

Biología de la Reproducción

TGF- β 1 regula in vitro a la mucina endometrial humana MUC1 durante la implantación embrionaria

TGF- β 1 regulate in vitro to human endometrial mucin MUC1 during embryo implantation

Meseguer M1,2, Martínez-Conejero JA 1,2, Aplin JD 3 Remohí J1,2 , Pellicer A1,2 , Simón C1,2*

1 Fundación Instituto Valenciano de Infertilidad, 2 Departamento de Obstetricia y Ginecología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, España, 3 Facultad de Medicina y Ciencias Biológicas, Universidad de Manchester, UK.

Resumen

La proteína MUC1 es una mucina transmembrana muy grande que está presente en la superficie de las células del epitelio luminal endometrial humano durante la fase de implantación. MUC1 es capaz de inhibir la adhesión célula-célula, debido a su habilidad para impedir estéricamente las interacciones ligando-receptor en la superficie celular. Recientes estudios usando un modelo de implantación humana han sugerido que la regulación local a la baja de la MUC1 ocurre en el sitio unión del embrión (1), pero el mecanismo por el que ocurre es desconocido. El TGF- β 1 es conocido por estar presente en la interfase materno fetal en el momento de la implantación, así pues nosotros hemos investigado su efecto sobre la expresión del ARNm de MUC1 y sus isoformas proteicas en células endometriales HEC1B en un modelo in vitro. La hibridación in situ y la inmunofluorescencia con o sin permeabilización celular, indicaron que la isoforma transmembrana de MUC1 está presente en la superficie apical y es heterogéneamente expresada en la población celular. La inmunolocalización de la proteína sugiere que se asocia con microvellosidades en la membrana plasmática apical. La variante no transmembrana, MUC1/SEC está además asociada con la superficie apical celular. El tratamiento con TGF- β 1 (0.5-4.0ng/mL) estimuló de forma dependiente de dosis el descenso de ambas isoformas. Los datos sugieren que TGF- β 1 podría actuar localmente reduciendo la exposición apical de MUC1 en células epiteliales maternas, contribuyendo a la producción de un epitelio materno receptivo.

Palabras clave: Línea celular HEC1B. MUC1. Receptividad. Implantación. TGF- β 1.

* **Correspondencia:** Dr. Carlos Simón M.D.,
C/ Guadassuar 1,
46015 Valencia, España.
e-Mail: csimon@interbook.net

Summary

MUC1 is a large transmembrane mucin present at the surface of human endometrial luminal epithelial cells during the implantation phase. MUC1 is capable of inhibiting cell-cell adhesion, due to its ability to hinder sterically ligand-receptor interactions at the cell surface. Recent studies using an in vitro model of human implantation have suggested that local down-regulation of MUC1 occurs at the site of attachment of the embryo (1), but the mechanism by which this occurs is unknown. TGF- β 1 is known to be present at the maternofetal interface at the time of implantation, so we have investigated its effect on expression of MUC1 mRNA and protein isoforms in HEC1B endometrial cells as an in vitro model. In situ hybridisation and indirect immunofluorescence with or without cell permeabilisation indicated that the transmembrane isoform of MUC1 is present at the apical cell surface and is heterogeneously expressed in the cell population. Protein immunolocalization suggests that it is associated with microvilli in the apical plasma membrane. The non-transmembrane splice variant MUC1/SEC is also associated with the apical cell surface. TGF- β 1 (0.5-4.0ng/ml) treatment stimulated a dose-dependent decrease of expression of both isoforms. The data suggest that TGF- β 1 may act locally to decrease the apical display of MUC1 in maternal epithelial cells, thus contributing to the production of a receptive maternal epithelium.

Key words: Celular line HECAB. MUCA. Receptivity. Implantation. TGF- β 1

INTRODUCCIÓN

El estado receptivo del endometrio es un balance entre la activación de moléculas de adhesión y la presencia de una barrera natural, el glicocalix epitelial. Se sabe que la implantación es controlada por hormonas esteroideas maternas, pero además es influenciada por señales paracrinas embrionarias (2, 3). Las mucinas son una familia de glicoproteínas altamente glicosiladas y de alto peso molecular (>250 kDa) presentes en las superficies apicales de los epitelios incluyendo las células epiteliales del endometrio humano (4, 5, 6). Un miembro de esta familia es la MUC1 que es una glicoproteína integral de membrana con un gran dominio extracelular con un número variable (aproximadamente 25-120) de repeticiones en tándem de 20 aminoácidos dando como resultado una estructura muy extendida que es inmunogénica y fuertemente glicosilada (7, 8). La MUC1 contiene un dominio transmembrana y un corto tallo citoplasmático (56 residuos) que puede ser fosforilado. Hay otras 2 isoformas: una que carece de dominios transmembrana y citoplasmático y que puede ser originado por corte proteolítico en el dominio extracelular cerca de la membrana (9) o por splicing alternativo (MUC1/SEC) (10), y la MUC1/Y que es una pequeña isoforma transmembrana (producto del splicing alternativo) que carece del dominio de repeticiones en tándem (11). MUC1/SEC une e interactúa específicamente con el dominio extracelular de MUC1/Y. La interacción de MUC1/SEC con MUC1/Y da como re-

sultado la fosforilación de MUC1/Y y cambios asociados en la morfología celular (11).

Cuando se expresa a niveles altos en la superficie celular, MUC1 tiene la habilidad de inhibir la adhesión célula-célula. Esta propiedad depende de la extensión del ectodominio y es probablemente el resultado de obstaculizar estéricamente las interacciones ligandos-receptor mediadas por familias de receptores de adhesión como las cadherinas (5, 12). Sin embargo, las repeticiones en tándem de MUC1 han sido descritas con capacidad de unir ICAM-1, y esta interacción puede mediar adhesiones célula-célula (13). Además, MUC1 puede llevar ácido de LewisX así como el siálico en las células endometriales (14), y hay evidencia de expresión de selectinas por embriones (15), sugiriendo la posibilidad de que una interacción selectina-MUC1 podría mediar en la reacción de aproximación inicial. De este modo, heterogeneidades intrínsecas en la glicosilación de la MUC1 podrían permitir el establecimiento de un sitio localmente receptivo en el endometrio en un contexto en el que la inhibición de la adhesión es dominante.

