 9 a la 14). Llama también la atención el hecho de que la reactividad no mostró diferencias entre el subgrupo que logró el embarazo y el que no a excepción de la Claudina 6 que curiosamente fue similar a la del grupo control, particularmente en cuanto a lo moderado de la reactividad.

Proteína	Epitelio luminal	Epitelio glandular	Estroma
Claudina-1	+	+	-
Claudina-2	+	+	+
Claudina-5	+	+	+
Claudina-6	+	+	-
LIF	+	+	+
Integrina $\alpha\beta3$	+	+	-

7.6 Imágenes

Las imágenes que aquí se anexan son muestras representativas de la reactividad de los endometrios que se analizaron. Del lado izquierdo se muestran los controles y del derecho las tinciones del grupo problema.

Notación: L=Lumen del útero, EL=Epitelio luminal, G=Glándula, EG=Epitelio glandular, E=Estroma.

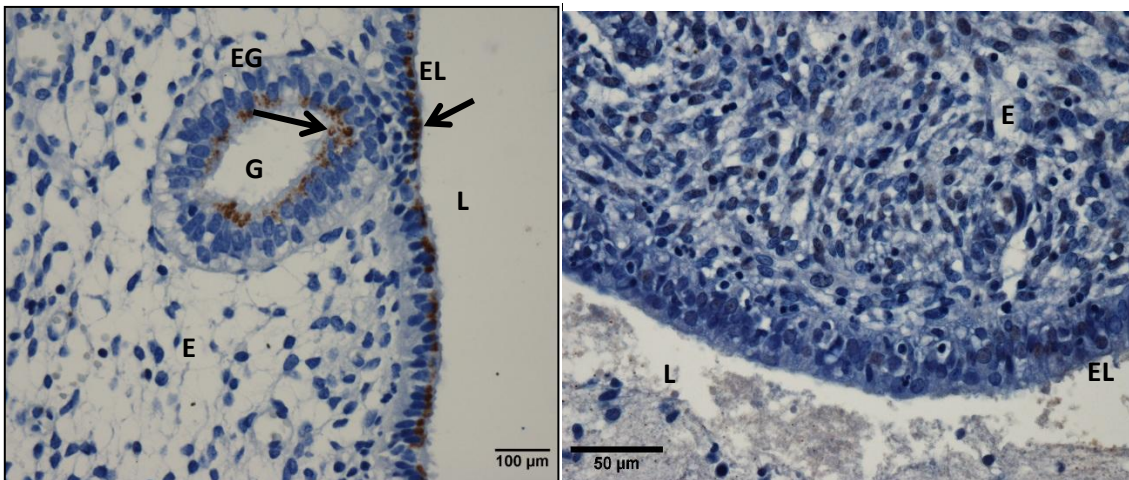


Figura 9. Integrina $\alpha\beta 3$

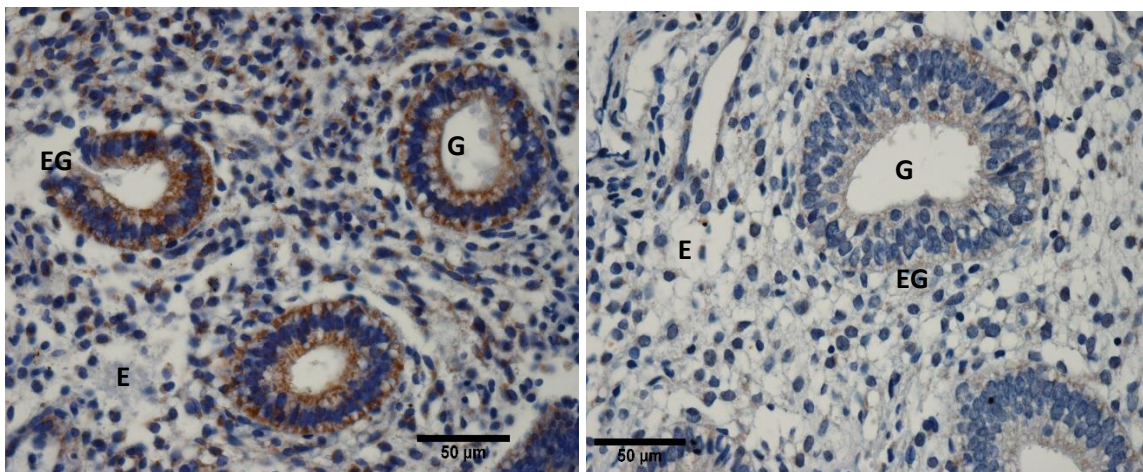


Figura 10. Claudina 1

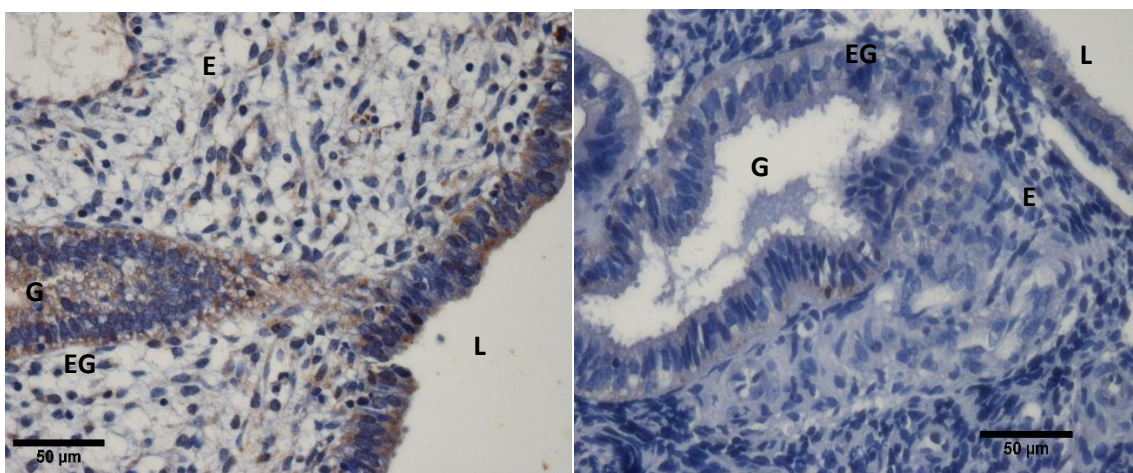


Figura 11. Claudina 2

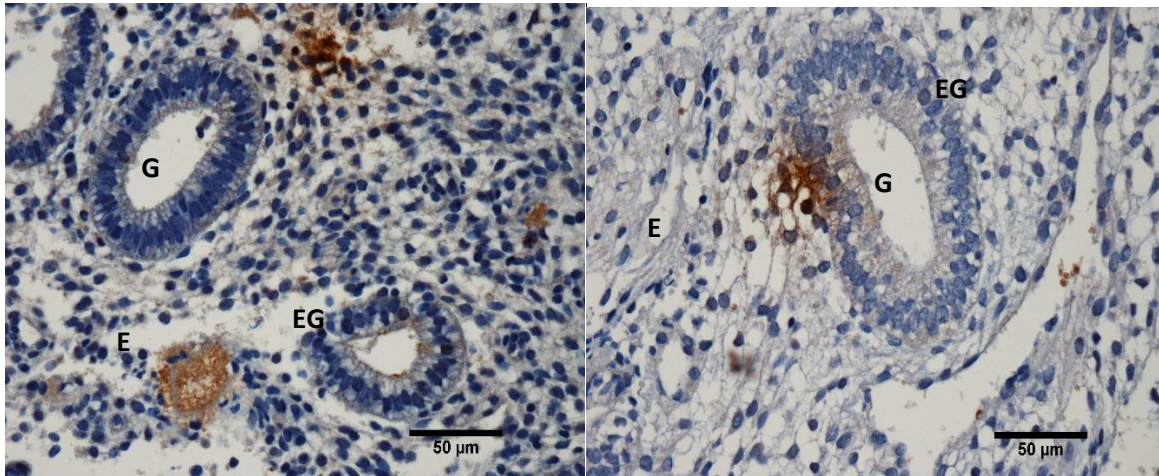


Figura 12. Claudina 5

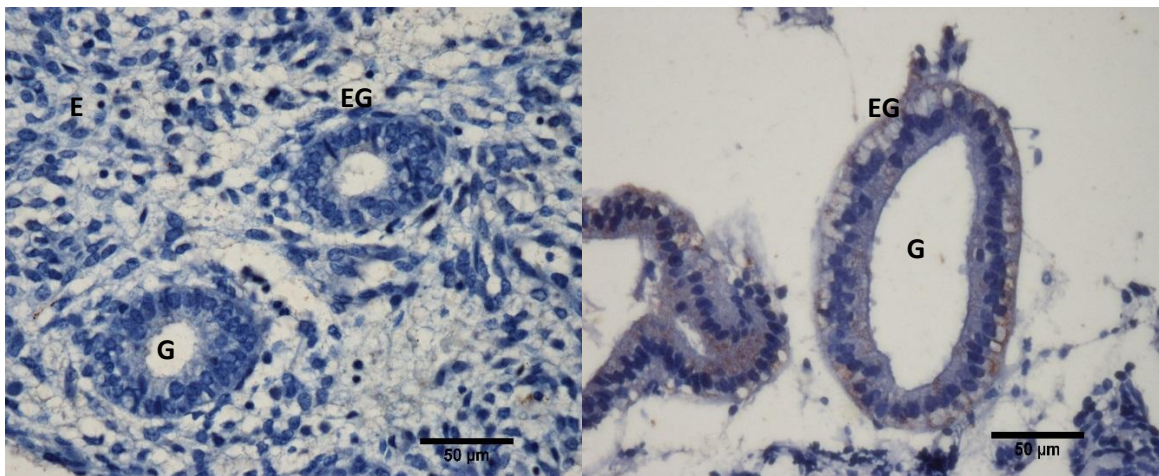


Figura 13. Claudina 6

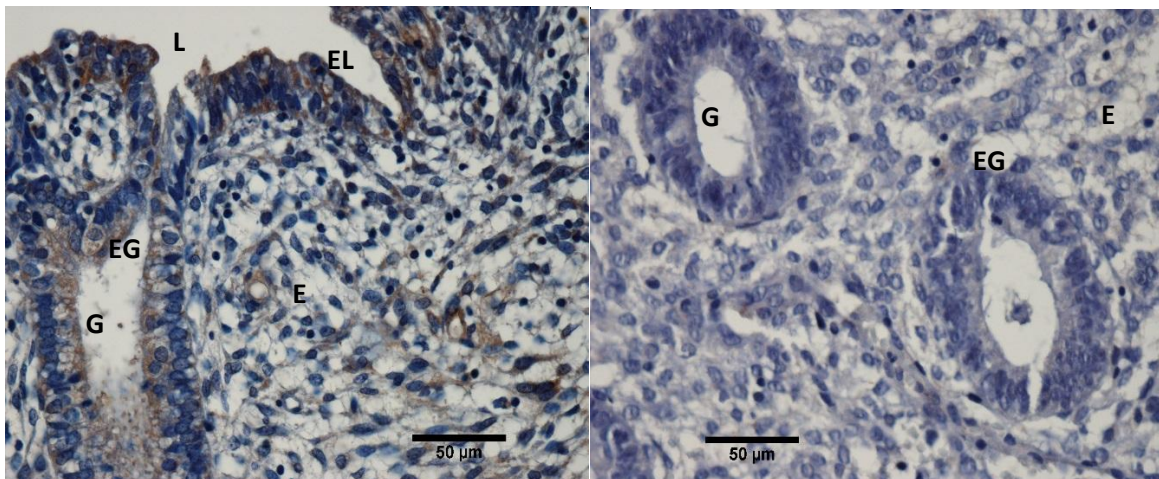


