

Estudi de l'acció antioxidant de la n-acetilcisteïna, quercetina i catequina sobre cèl.lules endometrials i de trafoblast, en condicions d'estrès oxidatiu

Estany Sanz, Susanna

ÍNDEX

ABREVIATURES	i
RESUM	v
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1 La implantació embrionària i l'establiment de l'embaràs	3
1.1.1 L'embrió	3
1.1.2 L'endometri	3
1.1.3 Etapes de la implantació	4
1.1.4 Aspectes bàsics de la proliferació i mort cel·lular	6
1.2 La immunologia de la reproducció	11
1.2.1 Les proteïnes reguladores del complement en l'endometri	14
1.3 L'esterilitat i la infertilitat femenina.	16
1.3.1 Paràmetres clínics i morfològics en l'estudi de la fertilitat	17
1.4 L'estrès oxidatiu	18
1.4.1 L'estrès oxidatiu i la infertilitat	20
1.5 Els antioxidants com a teràpia en la infertilitat	21
1.5.1 La n-acetilcisteïna	23
1.5.2 Els flavonoides	24
1.5.3 La vitamina E	25
1.5.4 Tractaments combinats amb antioxidants	26
2. HIPÒTESI	29
3. OBJECTIUS	33
4. MATERIALS I MÈTODES	37
4.1 Consideracions generals	39
4.2 Part 1: Estudi del model <i>in vitro</i> de l'oxidació cel·lular en cèl·lules endometrials i de trofoblast humanes	39
4.2.1 Cultiu cel·lular	39
4.2.2 Establiment del model <i>in vitro</i> d'estrès oxidatiu	40
4.2.3 Preparació dels antioxidants	41
4.2.4 Disseny experimental del tractament antioxidant	45

4.2.5 Valoració de la viabilitat cel·lular (assaig de MTT)	46
4.2.6 Anàlisi de l'apoptosi en el model d'oxidació	48
4.2.7 Avaluació del cicle cel·lular	53
4.3 Part 2: Anàlisi del tractament combinat de pentoxifilina i vitamina E en pacients infèrtils	57
4.3.1 Criteris d'inclusió en l'estudi. Valoracions clíniques dels pacients en estudi	57
4.3.2 Descripció del tractament	57
4.3.3 Obtenció i conservació de la mostra	57
4.3.4 Expressió gènica de proteïnes reguladores del complement	58
4.3.5 Processament de les dades i anàlisi estadística	62
5. RESULTATS (PART 1)	65
5.1 Establiment del model <i>in vitro</i> d'estrès oxidatiu en cèl·lules endometrials humanes. Valoració de l'activitat antioxidant del NAC, els flavonoides i la vitamina E	67
5.1.1 Establiment del model d'estrès oxidatiu en cèl·lules endometrials	67
5.1.2 Incorporació intracel·lular de la vitamina E inclosa en liposomes	68
5.1.3 Estudi de l'activitat antioxidant en el model d'oxidació de cèl·lules endometrials	70
5.2 Establiment del model <i>in vitro</i> d'estrès oxidatiu en cèl·lules de trofoblast humanes. Valoració de l'activitat antioxidant del NAC i dels flavonoides	74
5.2.1 Establiment del model d'estrès oxidatiu en cèl·lules de trofoblast	74
5.2.2 Valoració de l'activitat antioxidant en el model d'oxidació de cèl·lules de trofoblast	75
5.3 Estudi del tractament antioxidant en cèl·lules endometrials i de trofoblast humanes	79
5.3.1 Anàlisi de l'apoptosi en el tractament antioxidant	79
5.3.2 Avaluació del cicle cel·lular en el tractament antioxidant del model <i>in vitro</i> d'oxidació cel·lular	86

5. RESULTATS (PART 2)	92
5.4 Estudi de l'endometri de pacients infèrtils. Efecte del tractament combinat de pentoxifilina i vitamina E sobre l'expressió gènica de les proteïnes reguladores del complement (CD46, CD55 i CD59), el volum i el gruix endometrial	92
5.4.1 Anàlisi de l'expressió gènica de les proteïnes reguladores del complement en pacients fèrtils i infèrtils, tractades amb pentoxifilina i vitamina E	92
5.4.2 Avaluació del tractament combinat de pentoxifilina i vitamina E en pacients infèrtils	95
5.4.3 Correlació de les tres proteïnes reguladores del complement	98
6. DISCUSSIÓ	101
7. CONCLUSIONS	117
8. BIBLIOGRAFIA	121
9. ANNEXOS	137
Annex I: Antioxidant activity of n-acetylcysteine, favonoids and α -tocopherol on endometrial cells in culture	139
Annex II: Protective effect of vitamin E in an animal model of LPS-induced inflammatorion	151
Annex III: Anàlisi estadística de la viabilitat cel·lular per a les cèl·lules de trofoblast	159
Annex IV: Anàlisi estadística de l'acció antioxidant en l'activitat caspasa-3 en les cèl·lules endometrials	165
Annex V: Anàlisi estadística de l'acció antioxidant mitjançant l'avaluació de l'externalització de la fosfatidilserina i la mort cel·lular en les cèl·lules endometrials	169
Annex VI: Anàlisi estadística de l'acció antioxidant en cicle cel·lular per a les cèl·lules endometrials i de trofoblast	179
Annex VII: Seqüenciació de l'amplificat de PCRs	187

ABREVIATURES

ADN	àcid desoxiribonucleic
An	anexina
ANOVA	anàlisi de la variància
ARN	àcid ribonucleic
ATP	trifosfat d'adenosina
BA	β -actina
Cat	catalasa
CD46	proteïna del cofactor de membrana
CD55	factor accelerador de la degradació
CD59	protectina
cDNA	ADN complementari
CM	citotoxicitat moderada
CN	citotoxicitat nul·la
CoPost-T	contractament + post-incubació de l'antioxidant
Co-T	contractament
CP	punt de creuament
CRP	proteïna reguladora del complement
CS	citotoxicitat severa
DADS	disulfur de dialil
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DC (cèl·lula)	cèl·lula dendrítica
DEVD	àcid aspàrtic-àcid glutàmic-valina-àcid aspàrtic (Asp-Glu-Val-Asp)
DMEM	medi Dulbecco's Modified Eagle
DMSO	dimetilsulfòxid
dNK (cèl·lula)	cèl·lula NK de la decidua
DPPA	àcid fosfatídic dipalmitoil
EDTA	etilendiamina tetraacètic
ES	error estàndard
ESC	cèl·lules estromals de l'endometri
F12	medi Nutrient Mixture F-12
FBS	sèrum fetal boví
FSH	hormona fol·liculoestimulant
GPx	glutatió peroxidasa
GSH	glutatió
H₂O	aigua
H₂O₂	peròxid d'hidrogen
HLA	antígen leucocitari humà
HSPC	fosfatidilcolina hidrogenada de soja
IDO	indolamina 2,3-dioxigenasa

IL	interleucina
IUGR	retard del creixement intrauterí
LH	hormona luteoestimulant
LIF	factor inhibidor de leucòcits
LPS	lipopolisacàrid
MAC	complex d'atac a la membrana
mARN	ARN missatger
MgCl₂	clorur de magnesi
MHC	sistema major d'histocompatibilitat
MMPs	metaloproteinases de matriu
MTT	bromur de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-tetrazol
NAC	n-acetilcisteïna
NaOH	hidròxid de sodi
NK (cèl·lula)	cèl·lula citotòxica natural
O₂	oxigen molecular
O₂^{•-}	radical superòxid
OH[•]	radical hidroxil
PAMP	patró molecular associat a patògens
pb	parell de bases
PBS	tampó fosfat salí
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PI	iodur de propidi
Pnx-VE	pentoxifilina i vitamina E
Post-T	postractament
PreCoPost-T	contractament + pre- i post-incubació de l'antioxidant
Pre-T	pretractament
PRR	receptor de reconeixement de patrons
ROS	espècies reactives d'oxigen
RP-HPLC	cromatografia líquida d'alta resolució de fase reversa
RT	retrotranscripció
SDH	succinat deshidrogenasa
SOD	superòxid dismutasa
SPC	fosfatidilcolina natural de soja
TEAC	activitat antioxidant equivalent al trolox
Th (cèl·lula)	cèl·lula T col·laboradora
TRA	tècnica de reproducció assistida
Treg (cèl·lula)	cèl·lula T reguladora
Vit E	vitamina E

RESUM

INTRODUCCIÓ: L'estrès oxidatiu està present en diferents patologies que poden cursar amb esterilitat femenina o amb complicacions durant l'embaràs, com per exemple l'endometriosis o la preeclàmpsia. L'augment crònic de les espècies reactives d'oxigen en el teixit endometrial i/o embrionari pot provocar dany cel·lular, inflamació local i autoimmunitat, dificultant la implantació de l'embrió i la gestació. L'ús d'antioxidants podria afavorir la implantació, ajudar al desenvolupament de l'embaràs i evitar l'avortament.

OBJECTIUS: Avaluat l'acció antioxidant del n-acetilcisteïna (NAC), la quercetina, la catequina i la vitamina E en cèl·lules endometrials i en cèl·lules de trofoblast; estudiar el tractament combinat de vitamina E i pentoxifilina en dones infèrtils remeses a programes de reproducció assistida.

MATERIALS I MÈTODES: S'ha avaluat l'efecte antioxidant del NAC, la quercetina, la catequina i la vitamina E inclosa en liposomes en el model d'oxidació de cèl·lules endometrials i de trofoblast, induint l'estrès oxidatiu amb diferents concentracions de peròxid d'hidrogen (H_2O_2). S'ha avaluat el dany oxidatiu mitjançant la viabilitat cel·lular (o citotoxicitat) pel mètode de bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol (MTT). L'anàlisi de l'apoptosi s'ha realitzat mitjançant la valoració de l'externalització de la fosfatidilserina i l'activitat de la caspasa-3. Les fases del cicle cel·lular s'han analitzat mitjançant la quantificació del material gènic per citometria de flux. En l'estudi realitzat en un grup de dones infèrtils, s'ha analitzat l'efecte del tractament combinat de vitamina E i pentoxifilina sobre l'expressió de proteïnes reguladores del complement (CRPs), així com sobre el gruix i el volum de l'endometri d'aquestes dones.

RESULTATS: S'ha establert diferents graus de citotoxicitat en cèl·lules endometrials i de trofoblast, segons la concentració del H_2O_2 : citotoxicitat nul·la ($\leq 1mM$), moderada (1,5 i 2mM) i severa ($>2mM$). Un augment de citotoxicitat provoca un increment de l'apoptosi i de la necrosi en les cèl·lules endometrials. En les cèl·lules del trofoblast la mort cel·lular es realitza mitjançant la necrosi, ja que no s'ha observat apoptosi depenent de l'activitat caspasa-3. L'oxidació alenteix o atura el cicle cel·lular en la fase G2-M en ambdós tipus cel·lulars. L'administració de NAC i quercetina, en aquest model, disminueix significativament el dany oxidatiu i els seus efectes, fins i tot en condicions

de citotoxicitat severa. Els agents antioxidants només tenen efecte si estan presents durant l'estrès oxidatiu. El NAC té una millor activitat antioxidant que la quercetina i inhibeix totalment l'acció de l'agent oxidant. En l'endometri de dones infèrtils, s'observa un augment de l'expressió gènica de les proteïnes reguladores del complement CD46 i CD59 si es compara amb l'endometri de dones fèrtils. Els pacients infèrtils que han rebut el tractament combinat de pentoxifilina i vitamina E mostren una lleugera disminució en la seva expressió gènica de CD46 i CD59.

CONCLUSIONS: De tots els agents antioxidants estudiats en aquesta tesi, el NAC ha mostrat la major eficiència per a disminuir el dany oxidatiu en cèl·lules implicades en la implantació embrionària com les cèl·lules endometrials i de trofoblast. Les dones infèrtils tenen augmentades les proteïnes CD46 i CD59 respecte les dones fèrtils. El tractament antioxidant de vitamina E i pentoxifilina provoca una lleugera disminució d'aquestes proteïnes.

1. INTRODUCCIÓ

1.1 LA IMPLANTACIÓ EMBRIONÀRIA I L'ESTABLIMENT DE L'EMBARÀS

La implantació és el procés mitjançant el qual l'embrió s'uneix a l'endometri, envaeix el teixit endometrial i posteriorment forma la placenta, on es produeix la connexió materno-fetal.

1.1.1 L'EMBRIÓ

L'òocit i l'espermatozoide es troben a les trompes de Fal·lopi, on té lloc la fecundació. A partir d'aquest punt, el zigot comença a dividir-se per mitosi fins a formar el blastocist d'unes 100 cèl·lules (4rt-6è dia després de la fecundació). En aquest estadi, les cèl·lules es diferencien en una massa de cèl·lules perifèrica (**trofoblast**) i una massa de cèl·lules interna (**embrioblast**). El trofoblast formarà la placenta i membranes associades, mentre que l'embrioblast formarà l'embrió i l'amnion. El blastocist, després de la oclusió de la zona pel·lúcida, s'implantarà en l'endometri matern.

1.1.2 L'ENDOMETRI

L'endometri és la mucosa que recobreix l'interior de l'úter. L'endometri està compost per diferents tipus cel·lulars: cèl·lules epitelials glandulars i luminals, cèl·lules estromals i fibroblàstiques, cèl·lules del sistema immunològic i cèl·lules que componen els vasos sanguinis¹. Morfològicament, l'endometri es pot dividir en la capa funcional i la capa basal. La capa funcional té la finalitat de preparar-se per a la implantació del blastocist i per tant, és la capa on té lloc, principalment, la fase de proliferació, la fase secretora i la degeneració de l'endometri. La capa basal té l'objectiu de regenerar l'endometri després de cada menstruació.

En la **fase proliferativa** de l'endometri (del 5è al 14è dia després de la menstruació) es produeix la reconstrucció i el creixement de l'endometri, des d'uns 0,5 fins a 3,5-5 mm de gruix. Les cèl·lules epitelials són les cèl·lules que tenen el nombre més gran de mitosi de l'endometri i que formen un recobriment epitelial continu a la llum endometrial. L'hormona responsable d'aquesta fase és l'estrogen 17-beta estradiol, secretat per les cèl·lules del fol·licle ovàric en desenvolupament. Al final d'aquesta fase

hi ha un pic de les hormones fol·liculoestimulant (FSH) i luteoestimulant (LH) i hores després es produeix la ovulació. A continuació, s'inicia la **fase secretora** (del 15è al 28è dia després de la menstruació). En aquesta fase s'inhibeix la mitosi epitelial i comencen les secrecions de les cèl·lules glandulars al lumen de la cavitat endometrial. Les hormones responsables d'aquesta fase són la progesterona i l'estrogen 17-beta estradiol, secretades pel cos luti a l'ovari. Al final d'aquesta fase s'inicia una sèrie de canvis en l'endometri o **decidualització**². Si no té lloc la fecundació, es produeix la **descamació endometrial**, causada per un descens brusc dels estrogens i la progesterona. En aquesta fase, l'endometri inicia reaccions vasoconstrictores, processos d'apoptosi³, pèrdua del teixit i per últim la **menstruació** (figura 1). Si s'ha produït la fecundació, comença la **fase de la implantació** de l'embrió en l'endometri.

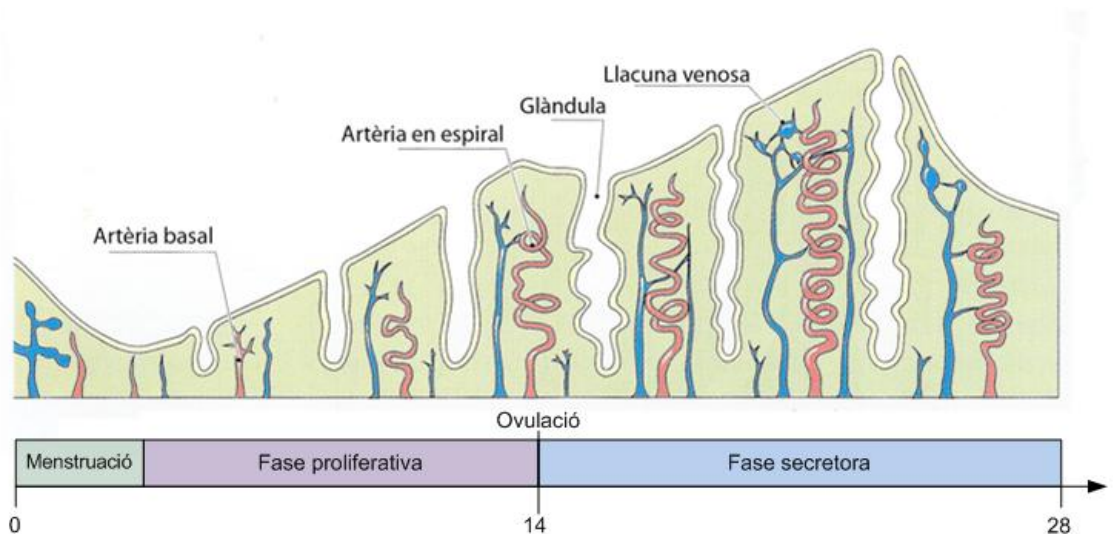


Figura 1. Fases i canvis de l'endometri humà durant el cicle menstrual de 28 dies.
Extret de Johnson MH, Everitt BJ. 2000. Essential reproduction. Ed. Blackwell Science. 5ena edició

1.1.3 ETAPES DE LA IMPLANTACIÓ

La implantació es divideix en tres etapes: l'aposió, l'adhesió i la invasió. Per a que la primera interacció entre l'embrió i l'endometri tingui èxit és necessari que es produeixi un conjunt de processos sincrònics entre ells. Per una banda, l'embrió preimplantacional té les primeres divisions cel·lulars a mesura que va viatjant al llarg de les trompes de Fal·lopi fins arribar a l'estadi de blastocist, quan s'allibera de la zona

pel·lúcida en la cavitat uterina. D'aquesta manera, exposa a l'exterior les molècules necessàries per a produir-se la interacció amb l'endometri, com per exemple, receptors de citocines, molècules d'adhesió cel·lular i metal·loproteases de matriu (MMPs).

Per altra banda, l'endometri es prepara per a la recepció de l'embrió. Cap al final de la fase secretora (del 20è al 24è dia després de la menstruació) succeeix una sèrie de canvis per aconseguir la denominada “finestra d'implantació”, quan pot haver-hi l'**aposió** i l'**adhesió** de l'embrió en la superfície de l'endometri⁴. En aquest període apareixen els pinopodes i es secreten citocines (factor inhibidor de leucòcits (LIF), interleucina 1 (IL-1) i IL-6), quimiocines (CX3CL1, CCL7, CCL14 i CCL4) que ajuden a la migració i la polaritat del blastocist en l'endometri, factors de creixement (factor estimulator de colònies-1 i factor de creixement epidèrmic d'unió a heparina) i expressa molècules d'adhesió a la superfície cel·lular (integrines i mucines)⁵. Malgrat això, encara no es coneix completament la funció específica de cadascuna d'aquestes molècules i les interaccions moleculars en humans.

Si aquesta interacció entre l'endometri i l'embrió ha tingut èxit, es dona la **invasió** de l'embrió en l'endometri. El trofoblast forma dues capes, el *citotrofoblast* una capa interna de cèl·lules mononucleades, i el *sincitiotrofoblast*, la capa externa de cèl·lules polinucleades resultant de la fusió de les cèl·lules del citotrofoblast, que establirà la placenta. En la placenta és on hi ha l'intercanvi de nutrients i de gasos entre la sang materna i la fetal. També genera algunes hormones com la gonadotropina coriònica humana, que ajuda al manteniment del cos luti en l'ovari. Es creu que aquesta hormona té un paper en la tolerància immunològica necessària en l'embaràs. Les cèl·lules de l'estroma de l'endometri que envolten l'embrió acumulen glucògen i lípids, formant un microambient adequat per a l'establiment embrionari, la decídua (figura 2).

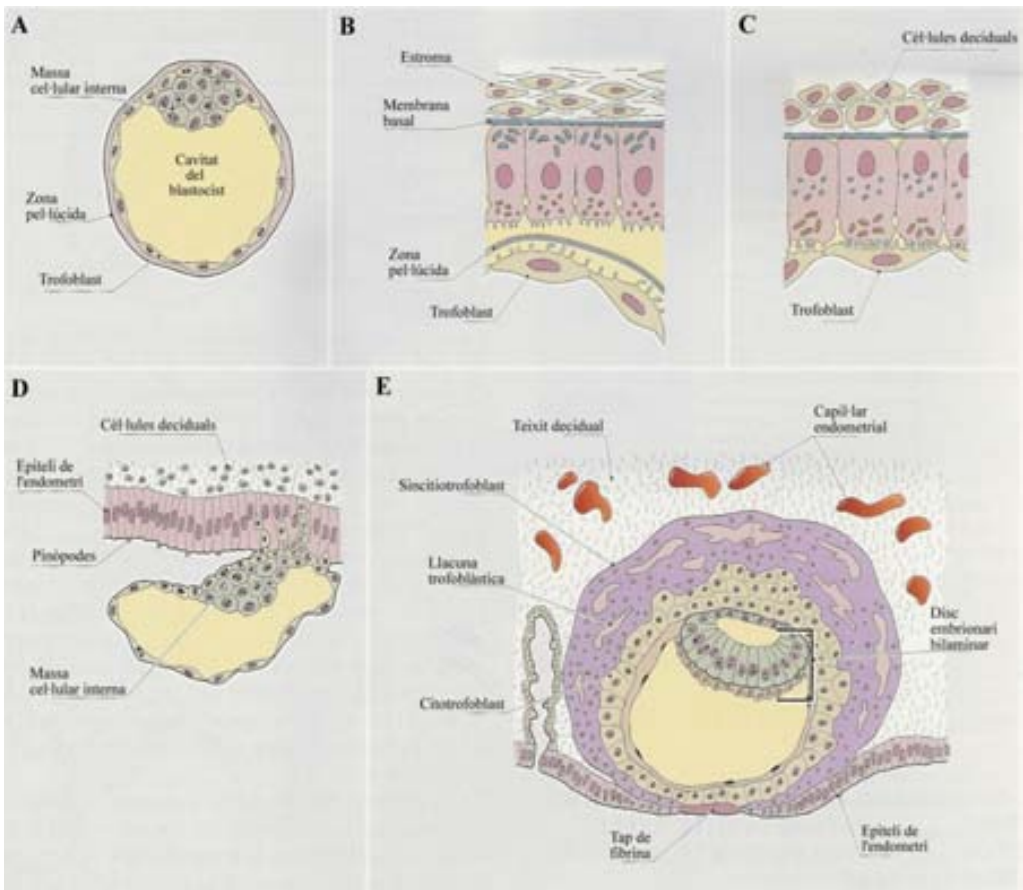


Figura 2. Etapes de la implantació en humans. (A) blastocist; (B) detall d'un blastocist en la cavitat uterina sense exposar els seus receptors a l'epiteli de l'endometri, no hi ha implantació; (C) aposició i adhesió de l'embrió en l'epiteli de l'endometri, inici de la implantació; (D) inici de la invasió embrionària; (E) establiment de l'embrió en l'endometri matern.

Extret de Johnson MH, Everitt BJ. 2000. Essential reproduction. Ed. Blackwell Science. 5ena edició

En aquest període, el teixit trofoblàstic és summament proliferatiu i es troba regulada per nombrosos factors de creixement i citocines produïts en els teixits fetals i materns.

1.1.4 ASPECTES BÀSICS DE LA PROLIFERACIÓ I MORT CEL·LULAR

L'homeòstasi d'un teixit ve donada per un equilibri entre la proliferació, la diferenciació i la mort cel·lular⁶. Aquests processos es donen en una ampla varietat de teixits d'una manera fisiològica o com a regeneració tissular després d'ocasionar un dany. Fisiològicament, aquests mecanismes els trobem en l'endometri⁷, en el desenvolupament embrionari⁸ o en la regeneració de les cèl·lules del sistema

immunològic⁹. Per altra banda, la regeneració després d'un dany tissular està descrita en certs teixits com per exemple en l'estructura òssia¹⁰, en el cartíleg¹¹ o en el múscul¹².

La *proliferació cel·lular* és el procés mitjançant el qual la cèl·lula progenitora es divideix en dues o quatre cèl·lules filles per mitosi o meiosi, respectivament. Tota cèl·lula en mitosi segueix una sèrie de fases que conformen el seu cicle cel·lular. Aquestes fases són la fase G1, la fase S, la fase G2 i la fase M. Les cèl·lules romanen en l'estat de quiescència (fase G0) fins que entren en el procés de divisió cel·lular (fase G1). En aquesta fase, hi ha el primer creixement cel·lular duplicant part del material proteic i lipídic intracel·lular. En la fase S comença la duplicació progressiva de tot el material genètic. Un cop acabada la duplicació de l'ADN, té lloc el segon creixement cel·lular, acabant de duplicar tot el material cel·lular (fase G2). Quan aquesta cèl·lula ja té duplicat tot el material genètic i cel·lular, es dividirà en 2 cèl·lules filles idèntiques a la cèl·lula progenitora en la fase de mitosi (fase M) (figura 3).

La *mort cel·lular* es pot produir per necrosi o per apoptosi. La **necrosi** és un procés passiu en resposta a danys ambientals. En aquesta mort cel·lular la membrana plasmàtica es danya i els components citosòlics cel·lulars s'alliberen a l'espai extracel·lular del teixit. D'aquesta manera es pot produir una resposta inflamatòria de més o menys intensitat, segons el dany ocasionat. L'**apoptosi**, en canvi, és un mecanisme actiu on la cèl·lula decideix la seva mort durant la morfogènesi, l'homeòstasi tissular o l'eliminació de les cèl·lules anòmales. Malgrat això, també hi ha estímuls externs que poden induir l'apoptosi en una cèl·lula. Aquest procés requereix de l'energia produïda per la cèl·lula, és a dir, és un procés trifosfat d'adenosina (ATP)-depenent. La majoria de vegades, els components cel·lulars s'alliberen emmagatzemats dins de petites vesícules anomenades cossos apoptòtics que s'eliminen gràcies a les cèl·lules parenquimals i fagocítiques residents en el mateix teixit, sense produir una resposta inflamatòria. L'apoptosi es caracteritza per l'activació de la cascada de les caspases, reducció del volum cel·lular, exposició del lípid fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmàtica, fragmentació del material genètic, condensació de l'ADN i formació de cossos apoptòtics (figura 4).

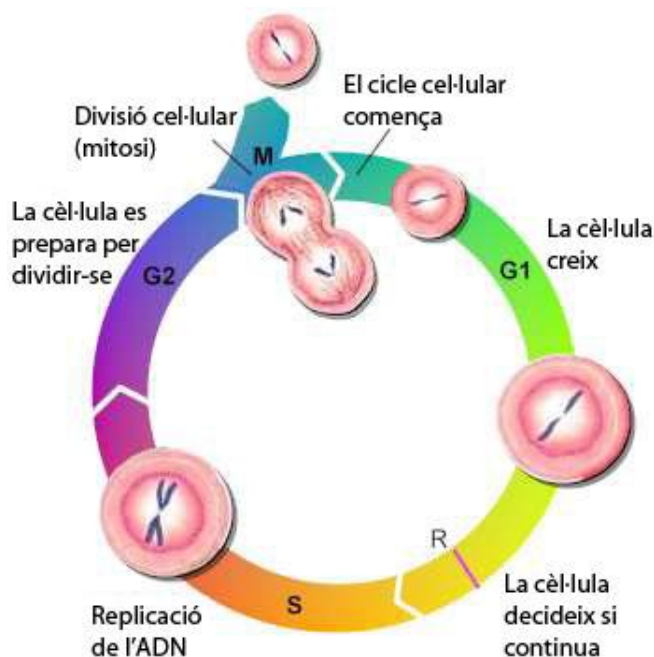


Figura 3. Esquema de les fases del cicle cel·lular.
Extret de <http://scicurious.wordpress.com/2010/07/14/aging-cancer-and-p53/>

1.1.4.1 LA PROLIFERACIÓ I MORT CEL·LULAR EN L'ENDOMETRI

L'endometri és un teixit que realitza més de 400 cicles de regeneració, diferenciació i mort cel·lular durant els anys reproductius de la dona. La proliferació cel·lular de l'endometri en humans està estretament modulada per la progesterona i els estrògens. L'estatus proliferatiu d'aquest teixit, es regula per oscil·lacions en les proteïnes reguladores del cicle cel·lular com les ciclins dependents de quinasses¹³.