En ratón, rata, cerdo y en menor grado en mandriles, MUC1 es regulado a la baja en el endometrio receptivo antes de la implantación cuando los niveles de progesterona son altos. En cada una de estas especies ha sido argumentado que la MUC1 inhibe la implantación y que su regulación a la baja contribuye a la adquisición de receptividad maternal (16, 17, 18, 19). De hecho, en el ratón, hay evidencias experimen-

tales que sugieren que la MUC1 evita la adhesión del embrión a las células epiteliales endometriales (20).

En conejos, una reducción llamativa de MUC1 está inducida de forma local por el blastocisto de conejo en el epitelio luminal apical específicamente en el sitio de implantación (21). Una vez más los datos apoyan la noción de una actividad inhibitoria que se levanta para que ocurra la implantación.

En humanos, la progesterona combinada con estradiol induce una regulación al alza de MUC1 en el endometrio receptivo (1). Durante las etapas de división embrionarias, evidencias *in vitro* sugieren que la presencia de un embrión humano incrementa a la MUC1 en el epitelio materno. Sin embargo, en la fase de adhesión se observa una pérdida local de la MUC1 en el epitelio materno en el sitio de contacto. Estos descubrimientos sugieren fuertemente que la MUC1 podría actuar como una barrera para el contacto intercelular directo, la pérdida ocurriría como resultado de un estímulo embrionario (1).

Durante el ciclo menstrual y en el embarazo, el endometrio uterino experimenta rápida y progresivamente una modificación morfológica y funcional. La expresión de TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 así como el receptor tipo II ocurre en varios tipos celulares en el endometrio (22, 23) así como en el embrión en pre-implantación (24). Los miembros de la familia de polipéptidos del factor beta de crecimiento transformante (TGF- β) (25) pueden regular acontecimientos fisiológicos diversos tales como proliferación y diferenciación, angiogénesis, funciones inmunes, esteroidogénesis, remodelación y reparación tisular. Dentro de la región funcional del endometrio, la expresión es la más grande en las células epiteliales lumbales y glandulares durante la fase proliferativa tardía (días 9-14), y en las fases secretoras temprana y media (día 19-25) y está disminuida en la fase secretoria tardía (días 26-28). Dichas TGF- β s pueden actuar regulando la función endometrial (23), y pueden jugar un papel en la implantación. Además, la TGF- β tiene la habilidad de regular a la baja a otros complejos de mucinas como sialomucina/MUC4 en rata y por consiguiente este proceso podría ser además posible en humanos (26).

El objetivo del presente estudio fue testar si la MUC1 endometrial podría ser regulada por TGF- β 1. Un ELISA celular fue utilizado para cuantificar las proteínas de membrana, y la RT-PCR semi-cuantitativa y la hibridación *in situ* fueron usados para evaluar la expresión de mRNA en células HEC-1B, que es una línea celular de carcinoma endometrial bien diferenciada en la que ha sido previamente demostrada la expresión de MUC1 (27).

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos celulares de HEC1B

La línea celular HEC1B de carcinoma endometrial fue mantenida en medio Eagles MEM suplementada con solución salina balanceada de Earle, suero bovino fetal al 10% y piruvato sódico 1mM (GibcoBRL). Además el medio fue completado con glutamina (2mM) (ICN, Thame, Oxon, UK) y antibióticos: estreptomycin 100 (g/mL (Evans Medical Ltd., Horsham, UK) y gentamicina 5 (g/mL (David Bull Laboratories, Warwick, UK). Las células fueron crecidas en monocapa con 95% de aire, 5% CO₂ (v/v). Para la inmunofluorescencia y la hibridación *in situ*, las células fueron crecidas en placas de plástico de 12 pocillos y en placas de 96 pocillos para ELISA (Corning, NY, USA). Para la RT-PCR fueron crecidas en frascos de 75 cm² (Costar UK Ltd., High Wycombe, Bucks, UK). Las células fueron tratadas con diferentes dosis de TGF- β 1 hasta 72 horas. Para los estudios de ELISA, las células fueron tratadas o no con 0.1, 0.5, 1, 2 y 4 ng/ μ L de TGF- β 1 diluido en medio de cultivo. Para los estudios de RT-PCR las células fueron tratadas o no con 1 or 4 ng/L.

Antibióticos

El anticuerpo monoclonal, ratón anti-MUC1 humana, HMFG-1 (IgG; 28) y el policlonal, conejo anti-MUC1 humana, CT-1 (29) fueron proporcionados amablemente por el Dr. Joy Burchell (Imperial Cancer Research Foundation, London). El anticuerpo monoclonal, ratón anti-MUC1 humana, BC-2 (IgG) fue obtenido de Serotec (Oxford, UK) y el BC-3 (IgM) fue comprado de Medical Innovations Ltd. (Queensland, Australia). El monoclonal 232A1 (IgG) fue facilitado por el Dr. J. Hilkens, (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam). HMFG-1, BC-2 y BC-3 reconocen una secuencia peptídica similar en la región extracelular de las repeticiones en tándem de MUC1 (30). Aunque estos anticuerpos son dirigidos contra el núcleo de la proteína, los glicanos unidos pueden disminuir la accesibilidad del epítipo (31, 32). La unión de BC-2 y especialmente de BC-3 es inhibida en menor grado por el grado de glicosilación, al contrario que HMFG-1 (33, 34). El monoclonal 232A1 es dirigido contra una única secuencia peptídica de MUC1 en el dominio extracelular próximo a la membrana (35). El anticuerpo monoclonal, ratón anti-isoforma MUC1 secretada humana (MUC1/SEC), 7H8/2 fue proporcionado por el Dr. D.H. Wreschner, Tel Aviv University, Israel.