Figura 14. LIF

8.0 Discusión

Una de las primeras observaciones realizadas entre los diferentes grupos fue que la edad promedio de ambos grupos era diferente ya que mientras que el grupo control tenía una edad promedio de 27 años el grupo de mujeres bajo tratamientos de reproducción asistida tenía 38 años. La relación entre la edad de la mujer y su fertilidad, declina marcadamente con la edad debido a la disminución en el número de ovocitos y en la calidad de los mismos debido a aneuploidias (34).

La segunda diferencia fue en el índice de masa corporal entre las mujeres del grupo que logro el embarazo contra el que no lo logro. Un IMC de 23 se considera normal mientras que un IMC de 25 se considera sobrepeso. Diversos estudios han demostrado que mujeres con un IMC por encima de 25 muestran una reducción en su fertilidad (35). Los efectos que el sobrepeso y la obesidad causan se categorizan en hormonales, ovulatorios/ováricos y endometriales. En cuanto a los cambios endometriales que son los que nos interesan, se sabe que el sobrepeso y la obesidad está asociada con la resistencia a la insulina e hiperinsulinemia lo que se asocia con reducción de glicodelina e IGFBP1. Bajos niveles de glicodelina se han asociado con pérdida recurrente del embarazo (36, 37). IGFBP1 es una proteína secretada por el endometrio decidualizado en la fase secretora del ciclo, y por ende dependiente de progesterona (38), que facilita la adhesión en la interfase en madre/feto, la perturbación de estas moléculas pueden contribuir a disminuir la fertilidad. Valores elevados de esta proteína se asocian con restricción del crecimiento fetal y deficiente función de la placenta (39). El sobrepeso y la obesidad están claramente asociadas con un estado pro-inflamatorio (40), muy particularmente conforme aumenta la edad de la persona (41). Este estado pro-inflamatorio implica importante elevación de citocinas, quimiocinas, leptina, secretina y otras así como mayor resistencia a la insulina (42). Estos eventos se dan no solo en hombres sino también en mujeres y se ha observado que niveles elevados de proteínas de fase aguda y citocinas pro-inflamatorias como IL-6, PAI1 y TNF ejercen un efecto negativo sobre la implantación y el desarrollo embrionario temprano (43)