Històricament, la menstruació es va associar amb una necrosi isquèmica de la capa funcional de l'endometri causada per la contracció de les artèries que la componen^{14,15}. Estudis més recents, però, han trobat indicis de la presència d'apoptosi en les cèl·lules glandulars durant la fase secretora^{16,17,18}.

<i>Necrosi</i>	<i>Apoptosi</i>
Característiques morfològiques	
<ul style="list-style-type: none"> • Pèrdua de la integritat de la membrana. • Fases inicials amb augment del volum citoplasmàtic i de la mitocondria. • Fases finals amb la lisi total cel·lular. • No formació de vesícules, lisi completa. • Desintegració dels orgànuls. 	<ul style="list-style-type: none"> • No pèrdua de la integritat de la membrana. • Agregació de la cromatina a la membrana nuclear. • Fases inicials amb reducció del volum citoplasmàtic i condensació del nucli. • Fases finals amb fragmentació cel·lular en petites vesícules. • Formació de vesícules formades per la membrana plasmàtica. • Formació de porus en la mitocondria (per acció de la família de les proteïnes bcl-2).
Característiques bioquímiques	
<ul style="list-style-type: none"> • Pèrdua de la regulació de l'homeòstasi de ions. • Sense requeriment de l'energia cel·lular (procés passiu que també transcorre a 4°C). • Digestió aleatòria de l'ADN després de la lisi cel·lular (fase tardana de la mort). 	<ul style="list-style-type: none"> • Procés regulat per fases d'activació enzimàtica. • Dependent de l'energia cel·lular (ATP) (procés actiu que no transcorre a 4°C). • Fragmentació no aleatòria de l'ADN de longitud de un o varis nucleosomes abans de la lisi cel·lular. • Alliberament de varis factors mitocondrials (citocrom C, AIF) en el citoplasme. • Activació de la cascada de les caspases. • Alteració en l'asimetria de la membrana (p.ex. translocació de la fosfatidilserina de la cara citoplasmàtica de la membrana a la extracel·lular).
Significança fisiològica	
<ul style="list-style-type: none"> • Afecta a grups de cèl·lules. • Provoca una resposta inflamatòria. 	<ul style="list-style-type: none"> • Afecta a cèl·lules individuals. • No provoca una resposta inflamatòria.

Figura 4. Característiques morfològiques, bioquímiques i significança fisiològica de la necrosi en comparació a l'apoptosi.

Extret de www.rocche-applied-science.com

Existeixen patologies que transcorren amb una desregulació de la proliferació endometrial. En l'endometriosis existeix una resistència a l'apoptosi de les cèl·lules endometrials durant la fase secretora/menstrual que facilita la supervivència del teixit endometrial ectòpic¹⁸ i una proliferació accelerada d'aquest en la cavitat peritoneal¹⁹. Un altre exemple és l'adenomiosi que es caracteritza per la presència ectòpica de glàndules endometrials en el miometri (la capa muscular subjacent a l'endometri). La seva fisiopatologia també cursa amb una disminució de l'apoptosi i augment de la proliferació cel·lular en l'endometri ectòpic²⁰.

1.1.4.2 LA PROLIFERACIÓ I LA MORT CEL·LULAR EN L'EMBRIÓ

El desenvolupament embrionari es caracteritza per un alt índex de proliferació i diferenciació cel·lular²¹ i a partir de l'estadi de 8 cèl·lules, la taxa de mort cel·lular també augmenta. Així, per un desenvolupament correcte del fetus es necessita una adequada proliferació, diferenciació i eliminació cel·lular²².

En humans, hi ha evidències d'apoptosi i de necrosi en les cèl·lules de trofoblast en el primer trimestre d'embaràs²³. Burton i col. creuen que un ambient deficient en ATP afavoreix a la mort per necrosi. En el primer trimestre d'embaràs es necessita un entorn d'hipoxia per a la proliferació embrionària i en conseqüència hi ha poca producció d'ATP²³. D'aquesta manera, les cèl·lules tenen una alta predisposició a morir per necrosi. L'apoptosi, per altra banda, s'inicia tant per raons fisiològiques com patològiques. Un microambient inadequat pot ocasionar un desenvolupament embrionari pobre, fragmentació cel·lular i finalment apoptosi. També s'ha descrit que els factors de creixement poden influenciar en el desenvolupament embrionari, tant en l'apoptosi com en la supervivència cel·lular²².

Patologies com la preeclàmpsia o el retard en el creixement intrauterí mostren una disfunció placentària que normalment està associat amb una desregulació en l'homeòstasi cel·lular del trofoblast. Encara que hi ha certa controvèrsia, la majoria d'estudis descriuen un augment de l'apoptosi en ambdós patologies²².

1.2 LA IMMUNOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓ

El sistema immunitari té la funció de reconèixer i eliminar un patogen o element estrany. La resposta immunitària es divideix en la immunitat innata i la immunitat adquirida. La immunitat innata és la primera línia de defensa contra les infeccions i es desencadena quan patrons moleculars associats a patogen (PAMP), que estan presents en molts grups de microorganismes, són identificats per receptors de reconeixement d'aquests patrons (PRR) de les cèl·lules de l'hoste. El sistema immunitari innat respon, doncs, d'una manera no específica pel patogen. La immunitat adquirida és una resposta altament específica per a cada patogen i confereix a l'individu la capacitat de recordar-lo i millorar la seva afinitat contra ell, gràcies als processos d'hipermutació somàtica de les cèl·lules B.

En l'embaràs, existeix una immunotolerància que evita el rebuig de l'embrió per part del sistema immunitari matern. D'aquesta forma, malgrat que l'embrió és reconegut com a un al·loinjert per no contenir el mateix sistema principal d'histocompatibilitat (MHC) matern, no es produeix un avortament espontani. Tan important és mantenir aquesta immunotolerància en l'embaràs com evitar possibles infeccions endometrials que són una de les causes de naixements prematurs, retard del creixement intrauterí (IUGR), complicacions en l'embaràs i infertilitat. En humans, s'ha descrit que un 10% dels naixements són prematurs i al voltant d'un 30% d'aquests naixements estan associats amb infeccions intrauterines^{24,25}.

El sistema immunitari matern de l'endometri també regula processos de l'embaràs tan importants com la implantació, la invasió trofoblàstica i el desenvolupament placentari. Les poblacions cel·lulars que ajuden a que es doni la implantació són les cèl·lules NK de la decídua (uNK), els macròfags, les cèl·lules dendrítiques (DCs) i les cèl·lules T, majoritàriament les CD4+²⁶.

Les **uNK** són cèl·lules que juguen un paper molt important en el creixement, diferenciació i invasió del trofoblast en la decídua en els estadis primerencs de l'embaràs. Un 50-70% dels leucocits que es troben en la interfase materno-fetal són uNK. Malgrat que expressen l'antigen de superfície CD56 com les cèl·lules NK de sang perifèrica, són fenotípica i funcionalment diferents entre elles²⁷. Les uNK no expressen o

tenen disminuïda l'expressió de l'antigen de superfície CD16 i no presenten activitat citolítica contra les cèl·lules del trofoblast, malgrat estar en contacte directe amb elles. Hi ha varies hipòtesis que explicarien aquesta tolerància de les uNK front les cèl·lules fetals. Una explicació seria que les cèl·lules del trofoblast expressen els antígens leucocitaris humans (HLA) de classe I no clàssica (HLA-G i HLA-E) i aquestes molècules interaccionen amb els receptors inhibidors de les uNKs, com per exemple, el CD94/NKG2A²⁸. D'aquesta manera, les uNKs no presenten la seva acció citolítica front a les cèl·lules del trofoblast. Vacca i col.²⁹ van descriure la funció inhibidora del receptor 2B4 de les cèl·lules uNK quan s'uneix al seu lligant CD48, present en els macròfags i cèl·lules dendrítiques de la decídua. Per altra banda, Kopcow i col.³⁰ van observar que les uNK no podien formar sinapsis madures ni polaritzar la perforina, i per tant, no podien provocar la lisi d'altres cèl·lules.

Els **macròfags** són unes cèl·lules que participen en la immunitat innata i en la immunitat adaptativa. En l'embaràs, s'observa una alta concentració d'aquestes cèl·lules al voltant de les cèl·lules del trofoblast que envaeixen la decídua en el lloc d'implantació embrionària. Representen el 20-25% dels leucòcits de la decídua i al voltant d'un 10% del total de les cèl·lules d'aquest teixit. Expressen els marcadors de superfície cel·lular típics de macròfags (CD14 i CD68) i l'antigen leucocitari humà de tipus II, HLA-DR³¹. En l'embaràs, els macròfags de l'endometri, les cèl·lules epitelials de l'endometri i les cèl·lules del trofoblast, expressen l'enzim indolamina 2,3-dioxigenasa (**IDO**), que degrada el triptòfan³². Aquest aminoàcid és necessari per a la resposta dels limfòcits T i per tant, l'activitat d'aquestes cèl·lules està disminuïda en aquesta zona, afavorint la tolerància de l'embrió front al sistema immunitari matern. Per altra banda, els macròfags tenen un paper important en la fagocitosi de les cèl·lules apoptòtiques que provenen de la regeneració cel·lular associada al creixement de la placenta. Ajuden, també, en la reorganització de la paret dels vasos de l'úter essencials en la formació de la placenta i en el manteniment de l'embaràs.

Les **cèl·lules T** juguen un paper important en la immunoregulació. Les cèl·lules T col·laboradores (Th) es poden classificar en quatre tipus cel·lulars: les *cèl·lules Th1* i les *cèl·lules Th2* que estan involucrades en la immunitat cel·lular i humoral respectivament, les *cèl·lules Th17* contribueix en els mecanismes d'inflamació i

autoimmunitat i les *cèl·lules T reguladores* (Treg). Es coneix que en l'embaràs hi ha un balanç de la immunitat Th1/Th2 a favor de la Th2, sobretot en la zona materno-fetal. Actualment, aquest balanç s'ha completat amb les cèl·lules Th17 i les cèl·lules Treg establint el paradigma Th1/Th2/Th17 i Treg per explicar l'embaràs i els avortaments que succeeixen en humans³³. Santner-Nanan i col.³⁴ van observar que l'augment de cèl·lules Th17 en la decídua de dones embarassades era perjudicial pel manteniment de l'embaràs.

Les cèl·lules T reguladores (Treg) comprenen el 1-3% de les cèl·lules T CD4+ i coexpressen els marcadors de membrana CD4 i CD25. La seva funció immunoreguladora les diferencia de les altres classes de cèl·lules T, fet que suggereix el seu paper important en el manteniment de l'embaràs i tolerància vers les cèl·lules del trofoblast fetal³⁵. Sasaki i col. van descriure un increment d'aquesta població cel·lular en la decídua i sang perifèrica de dones embarassades respecte a les dones amb avortaments recurrent o dones no embarassades³⁶. Més tard, aquest grup va descriure la disminució de les cèl·lules Treg en sang i decídua de pacients amb preeclàmpsia comparada amb dones que tenien un embaràs normal, fet que corrobora la importància de la seva presència en l'embaràs³⁷.

Les **cèl·lules dendrítiques** (DC) són les cèl·lules mediadores de la immunitat innata a la adaptativa ja que són les cèl·lules presentadores d'antigen professionals i tenen la capacitat d'estimular les cèl·lules T. En la decídua s'ha observat que la població de DC que produeixen IL-12, una citocina proinflamatòria, està disminuïda respecte les DC sanguínies. D'aquesta manera, les DC de la decídua afavoreixen la tolerància materna vers el fetus, gràcies a que mantenen el balanç de citocines Th1/Th2 a favor de les Th2³⁸. En ratolins, s'està identificant un nou paper fonamental de les DC en la implantació. Blois i col. descriuen la importància de les DC en l'angiogènesi de la decídua, en la proliferació de les cèl·lules estromals i en la modulació de la funció de les uNK³⁹.

1.2.1 LES PROTEÏNES REGULADORES DEL COMPLEMENT EN

L'ENDOMETRI

Les proteïnes del complement estan formades per un grup de proteïnes plasmàtiques que interaccionen amb els patògens per a ajudar la seva eliminació. Aquestes proteïnes potencien la resposta immunitària i faciliten la fagocitosi, la inflamació i la lisi del patogen. Aquestes proteïnes es poden activar per tres vies, els processos primerencs de les quals impliquen una sèrie de proteòlisi en cascada que conflueixen en la formació de la C3-convertasa, la qual provoca la ruptura de la proteïna C3. El fragment gran, C3b, s'uneix covalentment a la membrana de patògens i els opsonitza, facilitant la fagocitosi. El C3b unit a la C3-convertasa també inicia una altra cascada de proteòlisi que finalitzen en la formació del complex d'atac a la membrana (MAC), que provoca la lisi cel·lular. El fragment petit, C3a, junt amb altres fragments generats en aquesta cascada de proteòlisis, són els pèptids mediadors de la inflamació (figura 5).

En l'embaràs, la placenta posa en contacte les cèl·lules del trofoblast i la sang materna. S'ha vist que en l'interfase materno-fetal hi ha una acumulació tan de proteïnes del complement primerencs (C1q i C4) i tardanes (C5, C6 i C9), fet que suggereix que el sistema del complement està completament organitzat en aquest teixit⁴⁰. Una activació descontrolada de les proteïnes del complement s'associa amb un rebuig de l'embrió i l'avortament. Malgrat això, certa activació del complement és necessària per a que es produeixi un embaràs normal. La proteïna del complement C1q té un rol molt important en la invasió de les cèl·lules del trofoblast a les artèries en espiral de la placenta i ajuda a la seva interacció⁴¹. Agostinis i col.⁴² van demostrar que el ratolí *knockout* de C1q tenia una deficiència en el desenvolupament dels vasos de la decídua i en la invasió de les cèl·lules del trofoblast. Recentment, Derzsy i col.⁴³ han descrit que els nivells sanguinis de CRP, C4d, C3a, SC5b9, C3 i C9 són estadísticament més alts i l'inhibidor C1 més disminuït en dones embarassades que en dones que no ho estaven.

Les **proteïnes reguladores del complement** (CRPs) eviten que les proteïnes del complement actuïn sobre les cèl·lules pròpies i les destrueixin. Aquestes proteïnes poden ser plasmàtiques o bé unides a la membrana de les cèl·lules de l'hoste. En aquest últim grup trobem el cofactor de membrana (CD46), el factor accelerador de la

degradació (CD55) i la protectina (CD59). La CD46 i la CD55 inhibeixen la formació de la C3-convertasa. La CD59, en canvi, actua inhibint la formació del complex MAC (figura 5).

En l'embaràs, és essencial protegir el fetus de l'atac de les proteïnes del complement maternes i de possibles activacions descontrolades d'aquestes proteïnes en la interfase materno-fetal. Per aquesta raó, tant les cèl·lules del trofoblast com les cèl·lules endometrials expressen CRPs. Nogawa i col.⁴⁴ van descriure la presència de les proteïnes CD46, CD55 i CD59 en l'endometri. Van observar que les proteïnes CD46, CD55 i CD59 es trobaven localitzades en l'epiteli glandular i, excepte la CD55, també en l'endoteli vascular. En l'estroma endometrial no es va detectar cap d'aquest tipus de proteïnes reguladores. Al llarg del cicle menstrual, l'expressió d'aquestes proteïnes en les cèl·lules epitelials glandulars presentaven diferències entre la fase proliferativa i secretora del cicle. Es van observar, predominantment, durant la fase secretora del cicle menstrual⁴⁴. Rooney i col.⁴⁵ van documentar l'expressió d'aquestes proteïnes reguladores en l'epiteli cervical i en les trompes de Fal·lopi. En el nostre grup vam observar un augment de l'expressió d'aquestes proteïnes en la línia cel·lular endometrial RL95-2, en resposta a l'estrès induït pel lipopolisàcarid en un cultiu *in vitro*⁴⁶.

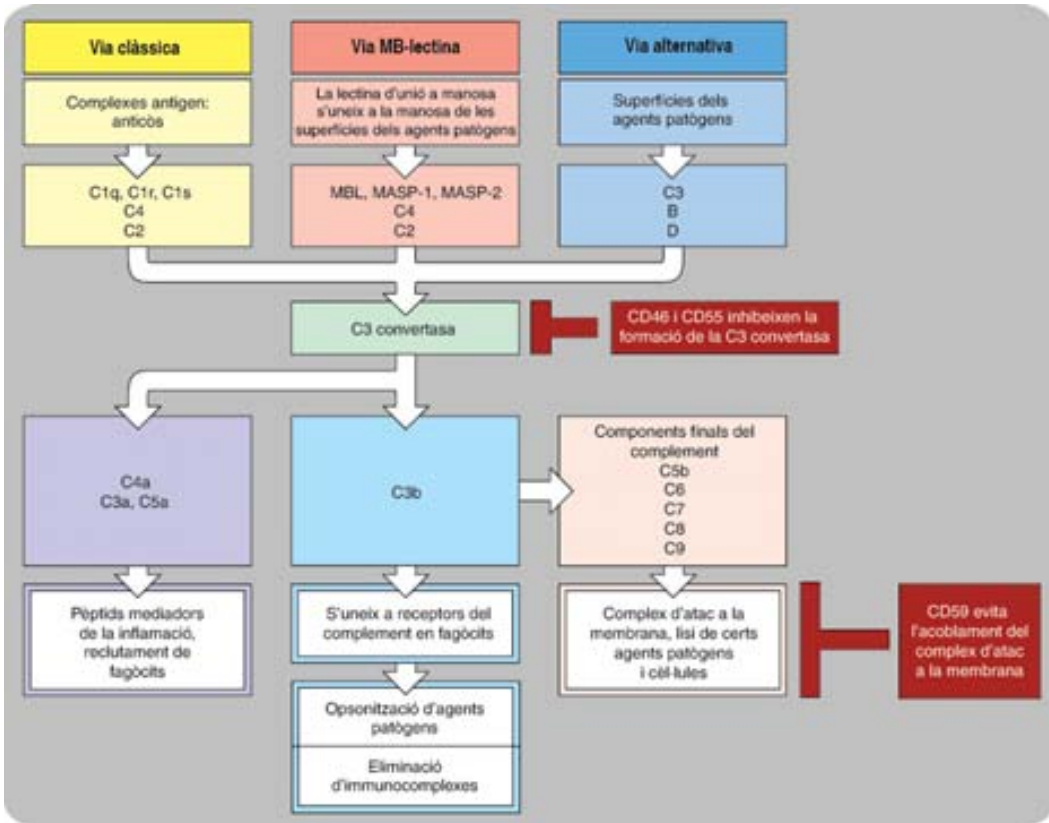


Figura 5. Esquema dels components principals del sistema del complement, accions efectores i les seves proteïnes reguladores. Extret de Janeway i col. 2000. Immunologia. Ed Masson. 4rta edició.

1.3 L'ESTERILITAT I LA INFERTILITAT FEMENINA.

L'esterilitat es defineix com la incapacitat d'aconseguir un embaràs després d'un any de mantenir relacions sexuals normals sense usar mètodes anticonceptius. La infertilitat, és un altre concepte que molts cops s'utilitza com a sinònim de l'esterilitat, encara que no és exactament el mateix. Una parella és infèril quan la fecundació és correcta, però que per alguna raó és incapaç de tenir descendència. En aquests casos, la implantació o la gestació s'interromp per avortaments que poden arribar a ser recurrents. Al voltant d'un 14% de parelles tenen problemes de fertilitat en Europa⁴⁷. L'etiologia de l'esterilitat i/o infertilitat femenina és molt diversa i, a vegades, desconeguda (idiopàtica).

Una de les alternatives per a tenir fills en les parelles estèrils/infèrtils són les tècniques de reproducció assistida (TRA). Encara que la taxa d'embaràs en les TRA ha anat millorant contínuament al llarg dels anys, les possibles causes que podrien explicar les complicacions en l'embaràs d'algunes pacients són els problemes en l'úter matern i la dificultat per a obtenir embrions de bona qualitat i amb el seu correcte desenvolupament. Ambdós factors intervenen, directament, en la implantació de l'embrió. La implantació és un dels processos claus en l'èxit d'aquesta tècnica.

Altres factors externs poden provocar la disminució de la taxa d'implantació. Aquest és el cas de les patologies que cursen amb estrès oxidatiu. S'ha descrit la presència de les espècies reactives d'oxigen en patologies que produeixen esterilitat femenina⁴⁸. Tanmateix, l'estrès oxidatiu és un dels factors més importants que afecten negativament a l'èxit de les TRA⁴⁹ i en la bona qualitat dels embrions obtinguts *in vitro*.

1.3.1 PARÀMETRES CLÍNICS I MORFOLÒGICS EN L'ESTUDI DE LA FERTILITAT

Els paràmetres que s'avaluen en un estudi de fertilitat, sobretot en sotmetre's a tècniques de reproducció assistida, són aquells que ens mostren l'estat de la dona en el moment de la transferència de l'embrió en la cavitat uterina per a valorar la idoneïtat del moment. Aquests valors poden ser la concentració sèrica de la hormona fol·liculoestimulant (FSH) i el gruix i el volum endometrial, entre altres.

La concentració de la **FSH plasmàtica** és un valor a tenir en compte alhora de valorar la fertilitat de la dona. La FSH estimula el creixement i reclutament dels fol·licles immadurs en l'ovari. És la hormona que rescata el fol·licle i l'oòcit de la mort programada (atresia). La concentració d'aquesta hormona és inversament proporcional al nombre i qualitat d'oòcits que genera la dona. Es diu que una dona té una bona reserva hormonal quan la FSH és inferior o igual a 10 mUI/ml. Si aquest valor és alt en una dona no menopàusica, aquesta dona té la reserva ovàrica està disminuïda i per tant, té la fertilitat disminuïda.

El **volum endometrial** i el **gruix de l'endometri** són mesures que preveuen la receptivitat de l'endometri per a que es doni la implantació embrionària. Ambdós

paràmetres que es poden mesurar amb un mètode no invasiu. El gruix de l'endometri dóna una mesura del creixement endometrial durant el cicle menstrual i està àmpliament acceptat que el mínim per aconseguir l'embaràs és de 6mm⁵⁰. El volum endometrial té més valor predictiu sobre l'avaluació de la receptivitat que el gruix de l'endometri, ja que és un paràmetre més homogeni en la seva mesura als diferents centres mèdics. Raga i col. van mostrar que el volum endometrial estava relacionat amb la freqüència d'implantació i l'embaràs. Els pacients que tenien un volum inferior al 2cm³ tenien uns valors d'implantació i embaràs significativament inferiors que els altres grups de pacients amb volums endometrials superiors⁵¹.

1.4 L'ESTRÈS OXIDATIU

L'estrès oxidatiu és un estat cel·lular que cursa amb un desequilibri entre les espècies reactives d'oxigen (ROS) i els agents antioxidants, obtenint concentracions elevades de ROS intracel·lular i també tissulars. Les ROS són produïdes, principalment, pel metabolisme normal cel·lular durant la conversió de l'oxigen molecular (O₂) a aigua (H₂O) en la mitocondria. Aquest grup de molècules inclou el radical superòxid (O₂^{•-}), el peròxid d'hidrogen (H₂O₂) i el radical hidroxil (OH[•]). Les ROS són altament reactives amb les macromolècules cel·lulars com les proteïnes, el DNA i els lípids, ocasionant dany molecular, pèrdua de la funció cel·lular i, en últim cas, apoptosi o necrosi cel·lular⁵². Alhora, la cèl·lula produeix enzims antioxidants com la superòxid dismutasa, la glutatió peroxidasa i la catalasa, que detoxifiquen les ROS (figura 6).

Les ROS, a concentracions fisiològiques, estan implicades en un ampli espectre de funcions cel·lulars, com per exemple transducció de senyals, expressió gènica, eliminació de patògens en els fagosomes dels macròfags, proliferació, diferenciació i mort cel·lular (figura 7). Malgrat això, quan aquestes molècules estan augmentades contribueixen a la patogènesi de nombroses malalties com per exemple l'artritis, el càncer, la psoriasis, l'endometriosi, el parkinson i l'alzheimer. En la reproducció, les ROS tenen un paper important tant fisiològicament com en la patogènesi d'algunes malalties.

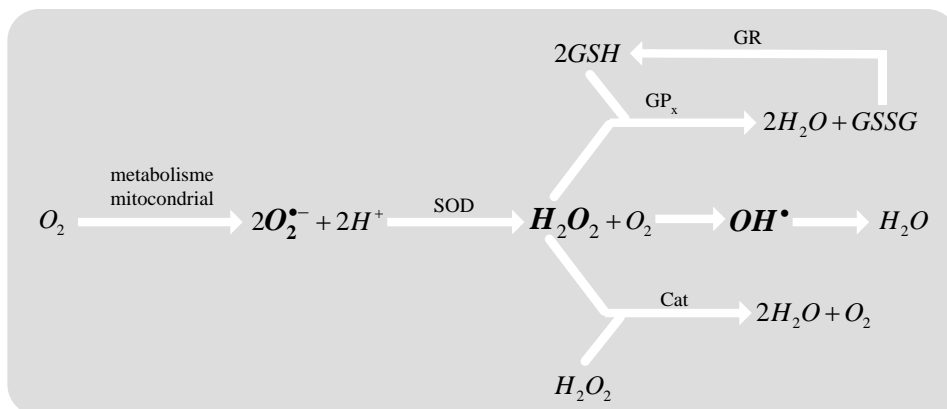


Figura 6. Producció i degradació de les ROS en el metabolisme cel·lular. En negreta les molècules que pertanyen al grup de les ROS. (O_2) oxigen molecular; ($O_2^{\bullet-}$) radical superòxid; (H^+) protó; (SOD) superòxid dismutasa; (H_2O_2) peròxid d'hidrogen; (OH^{\bullet}) radical hidroxil; (H_2O) aigua; (GSH) glutatió; (GR) glutatió reductasa; (GPx) glutatió peroxidasa; (GSSG) glutatió no oxidat; (Cat) catalasa.

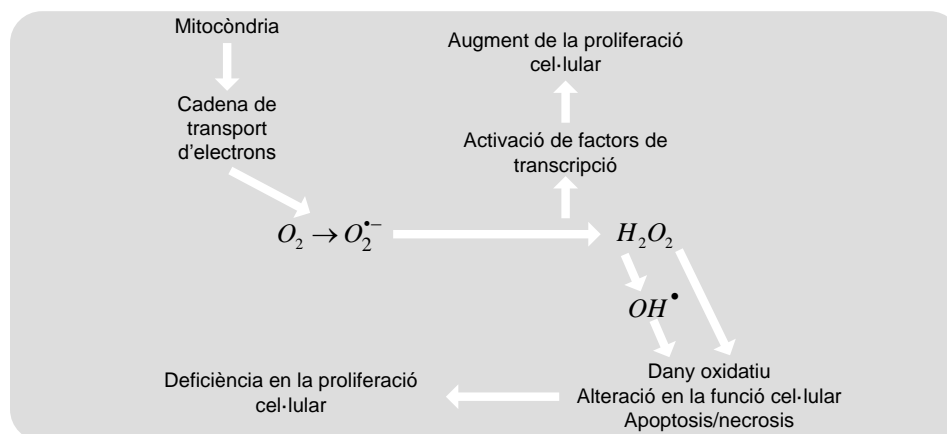


Figura 7. Generació de ROS i el seu efecte en la funció cel·lular. (O_2) oxigen molecular; ($O_2^{\bullet-}$) radical superòxid; (H_2O_2) peròxid d'hidrogen; (OH^{\bullet}) radical hidroxil.

Extret de Birth Defects Res C Embryo Today, 81(3):155-62 (2007).

1.4.1 L'ESTRÈS OXIDATIU I LA INFERTILITAT

La funció de les ROS en la fertilitat masculina s'ha estudiat àmpliament. Aquestes molècules són necessàries per a la capacitació, la hiperactivació, la inducció de la reacció acrosòmica i per a la unió a la zona pel·lúcida i penetració de l'espermatozoide a l'oòcit⁵³. Malgrat això, quan les ROS estan augmentades causen esterilitat. Recentment, el nostre grup ha descrit l'augment de proteïnes oxidades en el plasma seminal de pacients astenozoospermics⁵⁴.