Inmunocitoquímica

Para la inmunofluorescencia, las células HEC1B fueron lavadas en PBS y fijadas en formaldehído al 4% durante 30 min. a 4°C. Las uniones inespecíficas del anticuerpo fueron bloqueadas por incubación de 20 min. en Protein Block (Dako, High Wycombe, UK). La inmunofluorescencia fue realizada usando BC-2 (1:100 en PBS), antisuero policlonal CT-1 (1:50) (con este Ac las muestras fueron pretratadas con Tritón X-100 en PBS 10 min. a 4°C) y el monoclonal 232A1 (sin diluir). La incubación de estos anticuerpos primarios fue toda la noche a 4°C. La detección del Ac primario fue realizada usando una doble amplificación con conejo anti-ratón biotinilado (IgG) y cerdo anti-conejo F(ab') (para CT-1) a una dilución 1:100 en PBS y extravidina conjugada a isotiocianato de fluoresceína (Dako, High Wycombe, UK; 1:75 en PBS) con una incubación de 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Los cubres fueron montados con medio de montaje Dako acuoso y visto al microscopio de fluorescencia.

ELISA de células cultivadas HEC 1B

Para este apartado fueron cultivadas tres placas de 96 pocillos. La densidad celular fue medida en una de las placas con un ensayo colorimétrico de viabilidad celular. Las células fueron fijadas con formalina tamponada en fosfato al 4% (4°C), lavada 3 veces con PBS y se le añadió cristal violeta (0,02% (w/v) en 1% (w/v) de paraformaldehído) (100 (L/pocillo, RT, 30 min.). Después de lavar 5 veces con agua destilada, se le puso cloruro de guanidinio 2M (100 (L/pocillo). La placa fue removida en un agitador rotatorio durante 10 min. y se leyó la absorbancia a 630 nm.

La inmunocitoquímica fue revelada usando como anticuerpos primarios el BC-2 (1/2000), CT-1 (1/50), 232A1 (1/5) y HMFG-1 (1/2) contra MUC1 y 7H8/2 (1/2) contra MUC1/SEC. A las células fijadas, se les puso solución de bloqueo (5% leche en polvo en PBS-T; 150 (L/pocillo, 1h, RT) seguido por un lavado con PBS-T. Los anticuerpos primarios fueron añadidos (diluidos en PBS-T; 50 (L/pocillo; 3h, RT). Los lavados con PBS-T (3X) fueron realizados en un agitador rotatorio y después la incubación con el anticuerpo secundario (anti-conejo y anti-ratón conjugados con peroxidasa de rábano de Jackson 1/500; 50 (L/pocillo; 1h, RT). Se lavó tres veces la placa con PBS-T y una vez en tampón citrato-fosfato. Finalmente se le añadió la solución de trabajo ABTS (2,2-azino-di-(3-etilbenziltiazolin)-sulfonato 20 mM, tampón citrato-fosfato 110 mg/10 mL) (100 (L/poci-

llo) y se incubó de 30-45 min. El producto de la reacción fue medido por absorbancia a 405 nm en un lector de placas (Bio-Tek Instruments) después de desarrollar el color durante 20 min. Los controles negativos fueron aquellos en los que se omitieron los anticuerpos primarios por PBS.

Producción de sondas

La sonda pMUC7 de cDNA de MUC1 fue proporcionada por el Dr. J. Burchell (ICRF, UK; 7). Corresponde a 7 repeticiones en tándem de 60 pb que están presentes en la región VNTR del exón 2 en el mRNA de MUC1. El plásmido BluescriptSK (2.96 Kb) conteniendo 450 pares de bases (pb) de la secuencia de cDNA de MUC1 humana cortada con EcoRI (7) fue amplificada por E. coli DH5(transformada con el plásmido. El plásmido fue aislado con el kit Qiagen plasmid mega (Izasa, Madrid, Spain), después fue digerido con EcoRI, separado por electroforesis y la banda de 450 pb fue aislada con el kit de elución Pharmacia (Amersham, Barcelona, Spain). Un plásmido con un fragmento complementario a una secuencia de la β -actina humana también fue amplificado, aislado y marcado de la misma forma. 1 (g de cDNA (clon 7 y β -actina) fue utilizado para marcarlo y para ello se utilizó el kit DIG-High Prime Labelling (Boehringer-Manheim, UK) siguiendo las instrucciones.

Hibridación in situ de MUC1 sobre células HEC 1B

Las células HEC1B fueron fijadas con paraformaldehído al 4% (w/v) a 4 °C durante 16 h (toda la noche). Después lavamos con H₂O libre de RNAsa y se trataron con HCl 0.2M (20 min. temperatura ambiente), otro lavado de 5 min. en PBS-libre de RNAsas e incubación con proteinasa K (2,5 ug/mL, 30 min., 37°C). Las células fueron acetiladas a través de un tratamiento con anhídrido acético 30 mM (5min, RT) y lavadas 2 veces en PBS y uno con H₂O (-RNAsa). La prehibridación fue desarrollada en Denhardt's 1X, dextrano sulfato 10%, formamida 50%, 2mg BSA, 0.1 mg/mL fish sperm DNA en SSC 2X (1h, 37 °C). La sonda marcada ((230 ng) fue añadida a cada pocillo e incubada toda la noche a 42°C. Después las células fueron lavadas 3 veces en formamida 50%, SSC 2X (42°C, 30 min.) seguido de uno en formamida 50%, SSC 1X (42°C, 30 min.). Finalmente las células fueron aclaradas en Tritón X-100 0,1% en TBS (15 min. temperatura ambiente). La detección se hizo usando fosfatasa alcalina conjugada a un anticuerpo de oveja anti-DIG (Boehringer-

Manheim; 1/500, 3h, temp. amb.) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/NBT (nitroblue tetrazolium)) como sustrato (6h, RT).

RT-PCR

El RNA total fue extraído de las células HEC1B tratadas durante 72 horas con 0,1 (g/mL o 4 (g/mL de TGF- β 1. El RNA de endometrio secretor (alta expresión de MUC1) y de tejido adenoidal (baja expresión de MUC1) fueron usados como controles. La transcripción reversa fue realizada usando el kit Advantage RT-for-PCR (Clontech, Palo Alto, CA). La mezcla de reacción por muestra contenía 4 μ L tampón de reacción 5X, 1 μ L mezcla de dNTP (10mM cada uno), 0,5 μ L inhibidor recombinante de RNAsa, 1 μ L de la transcriptasa reversa MMLV (Moloney-Murine Leukemia Virus).