Respecto al patrón de tinción, nuestros resultados confirmaron una observación efectuada previamente por Gatje y cols en el 2008 en biopsias con endometriosis eutópica y ectópica. Estos autores observaron que el patrón de tinción en cada biopsia que se evaluó, fue en la mayoría de los casos heterogéneo, es decir glándulas negativas, teñida débil y fuertemente podrían estar presentes al mismo tiempo (25).

Las moléculas de adhesión celular (p. e. integrinas, selectinas, inunoglobulinas) son ligandos de superficie que median la adhesión célula-célula y son clave para la adhesión del blastocisto en el epitelio luminal uterino (44). Dentro de estas moléculas de adhesión, sobresalen las integrinas, que son una familia de proteínas cuya expresión en el endometrio ha sido investigada de manera extensa (45). De todos los miembros de esta familia, la integrina $\alpha\beta3$ es considerada como el marcador de receptividad endometrial más

ampliamente caracterizado (46). Nuestros resultados mostraron que la expresión de esta integrina en el subgrupo que logró el embarazo fue menor que el grupo control y el grupo que no logro embarazo. Este resultado parece indicar que la menor expresión de integrina favoreció la implantación (determinada por el embarazo). En primera instancia este resultado parece contradecir otros estudios donde se ha mostrado que la expresión de integrina $\alpha_v\beta_3$ es un indicador de endometrio receptivo, sin embargo, cabe recalcar que las muestra en este caso se tomaron en el día 17 del ciclo, mientras que en la literatura se tiene que la mayor expresión se alcanza en los días 6-7 postovulatorios (47). En relación con los cambios en la expresión de integrina, se sabe que los niveles anormales de progesterona y estrógenos durante los tratamientos de FIV para inducir la ovulación afectan la morfología endometrial y quizás también la receptividad; por ejemplo, se demostró que la expresión de ciertas integrinas por el endometrio se veían reducidas en el epitelio glandular después de la inducción de la ovulación, lo cual lleva a proponer que seguramente los niveles de estradiol alcanzados durante la FIV tiene efectos negativos en la implantación. Bajos niveles de estradiol reduce el número de oocitos que se pueden capturar pero altos niveles pueden ocasionar que el endometrio no esté en sincronía, expresando menores niveles de integrinas que deriva en bajas tasas de implantación (48). Otro punto importante a considerar es que, a pesar de que la co-expresión de $\alpha_v\beta_3$ junto con $\alpha_4\beta_1$, se relaciona con el periodo que se considera como de mayor receptividad, lo cual es cierto independientemente de si la mujer es fértil o no, si el endometrio está fuera de fase o en fase (47), la integrina $\alpha_v\beta_3$ es controlada de manera positiva por el factor de crecimiento epidermal (EFG) o el factor de crecimiento epidermal de unión a heparina (HB-EFG) (49), y de manera negativa es regulada por el estradiol, lo cual podría explicar que los niveles de integrina hayan sido bajos ya que las mujeres incluidas en el estudio tenían presumiblemente altos niveles de estradiol. Esta última observación es importante ya que mi propuesta es que, en los protocolos de tratamiento a estas pacientes debería ser obligatorio tener evaluaciones mensuales de la concentración sérica de estradiol y progesterona, ya que la expresión de integrinas en el endometrio también es regulada por progesterona (50).

Para que un endometrio sea capaz de soportar la implantación del embrión requiere de una irrigación adecuada a través de la cual se transporten nutrientes y oxígeno entre otras moléculas. Consistente con este hecho se observó una relación positiva entre la expresión de Claudina 5 que se expresa en vasos (51) e integrina $\alpha_v\beta_3$ que es una molécula clave en la angiogénesis (52), aparte de ser un indicador de receptividad endometrial. Claudina-5 es la Claudina predominante en las uniones estrechas que forman las células endoteliales vasculares, está Claudina es predominantemente formadora de barreras con baja permeabilidad a cationes; ratones knock-out para esta proteína permiten la rápida extravasación moléculas marcadoras con un peso molecular debajo de 800 Da hacia el cerebro y el parénquima del cordón espinal, mientras que en ratones control, la molécula se queda confinada al compartimiento intravascular (53). Ratones nulos para Claudina 5

mueren dentro de las 10 primeras horas después de nacidos, pero la causa aún no es clara (54). Se desconoce el rol fisiológico de esta Claudina en otros tejidos.