En la fertilitat femenina, s'ha descrit que els estadis primerencs del desenvolupament embrionari cursen en un entorn d'hipòxia. D'aquesta manera, es protegeix el fetus dels efectes nocius i teratogènics dels radicals lliures d'oxigen i permet mantenir l'estat pluripotent de les cèl·lules mare embrionàries^{55,56}. Attaran i col.⁵⁷ van descriure la necessitat de concentracions baixes de ROS en el líquid folicular per a que es produeixi un embaràs en pacients sotmeses a un programa de fecundació *in vitro*. Taylor i col.⁵³ van observar la necessitat de l'equilibri entre les ROS i els enzims antioxidants en el desenvolupament i manteniment de l'embaràs.

L'estrès oxidatiu s'ha associat en ser una de les causes en l'esterilitat femenina, actuant a diferents nivells, com per exemple:

En ovari: Matzuk i col.⁵⁸ van demostrar que l'enzim antioxidant SOD tipus 1 és necessari pel desenvolupament ovàric en ratolins knock-out per aquest gen. Suggereixen que l'excés de radicals lliures provocarien canvis en la biosíntesi hormonal, provocant l'esterilitat en aquest ratolí. L'estrès oxidatiu pot induir la degeneració i l'apoptosi en l'oòcit mitjançant alteració en el fus meiótic així com el dany provocat en la membrana plasmàtica⁵⁹. La pobre qualitat de l'oòcit s'explica, també, per l'increment de l'apoptosi de les cèl·lules de la granulosa provocat per l'estrès oxidatiu⁶⁰.

En l'endometri: L'estrès oxidatiu repercuteix en la qualitat de l'endometri, fet que podria explicar la baixa taxa d'implantació embrionària que s'aconsegueix en pacients estèrils remeses a fecundació *in vitro*. D'aquesta manera, l'estrès oxidatiu provocaria una modificació de la funcionalitat dels receptors de l'endometri, una alteració de l'antigenicitat de molècules (lípidis i proteïnes) de les cèl·lules endometrials i afavoriria l'aparició d'autoimmunitat degut a l'augment del dany tissular ocasionat⁶¹. Alhora,

l'estrès oxidatiu també alteraria el patró de citocines necessari en la implantació. L'endometriosis s'associa amb estrès oxidatiu elevat, una foliculogènesi anormal i una funció immunològica i hormonal alterada. Tot això provoca que la receptivitat endometrial sigui reduïda i per tant, explica les baixes taxes d'implantació embrionària en aquesta patologia⁶⁰.

En la placenta: Varis autors sostenen que l'estrès oxidatiu en la placenta contribueix a la pèrdua de l'embrió en les fases inicials de l'embaràs^{62,63,64}. Un cop es dona la implantació embrionària, les cèl·lules de trofoblast que primerament envaeixen l'endometri, recobreixen la llum de les arteries espirals maternes per augmentar el seu diàmetre i, d'aquesta manera, disminuir la resistència del pas del flux sanguini matern⁶⁵. En la preeclàmpsia existeixen unes interaccions immunològiques aberrants entre el fetus i la mare que provoquen una deficiència del recobriment de les cèl·lules del trofoblast en aquestes artèries i una pitjor perfusió sanguínia de la placenta. La hipòxia crònica o períodes d'hipòxia-reoxigenació provoquen estrès oxidatiu en aquest teixit i augmenten l'apoptosi i necrosi en la placenta^{66,67}.

1.5 ELS ANTIOXIDANTS COM A TERÀPIA EN LA INFERTILITAT

Els antioxidants s'utilitzen per a inhibir els efectes nocius de l'estrès oxidatiu^{68,69} i disminueixen l'efecte oxidant de les ROS en la cèl·lula per diversos mecanismes: catalitzant la reacció de degradació de les ROS, segrestant el radical per a que no pugui reaccionar amb altres molècules, segrestant metalls, etc. Existeixen molts tipus de compostos que tenen una activitat antioxidant, com poden ésser enzims antioxidants endògens o els agents exògens.

Els antioxidants endògens són sistemes enzimàtics que han desenvolupat les cèl·lules per a convertir els oxidants en molècules no tòxiques. D'aquesta manera, protegeixen a l'organisme dels efectes nocius de l'estrès oxidatiu. Aquest és el cas dels enzims superòxid dismutasa (SOD), catalasa (Cat) o glutatió peroxidasa (GPx) (figura 6).

Els antioxidants exògens són aquelles molècules amb propietats antioxidants que s'incorporen a l'organisme mitjançant la dieta. En aquest grup es troben un ampli ventall de molècules com l'àcid ascòrbic (vitamina C), el α -tocoferol (vitamina E), els carotenoids (vitamina A), els antioxidants que presenten grups tiol en la seva estructura química (p.ex. n-acetilcisteïna, cisteïna, GSH), els flavonoids (p.ex. quercetina i catequina) i els segrestadors dels ions metalls (p.ex. transferrina).

En el camp de l'esterilitat masculina, s'ha estudiat la ingesta d'antioxidants orals per a millorar la qualitat de l'esperma. Malgrat que uns investigadors demostraven que la fertilitat augmentava en pacients tractats amb antioxidants, altres no obtenien cap diferència. Per això, l'efectivitat de la teràpia antioxidant oral per a tractar problemes d'esterilitat masculina encara està en debat⁵³.

Malauradament, pocs treballs estudien possibles tractaments antioxidants en l'esterilitat/infertilitat femenina. No se sap segur si la ingestió d'antioxidants orals arribarien al teixit diana, com per exemple, a l'ovari, a les trompes de Fal·lopi o a l'úter, encara que no hi ha dades per pensar el contrari. En el nostre laboratori, s'ha establert un model *in vivo* d'inflamació peritoneal mitjançant la injecció intraperitoneal de LPS en ratolí (4 i 10 mg/kg). En aquest model animal, la viabilitat embrionària està disminuïda, però el pretractament i el postractament amb vitamina E (4 i 10 mg/kg) provoca un increment de la mateixa. El tractament amb aquest antioxidant també disminueix el ROS intracel·lular i l'expressió de IL1B dels macròfags peritoneals dels ratolins amb LPS (annex II)⁷⁰.

Es coneix que les ROS estan associades a processos d'esterilitat femenina o complicacions en el desenvolupament embrionari en humans. Malgrat això, l'utilització d'antioxidants en aquestes patologies encara provoca controvèrsia. La investigació en aquest camp és escassa comparada amb els treballs realitzats d'aquests agents en altres patologies. Encara està en estudi com els antioxidants poden millorar la qualitat de l'endometri en patologies que cursen amb estrès oxidatiu i/o inflamació, i com a conseqüència, poden millorar les taxes d'implantació embrionària, per exemple en pacients remeses a fecundació *in vitro*.

1.5.1 LA N-ACETILCISTEÏNA

Els antioxidants que presenten grups tiol (-SH) en la seva composició actuen realitzant diferents funcions com per exemple mediadors de les reaccions redox amb els radicals lliures, segrestadors de metalls o substrats de reaccions redox⁷¹. La n-acetilcisteïna (NAC) pertany a aquest grup i actua interaccionant amb les ROS (tan amb el H₂O₂ com amb el OH[•]) pel seu grup tiol reduït (figura 8A i 8D)⁷². El NAC s'ha utilitzat per a diferents aplicacions terapèutiques, els mecanismes moleculars de les quals estan molt estudiades. En l'artritis redueix la inflamació, la invasió sinovial i el dany al cartílag; en càncer inhibeix l'angiogènesi i indueix l'apoptosi en cèl·lules transformades; en fetge disminueix l'estrès oxidatiu produït per varis agents i també, protegeix front la fibrosi, la infecció viral i la toxicitat; en determinades cèl·lules, com condrocit i neurones, promou el creixement i supervivència⁷³; en la reproducció, l'acció del NAC no està suficientment avaluada^{74,75}.

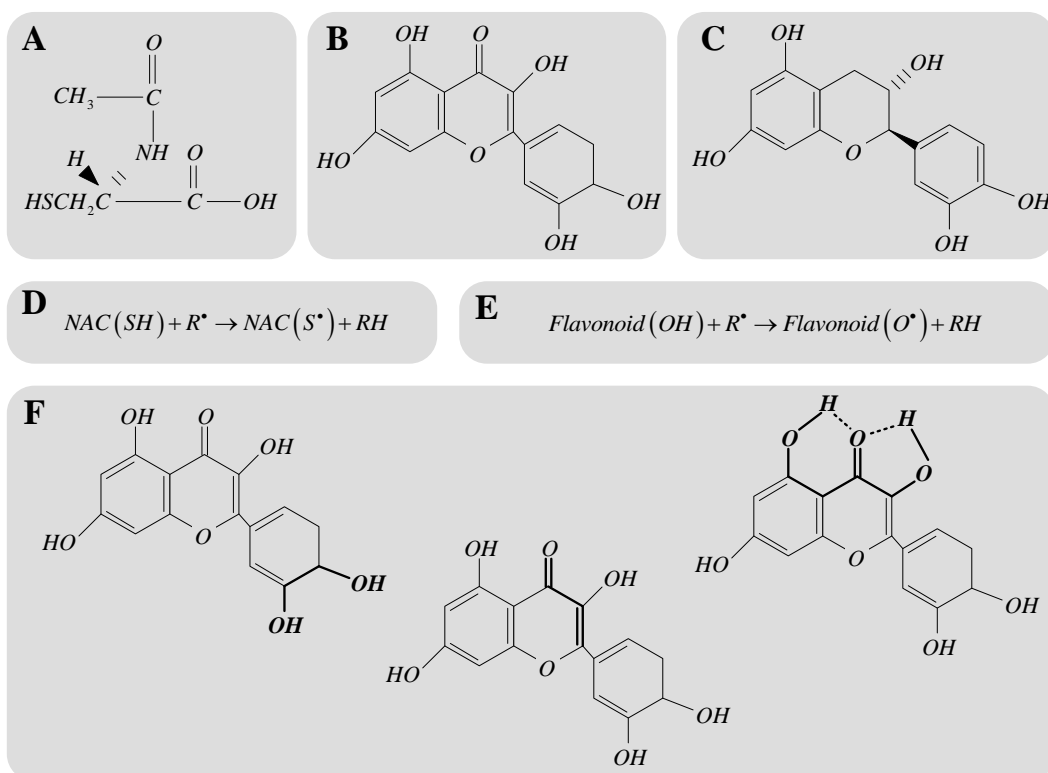


Figura 8. (A) estructura molecular del NAC; (B) estructura molecular de la quercetina; (C) estructura molecular de la catequina; (D) mecanisme antioxidant del NAC; (E) mecanisme antioxidant dels flavonoides; (F) estructures de la molècula dels flavonoides amb acció antioxidant.

1.5.2 ELS FLAVONOIDES

Els flavonoids són un grup de compostos naturals fenòlics que es troben fonamentalment en les fruites, els vegetals, el gra, l'escorça, les arrels, la tija, les flors, el tè i el vi⁷⁶. La seva acció beneficiosa ha fet que algunes plantes tinguin propietats medicinals. Els flavonoids es poden classificar en sis grups, segons la seva estructura molecular (figura 9)⁷⁷. És precisament en tres zones de l'estructura molecular on rau la propietat antioxidant que els flavonoides exerceixen en l'organisme (figura 8F)⁷⁸. Les ROS s'estabilitzen oxidant als flavonoids, i per tant, evita la toxicitat de les ROS en la cèl·lula (figura 8E). L'efecte antioxidant dels flavonoids és el més important però no és l'únic. S'han descrit mecanismes d'acció d'aquests compostos que podrien tenir propietats antiinflamatòries, antial·lèrgiques, antivirals i anticarcinògenes necessàries per a combatre diferents malalties⁷⁹. La quercetina i la catequina s'han estudiat, amb èxit, per a revertir el dany oxidatiu cel·lular *in vitro*⁸⁰ (figura 8B, 8C i 9).

Class	General Structure	Flavonoid	Substitution Pattern	Dietary Sources	TEAC (mM)
Flavanol		(+)-catechin	3,5,7,3',4'-OH	Tea (<i>Camellia sinensis</i>)	2.4
		(-)-epicatechin	3,5,7,3',4'-OH	Tea	2.5
		Epigallocatechin gallate	3,5,7,3',4',5'-OH,3-gallate	Tea	4.75
Flavone		chrysin	5,7-OH	Fruit skins	1.43
		apigenin	5,7,4'-OH	Parsley, celery	
		rutin	5,7,3',4'-OH,3-rutinoside	Red wine, buckwheat	2.4
		luteolin	5,7,3',4'-OH	Citrus, tomato skin	2.1
		luteolin glucosides	5,7,3'-OH, 4'-glucose 5,4'-OH, 4',7'-glucose	Red pepper	1.74 0.79
Flavonol		kaempferol	3,5,7,4'-OH	Leek, broccoli, endives grapefruit, black tea	1.34
		quercetin	3,5,7,3',4'-OH	Onion, lettuce, broccoli tomato, tea, red wine berries, olive oil, appleskin	4.7
		myricetin	3,5,7,3',4',5'-OH	Cranberry grapes, red wine	3.1
		tamarixetin	3,5,7,3'-OH,4-Ome		
Flavanone (dihydroflavonol)		naringin	5,4'-OH,7-rhamnoglucose	Citrus, grapefruit	0.24
		naringenin	5,7,4'-OH	Citrus fruits	1.53
		taxifolin	3,5,7,3',4'-OH	Citrus fruits	1.9
		eriodictyol	5,7,3',4'-OH	Lemons	1.8
		hesperidin	3,5,3'-OH,4'-Ome,7-rutinoside	Oranges	1.08
Isoflavone		genistin	5,4'-OH, 7-glucose	Soybean	1.24
		genistein	5,7,4'-OH	Soybean	2.9
		daidzin	4'-OH, 7-glucose	Soybean	1.15
		daidzein	7,4'-OH	Soybean	1.25
Anthocyanidin		apigenidin	5,7,4'-OH	Colored fruits	2.35
		cyanidin	3,5,7,4'-OH,3,5-Ome	Cherry, raspberry, strawberry	4.42

Figura 9. Classificació, estructura molecular i font alimentària dels diferents flavonoides. Extret de *J Nutr Biochem*, 13:572-584 (2002).

1.5.3 LA VITAMINA E

La vitamina E és una família de 8 molècules liposolubles constituïdes per un anell aromàtic i una cadena lateral lipofílica. Es divideixen en 2 grups: els tocoferols i els tocotrienols, segons si la cadena lateral és saturada o insaturada, respectivament. Cada grup està constituït per 4 isoformes α , β , γ i δ , segons els radicals que conformen l'anell aromàtic (figura 10A). La vitamina E es troba en molts aliments, principalment d'origen vegetal, com les pipes de gira-sol, l'oli d'oliva i la soja. α -Tocoferol és l'antioxidant que es troba majoritàriament en el teixit de mamífers i és un dels compostos lipofílics amb més capacitat antioxidant que es coneix en la naturalesa. Gràcies a que es localitza en la membrana lipídica de la cèl·lula, la seva acció antioxidant es basa en la reducció de la peroxidació lipídica produïda per l'estrès oxidatiu (figura 10B). D'aquesta manera preserva la membrana cel·lular del dany oxidatiu.

Els resultats dels estudis que valoren l'efecte beneficiós de la vitamina E en humans és qüestionat. Recentment, Clark i col. han fet una revisió del tractament amb vitamina E en l'arteriosclerosi i en la preeclàmpsia. Posen de manifest la controvèrsia en la seva efectivitat perquè el resultat d'alguns assaigs clínics consellen la seva administració ja que prevé la peroxidació lipídica, inhibeix l'agregació de plaquetes o junt amb la vitamina C, redueix la pressió sanguínia i l'estrès oxidatiu en dones hipertenses no tractades. Altres estudis, però, han observat un efecte innocu i, fins i tot, advers ja que no veuen que alenteixi el desenvolupament de la preeclàmpsia, que augmenti el pes dels neonats o que disminueixi la hipertensió⁸¹.

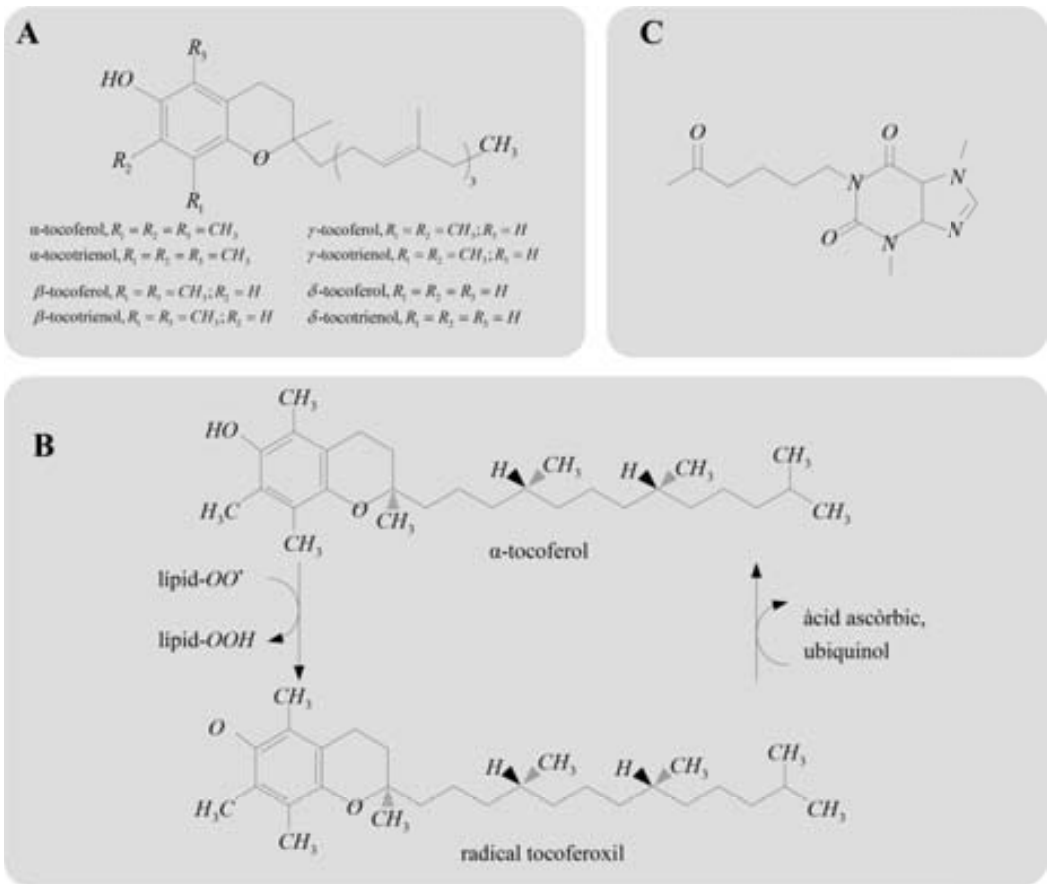


Figura 10. (A) Estructura química de la família de la vitamina E. Els tocoferols i els tocotrienols es diferencien segons si hi ha enllaços simples o dobles enllaços en la cadena lateral, respectivament; (B) mecanisme antioxidant de l' α -tocoferol; (C) estructura química de la pentoxifilina.

1.5.4 TRACTAMENTS COMBINATS AMB ANTIOXIDANTS

Per a millorar l'efectivitat d'aquests antioxidants s'utilitzen tractaments combinats de 2 o més antioxidants. Aquests és el cas d'estudis que s'han realitzat amb vitamina E i NAC, vitamina E amb pentoxifilina o vitamina E i C, entre altres. Malgrat això, encara que falten més estudis per a provar la seva eficiència vers a malalties com la preeclàmpsia o càncer.

1.5.4.1 VITAMINA E AMB PENTOXIFILINA

La pentoxifilina és un derivat de la metilxantina que té una acció vasodilatadora molt important i comunament s'utilitza com a tractament per a malalties vasculars perifèriques (figura 10C). Malgrat això, també s'ha observat un efecte antioxidant⁸² i una acció immunomoduladora, ja que inhibeix la síntesi proteica de $\text{TNF}\alpha$ ⁸³.

El tractament combinat amb α -tocoferol i pentoxifilina s'ha descrit com una teràpia eficient en disminuir la fibrosi, com per exemple en la fibrosi induïda per irradiació del cor de rata⁸⁴. En càncer, aquest tractament antioxidant s'ha estudiat per a disminuir el efectes secundaris de la radioteràpia^{85,86}. En la reproducció, s'ha observat un augment en el gruix de l'endometri en pacients que el tenien disminuït i estaven sotmeses a tractaments de reproducció assistida^{87,88}. Aquest paràmetre és considerat com un prerrequisit per a que es doni la implantació embrionària.

2.HIPÒTESI

L'estrès oxidatiu està en la base de moltes malalties, així com en patologies relacionades amb la fertilitat.

La disminució de l'estrès oxidatiu, mitjançant la utilització d'agents antioxidants pot millorar els paràmetres funcionals de les cèl·lules implicades en la implantació de l'embrió.

3.OBJECTIUS

3.1 OBJECTIUS GENERALS

Els objectius generals d'aquesta tesi són dos:

1. Avaluar l'acció antioxidant de la n-acetilcisteïna (NAC), la quercetina, la catequina i la vitamina E en cèl·lules endometrials i en cèl·lules de trofoblast.
2. Estudiar el tractament combinat de vitamina E i pentoxifilina en dones infèrtils remeses a programes de reproducció assistida.

3.2 OBJECTIUS CONCRETES

- 1.1 Establir un model d'oxidació *in vitro* amb cèl·lules endometrials i de trofoblast per avaluar l'acció antioxidant de diferents agents.
 - 1.2 Estudiar la incorporació del α -tocoferol inclòs en liposomes a les cèl·lules endometrials.
 - 1.3 Analitzar l'efecte dels antioxidants sobre la inducció de mort cel·lular en condicions d'estrès oxidatiu.
 - 1.4 Avaluar les modificacions en el cicle cel·lular de les cèl·lules endometrials i de trofoblast en els processos d'oxidació *in vitro* i en presència dels agents oxidants.
- 2.1 Valorar l'expressió gènica de les proteïnes reguladores del complement (CD46, CD55 i CD59) en l'endometri de pacients fèrtils i infèrtils, abans i després del tractament terapèutic combinat.
 - 2.2 Avaluar l'acció terapèutica de la vitamina E i pentoxifilina sobre paràmetres de l'endometri de pacients infèrtils.

4. MATERIALS I MÈTODES

4.1 CONSIDERACIONS GENERALS

Els materials i mètodes s'han distribuït en dos parts:

PART 1. L'estudi del model *in vitro* d'oxidació cel·lular en cèl·lules endometrials i de trofoblast humanes.

PART 2. L'estudi del tractament combinat de pentoxifilina i vitamina E en pacients infèrtils.

4.2 PART 1: ESTUDI DEL MODEL *IN VITRO* DE L'OXIDACIÓ CEL·LULAR EN CÈL·LULES ENDOMETRIALS I DE TROFOBLAST HUMANES

4.2.1 CULTIU CEL·LULAR

4.2.1.1 CARACTERÍSTIQUES I MANTENIMENT DE LA LÍNIA CEL·LULAR

Les línies cel·lulars utilitzades en aquesta part de l'estudi varen ser la línia endometrial d'adenocarcinoma humà (RL95-2), obtinguda de l'American Type Culture Collection (ATCC, USA) i la línia híbrida de coriocarcinoma-trofoblast (AC-1M59), cedida gentilmente pel Dr. Sedlmayr de la Universitat de Medicina de Graz, Àustria.

La línia endometrial prové d'una dona caucasiana de 65 anys d'edat que va patir un carcinoma endometrial ben diferenciat de grau 2 (fase avançada). Les cèl·lules endometrials tenen unes característiques epitelioides (segons el marcatge amb l'anticòs anti- α -queratina humana) i és positiu pel receptor d'estrògens. Creixen adherides a la superfície de poliestirè del flascó de cultiu, encara que tenen certa tendència a apilar-se en forma de dolmen⁸⁹.

La línia híbrida de trofoblast utilitzada és un subclon de l'híbrid de coriocarcinoma-trofoblast ACH1P. Aquesta línia va ser establerta mitjançant una hibridació somàtica d'un cultiu primari de cèl·lules trofoblàstiques masculines amb la línia cel·lular de coriocarcinoma AC1-1. A partir del passe 15, s'observa una uniforme citomorfologia trofoblàstica semblant a les cèl·lules epitelials i expressa ERK5, citoqueratina I, TNF-R2, VEGFR-2 and IL-2⁹⁰.

El medi utilitzat pel cultiu de les cèl·lules endometrials va ser el medi Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) (Gibco, Invitrogen Corporation) complementat amb insulina (0.005mg/ml) i 10% sèrum fetal boví (FBS) (Gibco, Invitrogen Corporation), prèviament inactivat. Les cèl·lules es van mantenir en una atmosfera de 90% d'aire-10% CO₂ a 37°C. La línia de trofoblast es va cultivar amb el medi Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F-12 (DMEM:F12) complementat amb el 10% de sèrum fetal boví (FBS) i en atmosfera de 95% d'aire- 5% CO₂ a 37°C.

Els subcultius cel·lulars es van realitzar amb tripsina-etilendiamina tetraacètic (EDTA) (Gibco), preparada amb 0.5g/L tripsina (o 0,25g/L per la línia de trofoblast) i 0.2g/L EDTA en Hanks'B.S.S. Després d'un rentat del cultiu amb tampó fosfat salí (PBS), les cèl·lules es van incubar amb tripsina durant 2-4 minuts a 37°C. Posteriorment, es va inactivar aquest enzim amb medi complementat. Es va procedir al recompte cel·lular mitjançant la cambra de Neubauer i amb el colorant vital blau de tripà (0.4%) (Sigma-Aldrich).

Els cultius cel·lulars utilitzats en els experiments d'aquesta tesis eren negatius en la detecció de la contaminació de micoplasma. Es van realitzar dos assaigs per a la detecció d'aquest microorganisme: el MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (Cambrex) i la tinció d'ADN amb 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). També es van sotmetre a aquest assaigs els diferents lots de FBS i tripsina utilitzats, font potencial d'aquestes contaminacions.

4.2.2 ESTABLIMENT DEL MODEL *IN VITRO* D'ESTRÈS OXIDATIU

Es va utilitzar el peròxid d'hidrogen (H₂O₂) (Panreac, Panreac química S.A.) com agent oxidant. En tot aquest estudi el temps d'administració d'aquest agent oxidant va ser de 3 hores. Quan l'experiment es prolonga més temps, l'agent oxidant es va retirar de l'assaig treient el medi de cultiu amb H₂O₂, fent un rentat amb PBS i administrant el medi de cultiu complementat sense l'agent oxidant a les cèl·lules. S'ha de ressaltar que durant l'oxidació amb H₂O₂ el medi utilitzat no està complementat amb FBS, ja que una part de l'efecte oxidant actuaria sobre les proteïnes del sèrum i disminuiria el seu efecte en la cèl·lula.

4.2.3 PREPARACIÓ DELS ANTIOXIDANTS

4.2.3.1 NAC, QUERCETINA, CATEQUINA I α -TOCOFEROL

Els antioxidants utilitzats en aquest estudi van ser la n-acetilcisteïna (NAC), els flavonoides quercetina i catequina i el α -tocoferol, en concentracions no tòxiques per a aquestes línies cel·lulars. Es va preparar una solució estoc de NAC a 600mM en medi de cultiu i de quercetina o catequina a 150mM en dimetilsulfòxid (DMSO). Aquests estocs es van esterilitzats per filtració, amb una membrana de 0,22 μ m de diàmetre abans del seu ús.

La vitamina E, agent liposoluble, es va encapsular en liposomes. Es van utilitzar dos fosfolípids de soja neutres: la fosfatidilcolina natural de soja (SPC) (Epikuron 200) i la fosfatidilcolina hidrogenada de soja (HSPC) (Epicuron 200 SH), ambdós obtinguts de la casa comercial Degussa (Duseldorf, Alemanya). L'altre fosfolípid que es va utilitzar va ser l'àcid fosfatídic dipalmitoil (DPPA), un fosfolípid saturat carregat negativament a PH neutre i que es va obtenir de la casa comercial Lipoid (Ludwigshafen, Alemanya).

4.2.3.1.1 Preparació dels liposomes

Es van preparar 3 tipus de liposomes amb un o dos fosfolípids descrits anteriorment: un liposoma neutre en estat fluid, que es va obtenir mitjançant el fosfolípid SPC, un altre liposoma carregat negativament en estat fluid, que es va generar per la combinació de SPC i DPPA (9:1, pes/pes) i l'últim tipus carregat negativament però en estat gelatinós, produït amb HSPC i DPPA amb una proporció 9:1 (pes/pes). La concentració final de fosfolípid va ser de 40mg/ml i la quantitat de vitamina E va ser de 6,72 mg per cada 40 mg de fosfolípid (figura 11).