Un μ g de cada muestra fue diluido con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) hasta un volumen final de 12,5 μ L, y se le añadió 1 μ L de oligo (dT) 18, se calentó a 70°C durante 2 minutos, y guardado en hielo hasta la adición de la mezcla de reacción (6,5 μ L). Una vez que todo estaba mezclado, la reacción fue incubada a 42°C durante 1 hora, y después a 94°C 5 minutos para parar la síntesis de cDNA y destruir la actividad DNAsa. El producto fue diluido con agua tratada con dietilpirocarbonato hasta un volumen final de 100 μ L y conservado a -20°C hasta la realización de la PCR como describe (36).

Las secuencias para los mRNA de MUC1 humana y de β -actina fueron obtenidas de GenBank. Los cebadores (Tabla 1) de Gibco. 2,5 μ L del producto de la retrotranscripción (RT) fueron mezclados con la mez-

cla de reacción de la PCR, que contenía 5 μ L buffer 10X, 2,5 μ L MgCl₂ 50mM, Taq Polimerasa 0,5 μ L (todo Bioline, London, UK), 1 μ L (mezcla de dNTP (Sigma, St.Louis, MI), 1 μ L 5' y 3' cebadores externos (Tabla A) (10pmol, Gibco, Barcelona, Spain) para MUC1, y agua destilada estéril hasta completar un volumen final de 50 μ L. El control negativo incluido en cada reacción consistía en H₂O sustituyendo al cDNA. Las reacciones de PCR fueron realizadas en UnoII Thermocycler (Biometra, Gottingen, Germany) con el siguiente programa usando una tapa calentada (100°C): 94°C 5 min., después 30 ciclos, 94°C 45 seg., 58°C 45 seg., 72°C 45 seg., con una extensión final a 72°C 5 min., después enfriar a 4°C. Las PCRs fueron realizadas usando 24 ciclos y 30 ciclos para MUC1. La detección de β -actina y MUC1 estaba dentro del rango lineal. Los productos fueron llevados a electroforesis en agarosa al 2% agarosa con 0.5 μ g/mL bromuro de etidio, y las bandas analizadas en un sistema de análisis de imagen. Como marcador de peso molecular fue usado el DNA Ladder de 100 pb (Gibco BRL Life Technologies, Barcelona, Spain). Los sitios de restricción en el DNA genómico y en los cDNA fueron determinados usando Sequaid II software (Rhoads & Roufa 1989; Molecular Genetics Laboratory, Kansas State University). Kpn I (Roche Molecular Biochemicals) fue usada en tampón L SuRE/CutTM y 100 (g/mL de BSA (37 oC, 2h).

Análisis estadístico

Los valores de absorbancia para el ELISA y las unidades de densitometría de la RT-PCR fueron ex-

Tabla 1

Cebadores de MUC1 y (-actina usados en la RT-PCR nested. Los cebadores internos fueron diseñados dentro de la secuencia del producto de la primera PCR obtenida con los cebadores externos.

mRNA	Tamaño del fragmento amplificado	Posición de cebadores en cDNA	Tipo de cebadores	Secuencia del oligonucleótico
β -actina	838 pb	294-325	- 5'	5'-ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG 3'
		1131-1100	- 3'	5'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC 3'
MUC1	537 pb	825-846	-5'	5'-CAC TTC TCC CCA GTT GTC TAC 3'
		1342-1362	-3'	5'-GGG TAC TCG CTC ATA GGA TG 3'

presados como media \pm SEM. El análisis estadístico usado fue el Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL). El análisis de la varianza (ANOVA) y para comparar múltiples variables el DMS, Scheffe y el test de Bonferroni. Valores de $P < 0.05$ fueron los considerados como significativos.

RESULTADOS

Localización de mRNA de MUC1 y proteína en células HEC1B cultivadas

El mRNA de MUC1 fue localizado en el citoplasma por hibridación y se encontró que estaba heterogéneamente distribuido con una variación intercelular significativa. Ninguna tinción visible se apreciaba en los controles negativos sin la sonda de cDNA. La β -actina fue usada como control positivo (Figura 1).

Los experimentos de inmunocitoquímica fueron desarrollados sobre monocapas de HEC1B usando diferentes anticuerpos primarios. La tinción con BC-2 mostraba variaciones de intensidad entre células muy significativas. La tinción en la superficie celular se asociaba con los microvilli (Fig. 2A, B). El CT-1 mostraba menor heterogeneidad (Fig. 2C). La unión del anticuerpo 232A/1 fue más fuerte en la superficie de las células y se volvía a observar variaciones obvias en los niveles de expresión en distintas células en la monocapa (Fig. 2D, E).

El efecto del TGF- β 1 sobre MUC1 en células HEC-1B

El efecto del TGF- β 1 sobre la expresión del mRNA de MUC1 en células HEC1B fue investigado por medio de una RT-PCR semicuantitativa y normalizada a la expresión de β -actina. Los resultados muestran que el mRNA de MUC1 disminuye a medida que aumenta la concentración de TGF- β 1 (Figura 3).

La MUC1 fue estudiada por inmunofluorescencia usando el anticuerpo monoclonal BC-3. La tinción de MUC1 en la membrana plasmática se reducía significativamente en presencia de 1ng/uL de TGF- β 1.

