

**“EFECTO DE PROGESTERONA Y ESTRADIOL SOBRE LA
EXPRESIÓN DE MARCADORES DE IMPLANTACIÓN Y
PROPIEDADES DE CÉLULAS MADRE ENDOMETRIALES
OBTENIDAS DESDE FLUIDO MENSTRUAL”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Sebastian Raul Venegas Duarte

Director del Seminario de Título:

Sebastián Illanes

Co-Director del Seminario de Título:

Manuel Varas Godoy

Patrocinante del Seminario de Título:

Magdalena Sanhueza Tohá

Santiago de Chile, julio 2017



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por:

Sebastián Raúl Venegas Duarte

“Efecto de Progesterona y Estradiol sobre la expresión de marcadores de implantación y propiedades de células madre endometriales obtenidas desde fluido menstrual.”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Sebastián Illanes López

Director Seminario de Título

Dr. Manuel Varas Godoy

Co-Director Seminario de Título

Dra. Magdalena Sanhueza Tohá

Director Seminario de Título

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Verónica Palma

Presidente Comisión

Dr. Ricardo Delgado

Evaluador

Santiago de Chile, julio 2017

Sebastian Venegas nació el 28 de septiembre de 1991 en Santiago de Chile, con una curiosidad innata por cosas que a nadie más le interesan, desde joven se notó que la academia y la investigación eran, probablemente, lo suyo. Su vida fuera del país, primero en Argentina y luego en la controversial Venezuela, y el posterior regreso a Chile le valieron su exterior reservado y desconfiado que sin embargo ocultan una sonrisa fácil y un carácter empático. Estudió desde el 2010 hasta el 2015 en la Universidad de Chile con su razonable cuota de penurias y alegrías, aunque las últimas sobrepasan por mucho a las primeras. Hoy trabaja activamente en finalizar su trabajo en el Laboratorio de Biología de la Reproducción del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de los Andes y solo el tiempo sabe que vendrá después.

Dedico este escrito a todos aquellos que me han apoyado en las buenas y en las malas (sobre todo durante estas últimas) a lo largo de mis años de colegial, universitario y trabajador. Sepan que sin su constante apoyo, consejo, paciencia y tutelaje este trabajo no habría sido posible, por lo cual les estoy eternamente agradecido.

No en desmedro de lo anterior, me gustaría agradecer directamente a algunas personas. En primer lugar, a mis padres Raúl y Lorena a quien les debo la vida y que siempre han creído en mí. También a mis hermanos, Maximiliano e Ignacia, quienes han tenido la paciencia para soportarme y comparten conmigo día a día. A mis compañeros de Universidad Constanza, Anita, Macarena, Josefina, Bianca, Camilo y Franco, quienes me enseñaron lo que es el verdadero compañerismo y amistad, me ayudaron a crecer como persona y compartieron conmigo en las buenas y en las malas. Al doctor Sebastian Illanes, por aceptarme en su laboratorio cuando nadie más lo habría hecho. Y finalmente, las personas con quienes trabajo (o trabajé) en el laboratorio Stephany, Lara, Daniela, Sofia, Ornela Ania, Ana, Albano, Charlotte y Manuel por ayudarme paciente e incansablemente tanto con mis experimentos como con la redacción de este y otros documentos. A todos ustedes, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

2.2 Resumen	1
2.3 Introducción	3
MSC y MenSC	5
Propiedades y Nicho de las MenSC	6
Implantación	9
Respuesta Hormonal de MenSC y Marcadores de Receptividad	10
Mecanismos de la Implantación y MenSC.....	13
Planteamiento	15
2.4. Materiales y Métodos	16
Cultivo y exposición hormonal de MenSC	16
Extracción de RNA con TRIzol	17
Tratamiento con DNAsa	18
Transcripción reversa	18
Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR)	19
Migración	20
Angiogénesis	21
Análisis Estadísticos	21
2.5 Resultados	22
Muestras Utilizadas	22
Expresión de Marcadores de Receptividad	23
Capacidad Pro-Migratoria MenSC	24
Capacidad Pro-Angiogénica	25
2.6 Discusión y/o Proyecciones	29
Efecto del Tratamiento sobre las MenSC	29
LIF, FGF-2 y Angiogénesis.....	30
CD105.....	34
Otros marcadores y Migración.....	36
Limitaciones y Proyecciones	37
2.8 Bibliografía	40

Índice de Tablas

Tabla 1: Tratamientos realizados sobre las MenSC.....	17
Tabla 2: Secuencias de los partidores utilizados.....	19
Tabla 3: Formula para el análisis de los Ct obtenidos	20
Tabla 4: Características de las muestras utilizadas	22

Índice de figuras

Figura 1: El ciclo menstrual y su relación con las hormonas Estradiol (E2) y Progesterona (P4).....	8
Figura 2: Expresión relativa de genes relacionados a la ventana de implantación.....	23
Figura 3: Fotos representativas de los cambios sufridos por la herida realizada sobre Jeg-3	24
Figura 4: (a) Curación de la herida en Jeg-3 a lo largo del tiempo y (b) Área bajo la curva de cada tratamiento.....	25
Figura 5: Imagen representativa de los resultados obtenidos a) antes y b) después de utilizar el software “Angiogenesis Analyzer”.....	26
Figura 6: Capacidad de estimulación pro-angiogénica del medio condicionado por MenSC.	27
Figura 7: Expresión relativa de los factores pro-angiogénicos.....	28
Figura 8: Vías activadas por LIF en el epitelio luminal del útero.....	31

Lista de abreviaturas

MSC	Células Madre Mesenquimales
MenSC	Células Madre Mesenquimales del Fluido Menstrual
P4	Progesterona
E2	Estradiol
WOI	Ventana de Implantación, del inglés “Window of Implantation”
LH	Hormona Luteinizante, del inglés “Luteinizing Hormone”
RT	Transcriptasa Reversa (Enzima), del inglés “Reverse Transcriptase”
LIF	Factor inhibidor de Leucemia, del inglés “Leukemia Inhibitory Factor”
VEGFa	Factor de Crecimiento Vascular Endotelial, del inglés “Vascular Endothelial Growth Factor A”
FGF-2	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2 (o Básico), del inglés “Fibroblast Growth Factor 2”
TGF- β 1	Factor de Crecimiento Transformante beta 1, del inglés “Transforming Growth Factor Beta 1”
HOXA-10	Caja de entrada A-10, del inglés “Homeobox A-10”
HUVEC	Células Vasculares Endoteliales de Cordón Umbilical Humano
JEG-3	Línea Celular de Coriocarcinoma Placentario Humano
CD105	Endoglina

2.2 RESUMEN

Las células madre mesenquimales (MSC) son un grupo heterogéneo de células multipotentes que han adquirido gran importancia en el último tiempo debido a su potencial aplicación en el desarrollo de terapias celulares. La principal limitante para estos tratamientos ha resultado ser la dificultad para el aislamiento de un número suficiente de células para los procedimientos propuestos. Recientemente, se ha identificado una población de estas células en el fluido menstrual, lo que permitiría superar esta dificultad. Las células madre aisladas desde fluido menstrual (MenSC) son una población de MSC cuyo aislamiento poco invasivo y regularidad de obtención las ubican en una posición ideal para el desarrollo de terapias celulares. Entre las características más destacadas de este tipo celular se encuentran una alta tasa proliferativa, una alta estabilidad cariotípica y buenas propiedades pro-angiogénicas y migratorias. Sin embargo, aún se desconocen gran parte de las propiedades y funciones de las MenSC, especialmente las relacionadas al nicho en donde se encuentran. Con respecto a este nicho, es posible hipotetizar que uno de los procesos en el cual las MenSC podrían tener un rol regulatorio correspondería a la implantación embrionaria, que a su vez está regulada por los cambios hormonales del ciclo menstrual que generan un endometrio receptivo, capaz de interactuar con el embrión y permitir la implantación. Por lo tanto, se investigaron los efectos de los cambios hormonales del ciclo menstrual sobre las MenSC aisladas de pacientes sanas, con el fin de evaluar cambios fenotípicos, especialmente los referidos (directa o indirectamente) al proceso de la implantación embrionaria. Para esto se cultivaron MenSC en condiciones que imitan el contexto hormonal que ocurre durante el ciclo menstrual, es decir, las concentraciones de Estrógeno y Progesterona tanto de la ovulación como del periodo de máxima

receptividad uterina, conocido como “ventana de implantación”. Los primeros genes analizados fueron aquellos que han sido reportados repetidamente como importantes para la ventana de implantación, tal es el caso del factor inhibidor de leucemia (LIF), Factor de Crecimiento Vascular Endotelial A (VEGFa), Factor de Crecimiento Transformante beta 1 (TGF- β), y Homeobox A-10 (HOXA-10). De los cuatro marcadores investigados solo LIF presentó diferencias significativas respecto al control al tratar a las MenSC con las concentraciones de Progesterona y Estradiol que imitan la ovulación y la ventana de implantación. Las segundas características evaluadas, fueron las propiedades pro-migratorias y pro-angiogénicas de las MenSC en respuesta a las hormonas del ciclo menstrual. Las MenSC estimuladas con las diferentes concentraciones de hormonas no presentaron diferencias significativas en su capacidad migratoria independientemente del tratamiento realizado. Por el contrario, tanto la capacidad de las MenSC de inducir la generación túbulos en células endoteliales de cordón umbilical, como la expresión de los marcadores pro-angiogénicos Endoglin (CD105) y Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2 (FGF-2) presentaron diferencias significativas respecto al control al tratar a las MenSC con las concentraciones de Progesterona y Estradiol que se suceden desde la ovulación hasta la ventana de receptividad del ciclo menstrual. Estos resultados apoyan la posibilidad de que las MenSC podrían estar participando en procesos relevantes para la implantación del embrión como son los procesos de angiogenesis. Este conocimiento podría ser importante para entender de mejor manera el rol de las MenSC en la regulación del proceso fisiológico de la implantación, como su participación en los procesos fisiopatológicos relacionados con ella, abriendo la puerta a potenciales usos como marcadores de enfermedades relacionadas a la implantación o a la generación de terapias celulares basadas en sus propiedades.

2.2 ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are a heterogeneous group of multipotent cells that have acquired great importance in recent years due to their potential application in the development of cellular therapies. The main limitation for these treatments has been the difficulty in isolating enough cells for the proposed procedures. Recently, a population of these cells has been identified in the menstrual fluid, which would allow to overcome this difficulty. Stem cells isolated from menstrual fluid (MenSC) are a population of MSCs whose minimally invasive isolation and regularity of collection place them in an ideal position for the development of cellular therapies. Among the most outstanding features of this cell type are a high proliferative rate, high karyotype stability and good pro-angiogenic and migratory properties. However, much of the properties and functions of the MenSC, especially those related to the niche in which they are found, are still unknown. Regarding this niche, it is possible to hypothesize that one of the processes in which the MenSC could have a regulatory role would correspond to the embryonic implantation, which in turn is regulated by the hormonal changes of the menstrual cycle that generate a receptive endometrium, capable of interacting with the embryo and allowing implantation. Hence, the effects of the hormonal changes of the menstrual cycle on the MenSC isolated from healthy patients were investigated to evaluate for phenotypic changes, especially those referred (directly or indirectly) to the process of embryo implantation. For this, MenSC were cultured in conditions that mimic the hormonal context that occurs during the menstrual cycle, i.e. the estrogen and progesterone concentrations of both the ovulation and the period of maximum uterine receptivity, known as the "implantation window". The first genes analyzed were those that have been repeatedly reported as important for the implantation window, such as Leukemia

Inhibitory Factor (LIF), Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF_A), Transforming Growth Factor beta 1 (TGF- β) and Homeobox A-10 (HOXA-10). Of the four markers investigated, only LIF showed significant differences compared to the control when treating the MenSC with the concentrations of Progesterone and Estradiol that mimic the ovulation and the implantation window. The following characteristics evaluated were the pro-migratory and pro-angiogenic properties of MenSC in response to menstrual cycle hormones. MenSC stimulated with the different concentrations of hormones did not present significant differences in their migratory capacity regardless of the treatment performed. In contrast, both the ability of MenSC to induce tubule generation in umbilical cord endothelial cells (HUVEC) and the expression of the pro-angiogenic markers Endoglin (CD105) and Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2) showed significant differences in respect of the control when treating the MenSC with the concentrations of Progesterone and Estradiol that transpire since the ovulation to the window of receptivity of the menstrual cycle. These results support the possibility that the MenSC could be involved in processes relevant to the implantation of the embryo such as the process of angiogenesis. This knowledge could be important to better understand the role of the MenSC in the regulation of the physiological process of implantation, as well as its participation in the pathophysiological processes related to it, opening the door to potential uses as markers of diseases related to implantation or the generation of cellular therapies based on their properties.

