

Descifrando los enigmas de la implantación durante la era postgenómica - Primera Parte

Idelma Serpa

Tesis para la Carrera de Postgrado en Ginecología y Obstetricia - Universidad Nacional de Rosario

Reproducción 2010; 25: 19-29

Resumen

La implantación es un evento crucial en la reproducción humana. Se trata de un proceso dinámico en el que intervienen principalmente dos elementos: el endometrio y el blastocisto.

El endometrio es receptivo para la implantación del blastocisto durante un período temporo-espacialmente restringido, conocido como “ventana de implantación”. Durante la era pregenómica, han sido identificadas numerosas moléculas que participarían en la formación del endometrio receptivo, sin embargo, sus funciones exactas y su importancia en el proceso de implantación aún deben ser descifradas. Con el advenimiento de la era post-genómica, investigaciones utilizando técnicas de microarrays permitieron la identificación de ciertos grupos de genes que son diferencialmente expresados en el endometrio durante la ventana de implantación y que nos permitieron acercarnos a nuevos conocimientos sobre tan intrincado proceso. Análisis funcionales confirmarían la importancia y la verdadera participación de estos genes involucrados en el proceso de implantación humana.

Palabras clave. *Implantación, receptividad endometrial, microarray, marcadores moleculares.*

Introducción

La implantación embrionaria es uno de los fenómenos más fascinantes de la reproducción humana. Participan en este proceso un endometrio receptivo y un blastocisto competente.

Sorprendentemente el fenómeno de la im-

plantación humana es altamente ineficaz, ya que menos del 30% de todas las concepciones por ciclo resultan en un nacido vivo. Esto se debería, en parte, a que se requieren estrictas condiciones a nivel del endometrio y del blastocisto para que éste se implante de manera exitosa.

El endometrio humano es receptivo para el embrión sólo durante un período temporo-espacialmente estricto llamado “ventana de implantación”. Esta ventana dura aproximadamente 4 días y se abre en la mitad de la fase secretora, alrededor del día 20-21 del ciclo menstrual, aproximadamente 7 días después del pico de LH.^{1,2}

Estas restricciones espacio-temporales aseguran que sólo el desarrollo simultáneo y sincronizado del endometrio y del blastocisto resulte en implantación.³

El endometrio es un tejido complejo que fue estudiado a lo largo de los años. El interés por el endometrio comenzó con Noyes en 1950,⁴ quien describió criterios morfológicos para el estudio de la biopsia endometrial en las distintas etapas del ciclo. Más tarde, utilizando los criterios de Noyes, varios investigadores intentaron correlacionar la histología endometrial con diferentes moléculas que potencialmente participarían en la implantación embrionaria.

Durante décadas, los investigadores se han enfocado en la identificación de ciertas moléculas que se expresan en el endometrio involucradas en el proceso de implantación. Otros han tratado de descifrar este complejo mecanismo implantatorio a través del estudio del blastocisto. Es preciso

Correspondencia: Idelma Serpa
E-mail: idelmaserpa@yahoo.com.ar

comprender que no existe una molécula única o un gen determinante, sino que son cientos de moléculas las que intervienen y son grupos de genes los que se expresan en ese período crítico.

Con el advenimiento de la tecnología genómica (*microarray*, *proteomics*, *metabolomics*) que permite el estudio de miles de genes y sus productos en una pequeña muestra de endometrio, los investigadores enfocaron sus trabajos hacia la identificación de aquellos genes que tendrían un rol relevante para la implantación.⁵ Así, grupos específicos de genes se correlacionan con las diferentes fases del endometrio y se describieron aquellos que tendrían un rol importante para la transformación del endometrio en receptivo para la implantación del blastocisto.^{2,6,7}

Sin embargo, no está del todo claro aún cuáles de estos genes poseen una actividad funcional importante durante la ventana de implantación.

Objetivo

El objetivo de esta tesis es investigar los diferentes factores involucrados en el diálogo entre el embrión y el endometrio y revisar la evidencia actual referida a los avances en el conocimiento sobre implantación embrionaria.

Métodos

Se realizó una revisión bibliográfica en búsqueda de la evidencia disponible acerca del proceso de implantación embrionaria. Se efectuó una búsqueda por Internet en *Medline* y en las revistas científicas relacionadas con el tema. Las palabras claves utilizadas fueron: implantación, receptividad endometrial, *microarray* y marcadores moleculares.

Fases de implantación

La fertilización se produce en la trompa de Falopio 24 a 48 horas después de la ovulación. Las etapas iniciales del desarrollo desde cigoto a mórula (etapa de 12 a 16 células) ocurren a medida que el embrión atraviesa la trompa, envuelto en una capa glicoproteica, la zona pelúcida.⁸

La mórula llega a la cavidad uterina dos o tres días postfertilización. La aparición de líquido en su interior marca la transición a blastocisto y las células se diferencian en dos macizos celulares: uno externo, el trofoblasto, que dará origen a las estructuras extraembrionarias, incluyendo la pla-

centa, y el macizo celular interno, constituido por células pluripotenciales que darán origen al embrión (blastocisto maduro).⁹

Después de las 72 horas de haber entrado a la cavidad uterina el embrión pierde la zona pelúcida, dejando expuesto el trofoblasto, reacción fundamental para que se inicie el diálogo entre el embrión y el endometrio. Este diálogo comienza aún antes de que el embrión se adhiera a la superficie epitelial, pero siempre después de desprenderse de la zona pelúcida.⁹

La implantación es el proceso mediante el cual el blastocisto toma íntimo contacto físico y fisiológico con el endometrio y ocurre en el día 6 ó 7 postovulación.