El ELISA se empleó para cuantificar el efecto de concentraciones crecientes de TGF- β 1 sobre la expresión de la proteína MUC1. Varios epítomos fueron estudiados usando un panel de anticuerpos contra MUC1 y su variante por splicing MUC1SEC. Un descenso de MUC1 dependiente de la dosis de TGF- β 1 fue evidente en el rango de concentración de 0,1-

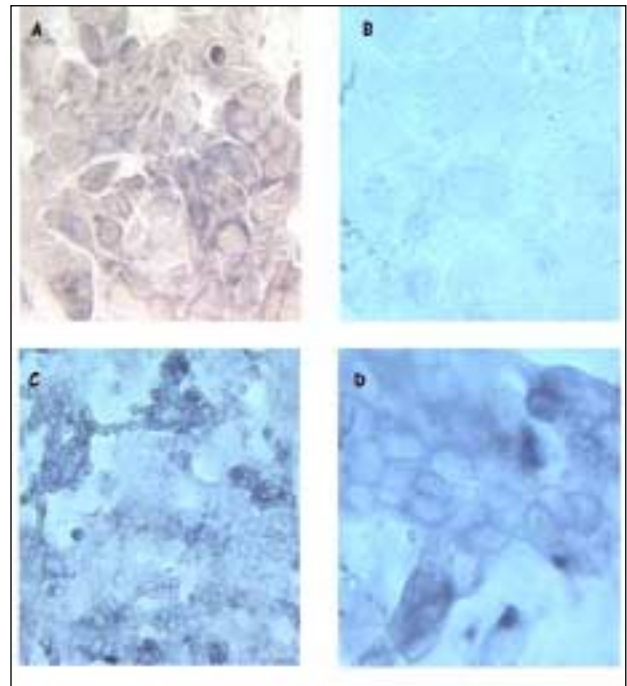


Figura 1

La localización del mRNA de MUC1 por hibridación in situ no radiactiva (C, D). El mRNA se expresaba en todas las células HEC 1B aunque son considerables las variaciones en cuanto a cantidad. La imagen más ampliada (D) muestra la localización citoplasmática. El control positivo es usando cDNA de (β -actina) y el negativo control omitiendo la sonda marcada y son A y B respectivamente. Amplificaciones; A, C X 250, B, D x 450.

4.0ng/mL, con niveles de reducción del 50% con respecto a los valores del control (Fig. 4).

DISCUSIÓN

La MUC1 en el glicocalix luminal apical se extiende alrededor de 500nm desde la membrana plasmática (9) y, es muy abundante en la fase receptiva, es probable que un embrión que se acerca a la superficie celular materna se la encuentre. Ha sido propuesto que MUC1 actúe como una molécula antiadhesión y podría inhibir la interacción entre el embrión y el epitelio apical materno, esto crearía una barrera uterina para la implantación (37, 38). Sin embargo, nosotros hemos usado un modelo in vitro de la implantación para mostrar que el blastocisto humano produce una regulación a la baja, específica y altamente localizada en el sitio donde se establecerá el embrión (1). Un mecanismo por el que esto podría ocurrir sería por un diálogo paracrino entre el em-

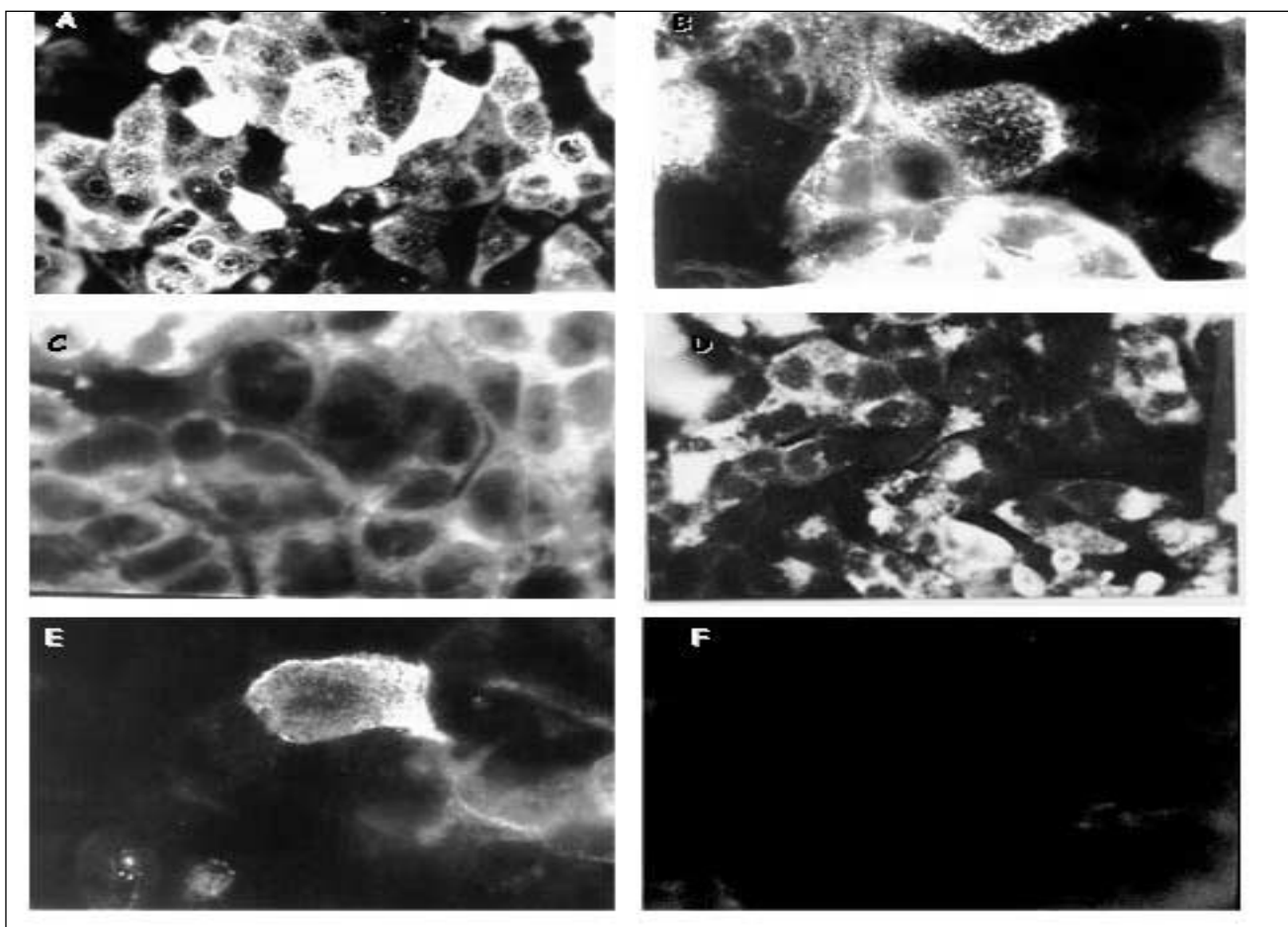


Figura 2

Localización por inmunofluorescencia de la MUC1 en monocapas confluentes de células HEC-1B de carcinoma endometrial. (A, B) El monoclonal BC-2 muestra unión heterogénea, con tinción visible como punteaduras en los microvilli en algunas células. (C) CT-1 (antígeno de la cola citoplásmica) como anticuerpo primario en células permeabilizadas, mostraba un menor grado de heterogeneidad en la unión. (D) El dominio reconocido por el epítipo 232A1 mostraba reactividad heterogénea y, a mayor ampliación (E) evidencias de su asociación con microvilli en la superficie apical de las células. Control negativo (F). (A, D, F ampliación 500X; B, D 1000X).