2.3 INTRODUCCIÓN

MSC y MenSC

Las células estromales mesenquimales multipotentes, (también conocidas como células madre mesenquimales, MSC por sus siglas en inglés) han sido destacadas en el último tiempo por sus propiedades y su amplio rango de posibles aplicaciones, especialmente en el ámbito de la terapia celular. Estas son un grupo heterogéneo de células (Tolar, 2010) unificado exclusivamente por el cumplimiento de tres criterios mínimos definidos por la “sociedad internacional para la terapia celular” en el año 2006: (a) adherencia al plástico, (b) expresión de antígenos de superficie específicos y (c) potencial de diferenciación multipotente. Los antígenos de superficie mínimos que toda MSC debe expresar son CD105, CD73 y CD90 en al menos un 95% de la población. Además, estas deben carecer de la expresión de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 y HLA de clase II, siendo el máximo de expresión aceptable de estos últimos un 2% (Dominici et al, 2006). Las MSC también deben ser capaces de diferenciarse en tejido osteogénico, adipogénico y condrogénico bajo condiciones estándar de diferenciación *in vitro*. Esta diferenciación debe ser demostrada mediante tinciones con “Alizarin Red” o “Von Kossa staining” (Osteoblastos), “Oil Red” (Adipositos) y “Alcian Blue” (Condriocitos) *in vitro* (Dominici et al, 2006). Aunque no se incluye dentro de los criterios mínimos definidos por Dominici y colaboradores, también se ha descrito y demostrado en numerosos estudios que este grupo celular es capaz de modular la respuesta inmune mediante interacciones con células del sistema inmune innato y del sistema inmune adaptativo (Katz et al, 2008; Castro-Manreza et al, 2015). Como ejemplo, se ha visto que algunas subpoblaciones de MSC aisladas de distintos tejidos son capaces de expresar la enzimaIDO (Indoleamina-2,3-dioxigenasa), una molécula capaz de mediar la inmunosupresión de

células T (Katz et al, 2008). La potencialidad de diferenciación en al menos tres tipos celulares distintos en conjunto a la capacidad de modular al sistema inmune son los principales motivos de la importancia que han adquirido las MSC en el último tiempo. En particular, se ha desarrollado un gran interés en este campo debido a las posibles aplicaciones en medicina regenerativa y desarrollo de terapias celulares. Las MSC han sido aisladas de diversos tipos de tejidos como la médula ósea (Friedenstein AJ., 1990), el tejido adiposo (Minteer et al., 2012), el músculo esquelético (Wang et al., 2004), el riñón (Wang et al., 2004), el hígado (da Silva et al, 2006) y el cordón umbilical (Arutyunyan et al., 2016). Sin embargo, el aislamiento de MSC desde dichas fuentes implica el empleo de complejas y en ocasiones costosas metodologías, lo que supone una limitante para su aplicación industrial. No obstante, en el año 2007 Meng y colaboradores lograron aislar células desde el fluido menstrual (MenSC del inglés menstrual stem cells) que cumplen con los criterios definidos para ser catalogadas como MSC (Meng et al, 2007; Khoury et al, 2014) y son considerablemente más fáciles de obtener que las MSC de otras fuentes más tradicionales. A pesar de esta ventaja, aún es poco lo que se sabe sobre las MenSC y la función que tienen.

Propiedades y Nicho de las MenSC

Como se mencionó, Meng y colaboradores establecieron en el 2007 que las MenSC cumplen con los criterios mínimos para ser consideradas MSC. En los últimos años también se ha descrito que las MenSC poseen una alta tasa de proliferación, estabilidad fenotípica a largo plazo y alto potencial migratorio y angiogénico en relación a las BM-MSC (Alcayaga-Miranda et al, 2015). Además, las MenSC tienen la capacidad de producir factores inmunosupresivos y de favorecer la expansión de células CD34+ (Luz-Crawford et al, 2015; Alcayaga-Miranda et al, 2015). Se ha demostrado que las MenSC

secretan una variedad de factores como el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial A (VEGFa), el Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF) y el Factor de Crecimiento de Insulina (IGF-1) (Du et al, 2016); son capaces de diferenciarse en tejido neuronal y cardiaco (Patel et al, 2008), aumentan la supervivencia de ratones afectados por GVHD (enfermedad de injerto contra huésped; Luz-Crawford et al, 2015) y confieren protección frente a heridas causadas por isquemia-reperfusión en riñones de ratón mediante un efecto inmunomodulador (Sun et al, 2016), entre otras propiedades.

Con respecto a su nicho, las MenSC provienen del tejido endometrial que recubre el interior del útero y que es eliminado cada mes con el flujo menstrual (Ulrich et al., 2013). El endometrio corresponde a la capa más interna del útero, la cual a su vez se subdivide en la capa basal (“stratum basalis”) y en la capa funcional (“stratum functionalis”). Ambas capas están similarmente compuestas por células epiteliales embebidas en un estroma, sin embargo, estas tienen funciones diametralmente distintas (Jones & López, 2014). Las células de la capa funcional responden a los estímulos hormonales del ciclo menstrual mediante la especialización en el tejido glandular y epitelial responsable de la interacción con el embrión (Jones & López, 2014). Este tejido especializado se pierde durante la menstruación y es nuevamente originado en la fase proliferativa por las células de la capa basal, la cual no se pierde durante la menstruación. El endometrio es el escenario sobre el cual se desarrollan una compleja serie de eventos cíclicos interrelacionados que permiten la implantación del embrión y el desarrollo del embarazo, estos eventos se conocen globalmente como el ciclo menstrual y son vitales para la reproducción humana (Jones & López, 2014). Durante este ciclo el endometrio está en constante cambio debido al efecto (directo o indirecto) de distintas hormonas sexuales, sin embargo, es posible distinguir tres fases distintas dependiendo del estado en el que

se encuentra la capa funcional del endometrio (Figura 1): (a) la fase menstrual (días 0-5), (b) la fase proliferativa (días 5-14) y (c) la fase secretora (días 14 a 28) (Jones & López, 2014).

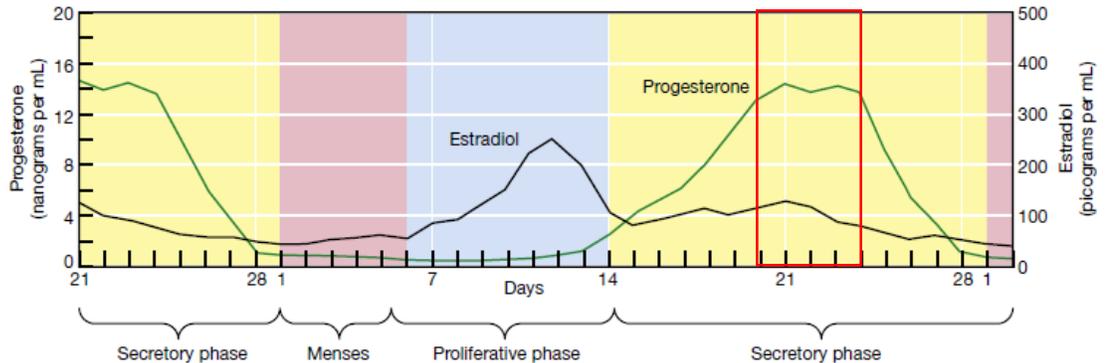


Figura 1: El ciclo menstrual y su relación con las hormonas Estradiol (E2) y Progesterona (P4), modificado de Jones & López, 2014. En rojo el periodo de máxima receptividad o "ventana de implantación".

Cada una de estas fases juega un papel clave en el desarrollo de un endometrio capaz de interactuar con el embrión. La fase menstrual o folicular se caracteriza en primer lugar por la apoptosis de la capa funcional del endometrio del ciclo anterior, esto debido a los bajos niveles de las hormonas Progesterona (P4) y Estradiol (E2). En respuesta a este fenómeno inicia un crecimiento de los folículos mediante la acción de las hormonas Luteinizante (LH) y Folículo Estimulante (FSH), lo que a su vez reinicia la producción de E2 en las células de la teca y granulosa del folículo. Durante la fase proliferativa o folicular los niveles cada vez mayores de E2 desencadenan un aumento en el grosor del endometrio, la aparición de receptores de LH en las células de la granulosa del folículo y, al final de este periodo, la ovulación. Finalmente, durante la fase secretora o lútea, la aparición de los receptores de LH en las células granulosas genera en estas un cambio en la vía de síntesis de esteroides, disminuyendo la síntesis de E2 e iniciando la síntesis

de P4. Esto genera que estas células se transformen en el cuerpo lúteo y que las células del endometrio empiecen a prepararse fenotípicamente para la llegada del embrión. De no ocurrir esto último, las concentraciones cada vez mayores de P4 y E2 generan una inhibición de en la producción de las hormonas LH y FSH. Con ello ocurre la degeneración del cuerpo lúteo y la pérdida de la fuente de las hormonas P4 y E2, lo que a su vez da inicio una vez más a la fase menstrual, completándose el ciclo (Jones & López, 2014).

Implantación

La función principal del ciclo menstrual es la de preparar la capa funcional del endometrio para interactuar con el trofoblasto, permitiendo la implantación del embrión (Jones & Lopez, 2014). Este proceso solo puede ocurrir durante la fase secretora del ciclo menstrual, momento en el cual se secretan cantidades altas de P4 y moderadas de E2. Este corto periodo de receptividad se conoce como la ventana de implantación (WOI por sus siglas en inglés) (Lessey, 2011; Valdez-morales, 2015; Jones & Lopez, 2014). La WOI se refiere al espacio temporal en el cual pueden ocurrir las interacciones endometrio-embrión necesarias para el fenómeno de implantación, es decir, la migración y remodelación de las arterias espirales por el sinciotrofoblasto y el trofoblasto extraveloso invasor, lo cual ocurre aproximadamente entre los días 20-24 de un ciclo "normal" de 28 días (Lessey, 2011; Valdez-morales, 2015; Jones & Lopez, 2014). Este proceso depende en su totalidad del ciclo menstrual y de las hormonas que participan, e implica una precisa regulación del sistema inmune, la proliferación celular, la migración e invasión del sinciotrofoblasto y del trofoblasto extraveloso invasor, y la angiogénesis, entre otras (Zhang et al, 2013; Norwitz et al, 2001; Tessier et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, las MenSC poseen como nicho el endometrio y poseen capacidades inmunomoduladoras, proliferativas, pro-angiogénicas y pro-migratorias. Todas estas propiedades podrían potencialmente demostrar que las MenSC jugarían un rol relevante en la implantación, para lo cual deberían responder a las distintas concentraciones hormonales de E2 y P4 que están presentes durante el ciclo menstrual.

Respuesta Hormonal de MenSC y Marcadores de Receptividad

El efecto que tienen las dos principales hormonas relacionadas con el control del ciclo, P4 y E2, sobre las MenSC aún se desconoce, pero existe evidencia de los efectos de éstas sobre MSC derivadas de otros tejidos. La Progesterona es esencial para la implantación en todas las especies que han sido estudiadas (Jeeyeon Cha et al, 2012) y es capaz de fomentar la capacidad que poseen algunas MSC de modular la respuesta inmune (Zhao et al, 2012; Kyurkchiev et al, 2011). Esto ocurre a través de cambios en la vía de las MAP kinasas, o bien, el aumento en la expresión de HLA-G, entre otros (Zhao et al, 2012; Kyurkchiev et al, 2011). Por otro lado, el rol de Estradiol es más desconocido, se cree que este podría aumentar la proliferación de las MSC, aunque solo a concentraciones bajas (DiSilvio et al, 2006). Otros estudios indican que es capaz de fomentar la diferenciación a osteoblastos mediante la activación de BMP-2 (Zhou et al, 2003). Teniendo en cuenta lo anterior, es posible suponer que las MenSC, al igual que otras MSC, serían capaces de responder a las hormonas sexuales del ciclo menstrual.

No obstante, es necesario que la respuesta de las MenSC a las hormonas sea evaluada y esté relacionada con las características del endometrio receptor. Existen marcadores de receptividad de la ventana de implantación, moléculas cuya expresión en el endometrio alcanza un máximo/mínimo durante la ventana y que, por lo tanto, permiten

identificar el momento de máxima receptividad del endometrio para con el embrión (Ackema & Charité, 2008; Nasef et al, 2008). Asimismo, esta expresión sincronizada a la ventana de implantación es un indicativo de que los marcadores podrían estar relacionadas con el mecanismo de implantación como tal (Ackema & Charité, 2008; Nasef et al, 2008). Al igual que en el caso de las hormonas sexuales, se desconoce la expresión de estos marcadores en las MenSC, pero se ha descrito que algunas MSC son capaces de expresar marcadores de receptividad *in vitro*, permitiendo suponer que las MenSC también podrían expresar estos marcadores bajo las condiciones adecuadas. En resumen, la literatura permite sustentar la suposición de que las MenSC tendrían la capacidad de responder a las concentraciones de las hormonas sexuales que existen durante el ciclo menstrual mediante la expresión de marcadores específicos del periodo de máxima receptividad uterina. Algunos de los marcadores de la ventana de implantación más mencionados en la literatura y aceptados son el factor inhibidor de leucemia (LIF), la caja de entrada A-10 (HOXA-10), el factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGFa) y el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) (Lessey, 2011; Valdez-Morales et al., 2015; Talbi et al., 2006; Achache and Revel, 2006).