Se describen en el proceso de implantación tres etapas: aposición, adhesión y penetración.^{3,7}

La *aposición* es el estadio en el que las células del trofoectodermo se encuentran en íntimo contacto con el endometrio, pero sin establecer ninguna conexión aún. Esta etapa es inestable.

En la *adhesión* se produce un contacto físico más íntimo entre el embrión y el endometrio y se establecen conexiones suficientemente resistentes. Las microvellosidades de la superficie apical del trofoectodermo se interdigitan con las microprotusiones (pinópodos) del epitelio luminal endometrial.

La *invasión* es la etapa en la que el sincitiotrofoblasto se introduce entre las células endometriales.⁹

El cambio del *status* endócrino durante el ciclo reproductivo y el embarazo da como resultado extensas remodelaciones en el tejido endometrial que hacen que el mismo se transforme en receptivo. Se desconoce el mecanismo exacto por el cual se producen estos cambios, pero se sabe que el estradiol, la progesterona y la gonadotropina coriónica humana (hGC) son fundamentales.

Otro proceso fundamental para la implantación es la decidualización. Se trata de la proliferación de las células del estroma y diferenciación en células más especializadas, las células deciduales, caracterizadas por poliploidia, células más grandes y multinucleadas. Estos cambios ocurren en el sitio donde el blastocisto se va a implantar.

El aumento de la permeabilidad vascular y la angiogénesis también son necesarios para una implantación exitosa, decidualización y placentación. En este delicado proceso intervienen diversos factores angiogénicos, como el Factor de

Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y la Angiopoyetina-1 (Ang-1), cuyo valor y mecanismos serán detallados más adelante.

Otro factor esencial para la implantación es la homeostasis del oxígeno, mediada por factores que inducen hipoxia (HIFs- *hypoxia-inducible factors*).⁷ Estos factores están íntimamente asociados con los eventos vasculares e inducen la expresión del gen VEGF.

Está demostrado que la presencia de un microambiente hipóxico juega un rol importante en la implantación, ya que la ablación del gen inductor de hipoxia (Arnt/HIF1 α) en roedores impide el normal desarrollo de la placenta con la consecuente falla de implantación.¹⁰

Ventana de implantación

La Ventana de Implantación (VI) es un momento trascendente y único.

Para una implantación exitosa se requieren un *endometrio receptivo* y un *blastocisto competente*.

La *receptividad endometrial* se define como el período durante el cual el endometrio se encuentra preparado para que el blastocisto se implante. Se conoce este período como *ventana de implantación* y se presenta entre los días 20 a 24 de un ciclo normal de 28 días.^{2, 3, 11}

Las características de un endometrio receptivo incluyen cambios histológicos. El endometrio se torna más vascularizado y edematoso, las glándulas endometriales presentan actividad secretora, la polaridad de las células cambia, las células epiteliales pierden su perfil tornándose circulares, los microvilli se fusionan dando lugar a la formación de los *pinópodos* (día 19). En el día 20 y 21 los microvilli ya están ausentes. El día 22 los microvilli comienzan a reaparecer (pinópodos en regresión) y el día 23 los pinópodos ya han desaparecido totalmente. Los pinópodos totalmente desarrollados no duran más de 2 días y han sido propuestos como marcadores estructurales de la ventana de implantación en la era *pregenómica*.²

Las hormonas esteroides (estradiol y progesterona) son fundamentales para la formación de un endometrio receptivo.⁷ El rol exacto de los estrógenos en humanos aún no ha sido dilucidado, pero se sabe que su participación en este proceso es fundamental.

En roedores la acción coordinada de estradiol

y progesterona regulando la proliferación y diferenciación de las células endometriales en una manera espacio-temporal determina la ventana de implantación.⁹

Se ha demostrado en humanos que altos niveles de estradiol en ciclos estimulados alteran el endometrio de manera tal que se producen fallas de implantación. Es decir, que se requiere de bajas concentraciones de estradiol para que el endometrio se torne receptivo y altas concentraciones para que se transforme en refractario o no receptivo.^{9,2}

Durante la era *postgenómica* se han llevado a cabo numerosos estudios para determinar el perfil génico del endometrio durante la ventana de implantación. Se han estudiado, mediante tecnología de *microarray*, los diferentes grupos de genes que se expresan en las distintas fases del endometrio a lo largo del ciclo menstrual. Más adelante se detallan los genes que se expresan en el endometrio en más o en menos, durante la ventana de implantación y que suponen un rol en la apertura, cierre y mantenimiento de esta ventana.

En un estudio reciente Franchi y col¹² han dado un paso más allá con la tecnología *microarray*. Han logrado caracterizar no sólo la expresión de los genes, sino además, la localización celular específica de ciertas proteínas y sus respectivos ligandos (*proteomics*) en el momento de la apertura y cierre de la ventana de implantación a través de una técnica llamada microdissección con captura láser.

Era pregenómica

Durante la era pregenómica ciertos factores han sido identificados como potenciales *marcadores de la receptividad endometrial*.

Se han estudiado numerosos marcadores bioquímicos y se ha intentado correlacionarlos con marcadores histológicos, pero es sabido en la actualidad que esto no tiene ningún valor clínico aplicable hasta el momento.