brión y al epitelio materno. El presente estudio es el primero en sugerir un posible mecanismo molecular.

La MUC1 es globalmente regulada al alza (en los tejidos glandular y luminal) por la progesterona en la fase secretora, y esto actúa como un marcador de diferenciación (1). Investigando como modelo la línea celular de carcinoma bien diferenciada, HEC1B, nosotros hemos demostrado la heterogénea expresión de proteína y de mRNA de MUC1. Esta heterogeneidad es equiparable a células glandulares normales en el endometrio secretor tardío; por contra, en la fase secretora media, la superficie apical del epitelio luminal es uniformemente inmunopositiva para MUC1 (39).

El TGF- β 1 fue identificado como un candidato pa-

ra la regulación local de MUC1 en el sitio de la implantación basado en el potente efecto en sobre la diferenciación epitelial en otros tejidos, así como que se expresa en el endometrio y en el embrión antes de la implantación. El TGF- β 1 regula a la baja al mRNA de MUC1 en células HEC-1B después de 72h del periodo de exposición, y hay un descenso dependiente de dosis de la forma transmembrana y las isoformas secretadas de la proteína MUC1. De hecho, la inmunofluorescencia indica que la tinción asociada a la superficie celular se reduce a un nivel muy bajo en presencia de TGF- β 1. Futuros experimentos serán necesarios para establecer que este efecto ocurre en células endometriales normales.

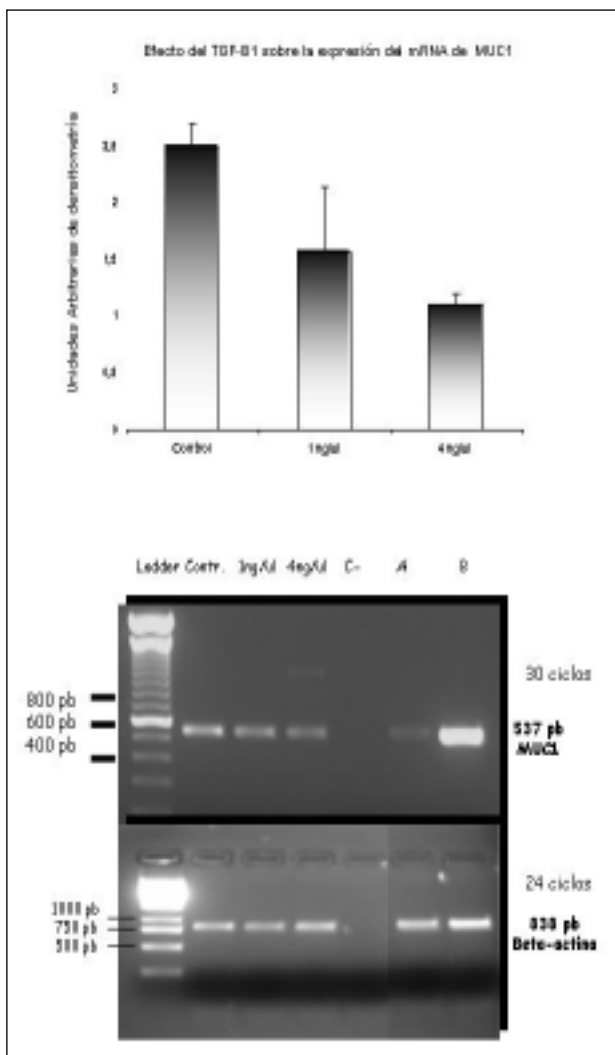


Figura 3

Los productos de la RT-PCR fueron corridos en un gel de electroforesis al 2 % de agarosa y con 0.5 mg/mL de bromuro de etidio, y el análisis de bandas en un sistema de análisis de imagen. Como marcadores de peso molecular (MW) se usaron DNAs de 100 y 250 pb. Las carreras contenían: control negativo (C-), células control HEC1B (Contr), células HEC1B tratadas con 1 ng/uL y 4 ng/uL, endometrio secretor (B) y tejido de vegetaciones (A).

El análisis de densitometría de los datos de RT-PCR, fue con las unidades de mRNA de MUC1 normalizadas con la señal de la (-actina en HEC1B. Los datos fueron combinados, expresados como la media de tres replicas de cada experimento y analizados por ANOVA seguido de Scheffe, DMS y el test de Bonferroni. El asterisco denota que el descenso en mRNA de MUC1 en células tratadas con 4 ng/uL de TGF-β1 comparadas con las células control era significativo.