La expresión endometrial de Claudina 6 en pacientes que lograron embarazarse mostró una correlación positiva con la expresión de Claudina 1. Claudina 1 es una proteína que se expresa de manera ubicua en casi todos los tejidos y su función es predominantemente de barrera ya que aumenta la resistencia transepitelial. Los ratones nulos para Claudina 1 sufren de pérdida de función de barrera para el agua y macromoléculas en el estrato granuloso de la epidermis (55, 56). Claudina 6 es una de las de las moléculas que más tempranamente se expresan durante la diferenciación epitelial, *in vitro* parece actuar como una barrera para Na^+ y Cl^- cuando se transfecta a células MDCK II. Ratones transgénicos que sobreexpresan Claudina 6 de manera desregulada muestran una pérdida de la barrera normal de piel con la consecuente pérdida de agua transepidermal y muerte neonatal (57, 58). Estos resultados ponen de manifiesto que la mera presencia de Claudina 6 no basta en la formación de una barrera epitelial normal, sino que debe haber un balance preciso en la cantidad de expresión de los diversos miembros que conforman las uniones intercelulares, siendo la familia de las Claudinas solo uno de los muchos componentes (59, 60). Estudios preliminares en nuestro grupo de trabajo, utilizando una línea celular de adenocarcinoma gástrico humano sobreexpresando Claudina 6, sugieren una correlación en el aumento de Claudina 1 y activación de MMP-2. Dado que en estos resultados observó el mismo patrón de expresión, es posible que las mujeres que lograron embarazarse fue debido a que hubo activación de la MMP-2, que es una proteína clave en la invasión del blastocisto al endometrio receptivo (61). Es por esta razón que posiblemente las mujeres que mostraron una mayor expresión de Claudina 6 lograron embarazarse, ya que mostraron un epitelio endometrial de mayor funcionalidad.

La expresión de LIF (leukaemia inhibitor factor) tampoco pareció tener correlación con el éxito del tratamiento. LIF es una proteína secretada por las células NK (62) que como se ha observado recientemente pueden diferenciarse en el útero donde también secretan interferón gama; ambas moléculas son importantes para la decidualización del endometrio (63, 64). Hace algunos años se reportó la posible asociación entre la expresión de LIF y Claudina 4 en el endometrio como posible marcadores del éxito de los procedimientos de reproducción asistida (24). En dicho trabajo se concluyó, utilizando técnicas de inmunohistoquímica, que el aumento en la expresión de LIF y la ausencia de expresión de Claudina 4 eran los marcadores que sugerían un aumento en la posibilidad de lograr el embarazo utilizando técnicas de reproducción asistida. Estos resultados son compatibles con los nuestros. También se ha mencionado que la expresión de LIF no se relaciona con la concentración de progesterona (65) lo cual llama la atención pues al parecer la hormona esteroidea más importante en todo el proceso de diferenciación y maduración del endometrio fisiológico es la progesterona. La progesterona se ha asociado con fertilidad deficiente en mujeres con síndrome de ovario poliquístico (66) pero hasta la fecha se

desconoce si ejerce alguna función reguladora en la expresión de Claudinas en el endometrio o si regula la activación de células NK en el útero, pero recientemente se observó que el uso de un antagonista de progesterona aumenta la citotoxicidad de las células NK uterinas a través de la activación de ERK (67) y ésta es la misma vía de señalización que regula la expresión de Claudinas en células epiteliales (68).

Finalmente los resultados pueden tener inconsistencias debido a: 1) el pequeño tamaño de la muestra por lo cual no se pudo aplicar estadística paramétrica y 2) no se están tomando en cuenta el factor masculino ni la calidad del embrión.

9.0 Apéndices

9.1 Soluciones

9.1.1 PBS 10X a pH 7.0 (Solución stock)

Para preparar 1L

79g de NaCl

15g de Na₂HPO₄

6 g de Na₂H₂PO₄

Se disuelve cada sal por separado, se mezclan, después se ajusta el pH y finalmente se afora a 1L con ddH₂O.

9.1.2 PBS 1X a pH 7.0 para lavados

Para preparar 1L

Se toma una alícuota de 100 mL de PBS 10X a pH 7.0 (solución stock) y se afora con ddH₂O para llegar a 1L.