Marcador histológico

Los pinópodos, como se describió anteriormente, aparecen en el endometrio alrededor del día 20 del ciclo menstrual en humanos y han sido propuestos como marcadores que indican la apertura de la "ventana de implantación".⁹ Esta transformación morfológica del epitelio de superficie tiene una vida breve que no excede las 48 horas

en el ciclo humano, presentando un desarrollo completo durante sólo 24 horas. Su aparición está bajo el control estricto de la progesterona.¹³ Se ha descrito una variación de 1 a 3 días en el tiempo de aparición de los pinópodos en el ciclo humano normal.¹⁴ La Terapia Hormonal Sustitutiva (THS) puede inducir incluso una mayor variabilidad inter-individual en la formación de los pinópodos, del día 20 al 24 del tratamiento con progesterona. Cuando la THS se asocia con agonistas del GnRH, esta variación es de solo 3 días.² Durante la estimulación de un ciclo de Fertilización *In Vitro* (FIV), los pinópodos aparecen entre los días 18 y 20, dependiendo de la paciente.¹⁵ Si los pinópodos son marcadores de la receptividad endometrial, el tiempo durante el cual un embrión puede implantarse es muy corto (no más que 48 horas). Y si se considera que ellos sólo marcan cuando se abre la ventana de implantación y se ha comprobado que esto es altamente variable (al menos 3 días) entre una paciente y otra, su utilidad como marcador es dudosa.

Marcadores moleculares

Desde hace décadas los investigadores han enfocado sus estudios en encontrar un marcador específico que pueda identificar fácilmente la clave de la alteración de la receptividad endometrial y proveer así un tratamiento. Pero, ¿qué características debería tener esa molécula o moléculas? Debería estar presente en toda mujer con fertilidad probada durante la ventana de implantación, su medición debería ser relativamente fácil y por métodos no invasivos,^{14, 16} debería poder ser correlacionada con una implantación exitosa, y por último, debería estar ausente en mujeres con fertilidad reducida.¹

Sin embargo, la búsqueda de un marcador de implantación resultaría utópica, ya que es sabido que en la formación de la ventana de implantación están involucrados cientos de ellos.¹⁷ Antes de que este concepto fuera comprendido se realizaron múltiples investigaciones orientadas a descifrar el rol de cada molécula en el proceso de implantación. A continuación se detallarán brevemente algunas moléculas relacionadas con la implantación descritas durante la era pre-genómica como potenciales candidatos a marcadores de la ventana de implantación.

Los marcadores moleculares más estudiados (Tabla 1).

Dentro de las **interleukinas**, la IL-1 fue la primera descrita y es tal vez la más estudiada. El **sistema interleukina-1-receptor** consiste en dos ligandos, **IL-1 α** y **IL-1 β** , y su receptor antagonista, el IL-1Ra. Existen dos tipos de receptores, el receptor Tipo 1 (IL-1RT1), ampliamente distribuido; y el Tipo 2 (IL-1RT2), que se expresa en leucocitos.⁹ Este último no promueve una función conocida al ser activado. En cambio, el IL-1Ra actúa como antagonista completo, previniendo que la IL-1 se una al receptor y se exprese en el epitelio endometrial durante el ciclo menstrual.¹⁸ El IL-1R Tipo I se expresa en el epitelio luminal y glandular del endometrio el día 4 postfertilización, lo que sugiere un rol muy importante durante la fase de adhesión.

Simón y col¹⁹ demostraron que el bloqueo del IL-1R Tipo I en el endometrio materno impide la implantación en roedores interfiriendo en la adhesión del blastocisto. La expresión en menos de la integrina $\alpha v \beta 3$ sería un posible marcador de este efecto.²⁰ Sin embargo, ratones transgénicos con deficiencia de la IL-1 y del receptor IL-1R son fértiles.¹⁵ Una explicación a este hecho podría ser que el fenotipo de este receptor es poco específico.

Entonces, el endometrio humano expresa el receptor IL-1R Tipo I en las células epiteliales endometriales a lo largo de todo el ciclo menstrual con un incremento marcado en la fase secretora, mientras que la expresión de la IL-1 β se encuentra más localizada en el estroma y las células endometriales.²¹ El receptor IL-1R Tipo II también se expresa en el endometrio humano en forma ciclo-dependiente.^{21, 22} La expresión de IL-1 β , IL-1R Tipo I y IL-1RA es regulada en más por la leptina (*up-regulation*), mientras que la IL-1 β incrementaría los niveles del receptor del LIF (factor inhibidor de la leucemia) en las células endometriales.²³ Bigonnesse y col²⁴ sugiere que el IL-1R Tipo I no estaría involucrado en la patogénesis de la infertilidad sin causa aparente.

El **LIF** es miembro de la familia de las citocinas. Actúa uniéndose a su receptor específico, el LIF-R β .^{9, 13}

Los niveles del LIF ascienden en forma marcada en la mitad de la fase secretora del ciclo tanto a nivel del epitelio glandular endometrial como en

el estroma. Además, es un factor importante para la decidualización e implantación.³

Se expresa en las glándulas endometriales el día 4 postfertilización y en las células del estroma cercanas al blastocisto en el momento de la adherencia. Esto indica que el LIF tiene una acción dual: actúa primero en la preparación del útero y más tarde en la fase de adherencia.⁹

Se ha demostrado que el LIF es importante para la implantación en roedores.²⁵ Los roedores con delección del gen del LIF presentaban infertilidad por fallas en la implantación que luego se corregían con la administración de LIF exógeno.^{25, 26}

Estudios en humanos demostraron que el LIF aumenta su expresión en el endometrio humano durante la ventana de implantación.^{27, 28} En mujeres infértiles, la expresión de LIF endometrial demostró ser regulado en menos.^{29, 30} Sin embargo, esto no fue confirmado por estudios más recientes en los que se utilizaron biopsias endometriales de mujeres con infertilidad sin causa aparente.³¹

Tampoco fue demostrado en estudios que utilizaron técnicas de *microarrays* en los que se compararon la expresión de genes en las fases proliferativa y secretora en mujeres sanas y fértiles.^{27, 32, 33}