La proteína LIF presenta una baja expresión en el endometrio salvo durante la fase secretora, alcanzando su máximo durante la WOI (Kodaman et al, 2004; Talbi et al, 2006; Díaz.Gimeno et al, 2010; Aghajanova, 2004). LIF estimula la producción de fibronectina por parte del trofoblasto, lo que facilita su anclaje y su diferenciación en un fenotipo invasivo (Kodaman et al, 2004). Se ha observado en madres LIF-/- que los embriones no logran implantarse, fenotipo que pudo ser rescatado con la suplementación de esta proteína. Además, los embriones LIF-/- son capaces de implantarse en el endometrio de ratones normales (Kodaman et al, 2004; Achache & Revel, 2006; Aghajanova, 2004).

HOXA-10 es un gen “homeobox” responsable de la identidad morfológica del útero, sin embargo, su expresión en células estromales del útero aumenta durante la WOI (Kodaman et al, 2004; Bagot et al, 2001; Zhang et al, 2013). Además, se ha demostrado que esta proteína es capaz de estimular la expresión de la integrina $\beta 3$, y las mujeres que presentan una menor expresión de HOXA-10 tienen una tasa de implantación menor (Kodaman et al, 2004). Incluso se ha observado que en ratonas HOXA-10^{-/-} no ocurre implantación (Bagot et al, 2001), pero que los embriones HOXA-10^{-/-} son viables en madres normales (Taylor et al., 1998). También se ha demostrado que su expresión aumenta al exponer células endometriales *in vitro* a P4 y E2 (Taylor et al., 1998).

VEGFa es un factor angiogénico que podría tener injerencia sobre la implantación (Talbi et al, 2006; Kao et al, 2002). Los fluidos de mujeres con infertilidad inexplicable presentan una reducción significativa de esta proteína y la aplicación de VEGFa humano recombinante (rhVEGFA) causa que los blastocitos se adhieran y esparzan sobre un área significativamente mayor (Hannan et al, 2011). Además, ésta es capaz de aumentar la expresión de la integrina $\beta 3$. Sin embargo, se desconoce el mecanismo mediante el cual VEGFa afectaría la implantación (Hannan et al, 2011). Finalmente, la aplicación de anticuerpos contra VEGF disminuye significativamente y de forma dosis-dependiente la implantación de los embriones de rata (Demir et al, 2010).

En el caso de TGF- $\beta 1$ algunos estudios indican que se encuentra sobre-expresado durante la implantación (Kao et al, 2002; Kodaman et al, 2004). Se ha demostrado que esta proteína es capaz de modular la inmunotolerancia, inducir la expresión de LIF *in vitro*, y restringir la invasión del trofoblasto durante la implantación (Valdez-Morales et al, 2015; Achache & Revel, 2006; Kodaman et al, 2004). También se cree que TGF- β podría estar influenciando la implantación a través de la regulación en la producción de VEGF

o de IGFBP-1, o bien promover la adhesión de trofoblasto a la matriz extracelular, donde esta proteína se almacena de forma latente (Dimitriadis et al., 2005).

Mecanismos de la Implantación y MenSC

Si bien los marcadores de receptividad son buenos indicadores de una respuesta a las hormonas sexuales relacionadas a la implantación, se requiere de un indicador más directo. Para esto es necesario evaluar si las MenSC son capaces de modular directamente alguna función de importancia para este proceso, tal como la migración o la angiogénesis. Estos dos procesos interactúan entre sí íntimamente, y son vitales para la remodelación de las arterias espirales, proceso indispensable para una implantación exitosa (Cha et al., 2012).

Las células emplean los mecanismos migratorios para generar la tracción que requieren para movilizarse en su medio. La migración es un proceso dinámico que involucra una compleja interrelación entre el ensamblaje y des-ensamblaje de los complejos de adhesión focal con la polimerización del esqueleto de actina (Gardel et al., 2010). Este proceso se puede dividir en cuatro pasos discretos: Protrusión de un segmento de la membrana, adhesión del segmento a la matriz extracelular, generación de tracción mediante el emparejamiento del flujo retrogrado de la actina con las adhesiones focales y des-ensamblaje de las adhesiones focales posteriores. Este proceso permite al sinciciotrofoblasto y al trofoblasto extravelloso invadir y migrar a través del tejido endometrial hasta alcanzar las arterias espirales, luego de lo cual estas son remodeladas mediante mecanismos angiogénicos (Tessier et al., 2015; Juneo & Rogéria, 2016).

La angiogénesis se define como el desarrollo de nuevos vasos a partir de vasos sanguíneos pre-existentes (Demir et al, 2010). Una implantación exitosa depende de un desarrollo vascular coordinado en ambos lados de la interfaz endometrio-embrión (Torry et al, 2007). Existen estudios que han observado que los sitios de implantación presentan un aumento significativo en la permeabilidad de sus vasos y en su densidad vascular tempranamente en la gestación en ratones (Torry et al, 2007). Además, en ratón, la inhibición de la angiogénesis con compuestos anti-angiogénicos antes o poco después de la implantación interrumpe la placentación e induce la reabsorción de todos los embriones (Torry et al, 2007). Entre los factores angiogénicos más conocidos se encuentran VEGFa, CD105 (Endogлина) y FGF-2, entre otros (Cross & Claesson-Welsh, 2001; Presta et al., 2005; Liu et al., 2014). Aunque los mecanismos exactos mediante los cuales VEGFa, CD105 y FGF-2 afectan a la implantación se desconocen, se sabe de su importancia para este proceso (Demir et al., 2009; Torry et al., 2007; Sherer & Abulafia, 2001; Chadchan et al., 2016), haciéndolos buenos candidatos evaluar la capacidad angiogénica de las MenSC.

Planteamiento

Si bien se desconoce la función que tienen las MenSC en el endometrio, la evidencia apuntaría a que podrían estar bajo el control de las hormonas sexuales, regulando así la expresión de moléculas y de procesos que modulen la implantación. Se propuso estudiar la expresión de marcadores de implantación en MenSC expuestas a las diferentes concentraciones hormonales de P4 y E2 que ocurren durante el ciclo menstrual. Además, se evaluaron las capacidades pro-angiogénicas y pro-migratorias *in vitro* de estas células bajo los estímulos hormonales mencionados.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo y exposición hormonal de MenSC

Se utilizaron muestras de pacientes obtenidas previamente para el desarrollo de otro proyecto, las muestras se encontraban congeladas en crio-viales y en pasajes 2, 3 y 4. Estas fueron cultivadas hasta alcanzar los pasajes deseados, 4, 5 y 6. Las condiciones de cultivo de las MenSc fueron: Medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM; Gibco; 10313-021), 15% suero fetal bovino (FBS; HyClone; SH30396.03), 1% Penicilina/estreptomina (P/S; HyClone; SV30016) y 1% Glutamina (Gibco; 11360-070). Las células se mantienen en cultivo en botellas T175 (Thermo Fisher Scientific). Para los diferentes ensayos las células fueron lavadas con PBS 1X, tripzinizadas con "HyClone™ Trypsin Protease" (HyClone; SH30042.01), y cultivadas en placas de 60mm con 300.000 células por pocillo en 3mL de medio DMEM 15% FBS, 1% P/S y 1% Glutamina. Cuando las placas alcanzaron un 70-80% de confluencia, el medio fue reemplazado por 3 ml de DMEM sin rojo fenol (Gibco; 21063-029) con 1% P/S, 2% Glut y 10% FBS tratado con carbono activado (Penreac AppliChem; 121237.1610). 4 horas post cambio de medio las células fueron cultivadas, luego de remover los medios anteriores, con diferentes estímulos hormonales (Tabla 1) durante 48 horas: 1) tratamiento control sin hormonas durante 48 horas, 2) tratamiento si hormonas durante 24 horas seguido de un tratamiento con E2 + P4 en concentraciones acordes a la ventana de implantación durante 24 horas (E2: 146pg/ml; P4: 11ng/ml; Stricker et al., 2006; Maathuis et al., 1978; Anttila et al., 1991) y 3) tratamiento con E2 conforme a la ovulación (Sigma-Aldrich; E2758. 213 pg/ml; Stricker et al., 2006; Maathuis et al., 1978) por 24 horas, seguido de un cambio de medio y 24 horas de E2 + P4 acorde a la ventana de implantación (E2: 146pg/ml; P4: 11ng/ml; Stricker et al., 2006; Maathuis et al., 1978; Anttila et al., 1991). Para todos los

tratamientos hormonales se utilizó DMEM sin rojo fenol (Gibco; 21063-029) con 1% P/S, 2% Glut y 10% de FBS tratado con carbono activado.

Tabla 1: Tratamientos realizados sobre las MenSC. Los colores de cada columna imitan los colores de cada fase del ciclo presentados en la Figura 1, donde amarillo indica fase secretora, rojo la fase menstrual y azul la fase proliferativa.

Tratamiento	Día 0	Día 1	Día 2
1) Control	-	-	-
2) E2+P4	-	-	Estradiol + Progesterona
3) E2; E2+P4	-	Estradiol	Estradiol + Progesterona

Extracción de RNA con TRIzol

Se extrajo el ARN total de las células mediante el método de TRIzol (life technologies; 15596-018) según el protocolo recomendado por el fabricante. Las MenSC fueron lavadas con PBS1X, se les agregó 1mL de Trizol a cada placa de 60mm y se incuban durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células con el TRIzol de cada placa fueron transferidas a tubos eppendorf de 1,5 ml, y se le agregó 200 µl de cloroformo, se mezcló vigorosamente por 15 seg y se incubó por 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 12.000xg por 15 min a 4°C obteniéndose una fase acuosa y una fase orgánica. Se recuperó la fase acuosa en un tubo eppendorf, se agregaron 500 µl de isopropanol (100%) a cada tubo, y se centrifugaron a 12.000xg por 10min a 4°C obteniéndose un pellet. El pellet fue lavado con 1ml de etanol al 75% y centrifugado a 7.500xg por 5min a 4°C. Posteriormente el pellet fue secado por 10 min aproximadamente, y resuspendido en 20 µL de agua DEPC libre de nucleasas a 55°C por 15min para luego ser guardado a -80°C.

La concentración de ARN fue cuantificada mediante Nanodrop (Thermo Scientific), y la calidad de este fue evaluada mediante gel de agarosa 1% (Lonza; 50004). Brevemente, 500 ng de ARN fueron mezclados con 2 μ L de gel red (Biotium; cat: 41002), 7 μ L de buffer de carga (New England BioLabs), y completado con con agua libre de nucleasa hasta llegar a 12 μ L. El ARN fue resuelto en un gel de agarosa 1% y visualizado en in transiluminador (Sigma T2201)

Tratamiento con DNAsa

Antes de la síntesis de cDNA mediante transcripción reversa, se eliminó el ADN contaminante mediante tratamiendo con DNAsa. Brevemente, 2 μ g de ARN fueron mezclados con 1 μ g de Buffer DNAsa 10x (Invitrogen), 1 μ g de enzima DNAsa (Invitrogen), y aforados a 9 μ L con agua libre de nucleasas (Promega). La mezcla fue incubada a 37°C durante 30min, posteriormente se agregó 1 μ L de EDTA 50mM a la mezcla y se incubo a 75°C por 10min para detener la reacción. Todas las incubaciones se realizaron en un equipo termociclador (MultigeneOptimax; LabNet International; 1202133)

Transcripción reversa

El ARN tratado con DNAsa fue retro-transcrito utilizando el kit SuperScript-II (Invitrogen). Brevemente, 1 μ L de random primers (500 μ g/mL; Promega), y 1 μ L de dNTP's (10mM c/u; Promega) fueron agregados al ARN tratado con DNAsa en el paso anterior e incubados a 65°C por 3min. Posteriormente se agrega 1 μ L de la Transcriptasa Reversa (RT; SuperScript-II, Invitrogen), 1 μ L de Inhibidor de RNAsa (Applied Biosystems), 2 μ L de DTT (Invitrogen), y 4 μ L de Buffer de la Transcriptasa Reversa 5x (Invitrogen) y se incubaba la mezcla a 25°C por 2min, luego a 42°C por 50min y finalmente a 70°C por 15min

obteniendo el ADN copia (cDNA). Como control se utilizó la reacción de RT sin adicionar transcriptasa reversa.

Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR)

La reacción de qPCR se realizó con el kit Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies Catalogo: #600828) en el sistema Mx3000P (Agilent Technologies; DE10900783). Se mezclan 2,5 µL de una dilución 1/5 del cDNA obtenido del paso de RT, con 1,5µL de agua libre de nucleasas, 5µL de Brilliant II SYBR y 0,5 µL del forward y reverse del gen específico (Tabla 2). La reacción de PCR fue la siguiente: 1 ciclo de 10min a 95°C, 40 ciclos de 20seg a 95°C, 20seg a 62°C y 20seg a 72°C. Finalmente un ciclo de 1min a 95°C, 30seg a 62°C y 30seg a 72°C. Cada reacción se lleva a cabo por duplicado. Como control de PCR se agrega la mezcla de PCR sin cDNA. Los resultados fueron analizados mediante la fórmula de la tabla 3.

Tabla 2: Secuencias de los partidores utilizados (UCSC Genome Browser; Kent WJ et al., 2002)

Gen	Secuencia
LIF	Forward: 3'-GTTTCCTCCAAGGCCCTCT-5'
	Reverse: 3'-TGTTTCCAGTGCAGAACCAA-5'
VEGFA	Forward: 3'-GCAGCTTGAGTTAAACGAACG-5'
	Reverse: 3'-TGGTGAGAGATCTGGTTCCC-5'
TGF-β1	Forward: 3'-CGACTCGCCAGAGTGGTTAT-5'
	Reverse: 3'-CTAAGGCGAAAGCCCTCAAT-5'
FGF-2	Forward: 3'-AGAAGAGCGACCCTCACATCA-5'
	Reverse: 3'-CGGTTAGCACACACTCCTTTG-5'

CD105	Forward: 3'-ACAGACGTGTCTTCCTGCATC-5'
	Reverse: 3'-GATGGCAGCTCTGTGGTGTT-5'
TBP	Forward: 3'-CACGAACCACGGCACTGAT -5'
(HOUSEKEEPING)	Reverse: 3'-GTTGGTGGGTGAGCACAAGG-5'

Tabla 3: Formula para el análisis de los Ct obtenidos

$$x = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde x representa la expresión relativa del gen

Migración

Las capacidades pro-migratorias de las MenSC se determinaron mediante un ensayo de herida sobre células de Coriocarcinoma Humano (JEG-3). Brevemente, se sembraron 150.000 células JEG-3 por pocillo en placas de 12 pocillos, y se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (GIBCO) suplementado con 0,5% P/S, 10% FBS, 1% Piruvato de Sodio y 1% de aminoácidos no esenciales. Una vez formada la monocapa se utiliza una regla de 20cm y una punta de 10µl para formar dos brechas rectas que cruzan el pocillo de lado a lado, comenzando a los 90° y 180° grados y finalizando a los 270° y 360° respectivamente (utilizando el borde largo inferior de la placa como referencia para los 0° del pocillo), de forma que exista un angulo de 90° entre ellas. Posteriormente las células se lavan cuidadosamente se agrega 1ml de medio condicionado de las MenSC tratadas con los diferentes estímulos hormonales mencionados previamente. De acuerdo al protocolo establecido en el laboratorio, se consideró al tratamiento control como verificación del correcto funcionamiento de la tecnica, es decir, como control positivo. Se tomaron 3 fotos a un aumento 40x con una

cámara AxioCam (ERc5s), en un microscopio invertido Carl Zeiss Primo Vert (Thermo Fisher Scientific; 415510-1161-000), por pocillo a las 0, 4, 8, 24, 32 y 48 horas. Estas fotos fueron analizadas mediante el software ImageJ, realizando mediciones del área no cubierta por células de una zona determinada a lo largo del tiempo.

Angiogénesis

Las capacidades pro-angiogénicas de las MenSC fueron evaluadas mediante la formación de túbulos de una línea celular de endoteliales de cordón umbilical (HUVEC). Brevemente, placas de 48 pocillo fueron tratadas previamente con Matrigel (Corning; ref: 356231) y 40.000 células HUVEC fueron sembradas en cada pocillo. Posteriormente 500 μ l de medio condicionado obtenido del cultivo de las MenSC tratadas con los diferentes estímulos hormonales fueron adicionados por pocillo. Como control positivo se utilizó medio EGM (Lonza). 16 horas post adición del medio condicionado se tomaron 3 fotografías representativas por pocillo a un aumento 40x con una cámara AxioCam (ERc5s), en un microscopio invertido Carl Zeiss Primo Vert (Thermo Fisher Scientific; 415510-1161-000), para su posterior análisis mediante el software “Angiogenesis Analyzer for ImageJ” (Carpentier Gilles, 2012).

Análisis Estadísticos

Los datos obtenidos se expresan como promedio \pm S.E.M. Cada grupo experimental consta de 4 donantes, cada uno analizado por triplicado. Las comparaciones entre los grupos se realizan mediante el test Kruskal-Wallis seguido de un análisis de Dunn. Se consideran como significativas diferencias con valores $p \leq 0,05$.

2.5 RESULTADOS

Muestras Utilizadas

Se utilizaron células madre provenientes del fluido menstrual (MenSC) de 4 pacientes nuli-gestas (Tabla 4), cada una en pasaje 4,5 y 6 para un total de 12 muestras distintas. Estas células fueron sometidas a tres tratamientos distintos, un tratamiento control sin hormonas, un tratamiento con E2 + P2 en concentraciones acordes a la ventana de implantación y un tratamiento con E2, seguido de E2 + P4 (Tabla 1).

Tabla 4: Características de las muestras utilizadas

Muestra	1	2	3	4
Edad	29	26	28	33
Peso (kg)	60	53	60	54
Estatura (m)	1,60	1,69	1,65	1,64
I.M.C.	23,4	18,6	22	20,1
Anticonceptivo	Preservativo	Ovulación	Ovulación	Preservativo
Antecedentes	No	No	No	No
Medicación	No	No	No	No
Fumadora	No	No	No	No

Expresión de Marcadores de Receptividad

El objetivo fue evaluar un total de 4 genes relacionados a la ventana de implantación mediante qPCR. Las células fueron tratadas de acuerdo al protocolo especificado con anterioridad (Tabla 1) y todos los resultados (Figura 2) fueron normalizados respecto al gen de la proteína de unión a TATA (TBP).

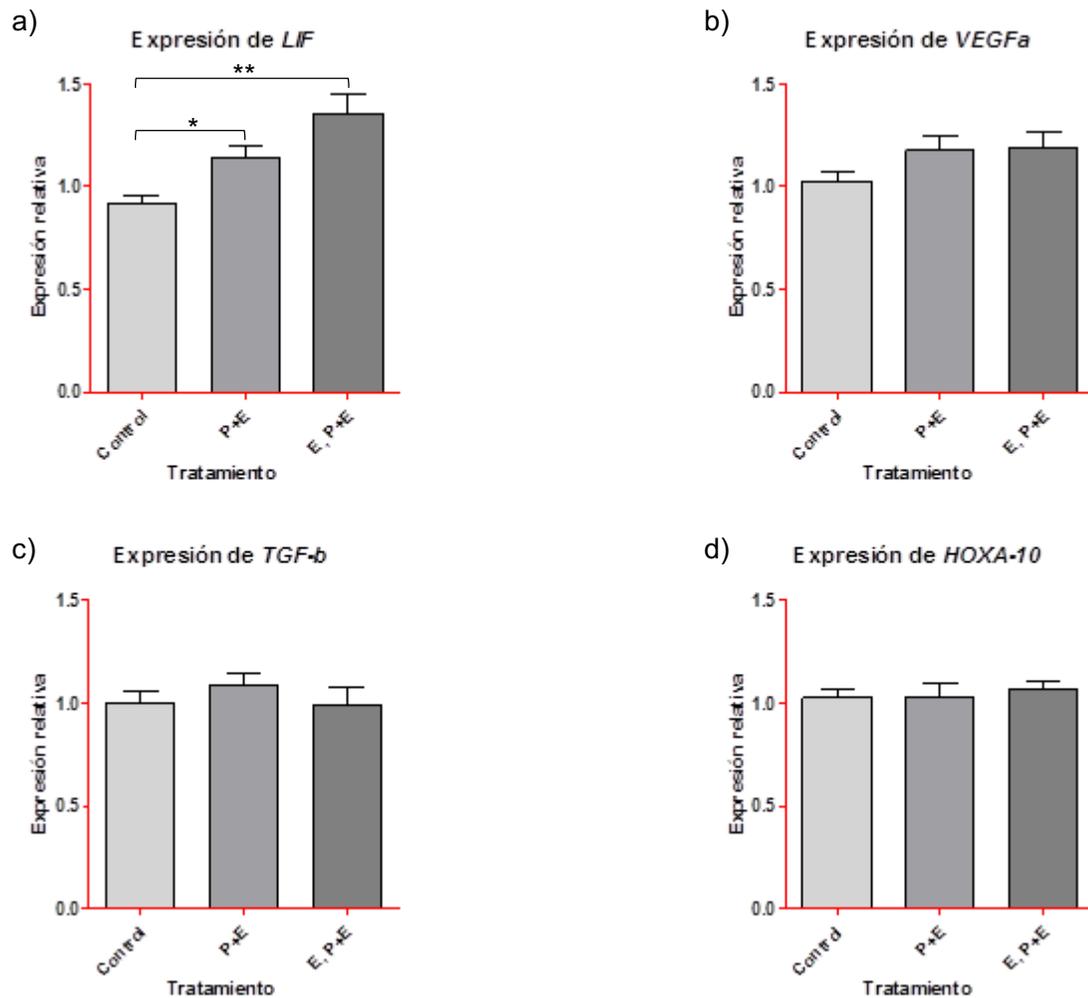


Figura 2: Expresión relativa de genes relacionados a la ventana de implantación (marcadores de receptividad) en las células sometidas a los distintos tratamientos mencionados (Tabla 1). a) Gen LIF, b) Gen VEGFa, c) TGF- β y d) HOXA-10. $p < 0,05$ test de Kruskal-Wallis y test comparativo de Dunn; N=4 c/u n=6.

Las MenSC estimuladas con las diferentes concentraciones hormonales del ciclo menstrual (tratamientos control, P+E y E; P+E; Tabla 1) presentaron una leve tendencia al aumento en la expresión del gen VEGFa. Sin embargo, al igual que en el caso de los genes HOXA-10 y TGF- β , no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Figura 2). En cambio al analizar la expresión del gen LIF este presentó un aumento estadísticamente significativo en ambos grupos tratados con las diferentes concentraciones hormonales del ciclo menstrual en comparación al grupo sin tratamiento hormonal, es decir, los tratamientos P+E y E;P+E generaron un aumento significativo en la expresión del gen LIF respecto del control sin hormonas (Figura 2a).

Capacidad Pro-Migratoria MenSC

Para evaluar las propiedades pro-migratorias de las MenSC en respuesta a los diferentes estímulos hormonales se realizó un ensayo de herida en células de coriocarcinoma placentario humano (JEG-3, Figura 3).

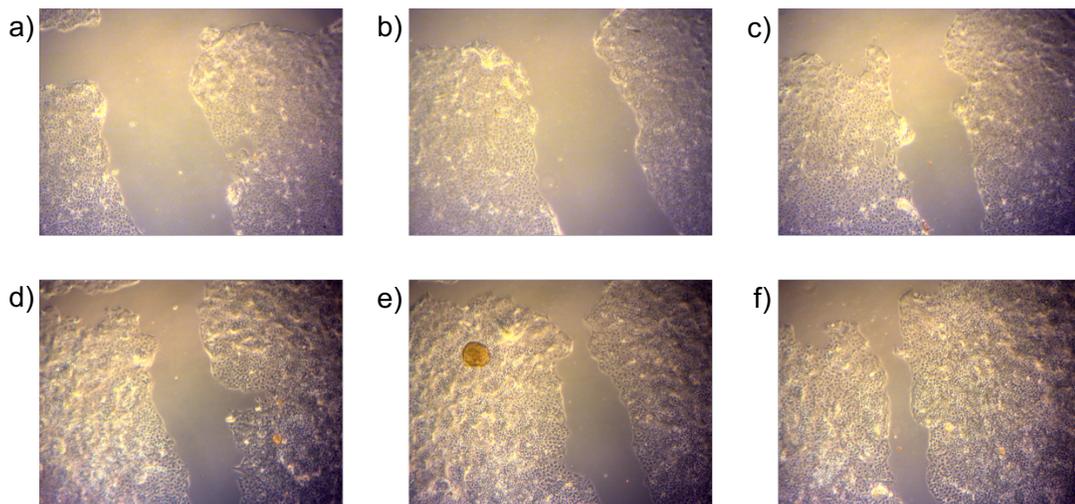


Figura 3: Fotos representativas de los cambios sufridos por la herida realizada sobre JEG-3 durante el ensayo de aumento 40x. a) Tratamiento control 0 horas, b) tratamiento P+E 0 horas, c) tratamiento E; P+E 0 horas, d) tratamiento control 32 horas, e) tratamiento P+E 32 horas y f) tratamiento E; P+E 32 horas.