9.1.3 PBS-Tween 0.2% para lavados

Para preparar 1L

Se toma PBS 1X se agregan 2 mL de Tween, se disuelve y se afora a 1L con más PBS 1X.

9.1.4 Buffer de citratos

Para preparar 100 mL

Se preparan por separado las siguientes soluciones:

-Ácido cítrico a 0.01 M

0.2101 g de ácido cítrico en 100 mL de ddH₂O.

-Citrato de sodio a 0.01 M

0.2941 g de citrato de sodio en 100 mL de ddH₂O.

Después se toman 9.5 mL de ácido cítrico y 41.5 mL de citrato de sodio, se ajusta el pH a 6 y finalmente se afora a 100 mL.

NOTA: para ajustar el pH siempre se usan ácido cítrico y citrato de sodio, no usar NaOH ni HCl.

9.1.5 PBS-Tritón 0.2%

Para preparar 100 mL de PBS-tritón se toman 200 µL de Tritón y se agregan al PBS 1X, luego se afora a 100 mL.

9.1.6 PBS-albúmina 2%

Para preparar 100 mL se usa PBS a 1X, se le agregan 2 gramos de albúmina y se afora a 100 mL.

9.1.7 PBS-albúmina 1%

A partir de la solución PBS-albúmina al 2% se pueden tomar 50 mL de PBS albúmina y agregar aforar a 100 mL con PBS 1X o prepararlo con 1 gramo de albúmina en PBS 1X y aforarlo a 100 mL.

10.0 Bibliografía

- 1.-Zhang S, Lin H, Kong S, Wang S, Wang H, Wang H y Armant R. 2013. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol Asp Med.* 34(5):939-80.
- 2.-Cha J, Sun X y Dey SK. 2012. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat. Med.* 18(12):1754-67.
- 3.-Koot YEM y Macklon NS. 2013. Embryo implantation: biology, evaluation, and enhancement. *Reprod Endocrinol.* 25(4): 274-79.
- 4.-Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, y Stevens GA. 2012. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PloS ONE.* DOI: 10.1371/journal.pmed.1001356.
5. - Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E. y Vanderpoel, S. 2009. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil Steril.* 92 (5): 1520-24.
6. - Wang H y Dey SK. 2006. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev.* 7: 185-99.
- 7.- Pelayo R., Santa-Olalla, J y Velasco, I. (Editores) 2011. Células troncales y medicina regenerativa. Buena Onda. México D. F. pp: 38-39.
- 8.- Tortora GJ y Derrickson B. 2006. Principles of Human Anatomy and Physiology. (11^a Ed.) *Panamericana.* Buenos Aires, Argentina. Pp. 941-42.
- 9.- Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T y Wang H. 2004. Molecular cues to implantation. *Endo Rev.* 25(3): 341-73.

- 10.- Coutifaris C, Meyers, ER, Guzik, DS, Diamond, MP Carson, SA, Legro, RS, MnGovern, PG, Schlaff, W, Carr, BR, Steinkampf, MP, Silva, SS, Voguel, DL Leppert, PC. 2004. Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is no related to fertility status. *Fertil Steril.* 82, 1264-72.
11. - Singh, A. B., Sharma, A. y Dhawan, P. 2013. Claudin family of proteins and cancer: An overview. *J Oncol.* 2010 doi:10.1155/2010/541957.
- 12.- Ben-David U, Nudel N y Benvenisty N. 2013. Immunological and chemical targeting of the tight-junction protein Claudin-6 eliminates tumorigenic human pluripotent stem cells. *Nat. Commun.*4: 1992 doi: 10.1038/ncomms2992.
13. - Furuse M. 2010. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspec Biol.* 2(1):a002907.
14. - Franke WW. Discovering the molecular components of intercellular junctions, a historical view. *Cold Spring Harb Perspec Biol.* 1:a003061.
- 15.-Turksen K, Troy TC 2004. Barriers built in claudins. *J. Cell Sci.* 117:2435-58.
- 16.-Furuse M, Sakaki H, Tsukita S. 1999. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J. Cell Biol.* 147:891-903.
- 17.- Piontek J, Winkler L, Wolburg H, Müller SL, Zuleger N, Piehl C, Wiesner B, Krause G, Blasig IE. 2008. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J.* 22(1):146-58.
18. - Oliveira SS, Morgado-Díaz JA. 2007. Claudins: Multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Cell and Mol. L. Sci.* 64:17-28.
- 19.- Pan XY, Wang B, Che YC, Weng ZP, Dai HY, Peng W. 2007 Expression of claudin-3 and claudin-4 in normal, hyperplastic, and malignant endometrial tissue. *Int J Gynecol Cancer.* 17:233-41.