Otra interleuquina extensamente estudiada en relación a la implantación y receptividad endometrial es la **interleuquina 11 (IL-11)**, la cual pertenece a la familia de la IL-6 y actúa a través de su receptor específico (IL-11R). Se ha demostrado que las ratonas con déficit del receptor 11R α son infértiles debido a defectos en la decidualización.^{34,35} Se requiere del receptor endometrial IL-11R para el normal desarrollo de la decidua en ratones^{36, 37} y en humanos.³⁸⁻⁴⁰ Ha sido documentada una desregulación de la IL-11 y su receptor en mujeres con infertilidad sin causa aparente y en mujeres con endometriosis.⁴¹ Sin embargo, y a pesar de haber sido extensamente estudiada, el rol de esta IL en la implantación no está claro aún.

El *VEGF* (factor de crecimiento del endotelio vascular) es un factor de permeabilidad

Tabla 1. Características de los marcadores moleculares más estudiados.

Marcador	Breve descripción de su rol en la implantación	Referencias
IL-1	Se expresa en el epitelio luminal endometrial y en el blastocisto. Rol importante en la fase de adhesión.	9,15,18-24
LIF	Participa en la fase de adhesión. Favorece el desarrollo del blastocisto preimplantatorio. Participa en el proceso de decidualización.	3,9,13,25-33
IL-11	Participa en la decidualización del endometrio. Desregulación de su receptor en mujeres infértiles.	34-41
VEGF	Dirige la angiogénesis durante la fase de adhesión y decidualización. Junto con la Ang-1 favorece a la maduración, estabilización y permeabilidad de los vasos sanguíneos.	9
Integrinas	Participan en la fase de adhesión. El déficit de la $\alpha 3$ ha sido asociado con infertilidad sin causa aparente.	13,42-45
HOXA-10y11	Participan en la decidualización. El déficit en su expresión demostró una disminución de las tasas de implantación.	46-58
EGF, TGF α , HB-EGF	Rol importante en la diferenciación del epitelio glandular y estroma endometriales. Promueven el crecimiento del blastocisto y desprendimiento de la membrana pelúcida.	62-70
Osteopontina	Aumento de su expresión durante la ventana de implantación. Información limitada sobre su rol.	60-61,84-88.
Leptina	Participa en el desarrollo del blastocisto. Posible molécula marcadora de viabilidad del blastocisto ya se expresa en específicamente ese período embrionario.	71-79

vascular y también un potente factor mitogénico de las células endoteliales y un importante regulador de factores de crecimiento para la vasculogénesis y angiogénesis.⁹ La alteración del gen VEGF en roedores da como resultado muerte fetal intraútero a mitad de la gestación con formación de vasos aberrantes.

Los efectos del VEGF son mediados por dos receptores tirosinquinazas: VEGFR1 y VEGFR2. Su acción y la expresión de sus receptores están reguladas por los estrógenos fundamentalmente y por la progesterona en menor proporción.

El VEGF actúa en las fases iniciales de la implantación. La Angiopoyetina-1 (**Ang1**), otro factor angiogénico, actúa en conjunto con el VEGF, pero más tardíamente. Promueve la maduración, estabilización y permeabilidad de los vasos sanguíneos. La Angiopoyetina-2 (**Ang2**) actúa como antagonista de Ang1, regulando en forma negativa la angiogénesis. El VEGF y las Angiopoyetinas dirigen la angiogénesis durante la fase de adhesión y durante la decidualización.⁹

Entre las moléculas de adhesión, las **integrinas** son las que han sido estudiadas más extensamente en humanos por los cambios ciclo-dependientes que presentan y su rol potencial en la receptividad del endometrio.⁴²

Los miembros de la familia de integrinas sirven como receptores de varios ligandos de la matriz extracelular (ECM) y modulan la adhesión célula-célula y los eventos de señales de transducción. Cada integrina está compuesta por dos subunidades, α y β , y cada combinación $\alpha\beta$ tiene su propia afinidad de unión y propiedades de señalización.¹³

A pesar de que muchas integrinas se expresan en el epitelio luminal del endometrio en forma constitutiva, muchas otras, como los heterodímeros $\alpha1\beta1$, $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha v\beta3$ y $\alpha v\beta1$ presentan cambios ciclo-dependientes. Algunas moléculas se expresan exclusivamente en el epitelio de superficie, mientras que otras están confinadas en las células epiteliales del compartimiento glandular. Se ha observado que su localización en la membrana celular también varía durante el ciclo. De tal manera que, por ejemplo, la integrina $\alpha6\beta1$ se expresa habitualmente a lo largo de la membrana basal y se re-localiza en la región ápico-lateral en el momento de la implantación.⁴² Igualmente, la $\alpha v\beta3$ se re-localiza de la región baso-lateral a la

región apical en el momento en que el endometrio es receptivo.⁴² Así, más que la síntesis de novo, es la distribución a lo largo de la membrana celular la que tiene un significado funcional en la adquisición de la receptividad del endometrio.