Al realizar mediciones del area de la herida a lo largo del tiempo (mediante el software ImageJ), no se pudieron observar diferencias en los patrones migratorios de las células JEG-3 expuestas al medio condicionado (con FBS tratado con carbono activado) de las MenSC estimuladas con las distintas concentraciones hormonales presentes durante el ciclo menstrual (Figura 4a). Esta observación se comprobó al realizar una medición de el areas bajo las curvas de relleno de la herida, las cuales no presentaron diferencias significativas (Figura 4b).

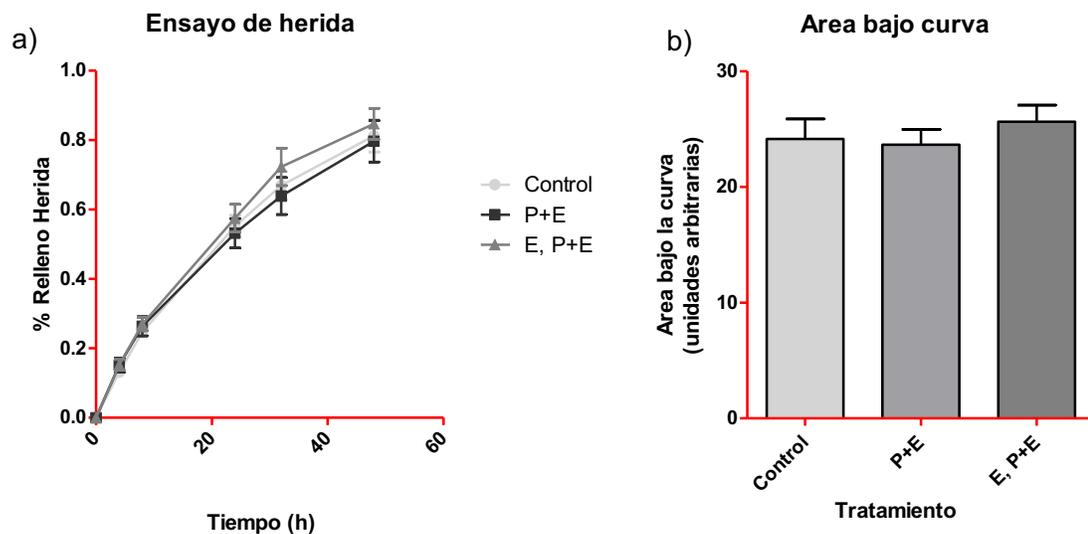


Figura 4: (a) Curación de la herida en Jeg-3 a lo largo del tiempo y (b) Área bajo la curva de cada tratamiento. Test de Kruskal-Wallis N=3 c/u n=6.

Capacidad Pro-Angiogénica

Para evaluar las propiedades pro-angiogenicas de las MenSC en respuesta a los diferentes estímulos hormonales se realizó el ensayo de formación de túbulos en células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC, Figura 5).

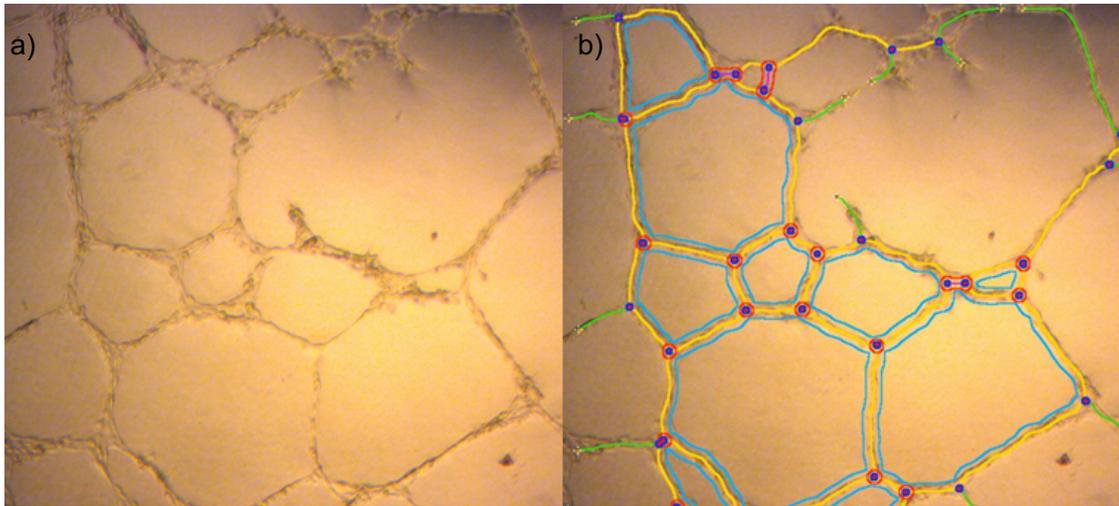


Figura 5: Imagen representativa de los resultados obtenidos con aumento 40x a) antes y b) después de utilizar el software “Angiogenesis Analyzer”. Algunos de los distintos parámetros que permiten evaluar la complejidad de los túbulos se ven representadas con líneas de colores: En azul oscuro (puntos) se demarcan los nodos, en rojo las uniones y en azul claro las redes.

Al analizar la formación de nodos, uniones, y redes, todos parámetros relacionados a la complejidad de los túbulos (Figura 5) se observó un aumento estadísticamente significativo en estos parámetros solo en las células HUVEC tratadas con el medio condicionado derivado de MenSC estimuladas con E2 y posteriormente con E2 y P4 (Figura 6), indicando un aumento en las propiedades pro-angiogénicas de las MenSC estimuladas con estas concentraciones de hormonas presentes en el ciclo menstrual.

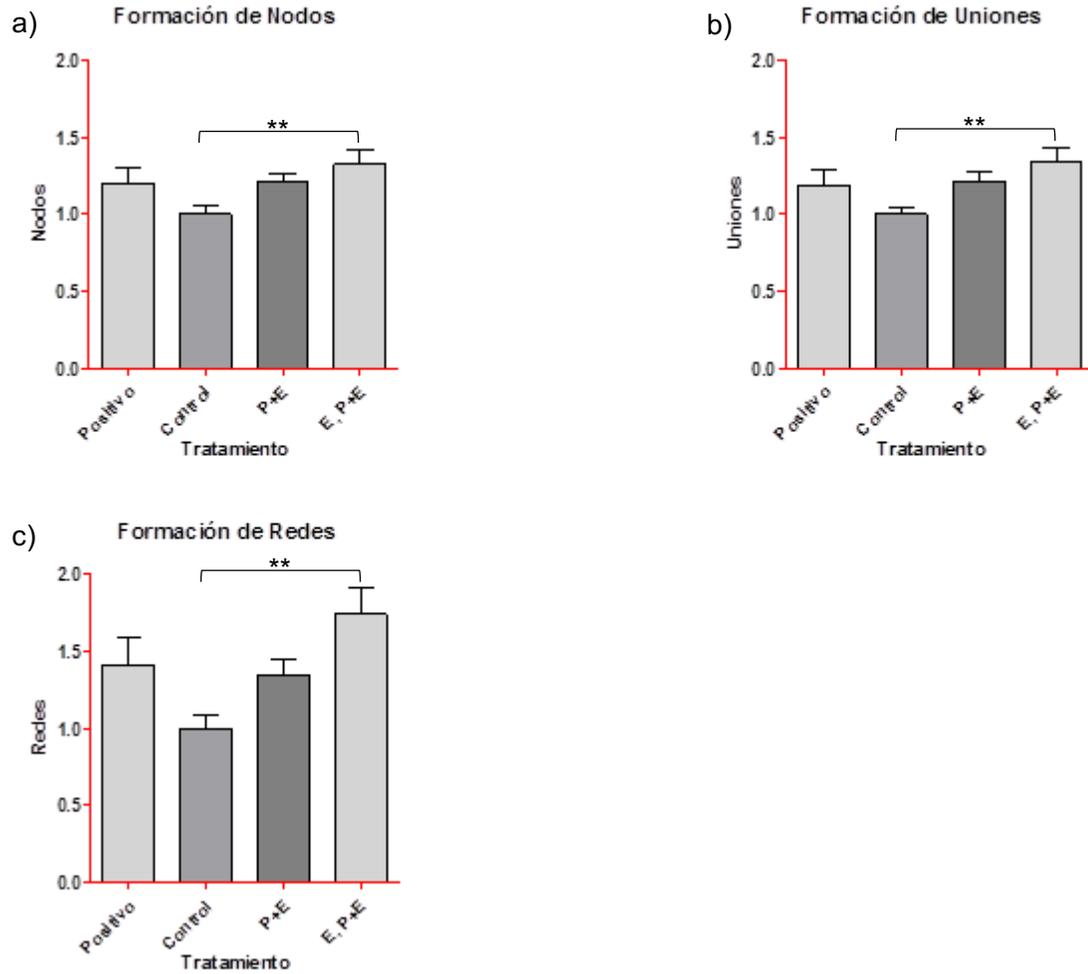


Figura 6: Capacidad de estimulación pro-angiogénica del medio condicionado por MenSC. Se evaluaron 3 propiedades de los túbulos formados: Los nodos (a), las uniones (b) y las redes (c). $p < 0,05$; Test de Kruskal-Wallis y test de Dunn; N=4 c/u n=6

Dado que no se observaron diferencias en la expresión del gen pro-angiogénico VEGFa, se evaluó la expresión génica de FGF-2 y CD105, genes que también se encuentran relacionados al proceso de angiogénesis, mediante la técnica de qPCR. Al analizar la expresión de FGF-2 en MenSC tratadas se pudo observar un aumento estadísticamente significativo con ambos estímulos hormonales en comparación al grupo no tratado

(Figura 7a). Por otro lado, al analizar a CD105 se pudo observar un efecto similar al ocurrido con FGF-2, aunque limitado al tratamiento E; P+E (Figura 7b).

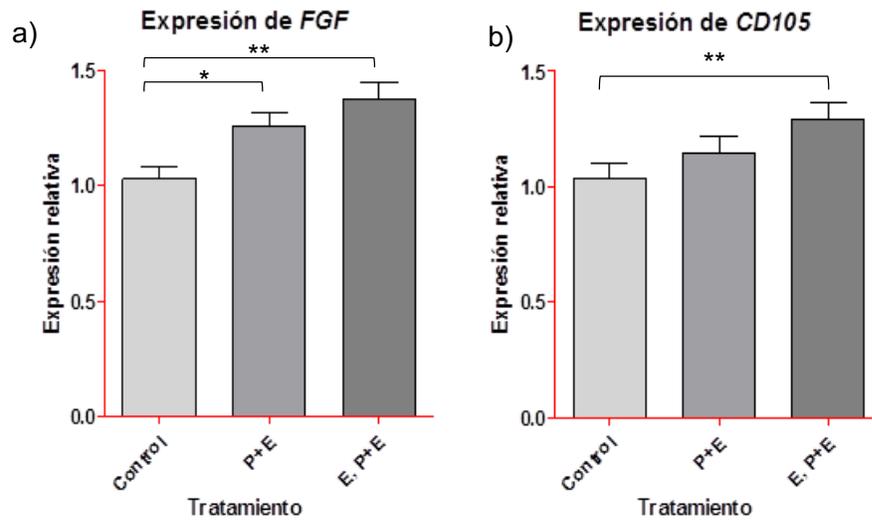


Figura 7: Expresión relativa de los factores pro-angiogénicos a) FGF-2 y b) CD105 en MenSC tratadas con las hormonas del ciclo menstrual. $p < 0,05$; Test de Kruskal-Wallis y test de Dunn; N=4 c/u n=6.

2.6 DISCUSIÓN Y/O PROYECCIONES

El estudio realizado durante este seminario de título sugiere la existencia de una relación directa entre las células madre mesenquimales aisladas desde el fluido menstrual y algunos de los fenómenos celulares que están implicados en la implantación del embrión en el endometrio receptivo. Los resultados observados indican que, al ser expuestas a los estímulos hormonales presentes durante la implantación, las MenSC desarrollan un aumento en la expresión de LIF y FGF-2, además de un aumento en su capacidad pro-angiogénica.