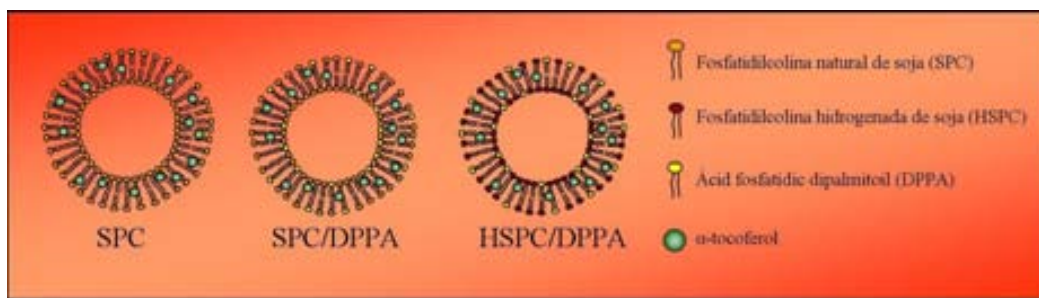


Figura 11. Tipus de liposomes emprats per a la incorporació de la vitamina E en el cultiu cel·lular.

Protocol per a la realització dels liposomes

Es va dissoldre la quantitat apropiada de fosfolípid amb la solució cloroform/metanol (2:1, volum/volum) en un flascó de fons arrodonit. En aquesta solució es va afegir la quantitat proporcional de vitamina E, quan els liposomes contenien aquest antioxidant. La solució es va evaporar mitjançant moviments rotatoris i d'aquesta manera es va obtenir una fina capa homogènia en el fons de flascó. Les traces de cloroform es van eliminar mitjançant liofilització. La capa fina es va hidratar amb PBS per a obtenir la concentració de 40mg de fosfolípid/ml. Posteriorment, la barreja es va vortejar i si era necessari, sonicar fins a la completa homogenització de la mostra. Finalment, per obtenir un menor diàmetre de liposomes es va utilitzar un homogeneïtzador d'alta pressió (Microfluidizer 100S de Microfluidics, Newton, MA), treballant a 4 bars de pressió durant 4 minuts.

La suspensió de liposomes que contenia el fosfolípid hidrogenat es va processar a 55°C.

4.2.3.1.2 Caracterització dels liposomes

La mida dels liposomes es va mesurar a través de la dispersió de llum dinàmica mitjançant un espectrofotòmetre de partícules (UPA 150 ultra-fine particle-analyser spectrometre de Microtrac, Montgomeryville, PA).

Les mostres es van diluir en PBS i es van adquirir durant 10 minuts. Després del seu anàlisi, els resultats es van representar com la mitjana del diàmetre i la mitjana de l'amplada, calculada com la meitat del diàmetre de la població de partícules que contenien el 68% dels liposomes.

4.2.3.2 MESURA DE L'INCORPORACIÓ CEL·LULAR DEL α -TOCOFEROL

La vitamina E es pot quantificar mitjançant l'utilització de la cromatografia líquida d'alta resolució de fase reversa (RP-HPLC). Aquesta tècnica separa els components d'una mescla basant-se en les diferents propietats físico-químiques de les molècules. Es realitza mitjançant el bombeig d'un líquid (fase mòbil) per una columna cromatogràfica (fase estacionària) a alta pressió. En aquest cas, la naturalesa polar o apolar dels components fa que es retardin diferencialment en el decurs del seu avanç per la columna i com a conseqüència, se separin. El temps que tarda un compost a ser eluït de la

columna s'anomena temps de retenció i és una propietat identificativa característica del compost sota les condicions experimentals.

Protocol de la quantificació de la vitamina E

Es van cultivar 25.000 cèl·lules endometrials per pou en plaques de 96 pouets i es va incubar amb 1,6 µg/pou de α -tocoferol durant 0, 1, 3, 6 i 24h. Després d'aquest temps es va agafar el sobrenedant de 3 pouets en les mateixes condicions i es va realitzar un rentat amb PBS per recollir la possible vitamina E que quedés en el pouet. Es van ajuntar el sobrenedant i el rentat i es va afegir el mateix volum de 0,1% d'àcid trifluoroacètic en aigua. La vitamina E d'aquesta solució es va quantificar mitjançant RP-HPLC (Beckman System Gold, Detector 166). Es va dur a terme en la columna C18 (Vydac) de 4,6mm x 250mm i la precolumna de C4. Es van utilitzar un gradient de 2 solucions com fase mòbil. La solució A composta per 0,1% d'àcid trifluoroacètic en aigua i la solució B que contenia acetonitril i metanol (70:30) amb 0,1% d'àcid trifluoroacètic. Es va realitzar un gradient lineal del 85% de la solució B: 15% de la solució A fins arribar al 100% de la solució B durant 24 minuts i amb un flux de 1ml/minut. La detecció de l'elut es va realitzar a 295nm (figura 12).

Es va realitzar una recta patró de 3 a 20 µg de la vitamina E inclosa en liposomes i dissolta en el medi de cultiu ($r^2=0.99$) (dades no mostrades en aquesta tesis). La quantificació de la vitamina E del sobrenedant del cultiu es va realitzar mitjançant la integració de l'àrea del pic que corresponia a la vitamina E en l'àrea del pic de la recta patró.

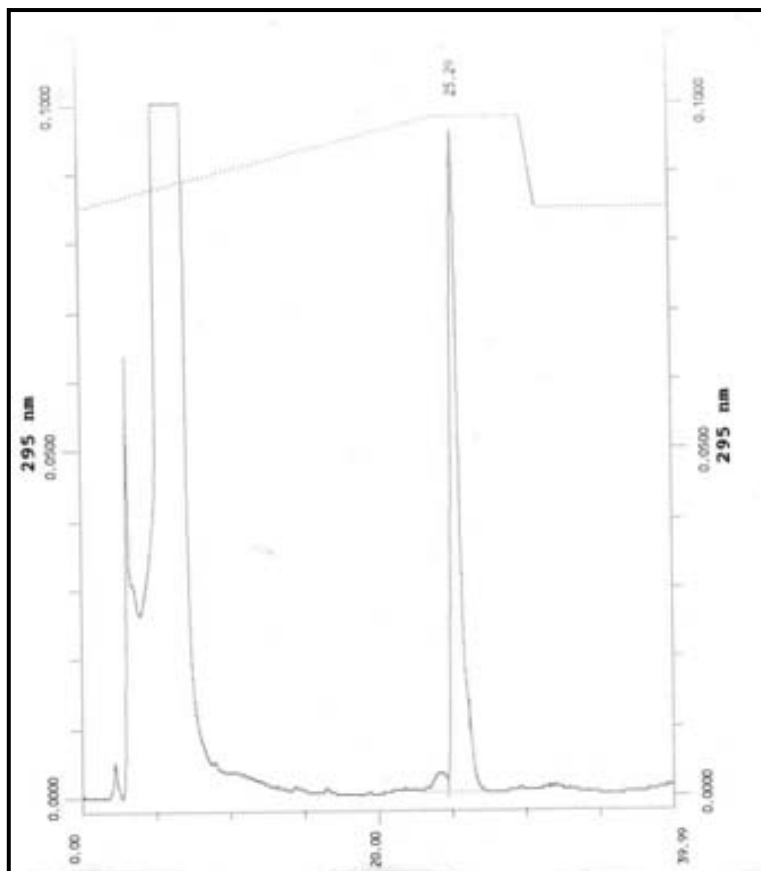


Figura 12. Detecció de la vitamina E per HPLC.

4.2.4 DISSENY EXPERIMENTAL DEL TRACTAMENT ANTIOXIDANT

Es van utilitzar 5 tipus de tractament antioxidant (figura 13). Aquests van ser:

1) **Pretractament (Pre-T)**: es van incubar les cèl·lules amb l'antioxidant durant 24h. Després es va produir l'oxidació (3h) i després es va mantenir el cultiu durant 24h en medi complementat.

2) **Cottractament (Co-T)**: es va incubar l'oxidant i l'antioxidant junts (3h).

3) **Postractament (Post-T)**: es va produir l'oxidació (3h) i després d'un rentat amb PBS, es va afegir l'antioxidant durant 24h.

4) **Cottractament + post-incubació de l'antioxidant (CoPost-T)**: la coïncubació oxidant-antioxidant (3h) es complementa amb una post-incubació de l'antioxidant sol (24h).

5) **Cottractament + pre- i post-incubació de l'antioxidant (PreCoPost-T)**: l'antioxidant està present en tots els moments de l'estudi, és a dir, abans (24h), durant (3h) i després (24h) de l'oxidació.

En les cèl·lules endometrials, es va realitzar els tractaments 2, 3, 4 i 5 pel NAC i els flavonoides. Per la vitamina E es va utilitzar els tractaments 1, 2, 4 i 5. En el cas de les cèl·lules de trofoblast, únicament es va utilitzar el tractament 2, com s'observarà en resultats.

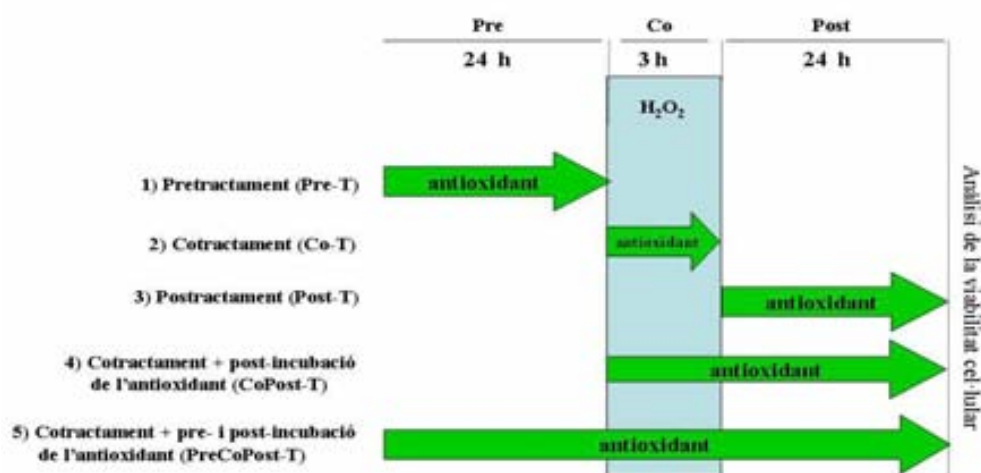


Figura 13. Tipus de tractaments utilitzats en l'estudi dels agents antioxidants en el model d'oxidació *in vitro*. Les fletxes indica la presència d'antioxidant en el cultiu cel·lular.

4.2.5 VALORACIÓ DE LA VIABILITAT CEL·LULAR (ASSAIG DE MTT)

La valoració de la viabilitat cel·lular es va realitzar mitjançant la determinació de l'activitat enzimàtica cel·lular, pel mètode de bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-tetrazol (MTT). Aquest assaig avalua l'activitat de l'enzim succinat deshidrogenasa (SDH) de les mitocondries de les cèl·lules en cultiu. La SDH catalitza la conversió del MTT a un formazan intracel·lular de color púrpura, que és soluble amb DMSO i quantificable en un espectròmetre. La quantitat de cèl·lules metabòlicament actives és directament proporcional a la absorbància obtinguda.

-Protocol per a determinar les concentracions de H₂O₂ o antioxidant utilitzat en el nostre model d'oxidació de cèl·lules endometrials i cèl·lules de trofoblast

Es van cultivar 25.000 cèl·lules vives/pou en plaques de cultiu de 96 pouets, excepte en les 2 fileres i les 2 columnes més externes de la placa que es van omplir amb 200µl de PBS o medi. D'aquesta manera es va formar una càmera humida, evitant l'evaporació del medi de cultiu. Es va establir aquest número de cèl·lules cultivades ja que existia una correlació lineal entre els valors de viabilitat obtinguts per l'assaig de MTT i el nombre de cèl·lules vives cultivades (5.000-50.000 cèl·lules) (dades no presentades en aquesta tesis).

Es va testar concentracions creixents de H₂O₂ de 10⁻⁶ a 10² mM i de 10⁻² a 5 mM per a les cèl·lules endometrials i de trofoblast, respectivament. La concentració d'ús dels antioxidants en els experiments posteriors es va determinar com la concentració màxima que no disminuïa la viabilitat cel·lular. Així es va testar varies concentracions d'antioxidant per a les cèl·lules endometrials: NAC (3-100mM), quercetina (10-1000µM), catequina (50-1000µM) i vitamina E inclosa en liposomes (0,026-26µg/pou). Per a les cèl·lules de trofoblast es va analitzar la viabilitat cel·lular que produïa el NAC (0,5 a 25mM) i els flavonoides (0,5 a 150µM).

Després de 24h de sembrar les cèl·lules en les paques de cultiu, es va rentar amb 200µl de PBS i es va afegir 200µl de medi amb diferents concentracions de H₂O₂ durant 3 hores. Llavors, es va rentar el cultiu amb PBS i es va deixar 24 hores més amb el medi complementat. Posteriorment es va rentar la placa amb PBS, es va incubar amb 100µl de medi complementat que contenia 0.5mg/ml de MTT durant 3 hores (temps determinat

experimentalment). Es va eliminar el sobrenedant i el formazan intracel·lular produït per les cèl·lules es va dissoldre amb 100µl de DMSO. Es va llegir l'absorbància a 490nm mitjançant l'espectrofotòmetre per a plaques Victor3 (PerkinElmer). D'aquesta manera, per a les cèl·lules endometrials es va analitzar la citotoxicitat del H₂O₂ en dos moments: just després de l'oxidació (3h) i 24h després sense l'oxidant (3+24h). Per a les cèl·lules de trofoblast, es va analitzar la viabilitat cel·lular després de l'oxidació (3h). Per a la valoració de la citotoxicitat dels antioxidants, les cèl·lules es van incubar 24h amb diferents concentracions d'aquests agents. Després es va analitzar la viabilitat mitjançant l'assaig de MTT.

Es van realitzar 5 rèpliques per a cada condició experimental en cada placa. Els valors de viabilitat cel·lular es van obtenir després de restar el valor obtingut del control negatiu (pou amb medi però sense cèl·lules). Posteriorment, la viabilitat es va expressar com el percentatge respecte al seu control que representa el 100%. Aquest control es va realitzar en les mateixes condicions experimentals però sense oxidant i en la mateixa placa experimental. Tots els experiments es van realitzar un mínim de 3 vegades.

-Protocol per a la valoració de l'activitat antioxidant en el model d'oxidació

Per a la valoració de l'activitat antioxidant front al H₂O₂ es va utilitzar les concentracions de H₂O₂ de 0, 0,1, 1, 2, 3, i 5 mM per a les cèl·lules endometrials i de 0, 0,1, 1, 1,5, 2 i 2,5 mM per a les de trofoblast, ambdós amb o sense antioxidant, en cada placa de 96 pouets. Després de l'incubació oxidant-antioxidant, es va realitzar l'assaig de MTT.

El processament de les dades es va realitzar de la mateixa manera que s'ha explicat en l'apartat anterior.

4.2.5.1 AVALUACIÓ DE LA CITOTOXICITAT CEL·LULAR

Es va avaluar la citotoxicitat de l'agent oxidant considerant els valors de viabilitat obtinguts mitjançant l'assaig de MTT. D'aquesta manera, definim com **citotoxicitat nul·la** quan la viabilitat cel·lular és superior o igual a 85%, **citotoxicitat moderada** quan aquests valors estant entre 85-50% i **citotoxicitat severa** si la viabilitat és inferior o igual a 50%.

4.2.5.2 ANÀLISI ESTADÍSTICA DE LA VIABILITAT CEL·LULAR.

Per a les cèl·lules endometrials, la comparació de múltiples grups experimentals es va realitzar mitjançant l'anàlisi de variància (ANOVA) d'un factor. En el cas de que l'ANOVA resultés significatiu, es va comparar individualment els grups mitjançant el test Student-Newman-Keuls. En aquest cas, es va utilitzar el programa estadístic SPSS.

Per a l'anàlisi de les dades de les cèl·lules de trofoblast es va utilitzar un model lineal amb mesures repetides⁹¹. Això és, prenent com a variable resposta el valor en percentatge de la viabilitat es van establir dos models lineals: l'un amb variable explicativa la concentració d'oxidant (valoració de l'acció oxidant) i l'altre amb l'antioxidant (valoració de l'acció dels antioxidants). En ambdós models es va tenir en compte la presència de mesures repetides fruit de tenir més d'una rèplica en cadascuna de les plaques experimentals. A partir d'aquests models es va obtenir la magnitud de l'efecte global de l'oxidant o antioxidant, així com el corresponent p-valor ($Pr > F$) per poder concloure si l'efecte era estadísticament significatiu o no (annex III, taula *Type 3 Test of Fixed Effects*). A més, per poder comparar entre concentracions d'oxidant o entre els diferents antioxidants, es van calcular els corresponents estadístics de contrast per a la comparació dos a dos fent ús de la correcció de Tukey per tenir en compte la multiplicitat de contrastos que es varen realitzar (annex III, taula *Differences of Least Squares Means*). En aquest cas obtenim el corresponent p-valor (columna Adj P) amb el seu interval de confiança (columnes Adj Lower i Adj Upper), fixant el nivell de significació al 0,05 ($\alpha < 0,05$). Per tant, per a tots els casos, els valors de Adj P < 0,05 es van considerar estadísticament diferents.

Els resultats estadístics es van obtenir utilitzant el software SAS v9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

4.2.6 ANÀLISI DE L' APOPTOSI EN EL MODEL D'OXIDACIÓ

L'anàlisi de la inducció de l'apoptosi front a l'estrès oxidatiu es va realitzar mitjançant dos mètodes: la valoració de l'activació de la proteïna intracel·lular caspasa-3 i la detecció de la externalització del fosfolípid de membrana fosfatidilserina.

4.2.6.1 MÈTODE DE QUANTIFICACIÓ DE L'ACTIVACIÓ DE LA CASPASA-3

Per valorar l'activitat de les caspases DEVD (Àcid aspàrtic-àcid glutàmic-valina- àcid aspàrtic) (Asp-Glu-Val-Asp) pèptid específiques, com per exemple la caspasa-3 i la caspasa-7, varem utilitzar el kit comercial EnzChek caspasa-3 assay kit 2 (Molecular Probes). Aquest assaig es basa en la ruptura de la sonda rodamina 110 bis-(*N*-CBZ-*L*-aspartyl-*L*-glutamyl-*L*-valyl-*L*-aspartic acid amide) (Z-DEVD-R110) per les caspases DEVD-específiques, produint una emissió de fluorescència a 520nm (excitació/emissió 496/520nm). Es va corroborar l'especificitat de la tècnica utilitzant l'inhibidor de la caspasa-3 (Ac-DEVD-CHO), subministrat en el kit.

-Protocol per a la valoració de l'activitat caspasa-3

Es va cultivar 700.000 cèl·lules vives endometrials i 400.000 cèl·lules vives de trofoblast en plaques de 35mm i 60mm de diàmetre, respectivament. Després del tractament amb H₂O₂ (3h), amb o sense antioxidant, les cèl·lules es van incubar durant 15h i 21h en medi complementat. Aquest temps es va determinar experimental realitzant una cinètica d'activació d'aquest enzim i de 18 a 24h és el temps en que hi havia la màxima activitat de la caspasa-3. Així, a les 18h (3+15h) i 24h (3+21h) després d'iniciar l'experiment, es va recollir les cèl·lules del sobrenedant junt amb les cèl·lules adherides, despreses mitjançant un rascador de cultiu cel·lular. El botó cel·lular es va congelar i emmagatzemar a -80°C. En el moment de l'anàlisi, es va seguir el protocol suggerit pel fabricant. Breument, les cèl·lules es van lliar amb 105µl de tampó de lisis (200mM TRIS, pH 7,5, 2M NaCl, 20 mM EDTA i 0,2% Tritó X-100) subministrat en el kit. Es van incubar en gel aproximadament 30 minuts, fins a lliar-les completament. Es va utilitzar 100µl de lliat cel·lular per a l'assaig de la valoració de l'activitat caspasa-3 i 4 µl para la quantificació de la proteïna total amb el kit Quant-iT Protein Assay (invitrogen), utilitzant el fluorímetre Qubit (invitrogen). D'una mateixa mostra, es va incubar 50µl de mostra amb 1µl de 1mM de Ac-DEVD-CHO i uns altres de 50µl amb 1µl DMSO durant 10 minuts a temperatura ambient. Finalment, ambdós es van incubar amb Z-DEVD-R110 (concentració final de 25µM) durant 50 minuts (temps determinat experimentalment). Es va realitzar una recta patró diluint el fluoròfor rodamina (R110) i es va llegir utilitzant els filtres F485/F535nm (ex/em) en el lector de fluorescència per a plaques Victor3 (PerkinElmer).

El valor de fluorescència obtingut per cada mostra es va extrapolar en la recta patró de la rodamina R110 i racionalitzar pel valor de la proteïna total del cultiu. Posteriorment, es van estandarditzar els valors respecte del control (cultiu sense antioxidant ni H₂O₂), per tant, el resultat és una variable que representa les vegades que l'activació de la caspasa-3 augmentava o disminuïa respecte al control. Cada condició experimental es va repetir un mínim de 3 vegades.

4.2.6.1.1 Anàlisi estadística

Per analitzar l'efecte de la concentració d'oxidant sobre l'activació de la caspasa-3 es va utilitzar, per a cada condició experimental, el valor màxim d'activació obtingut entre les 18h i les 24h. Tenint en compte que la variable resposta té valors estandarditzats respecte del valor control, es van prendre els logaritmes. Per dur a terme l'anàlisi es va establir un model lineal generalitzat amb variables explicatives: la citotoxicitat produïda i els antioxidants. Els resultats es van obtenir primer per la condició sense antioxidant, on l'objectiu era fer una comparació de l'activació de la caspasa-3 per a les diferents condicions de citotoxicitat (valoració de l'acció oxidant) i en segon lloc, estratificant per l'antioxidant, es van obtenir les diferències que presenta la caspasa-3 en les dos condicions de citotoxicitat estudiades (valoració de l'acció dels antioxidants). A partir d'aquests models es va obtenir la magnitud de l'efecte global de l'oxidant o antioxidant, així com el corresponent p-valor ($Pr>F$) per poder concloure si l'efecte era estadísticament significatiu o no (annex IV, taula *Type 3 Test of Fixed Effects*). Si l'efecte era significatiu es van calcular els corresponents estadístics de contrast per a la comparació dos a dos fent ús de la correcció de Tukey (annex IV, taula *Differences of Least Squares Means*). En aquest cas, obtenim el corresponent p-valor (columna Adj P) amb el seu interval de confiança (columnes Adj Lower i Adj Upper), fixant el nivell de significació al 0,05 ($\alpha<0,05$). Per tant, per a tots els casos, els valors de Adj P<0,05 es van considerar estadísticament diferents.

Totes les anàlisis es van realitzar amb el programa SAS v9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

4.2.6.2 MÈTODE PER LA DETECCIÓ DE L'EXTERNALITZACIÓ DE LA FOSFATIDILSERINA

L'anexina V és una proteïna cel·lular que s'uneix a fosfolípids carregats negativament d'una manera Ca^{2+} -depenent i, en especial, té una gran especificitat a la fosfatidilserina. La tinció amb anexina V conjugada a un fluorocrom (An) i iodur de propidi (PI) ens permet distingir, d'una manera molt clara, entre cèl·lules vives (An-/PI-), cèl·lules en apoptosi primerenca (An+/PI-) i cèl·lules mortes (PI+). Es pot observar la seva fluorescència en un microscopi de fluorescència, o bé, quantificar-les en un citòmetre de flux.

Per a la valoració de l'apoptosi mitjançant la doble tinció amb anexina i iodur de propidi es va utilitzar el kit comercial Annexin-V-FLUOS staining kit (Roche Molecular Biochemicals) i les cèl·lules es van analitzar mitjançant citometria de flux (FACSCalibur-Becton Dickinson). El fluorocrom conjugat a la anexina V va ser la fluoresceïna (FITC) (ex/em 488nm/518nm), que en el citòmetre de flux es detecta mitjançant el filtre dicroic band pass 530/30 (FL1). El iodur de propidi (ex/em 488nm/617nm) es va detectar mitjançant el filtre dicroic band pass 585/42 (FL2).

-Protocol per a la detecció de l'externalització de la fosfatidilserina

Es van cultivar 700.000 cèl·lules vives endometrials i 400.000 cèl·lules vives de trofoblast en plaques de 35 mm i 60 mm de diàmetre respectivament, i es va realitzar el tractament oxidant i/o antioxidant durant 3 hores. Després d'un rentat amb PBS, les cèl·lules es van incubar amb medi complementat fins al seu anàlisi, durant 21h o 45h. Posteriorment, es van recollir les cèl·lules del sobrenedant amb les cèl·lules adherides, mitjançant una tripsinització suau del cultiu. Després d'un rentat amb PBS, es va realitzar la tinció a la concentració indicada pel fabricant durant 15 minuts. Posteriorment, es van adquirir 10.000 cèl·lules amb el citòmetre de flux i es va analitzar l'apoptosi i la mort cel·lular mitjançant un diagrama de punts FL1 vs FL2 amb el programa CellQUEST-Pro.

Es va obtenir el percentatge de la població cel·lular que raïa en cada quadrant del diagrama de punts mitjançant els estadístics calculats pel programa informàtic del citòmetre. Les cèl·lules es varen classificar en tres grups: les cèl·lules vives (An-/PI-), les cèl·lules apoptòtiques (An+/Pi-) i les cèl·lules mortes (PI+) (figura 14).

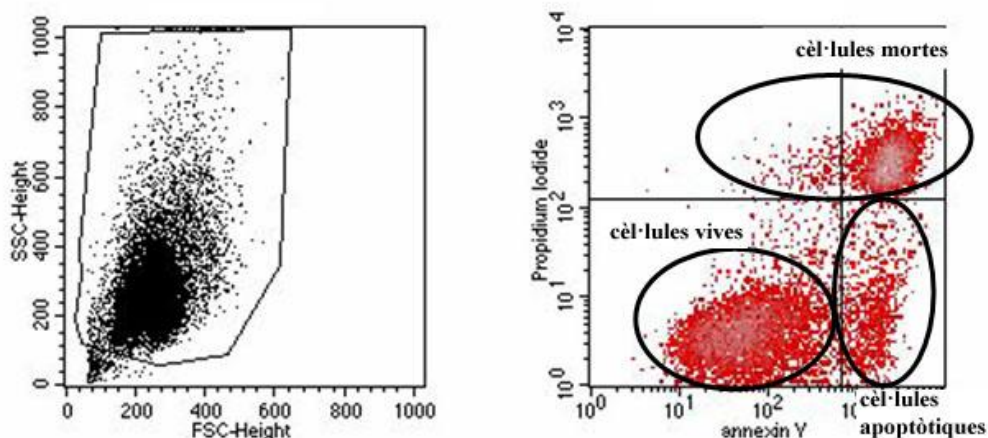


Figura 14. Diagrama de les cèl·lules endometrials per citometria de flux. A: Finestra d'adquisició de cèl·lules segons la mida (FSC-H) i complexitat cel·lular (SSC-H). B: Classificació de les cèl·lules segons la tinció amb anexina-FITC i iodur de propidi.

4.2.6.2.1 Anàlisi estadística

Per a l'anàlisi estadística d'aquestes dades es va utilitzar un model lineal generalitzat. Això és, prenent com a variable resposta el percentatge de cèl·lules es van establir dos models lineals: l'un amb variable explicativa la concentració d'oxidant (valoració de l'acció oxidant) i l'altre amb l'antioxidant (valoració de l'acció antioxidant) i, separadament, per les observacions a 24h (3+21h) i a 48h (3+45h). A partir d'aquests models es va obtenir la magnitud de l'efecte global de l'oxidant o antioxidant, així com el corresponent p-valor ($Pr > F$) per poder concloure si l'efecte era estadísticament significatiu o no (annex V, taula *Type 3 Test of Fixed Effects*). A més, per poder comparar entre concentracions d'oxidant o entre els diferents antioxidants, és van calcular els corresponents estadístics de contrast per a la comparació dos a dos fent ús de la correcció de Tukey per tenir en compte la multiplicitat de contrastos que es varen realitzar (annex V, taula *Differences of Least Squares Means*). Així, obtenim els estadístics corresponents al p-valor (columna Adj P) amb el seu interval de confiança (columnes Adj Lower i Adj Upper), fixant el nivell de significació al 0,05 ($\alpha < 0,05$). Per tant, per a tots els casos, els valors de Adj $P < 0,05$ es van considerar estadísticament diferents.