De especial interés es la expresión de la integrina $\alpha1\beta1$ que presenta cambios durante el período de implantación: su expresión está confinada a la fase secretora temprana y media tanto en el epitelio como en el estroma y limitada al estroma durante la fase de predecidualización.⁴³ Se ha demostrado, tanto en humanos como en roedores, que esta integrina se expresa en el momento de la implantación tanto a nivel del endometrio como del blastocisto, y que su bloqueo reduce el número de sitios de implantación en roedores.⁴⁴ También se ha registrado en varios estudios una reducción de esta integrina en pacientes con infertilidad inexplicable, en pacientes con endometriosis y con síndrome de ovarios poliquísticos (PCO).^{1,45}

Genes homeóticos: HOXA-10 y 11: Los genes *homeobox* o genes homeóticos están formados por una secuencia de ADN que codifica 61 aminoácidos, que a su vez se organizan en cuatro grupos (A, B, C y D) en los cromosomas.⁹ Los genes *homeobox* se conservan virtualmente idénticos a lo largo de la evolución y actúan como reguladores de la morfogénesis y diferenciación.⁴⁶ Codifican factores de transcripción que activan cascadas genéticas específicas. Los genes HOXA-0 y 11 regulan la organogénesis durante el período embrionario y se expresan en el adulto a nivel del epitelio glandular y del estroma durante el ciclo menstrual con un marcado incremento durante el período de implantación embrionaria.^{46,47}

El bloqueo de HOXA-10 induce un fenotipo Infértil debido a una falla de implantación.^{14, 48, 49} Los homocigotos para el HOXA-10 (-/-) ovulan y producen ovocitos fertilizables, pero los embriones resultantes nunca se implantan. Sin embargo, la implantación de los embriones de roedores HOXA-10 (-/-) sí sucede en un útero subrogado. Se han identificado diversos efectos moleculares en el endometrio de ratones sin HOXA-10. Por ejemplo, la respuesta proliferativa del estroma, secundaria a la acción de los esteroides, es anormal. Se ha observado el mismo fenotipo Infértil en los ratones sin HOXA-11.⁵⁰

En el ser humano ambos se expresan cíclica-

mente en el epitelio de superficie y en las células del estroma.^{47, 51} La expresión es baja en la fase folicular y fase lútea temprana, pero aumenta progresivamente hasta llegar a un máximo en mitad de la fase lútea y se mantiene hasta la menstruación.

HOXA-10 y 11 regulan la expresión de ciertos marcadores de receptividad endometrial y factores de transcripción que a su vez coordinan el desarrollo del endometrio en respuesta a los esteroides sexuales, tanto estradiol como progesterona.^{52, 53}

Se ha demostrado que el HOXA-10 es importante para la deciduización en roedores⁵⁴ y en humanos⁵⁵ y una disminución en su expresión en las células del estroma endometrial fue asociada a una disminución de la receptividad endometrial en mujeres con endometriosis.^{51, 56} A su vez, mujeres con hidrosalpinx y con síndrome de ovario poliquístico, con disminución de las tasas de implantación en ciclos de FIV demostraron una expresión alterada de la transcripción del HOXA-10.^{57, 58} Pese a esta evidencia, la participación de estos genes en la implantación humana es poco convincente. Se necesita de más estudios para conectar fallas de implantación en mujeres infértiles con alteraciones en la expresión de los genes homeóticos HOXA-10 y 11.

La **osteopontina** es una glicoproteína secretada por el epitelio endometrial que alcanza su valor máximo en la mitad de la fase secretora del ciclo y se la ha correlacionado con la formación de los pinópodos;^{59, 60} ambos marcadores están regulados por la progesterona.^{2, 61} La osteopontina es el único gen regulado más en los cinco trabajos de *microarray* que se detallarán más adelante,⁸⁴⁻⁸⁸ en los que se compara el endometrio en las fases secretora temprana y tardía de mujeres fértiles, por lo que su participación en el desarrollo de un endometrio receptivo está fuertemente demostrada. Sin embargo, la información sobre el rol de este marcador en mujeres infértiles es limitada.

La familia del factor de crecimiento epidérmico incluye al factor de crecimiento epidérmico en sí mismo (**EGF**), al factor transformador del crecimiento α (**TGF- α**) y al factor de crecimiento epidérmico fijador de heparina (**HB-EGF**), los cuales actúan a través de los receptores HER1 y HER4.⁶² Esta familia de factores juega un rol importante en el crecimiento y diferenciación del epitelio glandular y estroma endometriales, favorece el desarrollo

embrionario y participa en la reacción de adhesión del proceso de implantación. La mutación de los genes que codifica el EGF o el TGF- α en ratones no produce alteraciones en la implantación, probablemente por la compensación de la presencia de otro de los factores de la misma familia. Sin embargo, la delección del gen que codifica al receptor del EGF (EGFR) trae como consecuencia fallas de implantación.^{62, 63}

El **HB-EGF** es responsable de unos de los primeros cambios en el endometrio materno para el proceso de implantación: el aumento de la permeabilidad de los capilares próximos al blastocisto que está implantándose. Su máxima secreción por parte de las células del estroma coincide con la aparición de los pinópodos⁶⁴ y es capaz de regular en más otras proteínas que participan activamente en el proceso de implantación, como el LIF, HOXA-10 e integrina $\beta 3$.⁶⁵

El blastocisto, a su vez, contiene receptores de factores de crecimiento epidérmico que identifican al HB-EGF y promueven el crecimiento y desprendimiento de la zona pelúcida. Este es el marcador que más temprano se ha encontrado en forma exclusiva en el sitio del blastocisto activo, apareciendo horas antes de la fase de adhesión en roedores.