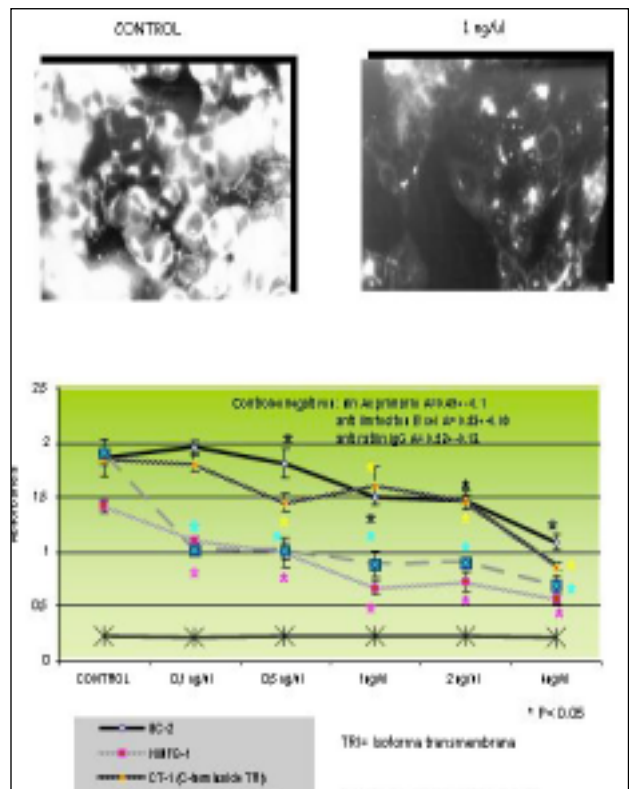


Figura 4

Immunofluorescencia de células cultivadas HEC1B sin tratar (control) o tratadas con 1ng/(L de TGF-β1, 72h, después de teñir con anticuerpo BC-3 contra MUC1. Debajo de la figura se muestran los resultados del ELISA normalizado para la densidad celular, en función de la concentración de TGF-β1 (n=4 para cada concentración). Los datos son expresados como media (SEM) y analizados por ANOVA seguido por Scheffe, DMS y test de Bonferroni). El asterisco denota una disminución en la proteína detectada estadísticamente significativa, comparado con células sin tratar o tratadas con una concentración más baja de TGF-β1.

Nuestros datos sugieren una nueva hipótesis para la mutua señalización paracrina entre las células maternas y las embrionarias en la implantación. La regulación de TGF-β1 es compleja y ocurre a varios niveles - síntesis y secreción del factor como precursor latente, activación (que puede ocurrir por proteólisis o por unión de una proteína activadora local en o cerca de la superficie), la expresión del receptor y la presencia de receptores adyuvantes o señuelos. Con la demostración de que TGF-β1 se expresa en el endometrio, y que tiene la habilidad de alterar la composición superficial de la célula, realizamos los primeros pasos para establecer un mecanismo de acción en la

implantación. Las posibilidades que pueden ser consideradas son la regulación en el sitio de implantación de TGF incluyendo la producción por células embrionarias o maternas, activación controlada por la expresión restringida de una proteasa o unión de una proteína y señalización regulada por expresión restringida de complejos del receptor. Dada la escasez de sitios de implantación in vivo para estudiar, las extensiones del modelo in vitro de implantación que nosotros hemos descrito (1) será necesario claramente confirmar las implicaciones de la ruta de TGF en la fase de aproximación de la implantación.

La hipótesis de una barrera para la implantación conduce a un posible mecanismo de selección de embriones. Embriones de baja calidad, carencia de habilidad para producir, estimular la síntesis de, o de activar el TGF- β 1 podría acarrear fallos en la implantación puesto que permanecería el glicocalix antiadhesivo intacto (37, 38). Tales ideas podrían tener implicaciones en los programas de TRA, donde las bajas tasas de éxito en la implantación siguen siendo un problema importante.

NOTA

Este trabajo fue respaldado por la Fundación Instituto Valenciano de Infertilidad y una beca del Fondo de Investigación Sanitaria de la Seguridad Social, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Meseguer M, Aplin JD, Caballero-Campo P, O'Connor E, Martín J, Remohí J, Pellicer A, et al.:** Human endometrial MUC1 is Up-Regulated by Progesterone and Down-Regulated In Vitro by the human blastocyst. *Biol. Reprod* 2001; 64:590-601.
2. **Paria BC, Lim H, Das SK, Reese J, Dey SK.:** "Molecular signalling in uterine receptivity for implantation." *Seminars in cell and developmental biology* 2000; 11:67-76.
3. **Aplin JD, Meseguer M, Simon C, Ortiz ME, Croxatto H and Jones CP.:** MUC1, glycans and the cell-surface barrier to embryo implantation. *Bioch. Soc. Trans* 2001; 29(2):153-56.
4. **Devine P, Mackenzie IFC.:** Mucins: structure, function and association with malignancy. *Bioassays* 1992, 14:619-625.
5. **Hilkens J, Ligtenber MJL, Vos HL, Litvinov SV.:** Cell membrane-associated mucins and their adhesion modulating property. *Trends. Biochem. Sci* 1992; 17:359-363.
6. **Lagow E, DeSouza MM, Carson DD.:** Mammalian reproductive tract mucins. *Hum. Reprod. Update* 1999; 5:280-292.
7. **Gendler SJ, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Peat T, Burchell J, Pemberton L, Lalani E, Wilson D. et al.:** Molecular cloning and expression of human tumour associated polymorphic epithelial mucin. *J. Biol. Chem* 1190B; 265:15286-15293.
8. **Aplin JD, Hey NA.:** MUC1, endometrium and embryo implantation. *Bioch. Soc. Trans* 1995; 23:826-831.
9. **Ligtenberg MJL, Kruishaar L, Buijs F, van Meijer M, Litvinov SM, Hilkens J.:** Cell associated epsialin is a complex containing two proteins derived from a common precursor. *J. Biol. Chem* 1992; 267:6171-6177.
10. **Zrihan-Licht S, Vos HL, Baruch A, Elroy-Stein O, Sagiv D, Keydar I, Hilkens J, Wreschner DH.:** Characterization and molecular cloning of a novel MUC1 protein, devoid of tandem repeats, expressed in human breast cancer tissue. *Eur. J. Biochem* 1994; 224:787-795.
11. **Baruch A, Hartmann M, Yoeli M, Greenstaein S, Stadler Y et al.:** The breast cancer-associated MUC1 gene generates both a receptor and its cognate binding protein. *Can. Res* 1999; 59:1552-1561.
12. **Wesseling J, van der Valk SW, Hilkens J.:** Epsialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *J Cell Biol* 1995; 129:255-265.
13. **Regimbald LH, Pilarski LM, Longenecker, BM, Reddish MA, Zimmermann G, Hugh JC.:** The breast mucin MUC1 as a novel adhesion ligand for endothelial intercellular adhesion molecule 1 in breast cancer. *Cancer Res* 1996; 56:4244-4249.
14. **Hey NA, Aplin JD.:** Sialyl-Lewis x and Sialyl-Lewis a are associated with MUC1 in human endometrium. *Glycoconj. J* 1996; 13:769-779.
15. **Campbell S, Swann HR, Seif MW, Kimber SJ, Aplin JD.:** Cell adhesion molecules on the oocyte and pre-implantation human embryo. *Mol. Hum. Reprod* 1995; 1:1571-1578.
16. **Surveyor GA, Gendler SJ, Pemberton L, Das SK, Chakraborty I, Julian J, Pimental RA, Wegner CC, Dey SK, Carson DD.:** Expression and steroid hormonal control of MUC1 in the mouse uterus. *Endocrinol* 1995; 136:3639-3647.
17. **Bowen JA, Bazer FW, Burghardt RC.:** Spatial and temporal analyses of integrin and MUC1 expression in porcine uterine epithelium and trophoectoderm in vivo. *Biology of Reproduction* 1996; 55:1098-1106.
18. **Hild-Petito S, Fazleabas A, Julian J, Carson DD.:** Mucin (MUC1) expression is differentially regulated in uterine luminal and glandular epithelia of the baboon (*Papio anubis*). *Biol Reprod* 1996; 54:939-947.