20. - Rangel LB, Agarwal R, D'Souza T, Pizer ES, Alo PL, Lancaster WD, Gregoire L, Schwartz DR, Cho KR, Morin PJ. 2003. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clin Cancer Res.* 9:2567–75
21. - Agarwal R, D'Souza T, Morin PJ. 2005. Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Res.* 65:7378–85.
- 22.- Miyamori H, Takino T, Kobayashi Y, Tokai H, Itoh Y, Seiki M, Sato H. 2001. Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 276:28204–11.
- 23.-Sing AB y Harris RC. 2004. Epidermal grow factor receptor activation differentially regulates claudins expression and enhances transepithelial resistance in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem.* 279: 3543-52.
- 24.-Serafini PC, Silva I DCG, Smith GD, LA Motta E, Rocha A M y Baracat EC. 2009. Endometrial claudin-4 and leukemia inhibitory factor are associated with assisted reproduction outcome. *Reprod Biol Endo.* 7:30.
25. - Gaetje R, Holtrich U, Engels k, Kissler S, Rody A, Karn T y Kaufmann M. 2008. Differential expression of claudins in human endometrium and endometriosis. *Gynecol Endocrinol.* 24(8):442-49.
- 26.-Sobel G, Németh J, Kiss A, Lotz G, Szabó I, Udvarheli N, Schaff Z y Páska C. 2006. Claudin 1 differentiates endometrial and serous papillary endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol.* 103:591-98.
27. - Brizzi MF, Tarone G y Defilippi P. 2012. Extracellular matrix, integrins and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Curr Opin in Cell Biol.* 24:645–51.
- 28.-Springer TA y Dustin ML. 2012. Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Curr Opin in Cell Biol.* 24:107–15.

29. - Pouwels J, Nevo J, Pellinen T, Yläne J y Ivaska J. 2012. Negative regulators of integrin activity. *J of Cell Sci.* 125: 3271–80.
30. - Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. 2010. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat.* 11:288-300.
31. - Avraamides CJ, Garmy-Susini B y Varner JA. 2008. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 8:604-17.
- 32.-Koot YEM, Teklenburg G, Salker MS, Brosens JJ y Macklon NS. 2012. Molecular aspects of implantation failure. *Bioch Biophys Acta.* 1822 (2012): 1943-50.
33. - Suman P, Malhotra SS, Gupta SK. 2013. LIF-STAT signaling and trophoblast biology. *Landes Bioscience.* 2:e25155.
34. -ESRHE Capri Workshop group. 2005. Fertility and ageing. *Hum Reprod Update.* 11(3):261-67. doi:10.1093/humupd/dmi006.
35. - Grodstein F, Goldman MB y Cramer DW. 1994. Body mass index and ovulatory infertility. *Epidemiology.* 5: 247–250.
- 36.-Carrington B, Sacks G & Regan L. 2005 Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 17: 591–97.
- 37.-Levens, ED & Skarulis MC 2008. Assessing the role of endometrial alteration among obese patients undergoing assisted reproduction. *Fertil Steril.* 89: 1606–08.
38. - Kim JJ y Fazleabas AT. 2004. Uterine receptivity and implantation: the regulation and action of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1), HOXA10 and forkhead transcription factor-1 (FOXO-1) in the baboon endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2: 34

39. - Holmes RP, Holly JMP y Soothill PW. 2000. Maternal insulin-like growth factor binding protein-1, body mass index, and fetal growth. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 81:F113-F117.
40. - Sundaram S, Johnson AR, Makowski L. 2013. Obesity, metabolism and the microenvironment: Links to cancer. *J Carcinog.* 12:19.
41. - Alam I, Pin T yx Larbi A. 2012. Does Inflammation Determine Whether Obesity Is Metabolically Healthy or Unhealthy? The Aging Perspective. *Mediators Inflamm Volume.* (2012), Article ID 456456, 14 pages.
42. - Tateya S, Kim F y Tamori Y. 2013. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol.* 4 (93):1-14.
43. - Brewer, C. J. y Balen, A. H. 2010. The adverse effects of obesity on conception and implantation. *Reprod.* 140: 347-64.
44. - Singh H y Aplin JD. 2009. Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation. *J Anat.* 215 (1): 3-13.
45. - Staun-Ram E y Shalev E. 2005. Human trophoblast function during the implantation process. *Repro Biol Endocrinol.* 3:56.
46. - Lessey BA. 1998. Endometrial integrins and the establishment of uterine receptivity. *Hum. Reprod.* 13(3): 247-58.
- 47.- Casals G, Ordi J, Creus M, Fábregues F, Casamitjana R, Quinto L, Campo E y Balasch J. 2008. Osteopontin and $\alpha\beta3$ integrin expression in the endometrium of infertile and fertile women. *RBM online.* 16 (6): 808-16.
- 48.-Revel, A. 2012. Defective endometrial receptivity. *Fertil Steril.* 97 (5): 1028-32.
49. - Barczyk M, Carracedo S y Gullberg D. 2010. Integrins. *Cell Tis Res.* 339 (1): 269-80.