Sin embargo, ratones con defectos en la expresión del EGF y del TGF α no mostraron defectos en la implantación. Se sugiere que esto se debe a que todos los factores de crecimiento se superponen en su patrón de expresión en el momento de la implantación del blastocisto, por lo que existiría un mecanismo compensatorio ante la ausencia de uno de los miembros de la familia EGF.⁶⁶

Se ha demostrado también que los ratones con mutaciones a nivel de HB-EGF presentan muerte neonatal temprana debido a defectos cardíacos.^{63, 66, 67}

Posee además una acción protectora contra la hipoxia y consecuente creación de radicales libres tóxicos que producen isquemia y daño celular, tanto *in vitro* como *in vivo*,⁶⁸ y además, promueve la expresión en menos de los genes que favorecen la apoptosis.⁶⁹

Su expresión es máxima en la fase secretora tardía (día 20-24 del ciclo), momento de receptividad endometrial. Además, el HB-EGF ha demostrado ser el factor de crecimiento más potente para incrementar el desarrollo embrionario y consecuente pérdida de la zona pelúcida en fertilización humana *in vitro*.⁷⁰

La **leptina** es un polipéptido involucrado en la regulación del peso corporal y en la función reproductiva, actuando tanto en forma endocrina como paracrina a través de su receptor OB-R.⁷¹ Existen al menos cuatro isoformas del receptor de la leptina en humanos, las que varían de acuerdo a la longitud del dominio intracelular: las formas cortas (OB-RT) y las formas largas (OB-RL).⁷² El receptor OB-R se localiza en el epitelio luminal y glandular endometrial. Se conoce que este receptor presenta una variación cíclica con un aumento mínimo de su expresión durante la fase lútea temprana y un pico durante la fase lútea tardía.^{72, 73}

Al OB-RT se lo ha identificado en todas las formas preimplantatorias del embrión, mientras que la leptina sólo está presente cuando el embrión alcanza el estadio de blastocisto, lo que sugiere que es una molécula marcadora de viabilidad del mismo.⁷⁴

Los ratones con delección de los genes de la leptina y su receptor son infértiles y su fertilidad se ve restaurada al administrar leptina en forma exógena.⁷⁵

Se ha demostrado en cultivos de células endometriales y en líneas celulares que la leptina incrementa los valores del LIF y de su receptor.⁷⁶

Ciertos estudios describen el impacto de la leptina en mujeres infértiles. Se ha reportado un incremento significativo de los niveles de leptina en suero de mujeres con infertilidad de causa inexplicable en comparación con mujeres fértiles como controles.⁷⁷ Otro estudio demostró una asociación entre altas concentraciones de leptina en el líquido folicular y una mayor tasa de fertilización con técnicas de alta complejidad en pacientes normogonadotróficas.⁷⁸ Sin embargo, Cervero y col demostraron en líneas celulares de endometrio humano que el aumento de la leptina no modifica la tasa de adhesión embrionaria.⁷⁹

Referencias

1. Hoozemans DA, Schats R, Lambalk CB, Homburg R, Hompes PG. Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reprod Biomed Online* 2004; 9: 692-715.
2. Mirkin S, Nikas G, Hsiu J, Díaz J, Oehninger S. Gene Expression Profiles and Structural/Functional Features of the Peri-Implantation Endometrium in Natural and Gonadotropin-Stimulated Cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5742-5752.
3. Norwitz E, Schust D, Fisher S. Implantation and the Survival of Early Pregnancy *New England Journal of Medicine* 2001; 345:1400-1408.
4. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1950;1:3-25.
5. Giudice LC. Elucidating endometrial function in the post-genomic era. *Hum Reprod Update* 2003;9:223-235.
6. Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, et al. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* 2006; 147:1097-1121.
7. Ponnampalam AP, Weston GC, Trajstman AC, Susil B, Rogers PA. Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling. *Mol Hum Reprod* 2004; 10:879-893.
8. Aghajanova L, Hamilton A, Giudice L. Uterine receptivity to human embryonic implantation: Histology, biomarkers, and transcriptomics. *Semin Cell Dev Biol* 2007.
9. Dey S, Lim H, Das S, Reese J, Paria B, Daikoku T, Wang H. Molecular Cues to Implantation. *Endocrine Reviews* 2004;25:341-373.
10. Aplin JD, Kimber SJ. Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:48.
11. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *New Engl J Med* 1999;340:1796-1799.
12. Franchi A, Zaret J, Zhang X, Bocca S, Oehninger S. Expression of immunomodulatory genes and their ligands/receptors during the window of implantation in human endometrium. *Mol Hum Reprod* (Advance Access published June 4, 2008).
13. Sharkey A. Cytokines and implantation. *Reviews of Reproduction* 1998;3:52-61.
14. Navarro J, Rosenwaks Z, Levy D, Remohí J, Prado N. Human endometrium receptivity: from basic science to clinic. *Rev Iberoam Fertil* 2002;(19)6:375-384.
15. Devlioglu OH, Hsiu J-G, Nikas G, Toner J, Oehninger S, Howard W, Jones J. Endometrial estrogen and progesterone receptor and pinopode expression in stimulated cycles of oocyte donors. *Fertil Steril* 1999; 71:1040-1047.
16. Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet* 2006;7:185-199.
17. Aghajanova L, Hamilton AE, Giudice LC. Uterine receptivity to human embryonic implantation: Histology, biomarkers, and transcriptomics. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19:204-211.
18. Dower SK, Call SM, Gillis S, Urdal DL. Similarity between the interleukin 1 receptors on a murine T-lymphoma cell line and on a murine fibroblast cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:1060-1064.
19. Simon C, Frances A, Piquette GN, et al. Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinology* 1994;134:521-528.