19. **DeSouza MM, Mani SK, Julian J, DD Carson.:** Reduction of MUC1 expression during the receptive phase in the rat uterus. *Biol Reprod* 1998; 58(6):1503-1507.
20. **DeSouza MM, Surveyor GA, Price RE, Julian J, Kardon R, Zhou X, Lagow E, Gendler S, Hilkens J, DD Carson.:** MUC1/epsialin; a critical barrier in the female reproductive tract. *J. Reprod. Immunol* 1999; 45(2):127-158.
21. **Hoffman LH, Olson GE, Carson DD, Chilton BS.:** Progesterone and implanting blastocyst regulate MUC1 expression in rabbit uterine epithelium. *Endocrinol* 1998; 139:266-271.
22. **Chegini N, Zhao Y, Williams RS, et al.:** Human uterine tissue throughout the menstrual cycle expresses transforming growth factor beta-1 (TGF- β 1), TGF- β 2, TGF- β 3, and TGF- β type II receptor messenger ribonucleic acid and protein and contains (125I) TGF- β 1 binding sites *Endocrinol* 1994; 135:439-449.
23. **Godkin JD, Dore JJ.:** Transforming growth factor beta and the endometrium. *Rev Reprod* 1998; 3:1-6.
24. **Chow JF, Lee KF, Chan ST, Yeung WS.:** Quantification of transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) mRNA expression in mouse preimplantation embryos and determination of TGFbeta receptor (type I and type II) expression in mouse embryos and reproductive tract. *Mol Hum Reprod* 2001; 7:1047-56.
25. **Massagé J.:** The transforming growth factor beta family *Ann. Rev. Cel. Biol* 1990; 6:597-641.
26. **Idris N, Carraway KL.:** Regulation of sialomucin complex/Muc4 expression in rat uterine luminal epithelial cells by transforming growth factor-beta: implications for blastocyst implantation. *J Cell Physiol* 2000; 185(2):310-6.
27. **Hey NA, Li TC, Devine PL, Graham RA, Saravelos H, Aplin JD.:** MUC1 in secretory phase endometrium: expression in precisely dated biopsies and flushings from normal and recurrent miscarriage patients. *Hum. Reprod* 1995; 10(10):2655-2662.
28. **Burchell J, Gendler S., Taylor-Papadimitriou J, Girling A., Lewis, A., Mills, R.:** Development and characterization of breast cancer reactive monoclonal antibodies directed to the core protein of the human milk mucin. *Cancer Res* 1987; 47:5476-5482.
29. **Pemberton, L, Taylor-Papadimitriou J, Gendler, S.J.:** Antibodies to the cytoplasmic domain of the MUC1 mucin show conservation throughout mammals. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1992; 185:167-175.
30. **Xing P-X, Reynolds K, Tjandra J.J, Tang X.L, McKenzie I.F.:** Synthetic peptides reactive with anti-human milk fat globule membrane monoclonal antibodies. *Cancer Research* 1990; 50:89-96.
31. **Price MR, Hudecz F, O'Sullivan C, Baldwin RW, Edwards PM, Tendler SJ.:** Immunological and structural features of the protein core of human human polymorphic epithelial mucin. *Mol. Immunol.* 27:795-802, 1990.
32. **Tendler SJ.:** Elements of secondary structure in a human epithelial mucin core peptide fragment. *Biochem J* 1990; 267:733-737.
33. **Karanikas V, Pattin K, Jamieson J, Pietersz G, McKenzie I.:** Affinity of antibodies to MUC1 antigens. *Tumor. Biol* 1998; 19(suppl 1):71-78.
34. **Reddish A., Suresh R.S, Koganty R, Fortier S, Baronic L, Berg A, Longecker M.:** Analysis of the role of Type 1 core oligosaccharides in the binding of anti-MUC1 antibodies by cytofluorometry and synthetic peptide/glycopeptide binding inhibition studies. *Tumor Biol* 1998; 19 (suppl):57-66.
35. **Hilkens J, Boer M.:** Monoclonal antibodies against the nonmucin domain of MUC1/epsialin. *Tumour Biol* 1998; 19(Suppl 1):67-70.
36. **Krüssel JS, Simón C, Rubio MC, Rape RA, Wen Y, Huang HY, Bielfeld P and Polan ML.:** Expression of interleukin-1 system mRNA in single blastomeres from human pre-implantation embryos. *Hum. Reprod* 1998; 13:2206-2211.
37. **Aplin JD.:** The cell biology of human implantation. *Placenta* 1996; 17:269-275.
38. **Aplin JD.:** Adhesion molecules in implantation. *Rev. Reprod* 1997; 2:84-93.
39. **Aplin JD, Hey NA, Graham RA.:** Human endometrial MUC1 carries keratan sulphate: characteristic glycoforms in the luminal epithelium at receptivity. *Glycobiology* 1998; 8(3):269-276.