Tots els resultats es van obtenir utilitzant el software SAS v9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

4.2.7 AVALUACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR

La quantificació del contingut d'ADN ens permet analitzar el percentatge de cèl·lules en les diferents fases del cicle cel·lular (G0-G1, S, G2-M). El contingut d'ADN cel·lular s'analitza mitjançant colorants fluorescents d'ADN per citometria de flux. La fluorescència emesa per una única cèl·lula és proporcional al seu contingut d'ADN, podent determinar en quina fase del cicle es troba cada cèl·lula.

En aquest estudi es va utilitzar el iodur de propidi (PI) com a colorant d'ADN. Aquest colorant s'intercala en la doble cadena dels àcids nuclèics de les cèl·lules mortes (o cèl·lules vives que es van fixar i permeabilitzar), emetent fluorescència. Per a realitzar els histogrames del contingut d'ADN es va detectar la fluorescència del PI mitjançant el filtre Long Pass 670 nm (FL3-A).

L'adquisició de les cèl·lules es va realitzar d'una manera molt meticulosa per evitar falses interpretacions. Es va realitzar una finestra d'adquisició en la població per mida i complexitat cel·lular (FSC-H i SSC-H). D'aquesta, es va adquirir les cèl·lules simples refusant els possibles doblets cel·lulars, poliploidies, debris cel·lular i agregats cel·lulars (figura 15A). Es va realitzar l'anàlisi mitjançant el programa informàtic d'anàlisi de cicle cel·lular per a dades que provinguin del citòmetre de flux, ModFit LT. Aquest programa ens permeten ajustar, mitjançant models matemàtics, les corbes gaussianes que corresponen a la distribució de cèl·lules en fase G0/G1 i G2/M i la regió entre elles, la fase S (figura 15B). Així, obtenim el percentatge cel·lular per a cada una de les fases del cicle cel·lular.

-Protocol d'anàlisi del cicle cel·lular per citometria de flux

Es va sembrar 700.000 cèl·lules vives endometrials i 400.000 cèl·lules vives de trofoblast en plaques de 35mm i 60mm de diàmetre. Les cèl·lules es van incubar durant 3h amb l'oxidant, amb o sense antioxidant i es van deixar en medi complementat durant 21h o 45h. Després, el cultiu cel·lular es va tripsinitzar, es va resuspendre amb una solució d'etanol fred al 70% i es va guardar a -20°C fins al seu anàlisi. En aquest moment, es va rentar amb PBS i el botó cel·lular es va resuspendre amb 1ml del tampó de tinció (0,1% v/v tritó X-100 -Sigma-aldrich-, 0,2mg/ml DNase-free RNAsa -Roche-, 20µgr/ml PI -Sigma-aldrich- en PBS) durant 30min a temperatura ambient. La RNAsa

d'aquest tampó evita la fluorescència produïda per dobles cadenes ADN-ARN o ARN-ARN. Es van adquirir entre 20.000-25.0000 cèl·lules simples mitjançant el citòmetre de flux (FACSCalibur-Becton Dickinson) i es va analitzar el percentatge de la població en cada fase del cicle.

Cada experiment es va realitzar entre 2-8 vegades i es va enregistrar el valor del percentatge de la població cel·lular en cada fase del cicle per a cadascun dels experiments.

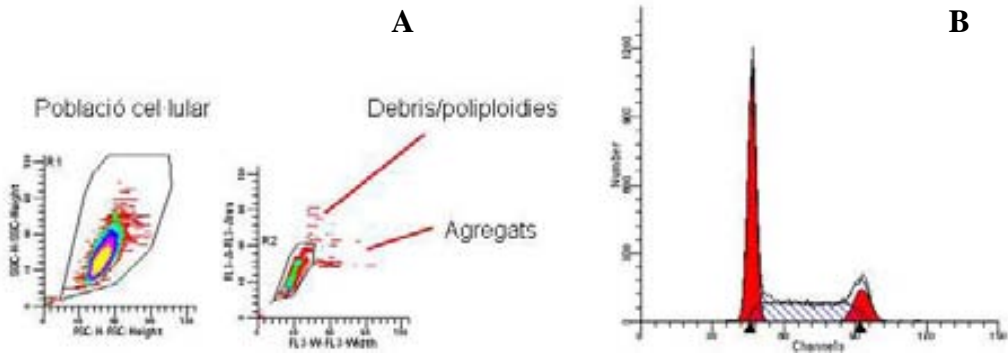


Figura 15. Adquisició i anàlisi de les cèl·lules per determinar les fases del cicle cel·lular. (A) finestra d'adquisició de cèl·lules simples. (B) modelatge del cicle cel·lular mitjançant el programa informàtic ModFit LT.

4.2.7.1 ANÀLISI ESTADÍSTICA

Els resultats es van analitzar mitjançant l'anàlisi de dades composicionals⁹². Aquest tipus d'anàlisi estadística té en compte que el triplet donat per la freqüència cel·lular en les diferents fases del cicle sempre sumen el 100% de les cèl·lules, o dit d'una altra manera, quan una fase augmenta, hi ha una altra que ha de disminuir. Per tant, es va analitzar el cicle com a un perfil cel·lular compost per les tres fases del cicle i no com a tres fases individuals del cicle. Els valors del cicle cel·lular es van representar en un diagrama ternari on cada punt té les coordenades de les tres fases de cicle i d'aquesta manera es pot observar que punts més pròxims són estadísticament similars i punts més llunyans, són estadísticament diferents (figura 16A).

Per dur a terme l'anàlisi d'aquestes dades, el triplet donat per la freqüència dels cicles es va transformar en un vector de dues components les quals es podien analitzar i representar la pla de dos dimensions⁹³ mantenint la disposició inicial de les dades (figura

16B). S'ha establert un model lineal generalitzat, similar al realitzat per McCullagh i Nelder⁹⁴, on les noves coordenades són la variables resposta en funció del cicle, el temps, la concentració d'oxidant i els antioxidants. D'aquesta manera es va obtenir la magnitud de l'efecte global de l'oxidant o antioxidant, així com el corresponent p-valor ($Pr > F$) per poder concloure si l'efecte era estadísticament significatiu o no (annex VI, taula *Type 3 Test of Fixed Effects*). A més, per poder comparar entre les citotoxicitats produïdes (valoració de l'acció oxidant) o entre els diferents antioxidants (valoració de l'acció dels antioxidants), es van calcular els corresponents estadístics de contrast per a la comparació dos a dos fent ús de la correcció de Tukey (annex VI, taula *Differences of Least Squares Means*). En aquest cas vam obtenir el corresponent p-valor (columna Adj P) amb el seu interval de confiança (columnes Adj Lower i Adj Upper), fixant el nivell de significació al 0,05 ($\alpha < 0,05$). Per tant, per a tots els casos, els valors de Adj P $< 0,05$ es van considerar estadísticament diferents.

Totes les anàlisis es va realitzar amb el programa SAS v9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

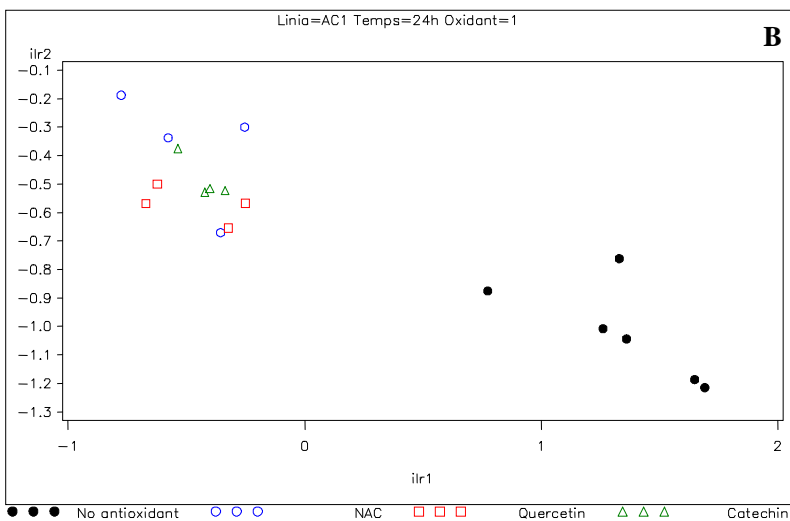
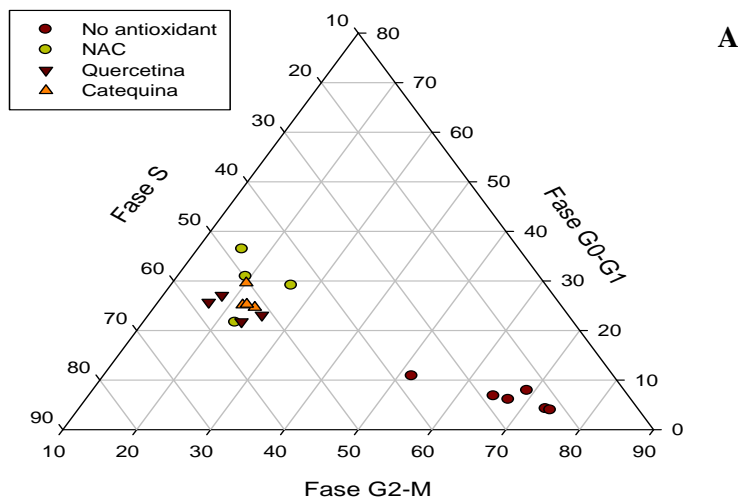


Figura 16. Representació gràfica dels casos per a observar que no es perd informació de les dades en la transformació matemàtica aplicada pel seu anàlisi estadístic. (A) gràfic ternari; (B) transformació en el pla de dos dimensions.

4.3. PART 2: ANÀLISI DEL TRACTAMENT COMBINAT DE PENTOXIFILINA I VITAMINA E EN PACIENTS INFÈRTILS

4.3.1 CRITERIS D'INCLUSIÓ EN L'ESTUDI. VALORACIONS CLÍNiques DELS PACIENTS EN ESTUDI

Aquest estudi es va realitzar amb 14 pacients infèrtils de l'hospital Centre Hospitalier Intercommunal Poissy-Saint-Germain-en-Laye (França) que acudien a la consulta de fertilitat (grup estudi) i 11 dones fèrtils (grup control). Els pacients inclosos presentaven, en la fase lútea del cicle menstrual (entre els dies 20-23), un volum endometrial inferior o igual a 2 cm³. La majoria d'aquests pacients havien patit múltiples avortaments espontanis en 10 o més embrions transferits en protocols de reproducció assistida. Totes les pacients tenien una bona reserva hormonal (FSH<10mIU/ml) i la mitjana d'edat era de 35 anys (25-41 anys). Es va valorar el volum endometrial i el grossor de l'endometri mitjançant un ultrasò en 3D amb un angiògraf.

Es va obtenir el consentiment informat de tots els pacients inclosos en aquest estudi i el Consell de Revisió Institucional d'aquest hospital va aprovar el protocol d'investigació utilitzat (CCPPRB, protocol 01-78).

4.3.2 DESCRIPCIÓ DEL TRACTAMENT

Als pacients inclosos en aquest estudi es va administrar el tractament combinat de pentoxifilina (800 mg/dia) i vitamina E (1000 IU/dia) per via oral durant 2-3 mesos. Abans i després del tractament es va obtenir la biòpsia endometrial.

4.3.3 OBTENCIÓ I CONSERVACIÓ DE LA MOSTRA

La biòpsia endometrial realitzada en les dones fèrtils i infèrtils, es va obtenir en el dia 7-9 després del pic de la hormona LH, identificat mitjançant anàlisi de sang seriats. Les biòpsies es van realitzar mitjançant un "cornier pipelle" estàndard, el procediment habitual per l'obtenció de biòpsies endometrial d'aquest hospital. Immediatament, van ser transferides en un vial amb la solució estabilitzadora d'ARN RNAlater (Ambion) i emmagatzemades a -80°C.

4.3.4 EXPRESSIÓ GÈNICA DE PROTEÏNES REGULADORES DEL COMPLEMENT

4.3.4.1 EXTRACCIÓ D'ARN TOTAL I TRACTAMENT AMB DNASA

L'extracció de ARN es va realitzar mitjançant un kit d'extracció de ARN en columnes de sílici (RNeasy plus mini kit, Qiagen), seguint les recomanacions del fabricant. Breument, es va disgregar i homogeneïtzar les biòpsies mitjançant un homogeneïtzador de teixit (TissueRuptor, Qiagen) en el tampó de lisis. Posteriorment, es va realitzar el tractament amb DNAsa i es va unir el ARN en les membranes de sílice pel seu aïllament. Es va rentar i eluir el ARN.

4.3.4.2 RETROTRANSCRIPCIÓ DE L'ARN MISSATGER

La retrotranscripció és el procediment pel qual es sintetitza l'ADN complementari (cDNA) al ARN extret. La retrotranscripció es va realitzar mitjançant el kit Omniscript reverse transcriptase, Qiagen. Aquest enzim és un enzim recombinant heterodimèric que s'expressa en *E.coli* i té, a part de l'activitat ADN polimerasa ARN dependent, l'exoribonucleasa (RNase H) que degrada l'ARN quan es troba en l'híbrid ARN:ADN. Aquesta característica de l'enzim fa millorar la sensibilitat de la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR).

-Protocol per la retrotranscripció

Es va barrejar 1µg d'ARN (lliure d'ADN genòmic) amb 2µl del tampó de reacció 10X (Qiagen), 1µl de oligo dT (0,25µg/µl) (Amersham Biosciences Europe GmbH), 2µl de dNTPs 5mM (Qiagen), 0,5µl de inhibidor de RNAsa (40U/µl) (Invitrogen), 1µl de Omniscript reverse transcriptase (4U/µl) (Qiagen) i H₂O-PCR fins a un volum final de 20µl. Es va incubar la reacció a 37°C durant 60 minuts. Es va guardar el cDNA sintetitzat a -20°C.

4.3.4.3 REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) A TEMPS REAL

La PCR és una tècnica que permet l'amplificació de seqüències específiques d'ADN *in vitro* d'una forma exponencial. Es realitza mitjançant diferents cicles de temperatura i amb una ADN polimerasa termostable (Taq DNA polimerasa). La PCR a temps real es

basa en la detecció puntual de la fluorescència que és incorporada en l'amplímer que es va generant. La fluorescència es genera a través de l'addició d'un fluorocrom en la barreja de reacció, com per exemple, el Sybr Green. Degut a la monotrització del procés, es pot observar la cinètica de síntesis d'ADN, descrivint una corba sigmoïdal. El moment exacte on l'amplificació exponencial es comença a detectar s'anomena crosspoint o punt de creuament (CP). El CP és indirectament proporcional al logaritme en base 10 de la concentració de l'ADN inicial. D'aquesta manera, si la quantitat inicial d'ADN és major, l'amplificació es comença a detectar en cicles més primerencs (CP més baix) que si la concentració d'ADN és menor. Es pot quantificar exactament l'ADN inicial si es referència a una recta patró de seqüències d'ADN de concentracions conegudes.

La PCR a temps real es va realitzar mitjançant el kit LightCycler FastStart DNA Master Sybr Green I (Roche). Aquest kit conté la Taq DNA polimerasa FastStart, el tampó de reacció, la barreja de dNTP (amb dUTP en comptes de dTTP), el fluorocrom Sybr Green I i $MgCl_2$. Es va utilitzar el termociclador LightCyclerTM 2.0 (Roche).

La Taq DNA polimerasa FastStart és una Taq DNA polimerasa modificada químicament que s'activa preincubant la reacció a 95°C durant 10 minuts, abans de l'inici dels cicles de temperatura de la PCR.

El fluorocrom Sybr Green I s'intercala en la doble cadena d'ADN, augmentant la seva fluorescència (100 vegades) respecte a la seva forma lliure. El seu espectre d'excitació té un màxim a 497 nm i d'emissió a 520 nm (en els equips de LightCycler s'utilitza el filtre de 530 nm per detectar-ho). És important tenir en compte que la seva fluorescència no es específica de l'amplímer, sinó que qualsevol doble cadena sintetitzada dona fluorescència com per exemple els dímers d'encebadors o possibles amplificacions inespecífiques. Per aquesta raó, les condicions de PCRs que vam optimitzar per a cada gen, no s'observava cap amplificació inespecífica.

-Disseny d'encebadors

El disseny d'encebadors es va realitzar mitjançant el programa informàtic Oligo 6. Es va seleccionar els parells d'oligòmers que tinguessin unes característiques òptimes per a la PCR, com per exemple, temperatures de desnaturalització similar, dímers entre oligòmers de baixa afinitat i entre ells mateixos i que s'unissin en exons diferents.

Finalment, es va procedir a testar l'especificitat dels oligòmers a la seqüència del nostre gen en la base de dades genòmica americana Genbank i el programa Blast on-line (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

Els encebadors utilitzats van ser:

β -actina (618 pb): sentit 5' aat ctg gca cca cac ctt ct 3'

antisentit 5' cgg atg tcc acg tca cac tt 3'

CD46 (192 pb): sentit 5' ctg tac tcc ttc tcc gat 3'

antisentit 5' atc tga gac agg tag cc 3'

CD55 (316 pb): sentit 5' tga tga agg aga gtg gag tgg c 3'

antisentit 5' ggt tac tag cgt ccc aag caa ac 3'

CD59 (391 pb): sentit 5' aca atg gga atc caa gga ggg 3'

antisentit 5' ctt agg gat gaa ggc tcc agg 3'

-Establiment de les condicions de les PCRs

Es van testar diferents condicions en la PCR: $MgCl_2$ i temperatura de nidació. En les condicions establertes no es van apreciar amplificacions inespecífiques en un gel d'agarosa (figura 17) i la corba d'amplificació observada a temps real era exponencial (figura 18A).

Les condicions d'amplificació van ser:

	$MgCl_2$ (mM)	T ^a nidació (°C)	T ^a lectura (°C)
β-actina	3	72	87
CD46	3	64	72
CD55	3	72	72
CD59	3	67	72

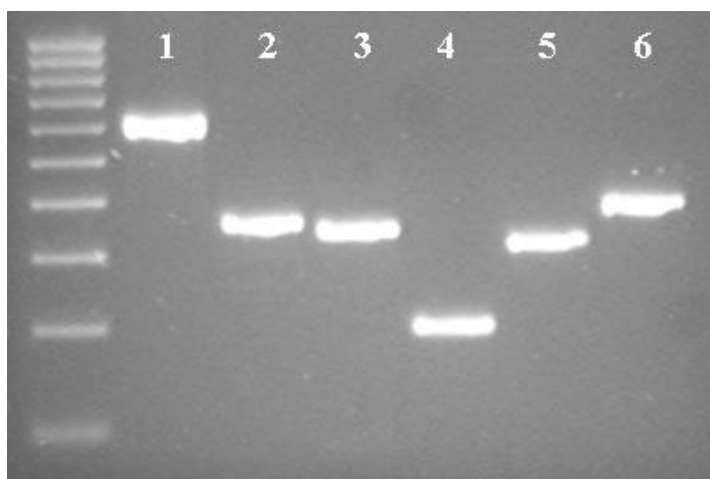


Figura 17. Visualització de l'amplificat de la PCR a temps real en un gel d'agarosa al 2%. (1) β -actina; (2) control de pes molecular de 351 parell de bases (pb); (3) control de pes molecular de 339 pb; (4) CD46; (5) CD55; (6) CD59.

-Establiment de la recta patró i seqüenciació de l'amplificat

La recta patró per la quantificació de cada gen es va realitzar amb diferents concentracions conegudes d'amplificat/ μ l (estàndards) (figura 18B). L'amplificat es va obtenir purificant el producte de la PCR d'un gel d'agarosa mitjançant les columnes GFXTMPCR DNA and Gel Band purification kit (Amersham Biosciences). Un cop extret, es va quantificar comparant la intensitat de la banda de l'amplificat amb pesos moleculars de concentració coneguda (100bp Ladder Marker, Biotools) en un gel d'agarosa al 2%.

La seqüenciació de l'amplificat es va realitzar en el Servei de Seqüenciació d'ADN de la Universitat Autònoma de Barcelona. Els resultats de la seqüenciació es mostren en l'annex VI. Posteriorment, es va confirmar que la seqüència amplificada pertanyia a cadascun del gen d'estudi amb el programa Blast on-line.

-Protocol de la PCR a temps real

El volum final per a la reacció de PCR va ser de 10 μ l, on 9,6 μ l eren de la barreja de reacció (amb 0,5 μ M de cada primer) i 0,4 μ l de cDNA (mostra o estàndard). El volum final de PCR és la meitat de la recomanada pel fabricant (Roche), ja que aquesta modificació no influïa en el CP sinó en el moment que la reacció arriba a la saturació.

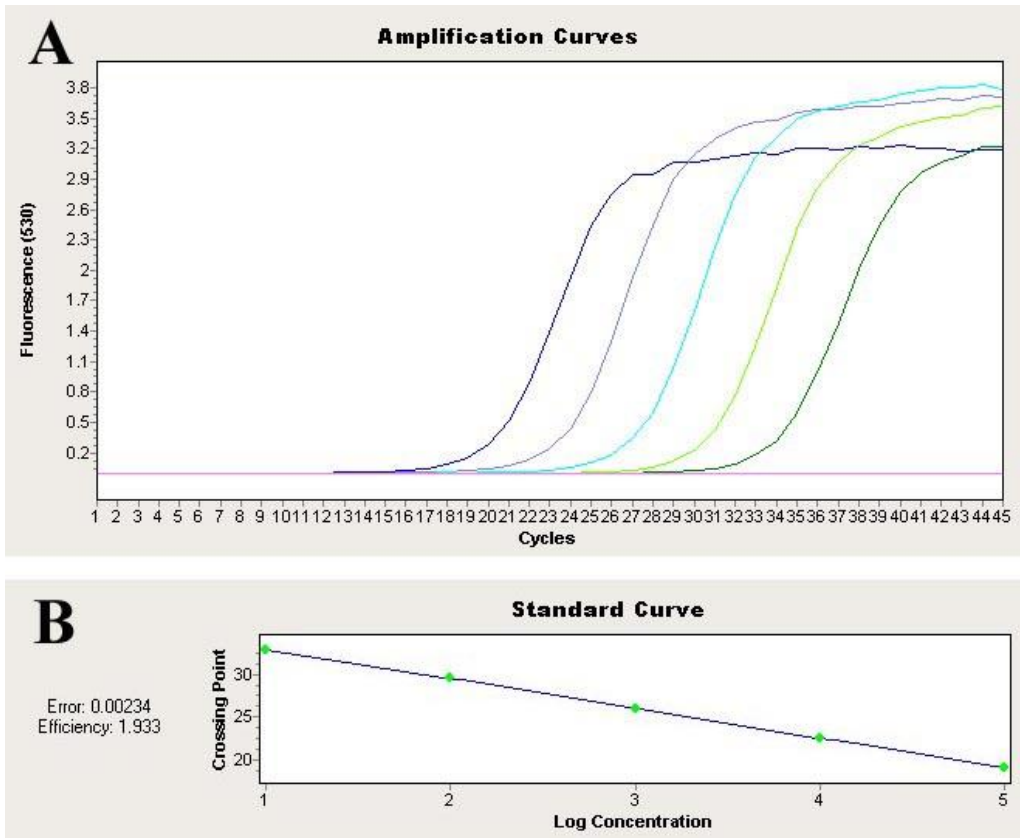


Figura 18. (A) corbes d'amplificació dels estàndards visualitzada en el programa Lightcycler software. (B) recta estàndard calculada automàticament pel programa de la Lightcycler.

4.3.5 PROCESSAMENT DE LES DADES I ANÀLISI ESTADÍSTICA

La quantificació dels resultats es va realitzar mitjançant el programa LightCycler software versió 4.0, el qual determina automàticament el nombre de còpies de cDNA (i per tant de l'ARN missatger –mARN-) de la mostra gràcies a l'extrapolació del seu CP en la recta patró dels estàndards (CP vs logaritme del nombre de còpies). El valor de l'expressió gènica és el resultat de normalitzar el nombre de còpies de mARN del gen d'estudi amb el valor de β -actina del mateix mARN i aquest valor va ser multiplicat per 10^3 . Per tant, els valors s'expressen com a còpies de mARN del gen d'estudi per a cada 10^3 còpies de mARN de la β -actina.

L'anàlisi de l'efecte del tractament en pacients infèrtils es va realitzar mitjançant el test t-student per a dades aparellades. En el cas que les dades no seguissin una distribució normal, es va utilitzar el test no paramètric Wilcoxon Signed Rank Test. La comparació

entre l'expressió gènica dels pacients infèrtils i les dones fèrtils, així com entre pacients infèrtils tractats i de les dones fèrtils, es va realitzar mitjançant el test t-student o el test no paramètric equivalent, Mann-Whitney Rank Sum Test. Per aquest anàlisi es va eliminar aquell valor superior a la mitjana més dos desviacions estàndard. Per a valorar la correlació entre les tres proteïnes CD46, CD55 i CD59, es va utilitzar el test de la P-Pearson.

En tots els casos, els valors de $p < 0,05$ es van considerar estadísticament diferents. L'anàlisi de les dades es va realitzar mitjançant el programa SigmaPlot (versió 11).

5.RESULTATS

PART 1.

5.1 ESTABLIMENT DEL MODEL *IN VITRO* D'ESTRÈS OXIDATIU EN CÈL·LULES ENDOMETRIALS HUMANES. VALORACIÓ DE L'ACTIVITAT ANTIOXIDANT DEL NAC, ELS FLAVONOIDES I LA VITAMINA E

5.1.1 ESTABLIMENT DEL MODEL D'ESTRÈS OXIDATIU EN CÈL·LULES ENDOMETRIALS

La valoració de la citotoxicitat provocada per l'agent oxidant (H_2O_2) en les cèl·lules endometrials es va realitzar immediatament després de l'oxidació (3h amb presència de H_2O_2) i 24h després de l'oxidació (3+24h). Tal i com es pot veure en la figura 19, no vam observar cap diferència remarcable entre aquests dos temps a l'analitzar la viabilitat cel·lular.

Els resultats mostren que la viabilitat cel·lular del cultiu es manté entorn al 100% a concentracions de H_2O_2 entre 10^{-6} i 1mM, per tant la citotoxicitat en aquestes condicions és **nul·la**. Observem també, que la concentració de 2mM provoca una **citotoxicitat moderada** en el cultiu i que a concentracions superiors o iguals a 3mM la **citotoxicitat és severa** (figura 19).

El model d'oxidació que s'utilitza en aquest estudi està compost per diverses concentracions de H_2O_2 que provoquen els diferents graus de citotoxicitat. D'aquesta manera podem avaluar acuradament l'activitat antioxidant dels agents en estudi front a diferents graus de dany oxidatiu cel·lular. En el cas de les cèl·lules endometrials, les concentracions de H_2O_2 són:

Control: 0mM de H_2O_2 .

Citotoxicitat nul·la: 0,1 i 1 mM de H_2O_2 .

Citotoxicitat moderada: 2 mM de H_2O_2 .

Citotoxicitat severa: 3 i 5 mM de H_2O_2 .

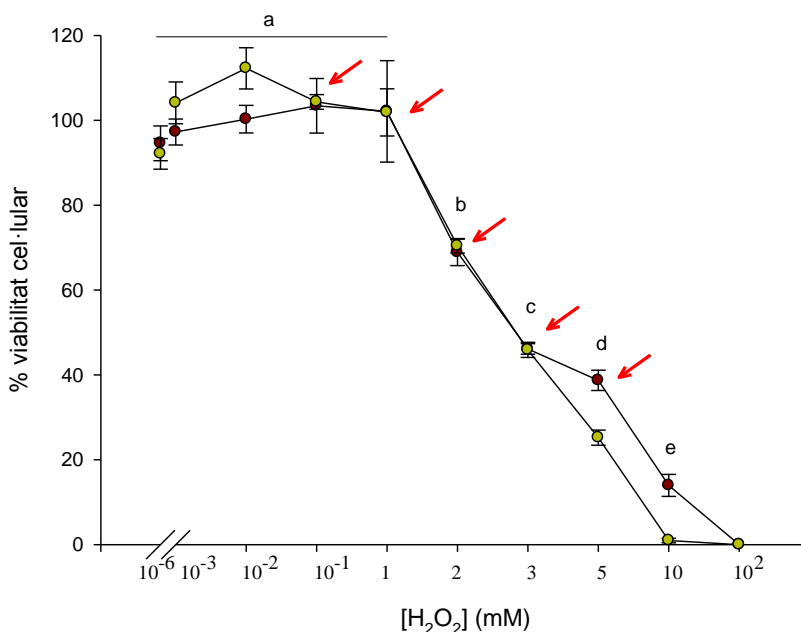


Figura 19. Determinació de les condicions d'oxidació del model de les cèl·lules endometrials (RL-95) mitjançant la viabilitat cel·lular. El percentatge de viabilitat s'ha mesurat pel mètode de MTT i s'ha calculat respecte el control sense oxidant. Els valors representats són la mitjana amb l'error estàndard de 3 assaigs i cada assaig es va realitzar per quintuplicat. Les diferents lletres indiquen diferències significatives ($p < 0,05$). (●) Valor obtingut després de l'oxidació (3h); (●) valor obtingut 24h després de l'oxidació (3+24h). Les fletxes mostren els valors utilitzats pel model d'oxidació *in vitro*.