20. Simon C, Moreno C, Remohi J, Pellicer A. Molecular interactions between embryo and uterus in the adhesion phase of human implantation. *Hum Reprod* 1998;13:219-232.
21. Simon C, Piquette GN, Frances A, Polan ML. Localization of interleukin-1 type I receptor and interleukin-1 beta in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:549-555.
22. Simon C, Frances A, Lee BY, et al. Immunohistochemical localization, identification and regulation of the interleukin-1 receptor antagonist in the human endometrium. *Hum Reprod* 1995;10:2472-2477.
23. Boucher A, Kharfi A, Al-Akoun M, Bossu P, Akoun A. Cycle-dependent expression of interleukin-1 receptor type II in the human endometrium. *Biol Reprod* 2001;65:890-898.
24. Bigonnesse F, Labelle Y, Akoun A. Triphasic expression of interleukin-1 receptor type I in human endometrium throughout the menstrual cycle of fertile women and women with unexplained infertility. *Fertil Steril* 2001;75:79-87.
25. Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ. p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature* 2007; 450:721-724.
26. Borthwick JM, Charnock-Jones DS, Tom BD, Hull ML, Teirney R, Phillips SC, Smith SK. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2003;9:19-33.
27. Arici A, Engin O, Attar E, Olive DL. Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:1908-1915.
28. Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, et al. Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta. *Biol Reprod* 1994;50:882-887.
29. Mikolajczyk M, Skrzypczak J, Szymanowski K, Wirstlein P. The assessment of LIF in uterine flushing--a possible new diagnostic tool in states of impaired fertility. *Reprod Biol* 2003;3:259-270.
30. Aghajanova L. Leukemia inhibitory factor and human embryo implantation. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1034:176-183.
31. Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ. p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature* 2007; 450:721-724.
32. Mikolajczyk M, Skrzypczak J, Szymanowski K, Wirstlein P. The assessment of LIF in uterine flushing--a possible new diagnostic tool in states of impaired fertility. *Reprod Biol* 2003;3:259-270.
33. Dimitriadis E, Sharkey AM, Tan YL, Salamonsen LA, Sherwin JR. Immunolocalisation of phosphorylated STAT3, interleukin 11 and leukaemia inhibitory factor in endometrium of women with unexplained infertility during the implantation window. *Reprod Biol Endocrinol* 2007;5:40-44.
34. Robb L, Li R, Hartley L, Nandurkar HH, Koentgen F, Begley CG. Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to a defective uterine response to implantation. *Nat Med* 1998;4:303-308.
35. Bischof P, Aplin JD, Bentin-Ley U, et al. Implantation of the human embryo: research lines and models. From the implantation research network 'Fruitful'. *Gynecol Obstet Invest* 2006;62:206-216.
36. Dimitriadis E, Salamonsen LA, Robb L. Expression of interleukin-11 during the human menstrual cycle: coincidence with stromal cell decidualization and relationship to leukaemia inhibitory factor and prolactin. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:907-914.
37. Cork BA, Li TC, Warren MA, Laird SM. Interleukin-11 (IL-11) in human endometrium: expression throughout the menstrual cycle and the effects of cytokines on endometrial IL-11 production in vitro. *J Reprod Immunol* 2001;50: 3-17.
38. Dimitriadis E, Robb L, Salamonsen LA. Interleukin 11 advances progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2002;8:636-643.
39. Tanaka T, Sakamoto T, Miyama M, Ogita S, Umesaki N. Interleukin-11 enhances cell survival of decidualized normal human endometrial stromal cells. *Gynecol Endocrinol* 2001;15:272-278.
40. Karpovich N, Klemmt P, Hwang JH, et al. The production of interleukin-11 and decidualization are compromised in endometrial stromal cells derived from patients with infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1607-1612.
41. Dimitriadis E, Stoikos C, Stafford-Bell M, et al. Interleukin-11, IL-11 receptor alpha and leukemia inhibitory factor are dysregulated in endometrium of infertile women with endometriosis during the implantation window. *J Reprod Immunol* 2006;69:53-64.
42. Farrell R, Gray D, Gindlesperger V, Arredondo F, Liu J, Loret de Mola JR. Treatment of avb3 integrin abnormalities increases pregnancy success rates after failed IVF cycles. *Fertility and Sterility* 2003;80:58-59.
43. Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, Buck CA. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest* 1992; 90:188-195.
44. Illera MJ, Cullinan E, Gui Y, Yuan L, Beyler SA, Lessey BA. Blockade of the alpha(v)beta(3) integrin adversely affects implantation in the mouse. *Biol Reprod* 2000; 62:1285-1290.
45. Lessey BA, Castelbaum AJ. Integrins and implantation in the human. *Rev Endocr Metab Disord* 2002;3:107-117.
46. Taylor HS. The role of HOX genes in the development and function of the female reproductive tract. *Semin Reprod Med* 2000;18:81-89.
47. Eun Kwon H, Taylor HS. The role of HOX genes in human implantation. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1034:1-18.