- 50.-Harduf H, Goldman S, Shalev E. 2009. Progesterone receptor A and c-Met mediates spheroids-endometrium attachment. *Reprod Biol Endocrinol* 7:14.
- 51.- Escudero-Esparza E, Jiang WG, y Martin TA. 2012. Claudin-5 is involved in breast cancer cell motility through the N-WASP and ROCK signalling pathways. *J Exp Clin Cancer Res.* 31(43): 31-43.
52. - Contois L, Akalu A y Brooks P. C. 2009. Integrins as “functional hubs” in the regulation of pathological angiogenesis. *Sem Can Biol.* 19: 318-28.
53. - Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. 1999a. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* 147: 185–94.
54. - Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. 1999b. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 511–16.
- 55.- Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol.* 141: 1539–1550.
- 56.-Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156: 1099–11.
57. - Sas D, Hu M, Moe OW, Baum M. 2008. Effect of claudins 6 and 9 on paracellular permeability in MDCK II cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1713–R1719.
58. - Turksen K, Troy TC. 2002. Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6. *Development* 129: 1775–84.

59. - Van Itallie CM y Anderson JM. 2013. Claudins interactions in and out of the tight junctions. *Tiss Barriers*. 1: e24518.
- 60.- Günzel, D y Yu, ASL. 2013. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*. 93: 525-69.
61. - Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D y Shalev E. 2004. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol*. 2:59.
- 62.- Cooper MA, Colonna M y Yokoyama WM. 2009. Hidden talents of natural killers: NK cells in innate and adaptive immunity. *EMBO reports*. 10(10):1103-10.
63. - Shuya LL, Menkhorst EM, Yap J, Li P, Lane N y Dimitriadis E. 2011. Leukemia Inhibitory Factor Enhances Endometrial Stromal Cell Decidualization in Humans and Mice. *PLoS ONE*. 6 (9): e25288- e25288.
- 64.-Riley JK y Yokoyama WM. 2008. NK Cell Tolerance and the Maternal–Fetal Interface. *Amer J Reprod Immunol*. 59: 371-78.
65. - Tsai HD, Chang, CC, Hsieh, YY y Lo HY. 2000. Leukemia Inhibitory Factor Expression in Different Endometrial Locations Between Fertile and Infertile Women Throughout Different Menstrual Phases. *J Assis Reprod Genet*. 17 (8): 415-18.
- 66.- Quezada, SM, Avellaira C, Jonhson, MC, Gabler F, Fuentes A y Vega M. 2006. Evaluation of steroid receptors, coregulators, and molecules associated with uterine receptivity in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 85 (4): 1017-26.
- 67.- Chen Y, Wang Y, Zhuang Y, Zhou F. y Huang L. 2012. Mifepristone Increases the Cytotoxicity of Uterine Natural Killer Cells by Acting as a Glucocorticoid Antagonist via ERK Activation. *PLoS ONE* 7(5): e36413.
68. - Johannes, MD y Huber O. 2012. Modulation of Tight Junction Structure and Function by Kinases and Phosphatases Targeting Occludin. *J Biomed Biotechnol*. 14 pages.

69. - Kimber SJ y Spanswick C. 2000. Blastocyst implantation: the adhesion cascade. *A Press*.11:77-92.

70.- Noyes RW, Hertig AT and Rock J. (1950) Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1:3-25.

71.- Weiss, RV y Clapauch R. 2014. Female infertility of endocrine origin. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 58(2):144-52.

72.- Reverchon M, Ramé C, Bertoldo M y Dupont J. 2014 . Adipokines and the Female Reproductive Tract. *Inter J Endocrinol.* Article ID 232454. 10 pages.
doi:10.1155/2014/232454

73.-Botella J. 1997. El útero fisiología y patología. Díaz de Santos. 395 p.