5.1.2 INCORPORACIÓ INTRACEL·LULAR DE LA VITAMINA E INCLOSA EN LIPOSOMES

La vitamina E, antioxidant liposoluble, es va incorporar eficientment en tots els tipus de liposomes utilitzats (SPC, SPC/DDPA i HSPC/DPPA). Aquests liposomes mostren una mitjana del diàmetre de $\leq 100\text{nm}$ amb una amplada petita ($\leq 50\text{nm}$).

Com es pot observar en la taula I, la incorporació de la vitamina E a la bicapa del liposoma augmenta la mida i l'amplada en tots els tipus de liposomes utilitzats. Malgrat això, aquests dos paràmetres ens permeten classificar els liposomes utilitzats com a vesícules petites, fet que afavoreix la seva fusió en la membrana plasmàtica de la cèl·lula.

La incorporació intracel·lular de la vitamina E en la cèl·lula endometrial mostra diferents cinètiques i eficiències segons el tipus de liposoma que utilitzem. Així podem

observar que el liposoma SPC/vitamina E és el liposoma que s'incorpora més ràpidament i eficientment en la membrana plasmàtica cel·lular (taula II). Després d'afegir 4,2µg de vitamina E en el cultiu (1,6 µg de vitamina E en cada pouet de la placa amb cèl·lules endometrials), la quantitat màxima que les cèl·lules poden captar amb aquest tipus de liposoma és de 1,17 µg, i un 73,5% d'aquesta s'incorpora en la primera hora de la incubació.

Per altra banda, les cèl·lules poden captar un màxim de 0,9 µg de vitamina E quan aquesta s'administra mitjançant el liposoma HSPC/DPPA/vitamina E. Cal remarcar, però, que en les primeres 6h de cultiu únicament s'incorpora el 38,9% i el 61,1% restant es produeix entre les 6 i les 24h. En el cas del liposoma SPC/DPPA/vitamina E, la incorporació cel·lular màxima de la vitamina E és de 0,72 µg, i que la majoria d'aquesta incorporació, un 73,6%, es produeix en les primeres 3h (taula II).

Donat aquests resultats, els tractaments que avaluen l'acció antioxidant de la vitamina E es fan a 24h, temps que hem observat que la seva incorporació en la cèl·lula és màxima. Aquest és el cas dels tractament 1, 4 i 5, és a dir, els que contenen un pre- o post-incubació amb vitamina E.

Taula I.

Mida dels liposomes obtinguts després de l'homogeneïtzació a alta pressió

Liposoma	Diàmetre (nm)	Amplada (nm)
SPC	63.3 ± 11.5 (n=3)	39.7 ± 10.5 (n=3)
SPC/vit E	149 ± 71 (n=2)	67.0 ± 24.0 (n=2)
SPC/DPPA	53.7 ± 11.2 (n=3)	29.7 ± 9.6 (n=3)
SPC/DPPA/vit E	87.5 ± 14.8 (n=2)	49.0 ± 15.6 (n=2)
HSPC/DPPA	60.0 ± 22.8 (n=4)	27.3 ± 13.2 (n=4)
HSPC/DPPA/vit E	116.7 ± 21.6 (n=3)	79.0 ± 30.3 (n=3)

Taula II.*Incorporació intracel·lular de la vitamina E, mesurada per RP-HPLC*

Liposoma	Vitamina E (μg)			
	1h	3h	6h	24h
SPC/Vit E	0.86 ± 0.16	0.97 ± 0.15	0.99 ± 0.07	1.17 ± 0.02
SPC/DPPA/Vit E	0.33 ± 0.13	0.53 ± 0.18	0.70 ± 0.2	0.72 ± 0.06
HSPC/DPPA/Vit E	0.3 ± 0.2	0.32 ± 0.05	0.35 ± 0.06	0.9 ± 0.24

5.1.3 ESTUDI DE L'ACTIVITAT ANTIOXIDANT EN EL MODEL**D'OXIDACIÓ DE CÈL·LULES ENDOMETRIALS****5.1.3.1 DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ D'ANTIOXIDANT UTILITZADA EN AQUEST MODEL CEL·LULAR**

La concentració de NAC utilitzada en aquest estudi és la màxima que no és citotòxica per a les cèl·lules endometrials. Aquesta concentració és la de 15mM (dades no exposades).

La quercetina i la catequina són molècules hidrofòbiques i per tant, es van dissoldre amb dimetilsulfòxid (DMSO) abans d'incorporar-los al cultiu cel·lular. El DMSO és tòxic a concentracions superiors a 0,2% en el medi de cultiu. Hem utilitzat els dos flavonoides a una concentració de 150 μM , concentració que no era citotòxica per les cèl·lules i afegíem al cultiu un 0,1% de DMSO, per sota de la concentració citotòxica del DMSO (dades no exposades).

Per altra banda, la concentració òptima de la vitamina E inclosa en els tres tipus liposomes és de 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, és a dir, vam utilitzar 1,6 μg de vitamina E/pou en el nostre model d'oxidació *in vitro* (dades no exposades).

5.1.3.2 VALORACIÓ DE L'ACTIVITAT ANTIOXIDANT EN EL MODEL D'OXIDACIÓ DE CÈL·LULES ENDOMETRIALS

Els resultats obtinguts en la viabilitat cel·lular a partir dels tractaments 2, 4 i 5, que contenen la coïncubació oxidant-antioxidant (figura 13), són molt semblants entre ells sense que hi hagi diferències significatives. En aquests tractaments, el NAC és capaç de mantenir la viabilitat cel·lular al voltant del 100% fins i tot en condicions de citotoxicitat severa en el nostre model. El tractament amb quercetina no pot disminuir totalment el dany provocat pel H_2O_2 en condicions de citotoxicitat moderada o severa. Malgrat això, l'addició de quercetina al cultiu millora significativament la viabilitat cel·lular respecte a les cèl·lules sense antioxidant. La catequina, no és capaç de protegir a les cèl·lules de la citotoxicitat causada per l'agent oxidant (figura 20).

En el tractament 3 que no inclou la coïncubació oxidant-antioxidant (figura 13) no observem cap millora de la viabilitat cel·lular del cultiu front a la citotoxicitat del H_2O_2 , en les condicions establertes (figura 20D).

Com es pot observar en la figura 21, la vitamina E no produeix cap disminució en la citotoxicitat del H_2O_2 en el nostre model d'oxidació, en cap tipus de liposomes ni dels tractaments estudiats.

D'aquesta manera, les nostres condicions establertes *in vitro*, l'eficiència antioxidant del NAC és superior a l'observada en la quercetina i aquesta és major a la detectada en la catequina i vitamina E.

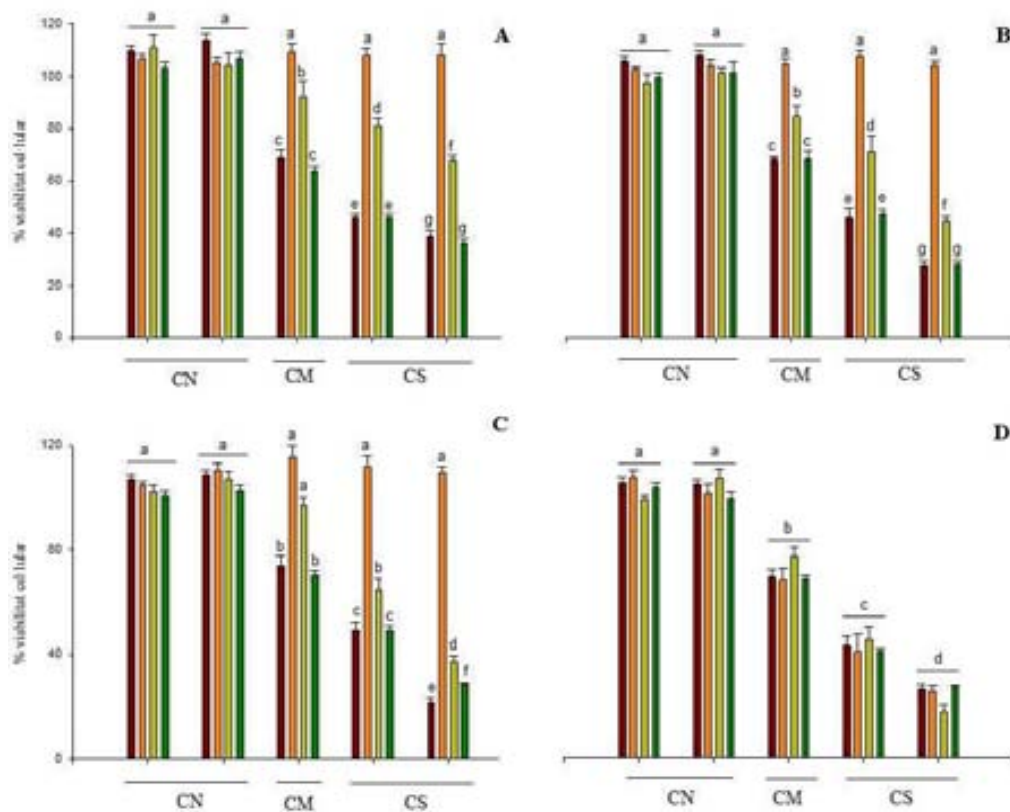


Figura 20. Acció antioxidant de NAC, quercetina i catequina en el model d'oxidació de cèl·lules endometrials (RL-95). S'ha calculat el percentatge de la viabilitat respecte el control sense oxidant. Els valors representats són la mitjana amb l'error estàndard de 3 assaigs independents i cada mesura es va realitzar per quintuplicat. Les diferents lletres indiquen diferències significatives ($p < 0,05$), segons el test Student-Newman-Keuls. (■) sense antioxidant; (■) NAC; (■) quercetina; (■) catequina. (A) cotractament; (B) cotractament + post-incubació de l'antioxidant; (C) cotractament + pre- i post-incubació de l'antioxidant; (D) postractament; CN=citotoxicitat nul·la; CM=citotoxicitat moderada; CS=citotoxicitat severa (veure figura 13).

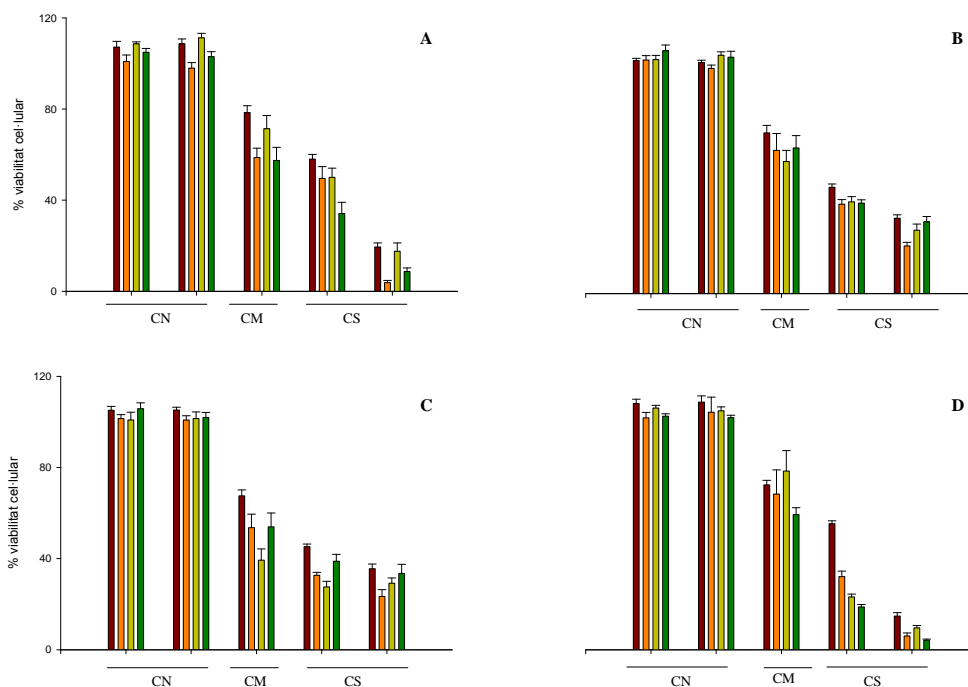


Figura 21. Acció antioxidant dels diferents tipus de liposomes amb vitamina E en el model d'oxidació de cèl·lules endometrials (RL-95). S'ha calculat el percentatge respecte el control sense oxidant. Els valors representats són la mitjana amb l'error estàndard de 3 assaigs independent i cada mesura es va realitzar per quintuplicat. (■) Liposomes sense vitamina E; (■) SPC/VE; (■) SPC/DPPA/VE; (■) HSPC/DPPA/VE (veure figura 11). (A) pretractament; (B) cotractament; (C) cotractament + post-incubació de l'antioxidant; (D) cotractament + pre- i post-incubació de l'antioxidant; CN=citotoxicitat nul·la; CM=citotoxicitat moderada; CS=citotoxicitat severa (veure figura 13).

5.2 ESTABLIMENT DEL MODEL *IN VITRO* D'ESTRÈS OXIDATIU EN CÈL·LULES DE TROFOBLAST HUMANES. VALORACIÓ DE L'ACTIVITAT ANTIOXIDANT DEL NAC I DELS FLAVONOIDES.

5.2.1 ESTABLIMENT DEL MODEL D'ESTRÈS OXIDATIU EN CÈL·LULES DE TROFOBLAST

Segons els resultats obtinguts en el model amb cèl·lules endometrials i descrits en la secció 5.1.1 (figura 19), no varem observar cap diferència entre la viabilitat de les cèl·lules endometrials observada a 3h o a les 3+24h . Per tant, en les cèl·lules de trofoblast es valorà la viabilitat únicament a les 3h, just després de finalitzar la incubació amb l'agent oxidant.

En el model *in vitro* en cèl·lules de trofoblast, hem pogut observar la **citotoxicitat nul·la**, a concentracions d'oxidant inferiors o igual a 1mM de H₂O₂. A partir de concentracions superiors o iguals a 1,5mM, la viabilitat cel·lular decreix significativament respecte al control. La **citotoxicitat moderada** correspon a les concentracions de H₂O₂ entre 1,5 i 2mM, amb valors de viabilitat entre el 85%-50%. En concentracions de l'oxidant superiors o igual a 2,5mM, la viabilitat cel·lular disminueix en valors inferiors al 50%, per tant provoca una **citotoxicitat severa** (figura 22). Els resultats estadístics d'aquest estudi s'han expressat en les taules de l'annex III apartat A.

Segons aquest resultat, hem establert el model d'oxidació *in vitro* de cèl·lules de trofoblast i hem definit les concentracions de l'oxidant que utilitzarem en aquesta part de l'estudi:

Control: 0mM de H₂O₂.

Citotoxicitat nul·la: 0,1 i 1 mM de H₂O₂.

Citotoxicitat moderada: 1,5 i 2 mM de H₂O₂.

Citotoxicitat severa: 2,5 mM de H₂O₂.

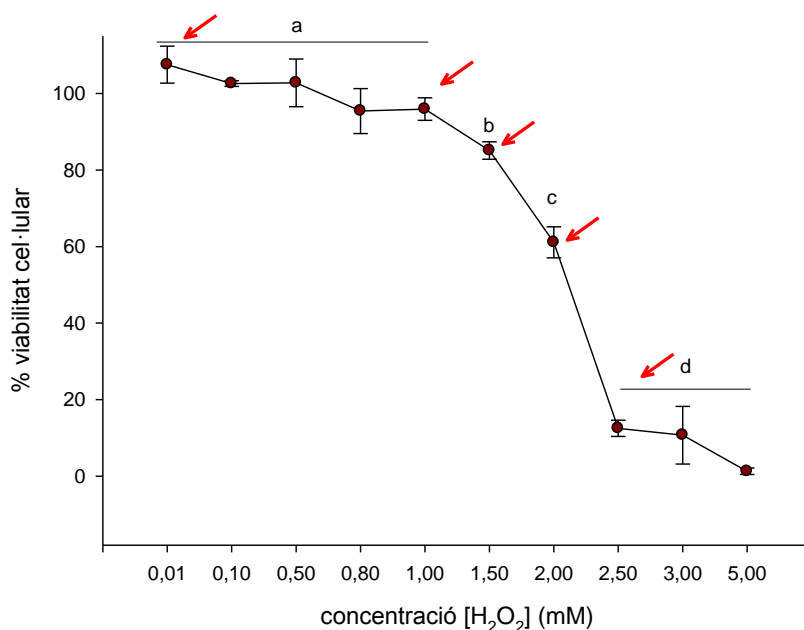


Figura 22. Determinació de les condicions d'oxidació en el model de les cèl·lules de trofoblast (AC-1M59) mitjançant la viabilitat cel·lular. El percentatge de viabilitat s'ha mesurat pel mètode de MTT i s'ha calculat respecte el control sense oxidant. Els valors representats són la mitjana amb l'error estàndard de 4-12 assaigs i cada assaig es va realitzar per quintuplicat. Les diferents lletres indiquen diferències significatives ($p < 0,05$), segons el model lineal de mesures repetides. Les fletxes mostren els valors utilitzats pel model d'oxidació *in vitro*.

5.2.2 VALORACIÓ DE L'ACTIVITAT ANTIOXIDANT EN EL MODEL D'OXIDACIÓ DE CÈL·LULES DE TROFOBLAST

5.2.2.1 DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ D'ANTIOXIDANT UTILITZADA EN LES CÈL·LULES DE TROFOBLAST

Les concentracions d'antioxidants utilitzades en aquest estudi varen ser les màximes que no eren citotòxiques per a les cèl·lules de trofoblast. Com es pot observar a la figura 23A, pel NAC aquesta concentració és la de 15mM. En el cas dels flavonoides, les concentracions màximes d'aquests flavonoides que no disminueixen la viabilitat cel·lular són la de 25µM per a la quercetina i la de 100µM per a la catequina (figura 23B i 23C).

Donat que la vitamina E no va donar cap resultat rellevant en la línia endometrial (apartat 5.1.3.2), no es va utilitzar aquest antioxidant en les cèl·lules de trofoblast.

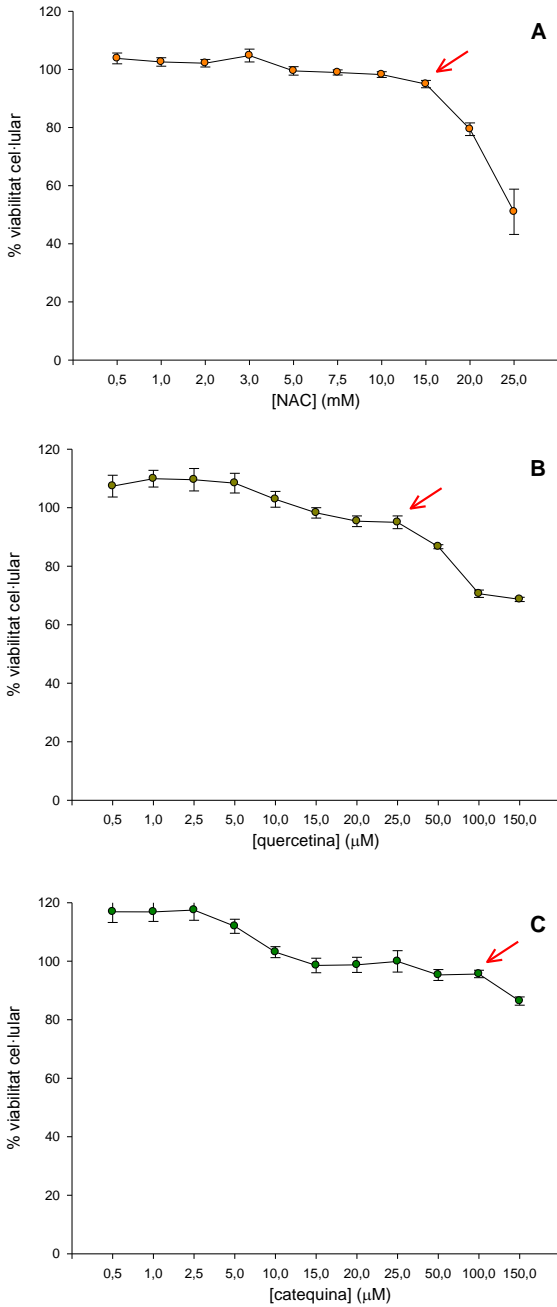


Figura 23. Determinació de la concentració òptima dels antioxidants (A) NAC, (B) quercetina i (C) catequina en les cèl·lules de trofoblast. Els valors representats són la mitjana \pm ES de 2-4 experiments per quintuplicat. La fletxa vermella indica la concentració utilitzada en els posteriors estudis.

5.2.2.2 VALORACIÓ DE L'ACTIVITAT ANTIOXIDANT EN EL MODEL D'OXIDACIÓ DE CÈL·LULES DE TROFOBLAST.

Els experiments realitzats en aquest estudi es van dur a terme incubant, simultàniament, l'oxidant amb l'antioxidant (tractament 2) ja que era el tipus de tractament que donava millors resultats en les cèl·lules endometrials.

La presència de NAC en el nostre model d'oxidació, evita que es produeixi una disminució en la viabilitat cel·lular i la manté entorn al 100% en condicions de citotoxicitat moderada i, fins i tot, citotoxicitat severa. El tractament amb quercetina no pot inhibir totalment el dany provocat pel H_2O_2 , encara que en condicions de citotoxicitat moderada i severa millora significativament la viabilitat cel·lular respecte a les cèl·lules sense antioxidant. Aquesta capacitat antioxidant es mostra més evident quan el dany és menor, en condicions de citotoxicitat moderada, que quan el dany és major, en la citotoxicitat severa. Per una altra banda, la catequina a la concentració emprada, no té cap efecte rellevant en el cultiu (figura 24). Els resultats estadístics d'aquest estudi s'han expressat en les taules de l'annex III apartat B.

Cal remarcar que l'efecte antioxidant dels diferents agents utilitzats front a les cèl·lules de trofoblast són molt similars a l'efecte obtingut pels mateixos agents en la línia cel·lular endometrial (figura 20). Així, l'eficiència antioxidant del NAC és superior a l'observada en la quercetina i aquesta és major a la detectada en la catequina.

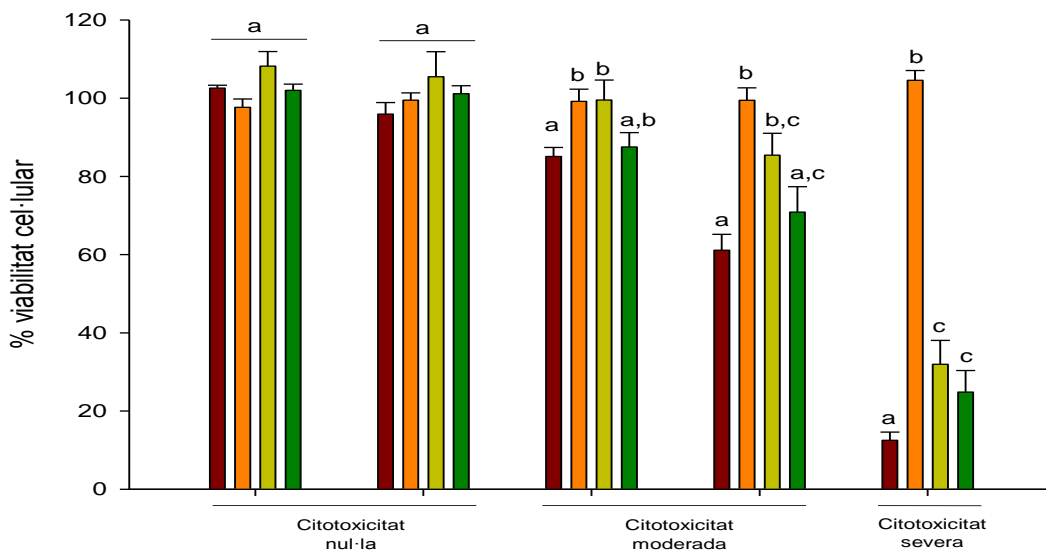


Figura 24. Acció antioxidant de NAC, quercetina i catequina en el model d'oxidació de cèl·lules de trofoblast, mesurat mitjançant la viabilitat cel·lular. El % de viabilitat s'ha mesurat pel mètode de MTT i s'ha calculat el percentatge respecte el control sense oxidant. Els valors representats són la mitjana amb l'error estàndard de 4-12 assaigs independents i cada mesura es va realitzar per quintuplicat. Les diferents lletres indiquen diferències significatives ($p < 0,05$), segons el model lineal de mesures repetides. (■) sense antioxidant; (■) NAC; (■) quercetina; (■) catequina.

5.3 ESTUDI DEL TRACTAMENT ANTIOXIDANT EN CÈL·LULES ENDOMETRIALS I DE TROFOBLAST HUMANES

5.3.1 ANÀLISI DE L' APOPTOSI EN EL TRACTAMENT ANTIOXIDANT

L'anàlisi de l'apoptosi es va realitzar mitjançant dos mètodes: la valoració de l'activació de la caspasa-3 i l'externalització de la fosfatidilserina. Ambdós resultats són complementaris, ja que en el primer mètode, els resultats ens mostren l'inducció d'apoptosi d'una manera semiquantitativa respecte a l'estat basal de les cèl·lules i en el segon mètode, ens indica quin percentatge de la població cel·lular es troba en apoptosi, a part de mesurar el percentatge de cèl·lules vives i mortes.

5.3.1.1 VALORACIÓ DE L' APOPTOSI MITJANÇANT L' ACTIVITAT DE LA PROTEÏNA CASPASA-3

L'oxidació amb H_2O_2 en la línia endometrial provoca un increment significatiu del procés d'apoptosi. L'increment de l'activitat de la caspasa-3 observat és dosis dependent, així, per a la citotoxicitat moderada augmentem 1,8 vegades l'apoptosi observada en condicions basals i si produïm una citotoxicitat severa, induïm l'apoptosi 3,5 vegades més que la produïda espontàniament en condicions de no oxidació (figura 25A).

Tal i com es pot veure a la figura 25B, en les cèl·lules de trofoblast no vam observar cap inducció de l'activació de la caspasa-3. Així, en condicions de citotoxicitat moderada i severa, es mostren uns valors d'activitat de la caspasa al voltant del control. Per tant, la mort cel·lular de les cèl·lules de trofoblast en aquest model d'oxidació no es dona mitjançant l'apoptosi per la via de les caspases.

Varem analitzar l'acció antioxidant en la línia cel·lular endometrial. El tractament antioxidant no augmenta la caspasa-3 activa basal que es troba a l'interior de la cèl·lula. El NAC protegeix totalment les cèl·lules de la inducció de l'apoptosi tan en condicions de citotoxicitat moderada com severa. L'addició de la quercetina o la catequina en el cultiu, no afecta, significativament, a l'expressió d'aquesta proteïna quan es compara amb les cèl·lules sense antioxidant, per tant no són eficaços per protegir les cèl·lules de la inducció de l'apoptosi per aquesta via (figura 26). Els resultats estadístics d'aquest estudi s'han expressat en les taules en l'annex IV.