48. Satokata I, Benson G, Maas R. Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice. *Nature* 1995;374:460-463.
49. Benson GV, Lim H, Paria BC, Satokata I, Dey SK, Maas RL. Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development* 1996;122:2687-2696.
50. Gendron RL, Paradis H, Hsieh-Li HM, Lee DW, Potter SS, Markoff E. Abnormal uterine stromal and glandular function associated with maternal reproductive defects in Hoxa-11 null mice. *Biol Reprod* 1997;56:1097-1105.
51. Vitiello D, Kodaman PH, Taylor HS. HOX genes in implantation. *Semin Reprod Med* 2007;25:431-436.
52. Troy PJ, Daftary GS, Bagot CN, Taylor HS. Transcriptional repression of peri-implantation EMX2 expression in mammalian reproduction by HOXA10. *Mol Cell Biol* 2003;23:1-13.
53. Yao MW, Lim H, Schust DJ, et al. Gene expression profiling reveals progesterone-mediated cell cycle and immunoregulatory roles of Hoxa-10 in the preimplantation uterus. *Mol Endocrinol* 2003;17:610-627.
54. Lim H, Ma L, Ma WG, Maas RL, Dey SK. Hoxa-10 regulates uterine stromal cell responsiveness to progesterone during implantation and decidualization in the mouse. *Mol Endocrinol* 1999;13:1005-1017.
55. Kim JJ, Taylor HS, Lu Z, Ladhani O, Hastings JM, Jackson KS, Wu Y, Guo SW, Fazleabas AT. Altered expression of HOXA10 in endometriosis: potential role in decidualization. *Mol Hum Reprod* 2007; 13: 323-332.
56. Taylor HS, Bagot C, Kardana A, Olive D, Arici A. HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod* 1999; 14:1328-1331.
57. Daftary GS, Taylor HS. Hydrosalpinx fluid diminishes endometrial cell HOXA10 expression. *Fertil Steril* 2002;78:577-580.
58. Cermik D, Selam B, Taylor HS. Regulation of HOXA-10 expression by testosterone in vitro and in the endometrium of patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:238-243.
59. Kao LC, Germeyer A, Tulac S, et al. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* 2003; 144:2870-2881.
60. Aplin JD. Embryo implantation: the molecular mechanism remains elusive. *Reproductive BioMedicine Online* 2006;13:833-839 (www.rbmonline.com/Article/2454).
61. Lessey BA, Castelbaum AJ. Integrins and implantation in the human. *Rev Endocr Metab Disord* 2002; 3:107-117.
62. Paria BC, Elenius K, Klagsbrun M, Dey SK. Heparin-binding EGF-like growth factor interacts with mouse blastocysts independently of ErbB1: a possible role for heparan sulfate proteoglycans and ErbB4 in blastocyst implantation. *Development* 1999;126:1997-2005.
63. Xie H, Wang H, Tranguch S, et al. Maternal heparin-binding-EGF deficiency limits pregnancy success in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:18315-18320.
64. Stavreus-Evers A, Aghajanova L, Brismar H, Eriksson H, Landgren BM, Hovatta O. Co-existence of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and pinopodes in human endometrium at the time of implantation. *Mol Hum Reprod* 2002; 8:765-769.
65. Lessey BA, Gui Y, Apparao KB, Young SL, Mulholland J. Regulated expression of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) in the human endometrium: a potential paracrine role during implantation. *Mol Reprod Dev* 2002; 62:446-455.
66. Iwamoto R, Yamazaki S, Asakura M, Takashima S, Hasuwa H, Miyado K, Adachi S, Kitakaze M, Hashimoto K, Raab G, Nanba D, Higashiyama S, Hori M, Klagsbrun M, Mekada E. Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:3221-3226.
67. Jackson LF, Qiu TH, Sunnarborg SW. Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling. *Embo J* 2003;22:2704-2716.
68. Kuhn MA, Xia G, Mehta VB, Glenn S, Michalsky MP, Besner GE. Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) decreases oxygen free radical production in vitro and in vivo. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:639-646.
69. Michalsky MP, Kuhn A, Mehta V, Besner GE. Heparin-binding EGF-like growth factor decreases apoptosis in intestinal epithelial cells in vitro. *J Pediatr Surg* 2001;36:1130-1135.
70. Chobotovaa K, Spyropouloua I, Carvera J, Maneka S, Heathb J, Gullickc W, Barlowa D, Sargenta I, Mardona H. Heparin-Binding Epidermal Growth Factor and its receptor ErbB4 mediate implantation of the human blastocyst. *Mech Dev* 2002;119: 137-144.
71. Bluher S, Mantzoros CS. Leptin in reproduction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2007; 14:458-464.
72. Cervero A, Horcajadas JA, Martin J, Pellicer A, Simon C. The leptin system during human endometrial receptivity and preimplantation development. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2442-2451.
73. Gonzalez RR, Caballero-Campo P, Jasper M, et al. Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4883-4888.
74. Cervero A, Horcajadas J, Domínguez F, Pellicer A, Simón C. Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;10:217-223.

75. Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 1996;12:318-320.
76. Gonzalez RR, Rueda BR, Ramos MP, Littell RD, Glasser S, Leavis PC. Leptin induced increase in leukemia inhibitory factor and its receptor by human endometrium is partially mediated by interleukin 1 receptor signaling. *Endocrinology* 2004;145:3850-3857.
77. Demir B, Guven S, Guven ES, Atamer Y, Gunalp GS, Gul T. Serum leptin level in women with unexplained infertility. *J Reprod Immunol* 2007;75:145-149.
78. De Placido G, Alviggi C, Clarizia R, et al. Intra-follicular leptin concentration as a predictive factor for in vitro oocyte fertilization in assisted reproductive techniques. *J Endocrinol Invest* 2006;29:719-726.
79. Cervero A, Dominguez F, Horcujadas JA, Quinonero A, Pellicer A, Simon C. Embryonic adhesion is not affected by endometrial leptin receptor gene silencing. *Fertil Steril* 2007;88:1086-1092.
80. Horcujadas JA, Riesewijk A, Dominguez F, Cervero A, Pellicer A, Simon C. Determinants of endometrial receptivity. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1034:166-175.
81. The human genome: Genome Map. *Science* 2001;291:1304-1351.
82. Horcujadas JA, Pellicer A, Simon C. Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. *Hum Reprod Update* 2007; 13:77-86.
83. White C, Salamonsen L. A guide to issues in microarray analysis: application to endometrial biology. *Reproduction* 2005;130:1-13.
84. Carson DD, Lagow E, Thathiah A, Al-Shami R, Farach-Carson MC, Vernon M, et al. Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Mol Hum Reprod* 2002;8:871-879.
85. Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 2002;143:2119-2138.