Efecto del Tratamiento sobre las MenSC

Los tratamientos hormonales utilizados buscaban imitar las condiciones que existen en el nicho de las MenSC durante el periodo de máxima receptividad uterina. Los efectos que tuvieron estas condiciones en las MenSC de las distintas pacientes fueron heterogéneos, a pesar de lo cual fue posible establecer la existencia de una tendencia en el comportamiento de esta población de células. Los tratamientos aquí estudiados generaron un aumento significativo en la expresión de los genes LIF y FGF-2 de las MenSC tratadas tanto con P+E y E; P+E respecto del tratamiento control. Este resultado indicaría que la exposición de las MenSC a las concentraciones de progesterona y estradiol existentes durante la fase secretora son suficientes como para inducir cambios fenotípicos relacionados a la implantación. A pesar de que ambos tratamientos hormonales generaron cambios significativos, debe destacarse que los cambios ocasionados por el tratamiento que más se asemeja al ciclo menstrual (E; P+E) fueron de mayor magnitud respecto del tratamiento que no incluyó un pre-acondicionamiento con el estradiol de la fase proliferativa (P+E). Especial son los casos de CD105 y los ensayos de pro-angiogénesis, donde solo existieron diferencias estadísticamente

significativas al pre-acondicionar a las MenSC con Estradiol, para luego tratar a las mismas con las concentraciones de Progesterona y Estradiol de la fase secretora. Esta información indicaría que, si bien las concentraciones de Estradiol y Progesterona de la fase secretora son suficientes como para inducir cambios fenotípicos relacionados a la implantación en las MenSC, un pre-acondicionamiento con el Estradiol liberado durante la fase secretora es necesario para generar el cambio fenotípico de mayor magnitud en las MenSC. Este aumento de magnitud podría deberse a la capacidad de Estradiol de promover un aumento en la expresión de los receptores de Progesterona (Paulson, 2011; Ozturk & Demir, 2010), es decir, al pre-acondicionar a las MenSC con Estradiol se estaría induciendo un aumento en la cantidad de receptores de Progesterona disponibles, lo que potenciaría los cambios observados en LIF, FGF-2, CD105 y en la capacidad pro-angiogénica. Estos a su vez podría estar relacionados con los mecanismos angiogénicos que ocurren durante la implantación del embrión.

LIF, FGF-2 y Angiogénesis

El rol preciso que desempeña la señalización de LIF por parte de las MenSC durante la implantación se desconoce, sin embargo, nuestros resultados podrían apuntar a la existencia de una relación entre esta proteína y el fenómeno de angiogénesis. LIF es un factor secretable que interviene en sus células blanco al interactuar con un receptor heterodimerico compuesto por dos proteínas de trans-membrana, LIFR y gp130, las que le permiten modular una variedad de vías de señalización dentro de las cuales se encuentran las vías JAK-STAT3 y ERK-1/2 (Figura 8), dos vías que están relacionadas al fenómeno angiogénico (Paradis & Gendron, 2000; Megeney et al., 1996; Rosario y Stewart, 2016; Srinivasan et al., 2009; Mavria et al., 2006).

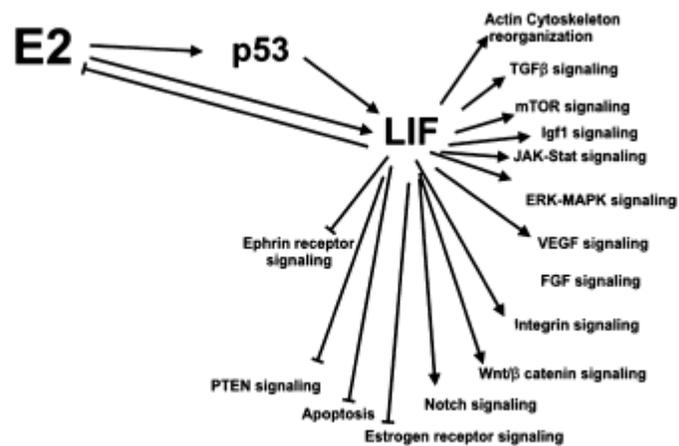


Figura 8: Vías activadas por LIF en el epitelio luminal del útero. Modificado de Rosario y Stewart, 2016.

La familia de proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (o STAT por sus siglas en inglés) son proteínas citoplasmáticas latentes que, al ser fosforiladas, permiten la transducción de señales provenientes de receptores de membrana asociados a ellas. Si bien muchos receptores de membrana poseen su propia actividad tirosina-quinasa, la mayoría de los receptores de las proteínas STAT no (Chen & Han, 2008; Aaronson & Horvath, 2002). En su lugar, la actividad quinasa requerida para activar a las STAT es provista por otro tipo de proteínas asociadas a los receptores, las quinasas Janus (JAK). Una vez fosforiladas, las proteínas STAT modulan la expresión de una gran variedad de funciones. Entre los miembros de esta familia, STAT3 es el principal regulador de la angiogénesis. Se ha demostrado que STAT3 es un activador clave de la angiogénesis (Chen & Han, 2008), debido principalmente a su capacidad de regular la expresión de VEGF y FGF-2 (Chen & Han, 2008; Carpenter & Lo 2014). Además, otros estudios han logrado asociar la expresión de LIF con la activación de STAT3, e incluso a ambos con otros procesos de la implantación (Megeny et al., 1996; Poehlmann et al., 2005; Liang et al., 2014; Fitzgerald et al., 2008; Suman P.

et al., 2014). Como ejemplo, Poehlmann y colaboradores demostraron en el 2005 que un Knock-Down de STAT3 resulta en una pérdida del efecto pro-invasivo fomentado por LIF en células JEG-3 (Poehlmann et al., 2005). A pesar de que el efecto que tiene la activación de STAT3 por parte de LIF en el fenómeno angiogénico aún se desconoce, la mayoría de los resultados obtenidos apoya al menos indirectamente esta hipótesis, siendo la única posible excepción el caso de VEGFa. Aún así, la falta de cambios a nivel del mRNA de VEGFa no necesariamente refleja una falta de cambios en los niveles o en la actividad de la proteína VEGFa. También es probable que la posible activación de STAT3 mediada por LIF regule solamente la expresión de FGF-2, por lo que estos resultados no invalidan la hipótesis de la vía STAT3 propuesta.

Por otro lado, un estudio realizado por Paradis y Gendron en el 2000 propondría que la activación de STAT3 por parte de LIF inhibiría la angiogénesis en lugar de activarla (Paradis & Gendron, 2000). En este mismo estudio se plantea que STAT3 estaría actuando como un regulador negativo de la angiogénesis inducida por LIF a través de la vía de las P41/43MAP kinasas (también conocidas como ERK-1 y ERK-2). ERK-1 y ERK-2 son proteínas serina/treonina kinasas emparentadas que participan en la cascada de transducción de señales Ras-Raf-MEK-ERK (Roskoski 2012). Esta cascada participa en la regulación de una gran variedad de procesos, dentro de los cuales se incluye efectivamente a la angiogénesis (Mavria et al., 2006, Srinivasan et al., 2009). Sin embargo, son pocos los estudios, fuera del mencionado, que relacionan a LIF y a las proteínas ERK-1 y ERK-2 con fenómenos de la implantación (Suman P. et al., 2014), ni menos con la angiogénesis que allí ocurre.

Por lo tanto, los cambios observados a nivel de mRNA de LIF en las MenSC moduladas por hormonas esteroidales podrían potencialmente estar correlacionadas a los cambios

vistos en las capacidades pro-angiogénicas que se observan con los medios condicionados de MenSC en células HUVEC. Sin embargo, se requieren más estudios para poder establecer si los cambios a nivel de mRNA se traducen efectivamente en cambios a nivel de proteína y para determinar cuál vía media el efecto de LIF sobre el fenómeno angiogénico. Estos estudios podrían basarse en la técnica de Westernblot para establecer si efectivamente existen variaciones en las concentraciones de proteínas relacionadas a los mRNA estudiados y a las vías propuestas. Otra opción consistiría en realizar Knock-Down's de los genes STAT3, ERK-1 o ERK-2, de forma de evaluar si estos son necesarios para la angiogénesis inducida por el medio condicionado por MenSC.

Por otro lado, el otro factor cuya expresión presento variaciones significativas fue el factor básico de crecimiento de fibroblastos o FGF-2. Las FGF-2 son una familia de factores secretables que incluye a miembros como FGF-1 y FGF-2 (bFGF). Esta familia posee una multiplicidad de funciones como la supervivencia, proliferación y diferenciación de células endoteliales, destacando así la importancia de estos factores para la angiogénesis. Al igual que LIF, se ha reportado que estos factores son capaces de modular las vías STAT3 y ERK-1/2, entre otras, ejerciendo asimismo una variedad de efectos (Ornitz and Itoh, 2015; Bernard and Christine Thisse, 2005). Potencialmente, LIF y FGF-2 podrían estar actuando coordinadamente sobre estas vías, cooperando en la inducción de la angiogénesis que observamos en las células HUVEC. Paradis y Gendron demostraron que LIF es capaz de modular de manera contradictoria la angiogénesis mediante la inducción de las vías STAT3 y ERK, sin embargo, en el mismo estudio también demostraron que la máxima formación de estructuras pseudo-capilares se logra al tratar a las células con la suma de los factores LIF y FGF-2 (Paradis & Gendron, 2000).

De la misma forma, el estudio de Megeney y colaboradores de 1996 demuestra que LIF y FGF-2 en conjunto son capaces de regular a las vías de STAT3 y ERK-1/2, fomentando la proliferación de mioblastos (Megeney et al., 1996), dejando abierta la posibilidad de que estos dos factores en conjunto puedan regular la proliferación de otros grupos celulares, como las células endoteliales. Esta evidencia, sustenta la posibilidad de que las proteínas LIF y FGF-2 provenientes de las MenSC tratadas estén efectivamente actuando de manera coordinada para regular el aumento de la actividad angiogénica que evidenciamos en las células HUVEC.

Por lo tanto, es plausible suponer que los cambios observados en las MenSC tratadas con estradiol y progesterona respondan a cambios relacionados entre sí y que en conjunto permitirían a las MenSC regular el fenómeno angiogénico que ocurre durante la implantación.

CD105

A pesar de ser un conocido factor pro-angiogénico, el caso de CD105 es distinto al de FGF-2 y LIF. Mientras que estos últimos son factores secretables, CD105 corresponde a una glicoproteína de membrana cuya función es la de actuar como receptor auxiliar para los receptores de clase II de TGF- β (T β RII; (Duff et al., 2003; Li et al., 2000; Valluru et al., 2011), mediando así el efecto de TGF- β sobre la angiogénesis. Cuando TGF- β interactúa con sus receptores de clase II sin la intervención de CD105 se induce la fosforilación y activación de las proteínas SMAD2 y SMAD3 las cuales inhiben la migración y proliferación de células endoteliales, es decir, los procesos angiogénicos. Contrariamente, la señalización en conjunto a CD105 inhibe esta señalización y favorece la señalización de TGF- β a través de SMAD1 y SMAD5 fosforiladas, las cuales inducen la migración y proliferación de las células endoteliales (Li et al., 2000; Valluru et al., 2011;

Liu et al., 2014). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con LIF y FGF-2, al ser CD105 un receptor de membrana, los efectos pro-angiogénicos de esta proteína ocurren sobre las células que la expresan, en este caso, las MenSC, por lo que el efecto que tiene su aumento sobre la angiogénesis que ocurre durante la implantación no es claro.

Debido a la capacidad pro-angiogénica de CD105 (Duff et al., 2003; Li et al 2000) y a la capacidad de diferenciación de las MenSC en tejido endotelial (Meng et al., 2007), la aproximación más lógica consiste en suponer que el aumento en la expresión de CD105 en las MenSC les permite a estas participar directamente, mediante su especialización a células endoteliales, de la angiogénesis que ocurre durante la implantación. De acuerdo a esto está un estudio que indica que al cultivar MSC con células mononucleares es posible inducir la formación de túbulos en ambos tipos celulares (Joensuu et al., 2011). Otra opción es que CD105 sea capaz de transducir señales de otras moléculas o de la misma TGF- β , ejerciendo otro tipo de efectos. Un ejemplo claro es la capacidad que posee TGF- β de inducir la secreción de LIF, aunque se desconoce el mecanismo molecular implicado (d'Hauterive et al., 2005). Esto implicaría que tal vez TGF- β y CD105 estarían implicadas en la angiogénesis mediada por las MenSC. También es posible que los cambios observados en la expresión de CD105 no estén relacionados directamente con la capacidad de las MenSC de mediar el proceso de implantación embrionaria. Como se mencionó, CD105 le permite a TGF- β fomentar la proliferación de las células endoteliales (Li et al., 2000; Valluru et al., 2011; Liu et al., 2014), por lo que posiblemente un aumento en CD105 permitiría un aumento en el número de integrantes de la población de MenSC, lo que a su vez generaría un aumento de la cantidad neta de factores, como LIF y FGF-2, liberados por la población.