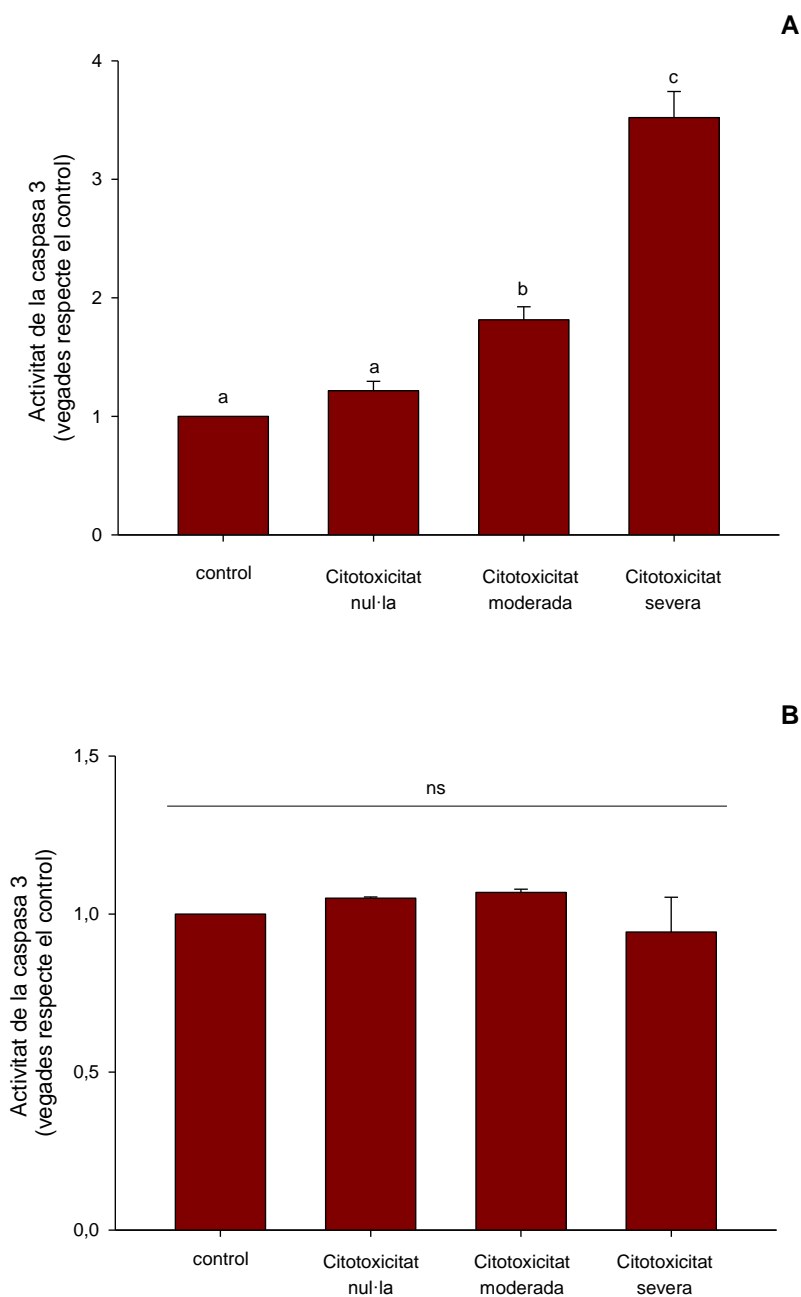


Figura 25. Valoració de l'apoptosi cel·lular de (A) les cèl·lules endometrials i (B) les cèl·lules de trofoblast mitjançant la inducció de l'activitat de la proteïna caspasa-3. Les barres representen la mitjana + ES de l'activació de la caspasa-3 respecte al control (cèl·lules sense oxidant) en 5-7 o 2-4 experiments independents en la línia endometrial o de trofoblast, respectivament. Les diferents lletres mostren diferències significatives ($p < 0,05$), segons el model lineal generalitzat; ns=no significatiu.

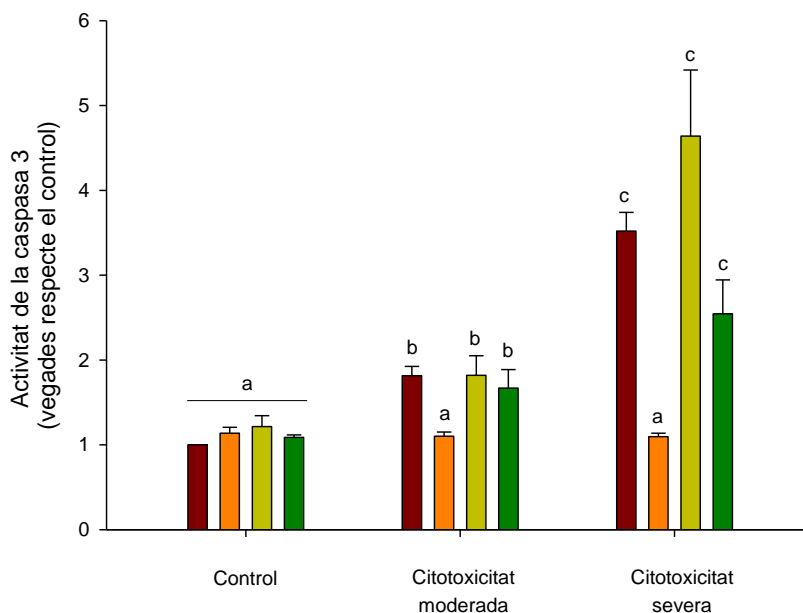


Figura 26. Efecte de l'acció antioxidant del NAC, la quercetina i la catequina sobre l'apoptosi de les cèl·lules endometrials, mitjançant l'anàlisi de l'activitat de la caspasa-3. Les barres representen la mitjana + ES de la inducció de la caspasa-3 respecte al control (cèl·lules sense oxidant) en 4-7 experiments independents. Les diferents lletres mostren diferències significatives ($p < 0,05$), segons el model lineal generalitzat. (■) sense antioxidant; (■) NAC; (■) quercetina; (■) catequina.

5.3.1.2 AVALUACIÓ DE L'APOPTOSI MITJANÇANT L'EXTERNALITZACIÓ DE LA FOSFATIDILSERINA PER CITOMETRIA DE FLUX

L'anàlisi de l'apoptosi per citometria de flux únicament es va poder dur a terme per a les cèl·lules endometrials. Les cèl·lules de trofoblast no oxidades, després de processar-les pel seu anàlisi, presentaven un baix percentatge de cèl·lules vives (inferior al 75%) (dades no mostrades), fet que ens va fer desestimar la realització d'aquesta tècnica en aquestes cèl·lules.

En la línia endometrial, l'oxidació cel·lular provoca una disminució de la viabilitat dosi dependent a l'oxidació produïda, que es pot observar tant a les 24h com a les 48h. Els percentatges de cèl·lules vives control és d'un $90,6\% \pm 0,92$ i d'un $90,08\% \pm 0,54$, per a les 24h i 48h respectivament i disminueix gradualment, a mesura que augmentem la citotoxicitat. Les cèl·lules apoptòtiques, anexina+/iodur de propidi- (an+/PI-), i les

mortes (PI+) augmenten, progressivament, la seva població a mesura que augmentem la citotoxicitat produïda (figura 27). Els resultats estadístics d'aquest estudi s'han expressat en les taules de l'annex V apartat A.

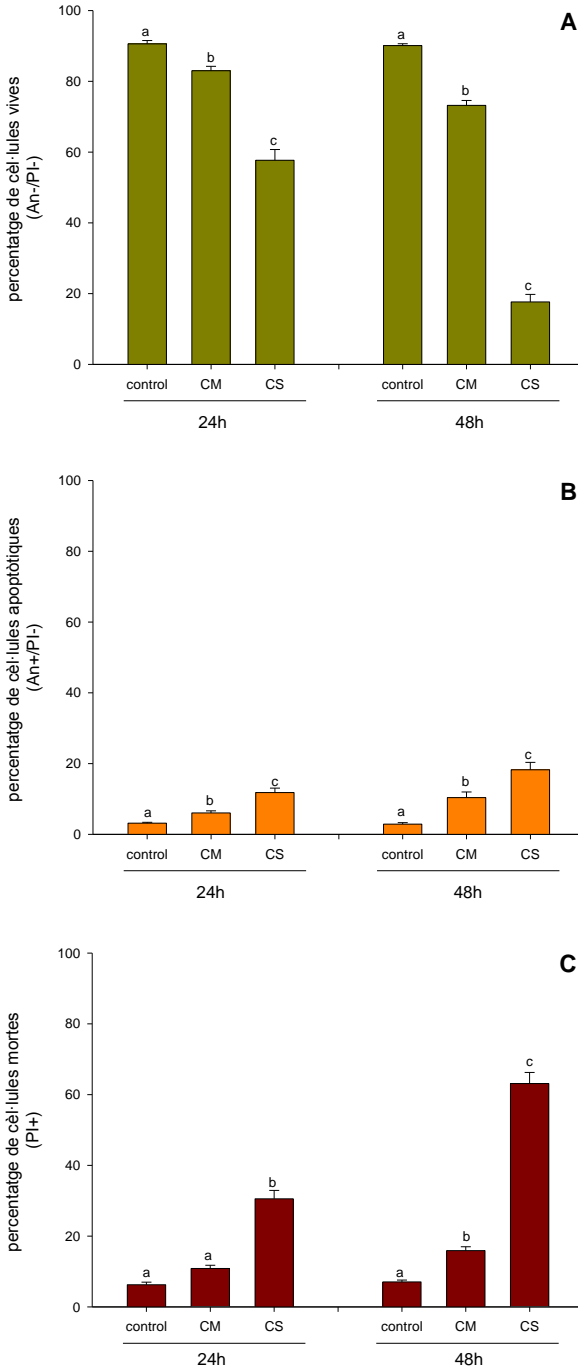


Figura 27. Anàlisi de l'apoptosi i la mort cel·lular en l'oxidació de cèl·lules endometrials mitjançant l'avaluació de l'externalització de la fosfatidilserina i la tinció amb iodur de propidi, per citometria de flux. Les barres representen la mitjana + ES del percentatge cel·lular en 4-6 experiments independents. Les diferents lletres mostren diferències significatives ($p < 0,05$), segons el model lineal generalitzat. (A) cèl·lules vives, (B) cèl·lules apoptòtiques i (C) cèl·lules mortes. Control=cèl·lules sense oxidació; CM=citotoxicitat moderada; CS=citotoxicitat severa.

Referent als tractaments amb els agents antioxidants, el NAC, la quercetina i la catequina a les concentracions utilitzades no modifiquen els percentatges de la població de cèl·lules vives (an-/PI-), apoptòtiques (an+/PI-) o mortes (PI+) de les cèl·lules endometrials, comparades amb el control (cèl·lules sense oxidant ni antioxidant) (figura 28).

Per altra banda, tots els antioxidants produeixen un lleuger augment de la viabilitat cel·lular (an-/PI-) quan es produeix una citotoxicitat moderada. Aquest increment s'observa tant a les 24h com a les 48h, encara que és més evident a les 48h. El NAC és l'antioxidant que més eficientment protegeix les cèl·lules de la mort cel·lular i obté percentatges de viabilitat iguals als obtinguts en aquestes cèl·lules sense oxidació (al voltant del 90% de la població total). Ambdós flavonoides, en condicions de citotoxicitat moderada, poden millorar la viabilitat cel·lular ($80,87\% \pm 0,79$ i $81,18\% \pm 4,6$ per la quercetina i la catequina, respectivament) en comparació a les cèl·lules sense antioxidant ($73,2\% \pm 1,4$). En condicions de citotoxicitat severa, observem que el NAC manté la viabilitat cel·lular semblant al control sense oxidació mentre que la quercetina, en menor eficiència, pot neutralitzar parcialment l'acció de l'oxidant. Aquesta acció de la quercetina s'observa a les 24h, ja que a les 48h les cèl·lules s'acaben morint. La catequina en aquestes condicions, no incrementa la viabilitat, quan la comparem amb les cèl·lules sense antioxidant (figura 28A).

Tal i com s'observa en la figura 28B, l'acció antioxidant del NAC prevé totalment l'apoptosi cel·lular induïda per l'estrès oxidatiu en les cèl·lules endometrials i manté el percentatge cel·lular semblant al observat en les cèl·lules sense l'oxidant (al voltant del 3%), tant en condicions de citotoxicitat moderada i severa. L'addició dels flavonoides no produeixen una disminució estadísticament significativa de l'apoptosi quan la comparem amb les mateixes condicions sense antioxidant, ni en citotoxicitat moderada ni en severa.

Si observem les cèl·lules mortes (PI+) (figura 28C), el NAC també inhibeix completament la mort cel·lular induïda per l'oxidació, tant en condicions de citotoxicitat moderada com severa i manté aquests percentatges cel·lulars semblant als observats en les cèl·lules sense oxidant (al voltant del 6,5% de la població total). En condicions d'oxidació que provoquen una citotoxicitat moderada, la quercetina i la catequina

disminueixen el percentatge de cèl·lules mortes, encara que aquest decreixement no és estadísticament significatiu. En situacions de citotoxicitat severa el tractament amb quercetina o catequina, disminueix el percentatge de la població cel·lular morta ($16,6\% \pm 5,44$ i $21\% \pm 2,29$, respectivament) respecte al cultiu sense antioxidant ($30,54\% \pm 2,36$) a les 24h. A les 48h, però, no s'observa aquest efecte en la població cel·lular quan la incubem amb els flavonoides. Els resultats estadístics d'aquest estudi s'han expressat en les taules de l'annex V apartat B.

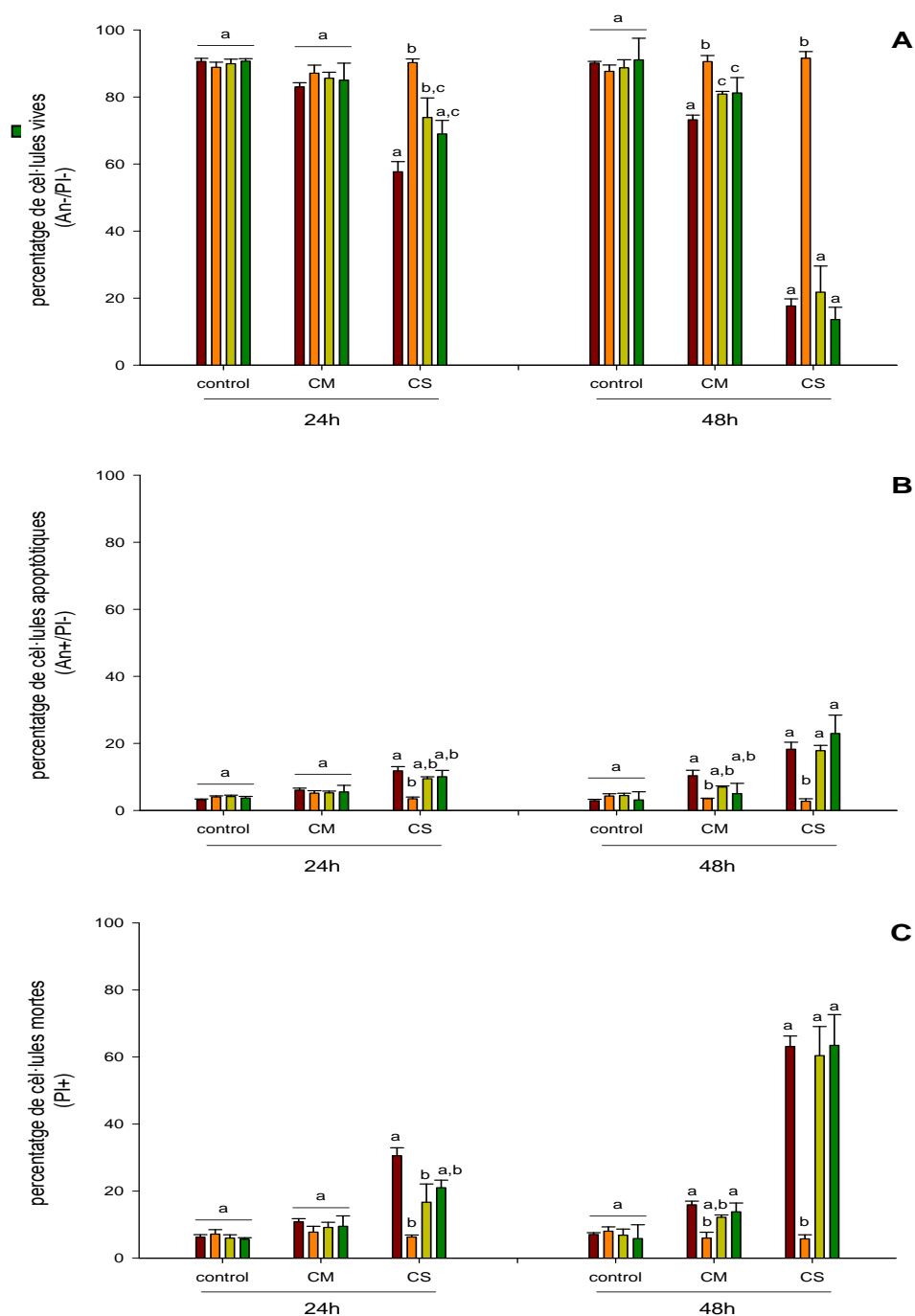


Figura 28. Avaluació de l'efecte antioxidant del NAC, la quercetina i la catequina en la inducció de l'apoptosi i mort cel·lular en l'oxidació de cèl·lules endometrials mitjançant l'anàlisi de l'externalització de la fosfatidilserina i iodur de propidi per citometria de flux. Les barres representen la mitjana + ES del percentatge cel·lular en 4-6 experiments independents. Les diferents lletres mostren diferències significatives ($p < 0,05$), segons el model lineal generalitzat. (■) No antioxidant; (■) NAC; (■) quercetina; (■) catequina. (A) cèl·lules vives; (B) cèl·lules apoptòtiques; (C) cèl·lules mortes. CM=citotoxicitat moderada; CS=citotoxicitat severa.

5.3.2 AVALUACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR EN EL TRACTAMENT ANTIOXIDANT DEL MODEL *IN VITRO* D'OXIDACIÓ CEL·LULAR

5.3.2.1 ANÀLISI DEL CICLE CEL·LULAR EN EL MODEL D'OXIDACIÓ DE CÈL·LULES ENDOMETRIALS I DE TROFOBLAST HUMANES

El percentatge de cèl·lules vives en cada fase del cicle cel·lular en la línia cel·lular endometrial (RL95) i en la trofoblàstica (AC1-M59) és diferent. Mentre que més de la meitat de cèl·lules endometrials es troben en la fase G0-G1 del cicle cel·lular, les cèl·lules de trofoblast es troben, majoritàriament, en la fase S (figura 29). És a dir, després de 48h del cultiu de cèl·lules endometrials en condicions no oxidants, tenen un 53,2% de cèl·lules vives en fase G0-G1 del cicle cel·lular, un 37% en la fase S i un 9,8% de la fase G2-M. Per a les cèl·lules de trofoblast, en canvi, observem un 23,6% de cèl·lules en la fase G0-G1, un 54,9% en la fase S i un 21,5% en la fase G2-M del cicle cel·lular (figura 30).

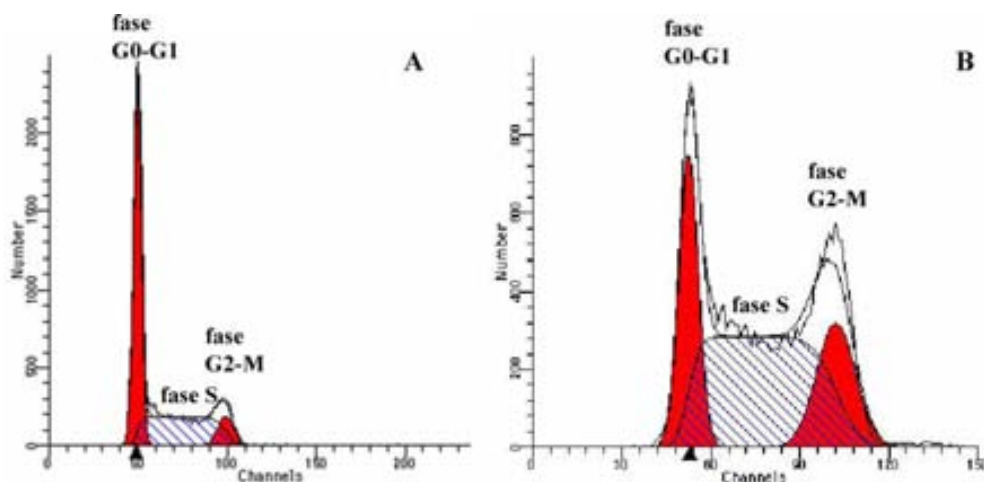


Figura 29. Perfil i estimació de les fases del cicle cel·lular mitjançant el programa ModFit LT de (A) cèl·lules endometrials i (B) cèl·lules de trofoblast.

L'oxidació de les cèl·lules endometrials en condicions de citotoxicitat nul·la o moderada canvia, estadísticament, el perfil dels percentatges cel·lulars que rauen en cada fase del cicle cel·lular. Els resultats ens mostren que 24h després d'una oxidació

lleu (citotoxicitat nul·la) es produeix una acumulació de cèl·lules en la fase G2-M en detriment, majoritàriament, de la fase G0-G1. Transcorregudes 48h després de l'oxidació, el cicle cel·lular tendeix a tornar al perfil normal, disminuint la fase G2-M i augmentant la fase G0-G1. Per altra banda, en condicions de citotoxicitat moderada, l'oxidació també provoca un increment de l'última fase del cicle cel·lular però, lluny de recuperar la distribució del cicle cel·lular normal a les 48h, aquesta diferència es fa molt més prominent (figura 30A).

En el cas de les cèl·lules de trofoblast, l'oxidació interfereix en el cicle cel·lular d'una manera molt semblant a la descrita anteriorment. Concentracions d'oxidant que produeix una citotoxicitat nul·la, triplica la fase G2-M 24h després de l'oxidació, en detriment de les altres dos fases. Posteriorment, a les 48h, aquests percentatges cel·lulars modificats per l'oxidació van tornant al perfil cel·lular de les cèl·lules sense oxidant. En condicions de citotoxicitat moderada el perfil cel·lular és similar al descrit anteriorment per a la citotoxicitat nul·la, a les 24h. En aquest cas, però, la recuperació del percentatges cel·lulars en cada fase del cicle a les 48h, si n'hi ha, és molt més lenta (figura 30B). Els resultats estadístics d'aquest estudi s'han expressat en les taules de l'annex VI.

Tot això ens indica que l'oxidació provoca, en els dos tipus cel·lulars, un augment de la fase G2-M i per tant, la població cel·lular no aconsegueix fàcilment acabar de completar la divisió cel·lular i romanen més temps en aquesta fase. La modificació d'aquest cicle cel·lular és H_2O_2 dosi-dependent, ja que és més accentuada en citotoxicitat moderada que en la nul·la.

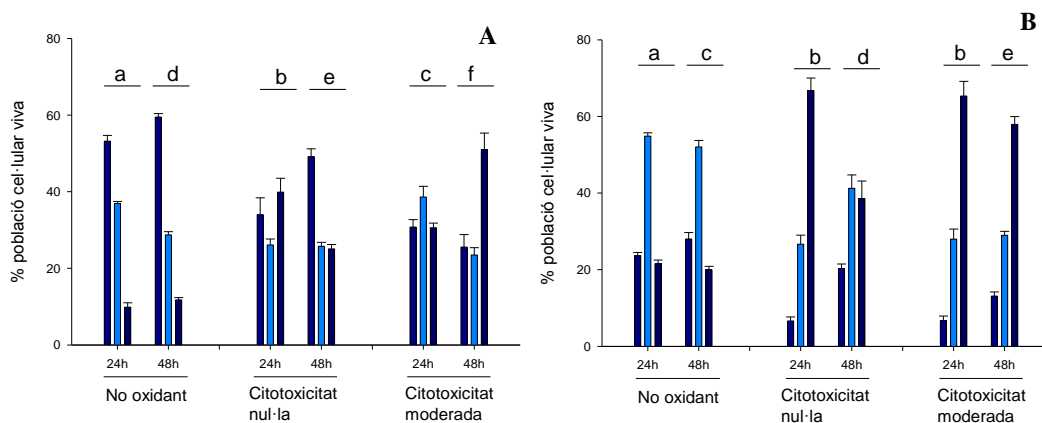


Figura 30. Anàlisi de les fases del cicle cel·lular en (A) cèl·lules endometrials i (B) cèl·lules de trofoblast, en condicions d'oxidació que provoquen citotoxicitat nul·la o moderada. Cada columna representa la mitjana + ES del percentatge de la població cel·lular en cada fase del cicle de 4-8 experiments independents. Les diferents lletres mostren diferències significatives ($p < 0,05$) dins del mateix període de temps (24h o 48h), segons l'anàlisi de dades composicionals. (■) Fase G0-G1; (▒) fase S; (■) fase G2-M.

5.3.2.2 EFECTE ANTIOXIDANT EN EL CICLE CEL·LULAR DEL MODEL D'OXIDACIÓ *IN VITRO*

Els antioxidants emprats a les condicions establertes no interfereix en el cicle cel·lular de la línia de cèl·lules endometrials ni de trofoblast (figura 31A i 32A).

En les cèl·lules endometrials, l'addició de NAC protegeix completament el cicle cel·lular modificat per l'acció de l'oxidant, tant en condicions de citotoxicitat nul·la com moderada. Així, el percentatge de cèl·lules vives en cada fase del cicle cel·lular en aquestes condicions és similar que el percentatge observat en el cultiu de cèl·lules sense oxidant. La quercetina pot revertir, l'acció de l'oxidant en condicions de citotoxicitat nul·la, encara que no reestableix completament la freqüència cel·lular d'aquest tipus cel·lular. Si provoquem una citotoxicitat moderada, s'observa certa acció antioxidant ja que l'acció de la quercetina disminueix la modificació del cicle cel·lular causada per l'oxidació. A les 48h les cèl·lules tendeixen a recuperar les freqüències cel·lulars del cicle de les cèl·lules endometrials sense oxidant. En canvi, en el cas de la catequina no observem cap efecte antioxidant i el perfil del cicle cel·lular amb aquest antioxidant és similar al perfil del cicle sense cap tipus d'antioxidant en el cultiu, tant en condicions de

citotoxicitat nul·la i moderada (figura 31B i 31C). Els resultats estadístics d'aquest estudi s'han expressat en les taules de l'annex VI apartat A.

En el cas de les cèl·lules de trofoblast, el tractament amb NAC, quercetina o catequina inhibeix la modificació del cicle cel·lular provocada pel peròxid d'hidrogen en condicions de citotoxicitat nul·la i mantenen la freqüència de la població cel·lular en cadascuna de les fases del cicle cel·lular estadísticament igual que la del control sense l'oxidant. Aquesta acció es detecta tant a les 24h com a les 48h. En condicions de citotoxicitat moderada, únicament el NAC protegeix completament les cèl·lules de l'acció de l'oxidant. La quercetina, en canvi, neutralitza parcialment l'acció del H_2O_2 sobre el cicle cel·lular a les 24h. És a dir, manté la fase G0-G1, però l'acció oxidant augmenta en un 10% la població cel·lular en fase G2-M, en detriment de la fase S. A les 48h, el perfil d'aquest cicle és semblant que el de les cèl·lules control. L'addició de catequina en el cultiu en condicions de citotoxicitat moderada produeix una modificació molt subtil del cicle cel·lular quan ho comparem amb les cèl·lules sense antioxidant a les 24h. Malgrat això, aquest antioxidant ajuda a recuperar el cicle cel·lular de les cèl·lules sense oxidant a més llarg termini (48h) (figura 32B i 32C). Els resultats estadístics d'aquest estudi s'han expressat en les taules de l'annex VI apartat B.