Otros marcadores y Migración

Es necesario también tener en cuenta aquellos fenotipos que no se comportaron como se esperaba. Es el caso de los marcadores VEGFa, TGF-beta y HOXA-10, además de la capacidad pro-migratoria.

En estos casos se asumió a priori que estos aumentarían de manera similar a lo ocurrido con LIF, FGF-2 y la capacidad pro-angiogénica, lo que sin embargo no ocurrió. Estos resultados pueden ser abordados desde dos perspectivas, la primera consiste en suponer que la falta de cambios se debe al diseño del estudio, ya sea porque (1) el modelo de ciclo menstrual omitió elementos de importancia para estos factores, como por ejemplo la hipoxia propia del endometrio (la cual es una reguladora de importancia de VEGFa); (2) que no se haya observado un cambio por necesitarse un número de pacientes (n) más grande; (3) las vías que controlan estas propiedades de las MenSC requieren de más tiempo de exposición a las hormonas antes de iniciar cambios en la expresión de los mismos, entre otras posibilidades.

Por otro lado, podría considerarse la falta de cambios como la realidad. En este caso se podría decir que el ciclo menstrual no genera cambios en estas características y propiedades de las MenSC, a pesar de la importancia de las mismas para la implantación. Esta opción, sin embargo, contradice una multitud de estudios que destacan la capacidad de VEGFa, TGF-beta y HOXA-10 de responder a las hormonas sexuales y su importancia para la implantación (Achache & Revel, 2006; Demir et al., 2010; Kodaman et al., 2004; Talbi et al., 2006). Asimismo, también se ha reportado que LIF es capaz de inducir procesos migratorios en el trofoblasto (Silva & Serakides, 2016), haciendo menos plausible esa opción.

Sin embargo, lo que se debe destacar en este estudio es que, bajo las condiciones experimentales utilizadas, no hubo respuesta de los marcadores en cuestión ni de la capacidad pro-migratoria y que la causante de esto se desconoce

Limitaciones y Proyecciones

A pesar de la significancia estadística que presentan los resultados obtenidos en este estudio, es necesario tener un ojo crítico a la hora de su interpretación, sobre todo teniendo en cuenta las implicancias que estos puedan tener. En primer lugar, se debe destacar que los resultados observados se enmarcan en el contexto de tratamientos hormonales que intentan emular *in vitro* las condiciones que anteceden a la ventana de máxima receptividad uterina *in vivo*. Este modelo, al igual que cualquier otro modelo, es una aproximación simplificada de la realidad cuyos resultados deben ser tomados con la adecuada cautela, es decir, estos no son más que indicadores de lo que posiblemente ocurre en la realidad. Finalmente, otro factor a tener en cuenta es el bajo número de pacientes analizados (N=4). Con solo cuatro muestras de pacientes en tres pasajes distintos, a pesar de ser estadísticamente significativos, y lógicos de un punto de vista mecanístico, es necesario analizar los resultados con el debido cuidado. A pesar de estas limitantes, el estudio aquí presentado cumple con su objetivo de servir como una primera aproximación en él lo que respecta al rol de las MenSC.

Teniendo en cuenta las limitaciones y los resultados del estudio se debiese realizar, en caso de considerarse necesario, un ajuste del modelo de tratamiento hormonal. Para poder tener resultados más acordes a la realidad se debiese incluir la condición de hipoxia que existe al interior del endometrio a lo largo del ciclo menstrual (Ottosen, 2006) de esta forma seria posible evaluar nuevamente el comportamiento de los marcadores de receptividad que no respondieron, en búsqueda de cambios en su expresión.

También se debiese aumentar el número de muestras incluidas en el estudio de forma de poder obtener resultados que representen de mejor manera a la población deseada. Finalmente, se postula la medición de más propiedades de las MenSC, tales como el fomento de la invasión, los niveles proteicos de los marcadores de receptividad, la activación o inhibición de las proteínas STAT3 y ERK-1/2, entre otros.

2.7 CONCLUSIÓN

En base a los cambios fenotípicos experimentados por las MenSC tratadas en el presente estudio es plausible proponer la existencia de una relación entre esta población de células madre y el proceso angiogénico que ocurre durante la implantación del embrión. Esta relación estaría aparentemente bajo el control del ciclo menstrual y consistiría en una modulación directa de las MenSC sobre el fenómeno angiogénico estudiado.

2.8 BIBLIOGRAFIA

Aaronson David S. and Horvath Curt M. (2002). A Road Map for Those Who Don't Know Jak-STAT. *Science*, Vol. 296: 1953-1955.

Achache H. and Revel A. (2006). Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human Reproduction Update*, Vol.12, No.6 pp. 731-746.

Ackema Karin B. and Charité Jeroen (2008). Mesenchymal Stem Cells from Different Organs are Characterized by Distinct Topographic Hox Codes. *Stem Cells And Development* 17:979–992.

Aghajanova Lusine (2004). Leukemia Inhibitory Factor and Human Embryo Implantation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1034: 176-183.

Alcayaga-Miranda F., Cuenca Jimena, Luz-Crawford Patricia, Aguila-Díaz Carolina, Fernández Ainoa, Figueroa Fernando E and Khoury Maroun (2015). Characterization of menstrual stem cells: angiogenic effect, migration and hematopoietic stem cell support in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy* (2015) 6:32.

Allickson J.G., Sanchez Anthony, Yefimenko Natalie, Borlongan Cesar V., and Sanberg Paul R. (2011). Recent Studies Assessing the Proliferative Capability of a Novel Adult Stem Cell Identified in Menstrual Blood. *Open Stem Cell J.*; 3: 4–10.

Almalki Sami G. & Agrawal Devendra K. (2016). Effects of matrix metalloproteinases on the fate of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy* 7:129.

Arnaoutova Irina & Kleinman Hynda K (2010). *In vitro* angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nature Protocols* Vol.5 No.4: 628 - 635

Bagot Catherine N., Kliman Harvey J., And Taylor Hugh S. (2001). Maternal Hoxa10 Is Required for Pinopod Formation in the Development of Mouse Uterine Receptivity to Embryo Implantation. *Developmental Dynamics* 222:538–544.

Bianco P., Gehron Robey Pamela and J. Simmons Paul (2008). Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell*, 2: 313-319.

Carpentier Gilles (2012). Angiogenesis Analyzer for ImageJ. *ImageJ User and Developer Conference 2012*. October 24-26.

Carpenter, R. L., & Lo H. W. (2014). STAT3 Target Genes Relevant to Human Cancers. *Cancers*, 6(2), 897-925.

Castro-Manreza M. E. and Montesinos Juan J. (2015). Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications. *Journal of Immunology Research* Volume 2015, Article ID 394917, 20 pages.

Cha Jeeyeon, Sun Xiaofei, Dey Sudhansu K (2012). Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med*. Vol 18: 12. 1754 -1767.

Chadchan Sangappa Basanna, Kumar Vijay, Maurya Kumar Vineet, Kumar Soni Upendra, Kumar Jha Rajesh (2016). Endoglin (CD105) coordinates the process of endometrial receptivity for embryo implantation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 425: 69-83.

Chang Lufen & Karin Michael (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, Vol 410: 37-40.

Chen Zhong and Han Zhong Chao (2008). STAT3: A critical transcription activator in angiogenesis. *Medical Research Reviews*, Vol. 28, No. 2: 185-200.

Cross Michael J. and Claesson-Welsh Lena (2001). FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends in Pharmacological Sciences* Vol.22 No. 4

d'Hauterive Sophie Perrier, Chantal Charlet-Renard, Michel Dubois Sarah Berndt, Frederic Goffin, Jean-Michel Foidart, Vincent Geenen (2003). Human Endometrial Leukemia Inhibitory Factor and Interleukin-6: Control of Secretion by Transforming Growth Factor- β -Related Members. *Neuroimmunomodulation* 2005; 12:157–163.

Da Silva Meirelles Lindolfo, Chagastelles Pedro Cesar, Beyer Nardi Nance (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science* 119: 2204-2213.

Demir Ramazan, Aylin Yaba, Berthold Huppertz (2010). Vasculogenesis and angiogenesis in the endometrium during menstrual cycle and implantation. *Acta histochemica* 112: 203-214.

d'Hauterive Sophie Perrier, Charlet-Renard Chantal and Dubois Michel (2005). Human Endometrial Leukemia Inhibitory Factor and Interleukin-6: Control of Secretion by Transforming Growth Factor- β -Related Members. *Neuroimmunomodulation* 12: 157-163.

Díaz-Gimeno P., Horcujadas Jose A., Martinez-Conejero Jose A., Esteban Francisco J., Alama Pilar, Pellicer Antonio, and Simon Carlos (2011). A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertility and Sterility* Vol. 95, No. 1. 50-60.

Dimitriadis E., White C.A., Jones R.L. and Salamonsen L.A (2005). Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Human Reproduction Update*, Vol.11, No.6 pp. 613-630.

DiSilvio L., Jameson Jacqueline, Gamie Zakareya, Giannoudis Peter V., Tsiroidis Eleftherios (2006). *In vitro* evaluation of the direct effect of Estradiol on human osteoblasts (HOB) and human mesenchymal stem cells (h-MSCs). *Injury, Int. J. Care Injured* (2006) 37S, S33-S42.

Dominici M, K Le Blanc, I Mueller, I Slaper-Cortenbach, FC Marini, DS Krause, RJ Deans, A Keating, DJ Prockop and EM Horwitz (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* Vol. 8, No. 4, 315-317.

Du X., Qing Yuan, Ye Qu, Yuan Zhou, and Jia Bei (2016). Endometrial Mesenchymal Stem Cells Isolated from Menstrual Blood by Adherence. *Stem Cells International* Volume 2016, Article ID 3573846, 1-8.

Duff Sarah E., Li Chenggang, Garland John M. and Kumar Shant (2003). CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *The FASEB Journal*. Vol. 17. 984-992.

Edwards D.P. (2005). Regulation Of Signal Transduction Pathways By Estrogen And Progesterone. *Annu. Rev. Physiol.* 67:335–76.

Fitzgerald Justine S., Poehlmann Tobias G., Schleussner Ekkehard and Markert Udo R. (2008). Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Human Reproduction Update*, Vol.14, No.4 pp. 335-344.

Fowler D.J., Nicolaides K.H., Miell J.P. (2000). Insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1): a multifunctional role in the human female reproductive tract. *Human Reproduction Update*, Vol 6. No 5. pp. 495-504.

Friedenstein AJ (1990). Osteogenic stem cells in bone marrow. *Bone and Mineral Research*. Elsevier; 1990: 243-272.

Gardel, M. L., Schneider, I. C., Aratyn-Schaus, Y., & Waterman, C. M. (2010). Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 26, 315–333

Hannan N.J., P. Paiva, K. L. Meehan, L. J. F. Rombauts, D. K. Gardner, and L. A. Salamonsen (2011). Analysis of Fertility-Related Soluble Mediators in Human Uterine Fluid Identifies VEGF as a Key Regulator of Embryo Implantation. *Endocrinology*, 152(12):4948–4956.

Hu Wenwei, Feng Zhaohui, Teresky Angelika K. & Levine Arnold J. (2007) p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature*, Vol 450: 721-725.

Arutyunyan Irina, Elchaninov Andrey, Makarov Andrey and Fatkhudinov Timur (2016). "Umbilical Cord as Prospective Source for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy," *Stem Cells International*, Vol. 2016: 1-17

Jeeyeon Cha, Xiaofei Sun & Sudhansu K Dey (2012). Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat. Med.* 18, 1754-1767.

Joensuu K., Paatero I., Alm J. J., Elenius K., Aro H. T., Heino T. J., Hentunen T. A (2011). Interaction between marrow-derived human Mesenchymal Stem Cells and peripheral blood mononuclear Cells in endothelial cell differentiation. *Scandinavian Journal of Surgery* 100: 216–222.

Jones R.E & Kristin H. Lopez (2014). *Human Reproductive Biology* (fourth edition). Academic Press, Elsevier.

Juneo F Silva & Rogéria Serakides (2016): Intrauterine trophoblast migration: a comparative view of humans and rodents, *Cell Adhesion & Migration*.

Kao L.C., S. Tulac, S. Lobo, B. Imani, J. P. Yang, A. Germeyer, K. Osteen, R. N. Taylor, B. A. Lessey, And L. C. Giudice (2002). Global Gene Profiling in Human Endometrium during the Window of Implantation. *Endocrinology* 143(6):2119–2138.

Katz Jessica B., Alexander J. Muller, George C. Prendergast (2008). Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunological Reviews* Vol. 222: 206–221.

Khoury M., Francisca Alcayaga-Miranda, Sebastián E. Illanes and Fernando E. Figueroa (2014). The promising potential of menstrual stem cells for antenatal diagnosis and cell therapy. *Frontiers in Immunology*, Volume 5, Article 205, 1-8.

Kodaman P.H., Taylor Hugh S. (2004). Hormonal regulation of implantation. *Obstet Gynecol Clin N Am* 31: 745– 766.

Kyurkchiev D.S, Ekaterina Ivanova-Todorova, and Stanimir D. Kyurkchiev (2011). Effect of Progesterone on Human Mesenchymal Stem Cells. *Vitamins and Hormones*, Volume 87.

Lessey B.A. (2011). Assessment of endometrial receptivity. *Fertility and Sterility* Vol. 96, No. 3.

Liang Xiao-Huan, Deng Wen-Bo, Li Ming, Zhao Zhen-Ao, Wang Tong-Song, Feng Xu-Hui, Cao Yu-Jing, Duan En-Kui, and Yang Zeng-Ming (2014). Egr1 Protein Acts Downstream of Estrogen-Leukemia Inhibitory Factor (LIF)-STAT3 Pathway and Plays a Role during Implantation through Targeting Wnt4. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 289, No. 34: 23534-23545.

Li Chenggang, Hampson Ian N., Hampson Lynn, Kumar Pat, Bernabeu Carmelo and Kumar Shant (2000). CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor β 1 on human vascular endothelial cells. *The FASEB Journal*. Vol. 14: 55-64.

Liu Z, Lebrin F, Maring JA, van den Driesche S, van der Brink S, et al. (2014) Endoglin Is Dispensable for Vasculogenesis, but Required for Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Angiogenesis. *PLOS ONE* 9(1): e86273.

Luz-Crawford P., Maria J. Torres, Daniele Noe"l, Ainoa Fernandez, Karine Toupet, Francisca Alcayaga-Miranda, Gautier Tejedor, Christian Jorgensen, Sebastian E. Illanes, Fernando E. Figueroa, Farida Djouad, Maroun Khoury (2015). The Immunosuppressive

Signature of Menstrual Blood Mesenchymal Stem Cells Entails Opposite Effects on Experimental Arthritis and Graft Versus Host Diseases. *STEM CELLS*; 34: 456-469.

Maathuis J.B., P. F. A. Van Look and E. A. Michie (1978). Changes In Volume, Total Protein And Ovarian Steroid Concentrations Of Peritoneal Fluid Throughout The Human Menstrual Cycle. *J. Endocr*; 76, 123-133.

Mavria Georgia, Vercoulen Yvonne, Yeo Maggie, Paterson Hugh, Karasarides Maria, Marais Richard, Bird Demelza, and Marshall Christopher J. (2006). ERK-MAPK signaling opposes Rho-kinase to promote endothelial cell survival and sprouting during angiogenesis. *Cancer cell* 9, 33-44.

Maurya Vineet Kumar, Rajesh Kumar Jha, Vijay Kumar, Anubha Joshi, Sangappa Chadchan, Jasna Jagan Mohan, and Malini Laloraya (2013). Transforming Growth Factor-Beta 1 (TGF-B1) Liberation from Its Latent Complex During Embryo Implantation and Its Regulation by Estradiol in Mouse. *Biology Of Reproduction* (2013) 89(4):84, 1–17.

Megeney Lynn A., Perry Robert L.S., Lecouter Jennifer E. and Rudnicki (1996) bFGF and LIF Signaling Activates STAT3 in Proliferating Myoblasts. *Developmental Genetics* 19: 139-245.

Meng X., Thomas E Ichim, Jie Zhong, Andrea Rogers, Zhenglian Yin, James Jackson, Hao Wang, Wei Ge, Vladimir Bogin, Kyle W Chan, Bernard Thébaud and Neil H Riordan (2007). Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population. *Journal of Translational Medicine*, 5:57.

Minteer Danielle, Marra Kacey G, Rubin J. Peter (2012). Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Biology and Potential Applications. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Vol. 129: 59-71.

Musina R. A., Belyavski A. V., Tarusova, O. V, Solovyova E. V and Sukhikh G. T (2008). Endometrial Mesenchymal Stem Cells Isolated from the Menstrual Blood. *Cell technologies in biology and medicine*, Vol. 145, No. 4.

Nasef Aisha, Christelle Mazurier, Sandrine Bouchet, Sabine François, Alain Chapel, Dominique Thierry, Norbert-Claude Gorin, Loïc Fouillard (2008). Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. *Cellular Immunology* 253 (2008) 16–22.

Norwitz Errol R., Danny J. Schust, Susan J. Fisher (2001). Implantation And The Survival Of Early Pregnancy. *N Engl J Med*, Vol. 345, No. 19.

Ornitz David M. and Itoh Nobuyuki (2015). The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *WIREs Dev Biol* 4: 215-266.

Ottosen Lars DM (2006). Observations on intrauterine oxygen tension measured by fibre-optic microsensors. *Reproductive BioMedicine Online*, Vol 13, No 3: 380-385.

Ozturk Saffet and Demir Ramazan (2010). Particular functions of estrogen and progesterone in establishment of uterine receptivity and embryo implantation. *Histol Histopathol* 25: 1215-1228

Paradis Helene and Gendron Robert L. (2000). LIF transduces contradictory signals on capillary outgrowth through induction of STAT3 and ^{p41/p43}MAP Kinase. *Journal of Cell Science* 113: 4331-4339.

Patel A.N, Eulsoon Park, Michael Kuzman, Federico Benetti, Francisco J. Silva, and Julie G. Allickson (2008). Multipotent Menstrual Blood Stromal Stem Cells: Isolation, Characterization, and Differentiation. *Cell Transplantation*, Vol. 17, pp. 303-311.

Paulson Richard J. (2011). Hormonal induction of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 96:530–5.

Perez-Sepulveda, A., Torres, M. J., Khoury, M., & Illanes, S. E. (2014). Innate Immune System and Preeclampsia. *Frontiers in Immunology*, 5, 244.

Poehlmann T. G., Fitzgerald J. S., Meissner A., Wengenmayer T., Schleussner E., Friedrich K. and Markert U. R. (2005). Trophoblast Invasion: Tuning Through LIF, Signalling Via Stat3. *Placenta* (2005), Vol. 26, Vol. 19.

Presta Marco, Dell’Era Patrizia, Mitola Stefania, Moroni Emanuela, Ronca Roberto and Rusnati Marco (2005). Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16: 159-178

Ramma, W., & Ahmed, A. (2011). Is inflammation the cause of pre-eclampsia? *Biochemical Society Transactions*, 39(Pt 6), 1619-1627.

Ray R., Nathan M Novotny, Paul R Crisostomo, Tim Lahm, Aaron Abarbanell, and Daniel R Meldrum (2008). Sex Steroids and Stem Cell Function. *Mol Med*; 14 (7-8) 493-501.

Rosario GX and Stewart CL (2016). The multifaceted actions of leukaemia inhibitory factor in mediating uterine receptivity and embryo implantation. *Am J Reprod Immunol* 75: 246–255.

Roskoski Robert Jr. (2012). ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research* 66: 105-143.

Sherer D. M. and O. Abulafia (2001). Angiogenesis during Implantation, and Placental and Early Embryonic Development. *Placenta*, 22, 1-13.

Silva Juneo F & Serakides Rogéria (2016). Intrauterine trophoblast migration: a comparative view of humans and rodents. *Cell Adhesion & Migration* Vol 10.

Stricker Reto, Raphael Eberhart, Marie-Christine Chevailler, Frank A. Quinn, Paul Bischof and Rene Stricker (2006). Establishment of detailed reference values for luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, Estradiol, and progesterone during different phases of the menstrual cycle on the Abbott ARCHITECT analyser. *Clin Chem Lab Med*; 44(7): 883-887

Suman P, Gupta SK. STAT3 and ERK1/2 cross-talk in leukaemia inhibitory factor mediated trophoblastic JEG-3 cell invasion and expression of mucin1 and Fos. *Am J Reprod Immunol* 2014; 72: 65–74

Sun P., Jian Liu, Wenwen Li, Xiaoxi Xu, Xiangying Gu, HongYue Li, Hongqiu Han, Caigan Du and Hao Wang (2016). Human endometrial regenerative cells attenuate renal ischemia reperfusion injury in mice. *Transl. Med.*; 14:28.

Srinivasan Ruchika, Zabuawala Tahera, Huang Hong, Zhang Jianying, Gulati Parul, Fernandez Soledad, Karlo J. Colleen, Landreth Gary E., Leone Gustavo, Ostrowski Michael C. (2009). Erk1 and Erk2 Regulate Endothelial Cell Proliferation and Migration during Mouse Embryonic Angiogenesis. *PLoS ONE* 4(12): e8283.

Talbi S., A. E. Hamilton, K. C. Vo, S. Tulac, M. T. Overgaard, C. Dosiou, N. Le Shay, C. N. Nezhat, R. Kempson, B. A. Lessey, N. R. Nayak, and L. C. Giudice (2006). Molecular Phenotyping of Human Endometrium Distinguishes Menstrual Cycle Phases and Underlying Biological Processes in Normo-Ovulatory Women. *Endocrinology* 147(3):1097–1121.

Taylor Hugh S., Arici Aydin, Olive David, and Igarashi Peter (1998). HOXA10 is Expressed in Response to Sex Steroids at the Time of Implantation in the Human Endometrium. *J. Clin. Invest.*; Volume 101, Number 7, 1379-1384.

Tessier Daniel R., Yockell-Lelièvre Julien, Gruslin Andrée (2014). Uterine Spiral Artery Remodeling: The Role of Uterine Natural Killer Cells and Extravillous Trophoblasts in Normal and High-Risk Human Pregnancies. *J Reprod Immunol* 2015; 74: 1-11.

Thisse Bernard & Thisse Christine (2005). Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Developmental Biology* 287: 390-402

Tolar J, Katarina Le Blanc, Armand Keating, Bruce R. Blazar (2010). Concise Review: Hitting the Right Spot with Mesenchymal Stromal Cells. *STEM CELLS* 2010; 28:1446-1455.

Torry Donald S. & Jonathan Leavenworth & Miao Chang & Vatsala Maheshwari & Kathleen Groesch & Evan R. Ball & Ronald J. Torry (2007). Angiogenesis in implantation. *J Assist Reprod Genet* 24:303-315.

UCSC Genome Browser: Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002 Jun; 12(6):996-1006.

Ulrich Daniela, Muralitharan Rikeish & Gargett Caroline E (2013). Toward the use of endometrial and menstrual blood mesenchymal stem cells for cell-based therapies. *Expert Opinion on Biological Therapy* Vol. 13: 1-14.

Valdez-Morales F.J, Armando Gamboa-Domínguez, Victor S. Vital-Reyes, Juan C. Hinojosa Cruz, Jesús Chimal-Monroy, Yanira Franco-Murillo and Marco Cerbón (2015). Changes in receptivity epithelial cell markers of endometrium after ovarian stimulation treatments: its role during implantation window. *Reproductive Health* 12:45.

Valluru Manoj, Staton Carolyn, Reed Malcolm, Brown Nicola (2011). Transforming Growth Factor- β and Endoglin Signaling Orchestrate Wound Healing. *Frontiers in Physiology*. Vol 2: 1-12.

Wang, H. S., Hung, S.C., Peng, S. T., Huang, C. C., Wei, H. M., Guo, Y. J., Fu, Y. S., Lai, M. C. and Chen, C. C. (2004), Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. *STEM CELLS*, 22: 1330-1337

Westwood Melissa, J. Martin Gibson, Amanda C. Williams, Peter E. Clayton, Ole Hamberg, Allan Flyvbjerg, And Anne White (1995). Hormonal Regulation of Circulating Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-I Phosphorylation Status. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol. 80 No. 12. 3520-3527.

Young S.L. (2013). Oestrogen and progesterone action on endometrium: a translational approach to understanding endometrial receptivity. *Reproductive BioMedicine Online*; 27, 497– 505.

Zhang Shuang, Haiyan Lin, Shuangbo Kong, Shumin Wang, Hongmei Wang, Haibin Wang, D. Randall Armant (2013). Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Molecular Aspects of Medicine* 34; 939-980.

Zhao X., Liu Liu, Dan Liu, Hongye Fan, Yaping Wang, Yali Hu, Yayi Hou (2012). Progesterone Enhances Immunoregulatory Activity of Human Mesenchymal Stem Cells Via PGE2 and IL-6. *J Reprod Immunol*; 68: 290–300.

Zhou S., Gadi Turgeman, Stephen E. Harris, Dale C. Leitman, Barry S. Komm, Peter V. N. Bodine, And Dan Gazit (2003). Estrogens Activate Bone Morphogenetic Protein-2 Gene Transcription in Mouse Mesenchymal Stem Cells. *Molecular Endocrinology* 17(1):56–66.