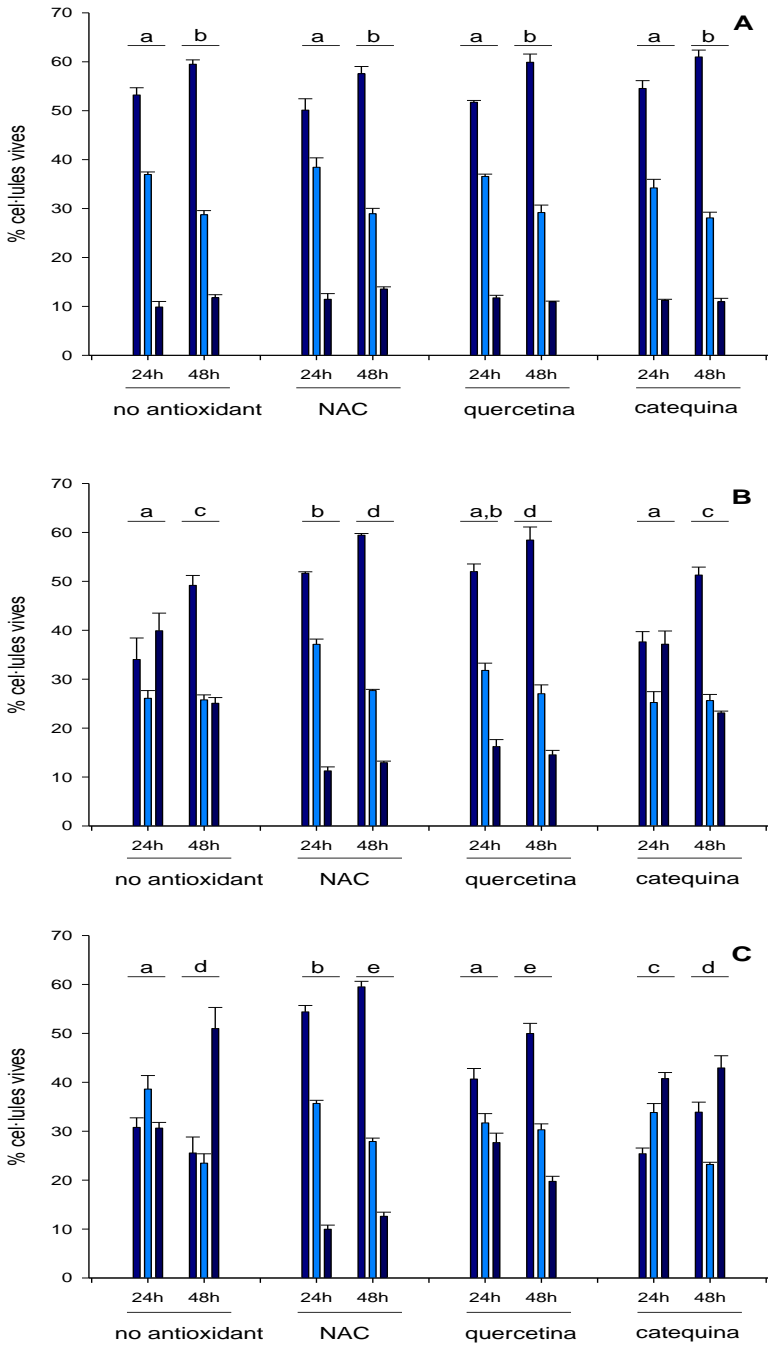


Figura 31. Avaluació de l'efecte antioxidant del NAC, la quercetina i la catequina en el cicle cel·lular de les cèl·lules endometrials en condicions de (A) sense oxidació, (B) citotoxicitat nul·la i (C) citotoxicitat moderada. Cada columna representa la mitjana + ES del percentatge cel·lular en cada fase del cicle de 2-5 experiments independents. Les diferents lletres mostren diferències significatives ($p < 0,05$) dins del mateix període de temps (24h o 48h), segons l'anàlisi de dades composicionals. (■) Fase G0-G1; (■) fase S; (■) fase G2-M.

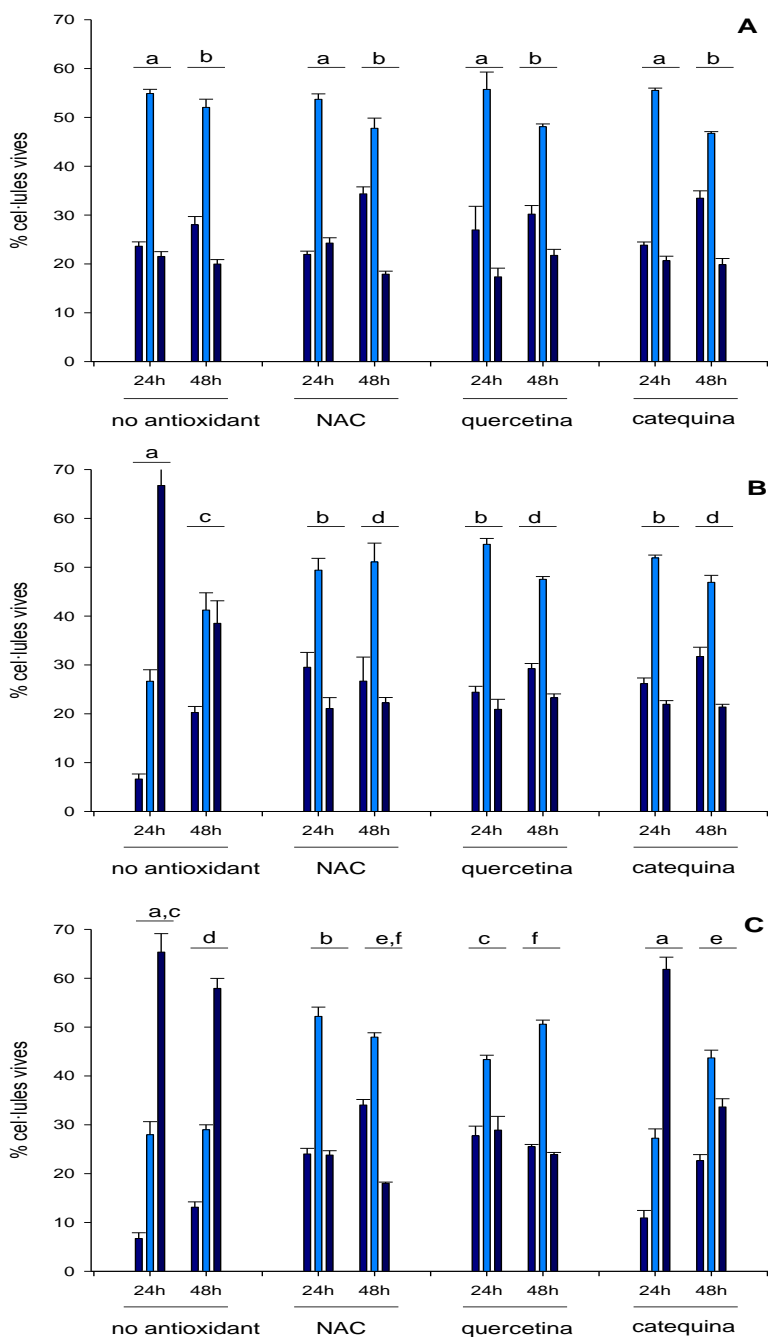


Figura 32. Avaluació de l'efecte antioxidant del NAC, la quercetina i la catequina en el cicle cel·lular de les cèl·lules de trofoblast en condicions de (A) sense oxidació, (B) citotoxicitat nul·la i (C) citotoxicitat moderada. Cada columna representa la mitjana + ES del percentatge cel·lular en cada fase del cicle de 2-8 experiments independents. Les diferents lletres mostren diferències significatives ($p < 0,05$) dins del mateix període de temps (24h o 48h), segons l'anàlisi de dades composicionals. (■) Fase G0-G1; (■) fase S; (■) fase G2-M.

PART 2

5.4 ESTUDI DE L'ENDOMETRI DE PACIENTS INFÈRTILS. EFECTE DEL TRACTAMENT COMBINAT DE PENTOXIFILINA I VITAMINA E SOBRE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DE LES PROTEÏNES REGULADORES DEL COMPLEMENT (CD46, CD55 I CD59), EL VOLUM I EL GRUIX ENDOMETRIAL

Hem estudiat l'efecte del tractament antioxidant de pentoxifilina i vitamina E *in vivo*, en l'endometri de pacients infèrtils que van sotmetre's a tècniques de reproducció assistida a l'hospital Centre Hospitalier Intercommunal Poissy-Saint-Germain-en-Laye (França). Hem analitzat el volum i el gruix de l'endometri, obtinguts pels ginecòlegs d'aquest hospital. Per altra banda, i gràcies a les biòpsies endometrials realitzades en aquests pacients i en dones fèrtils, hem quantificat tres proteïnes reguladores del complement.

5.4.1 ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DE LES PROTEÏNES REGULADORES DEL COMPLEMENT EN PACIENTS FÈRTILS I INFÈRTILS, TRACTADES AMB PENTOXIFILINA I VITAMINA E

La proteïna CD46 està sobreexpressada significativament en les pacients infèrtils (126 còpies de mRNA \pm 19,3 per cada 10^3 còpies de β -actina) respecte a les dones fèrtils (57,43 còpies \pm 12,81 per cada 10^3 còpies de β -actina). Si comparem les pacients infèrtils que han estat tractades amb pentoxifilina i vitamina E amb les dones control, podem observar que no hi ha diferències significatives ($83,68 \pm 10,10$ vs $57,43 \pm 12,81$, respectivament). Per tant, el tractament fa decreïxer l'expressió gènica de CD46 en els pacients infèrtils, sent semblant als valors trobats en les dones fèrtils (figura 33A). Aquest fet ens mostra l'efecte beneficiós del tractament en l'expressió d'aquesta proteïna.

L'expressió de la proteïna CD55 és molt variable entre pacients, i això fa que no observem cap tipus de diferència significativa. Com els valors obtinguts no tenen una

distribució normal, s'ha calculat la mediana i els percentils 25% i 75% de les dades (figura 33B). L'expressió gènica de la proteïna CD55 en dones fèrtils (14,32 còpies per cada 10^3 còpies de β -actina) és inferior al valor en els pacients infèrtils (51,2 còpies). El tractament amb pentoxifilina + vitamina E en les pacients infèrtils també disminueix els valors d'aquesta proteïna a 33,64 còpies de CD55 per cada 10^3 còpies de β -actina.

Els valors obtinguts per a la proteïna CD59 tampoc tenen una distribució normal, i per tant, s'ha calculat la mediana i els percentils 25% i 75% de les dades (figura 33C). Aquesta proteïna CD59 també es troba sobreexpressada significativament en pacients infèrtils (82,7 còpies per cada 10^3 de β -actina) respecte a les dones fèrtils (25,68 còpies per cada 10^3 de β -actina). El tractament antioxidant fa disminuir la mediana de l'expressió gènica de les dones infèrtils (58,74 còpies per cada 10^3 de β -actina), encara que segueix sent significativament diferent quan ho comparem amb l'expressió gènica en les dones fèrtils. Per tant, en aquest cas, el tractament té cert efecte sobre la proteïna CD59, però no tant acusat com en la proteïna CD46.

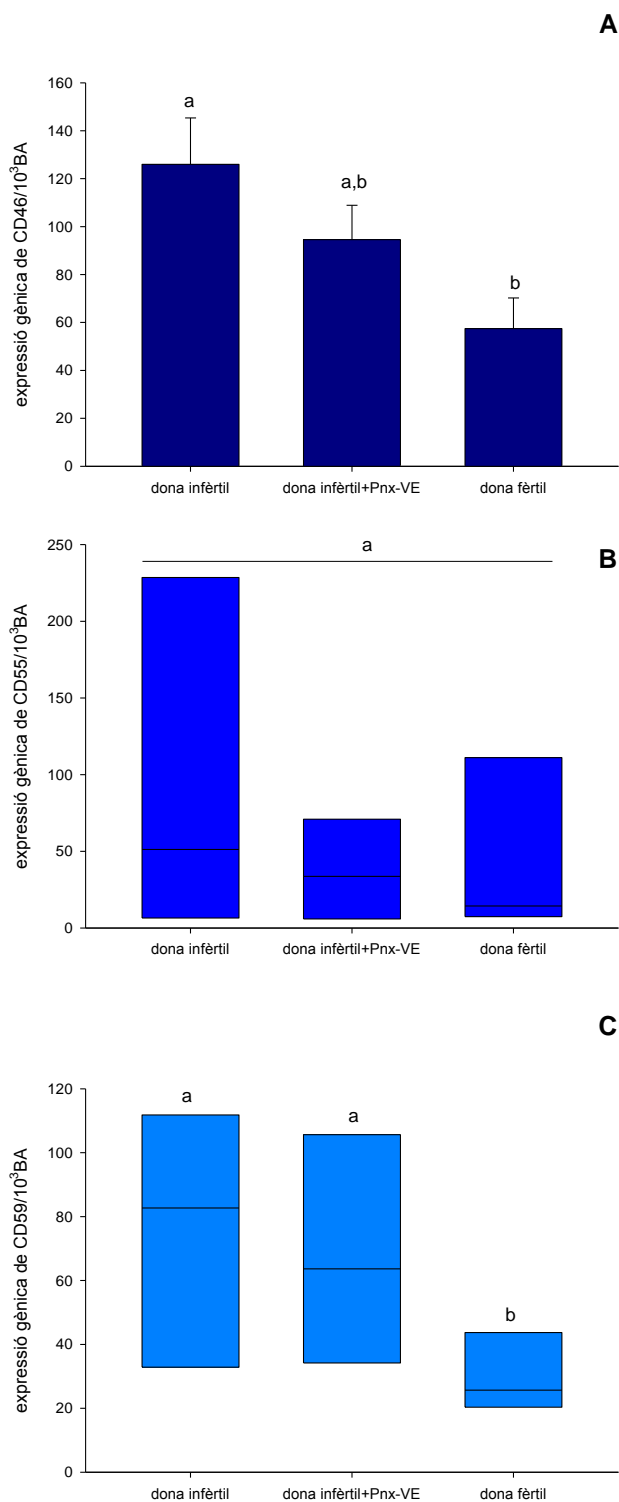


Figura 33. Avaluació de l'expressió gènica de les proteïnes reguladores del complement en el teixit endometrial de dones infèrtils, infèrtils tractades amb pentoxifilina + vitamina E (Pnx-VE) i dones fèrtils. (A) les barres representen la mitjana + ES de l'expressió gènica de CD46 en 14 pacients infèrtils i 11 fèrtils. Les diferents lletres indiquen diferències significatives ($p < 0,05$), segons el test de la t-student. (B) i (C) les caixes representen la mediana amb els percentils 25% i 75% de l'expressió gènica de CD55 i CD59, respectivament. Les diferents lletres indiquen diferències significatives ($p < 0,05$), segons el test no paramètric Mann-Whitney Rank Sum Test.

5.4.2 AVALUACIÓ DEL TRACTAMENT COMBINAT DE PENTOXIFILINA I VITAMINA E EN PACIENTS INFÈRTILS

5.4.2.1 EFECTE DEL TRACTAMENT COMBINAT EN EL VOLUM I GRUIX ENDOMETRIAL

El volum endometrial i el gruix de l'endometri van augmentar el seu valor després del tractament amb pentoxifilina i vitamina E. En el cas del volum endometrial, que en tots els casos era inferior o igual a 2cm^3 abans del tractament, l'increment es dona en 12 de les 14 dones infèrtils tractades. Aquests 12 pacients van augmentar $0,4\text{ cm}^3$ el seu volum endometrial, és a dir, tenien una mitjana del volum endometrial de $1,6\text{ cm}^3 \pm 0,1$ abans del tractament i després la mitjana observada és de $2,2\text{ cm}^3 \pm 0,2$ (figura 34).

El gruix de l'endometri després del tractament combinat es va veure augmentat en 10 dels 14 pacients estudiats. En aquest cas, els pacients tenien una mitjana del gruix endometrial de $7,9\text{ mm} \pm 0,4$ abans del tractament i després, aquesta mitjana ha incrementat a $8,9\text{ mm} \pm 0,5$, és a dir, van augmentar 1mm el gruix de l'endometri (figura 34).

5.4.2.2 EFECTE DEL TRACTAMENT COMBINAT EN L'EXPRESSIÓ GÈNICA DE LES PROTEÏNES REGULADORES DEL COMPLEMENT

L'expressió gènica de les proteïnes reguladores del complement (CD46, CD55 i CD59) abans i després del tractament antioxidant en pacients infèrtils no varia significativament. Malgrat això, detectem una tendència molt clara en disminuir la seva expressió després del tractament.

En el cas de la proteïna CD46 hi ha una disminució de l'expressió de CD46 endometrial en 10 dels 14 casos estudiats, és a dir, en un 71% dels pacients tractats (figura 35A). Aquests 10 casos, el tractament antioxidant provoca un decreixement de $153\text{ còpies de mRNA} \pm 18,4$ a $72,9\text{ còpies} \pm 15,3$, és a dir, en quasi la meitat de còpies que tenien inicialment. L'expressió de la proteïna CD55, disminueix únicament en el 50% dels 14 casos estudiats (figura 35B). La proteïna CD59, decreix en 8 dels 14 pacients infèrtils i un cas va mantenir-se igual. En aquests 8 pacients disminueix un 50%

la seva expressió gènica respecte a l'expressió obtinguda abans del tractament (figura 35C).

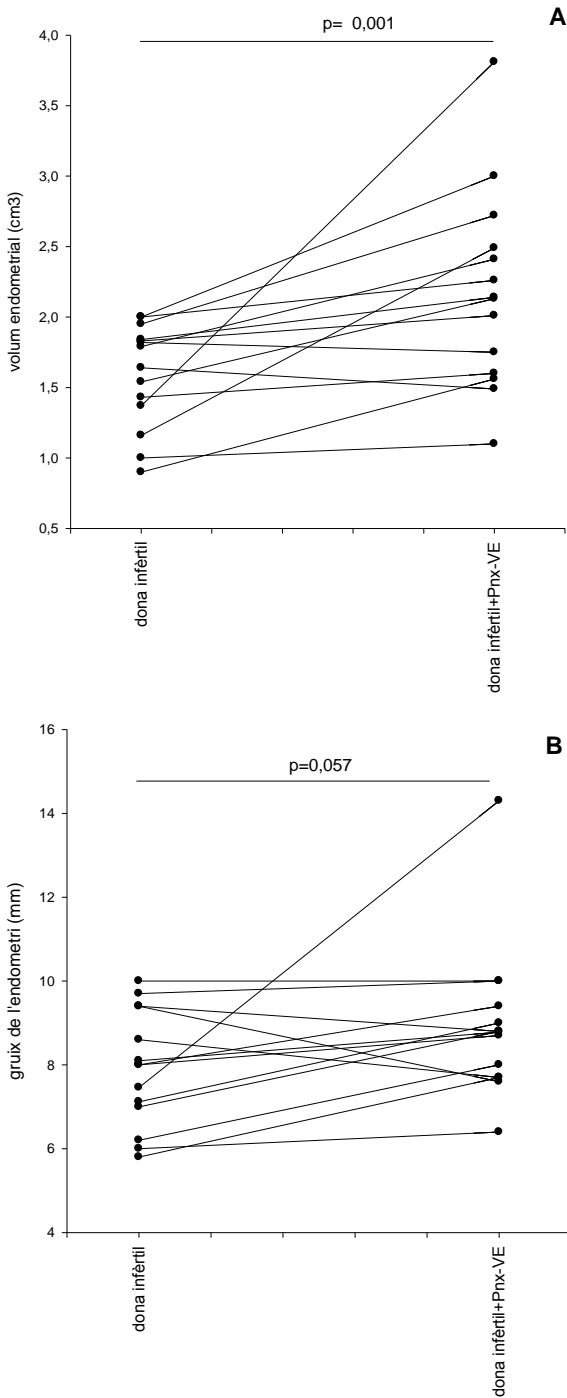


Figura 34. Efecte del tractament combinat de pentoxifilina i vitamina E (Pnx-VE) en l'endometri de pacients infèrtils. L'anàlisi estadística s'ha realitzat mitjançant el test Wilcoxon Signed Rank test. (A) volum endometrial; (B) gruix endometrial.

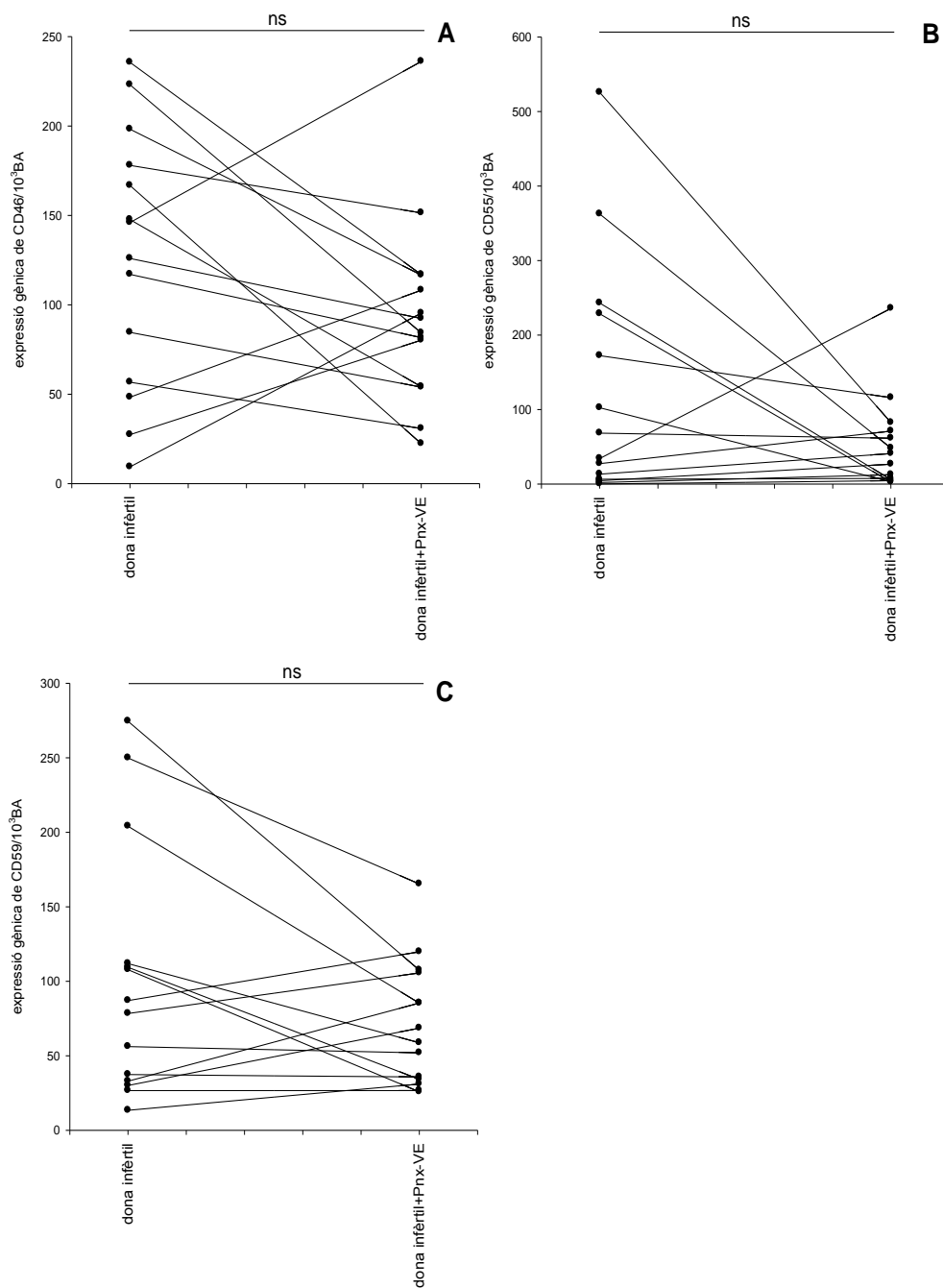


Figura 35. Efecte del tractament combinat de pentoxifilina i vitamina E (Pnx-VE) en l'expressió gènica de les proteïnes reguladores del complement en l'endometri de les pacients infèrtils. L'anàlisi estadística s'ha realitzat mitjançant la t-student per a dades aparellades. (A) CD46; (B) CD55; (C) CD59; ns=no significatiu.

5.4.3 CORRELACIÓ DE LES TRES PROTEÏNES REGULADORES DEL COMPLEMENT

Es va analitzar el fet que les proteïnes CD46, CD55 i CD59 incrementessin o disminuïssin la seva expressió gènica conjuntament en els pacients infèrtils, ja que són proteïnes que regulen l'activació de la cascada del complement. Els nostres resultats mostren que existeix una correlació moderada ($r=0,63$, $p=0,01$) quan analitzem l'expressió gènica de CD46 i de CD59 conjuntament. Així podem dir que, en aquest cas, ambdós proteïnes tenen certa tendència a expressar-se conjuntament (figura 36A). En els resultats obtinguts per a CD46-CD55 i CD55-CD59 observem que existeix una correlació feble ($r=0,49$ i $r=0,5$, respectivament), encara que no arriba a ser significativa en els pacients infèrtils (figura 36B i 36C).

El tractament combinat amb pentoxifilina i vitamina E administrat en els pacients infèrtils no afecten de la mateixa manera a l'expressió d'aquestes tres proteïnes. No hem observat cap mena de correlació en la disminució d'aquestes proteïnes causada pel tractament combinat (dades no mostrades).

De la mateixa manera, tampoc hem obtingut cap relació en l'expressió gènica d'aquestes proteïnes en el grup de dones fèrtils. És a dir, en aquelles dones que tenia l'expressió gènica d'una de les proteïnes més elevada que la mitjana no observem un augment en les altres dos proteïnes (dades no mostrades).

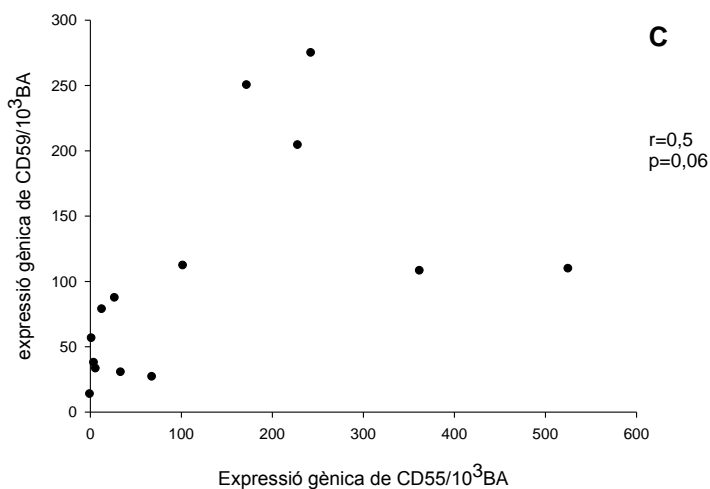
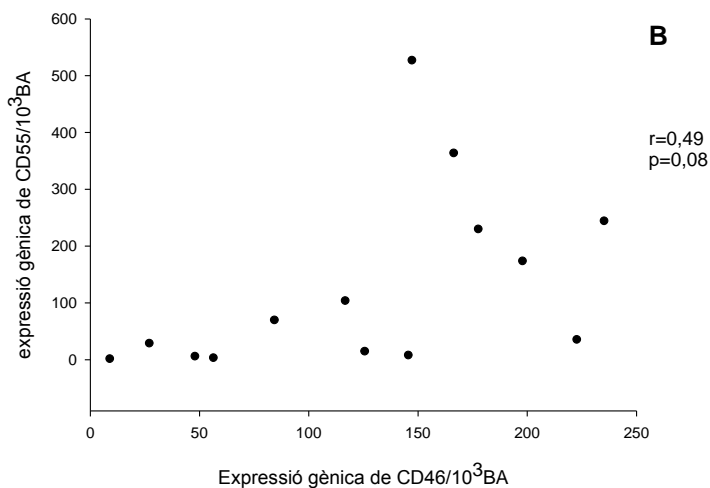
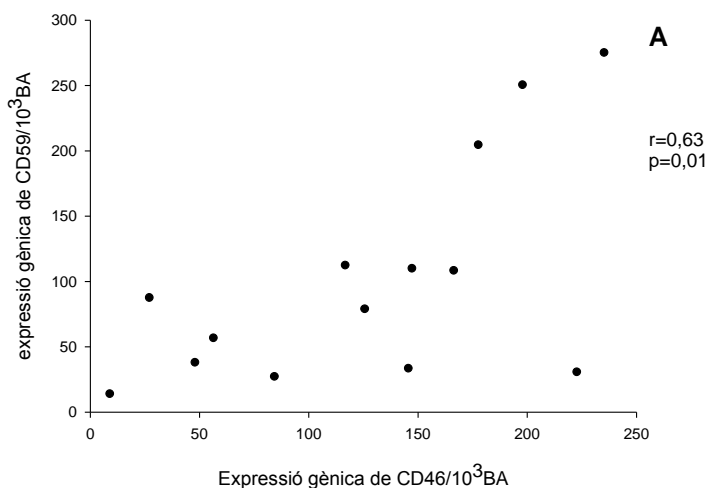


Figura 36. Correlació de les proteïnes reguladores del complement en 14 pacients infèrtils. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant la correlació de pearson en que "r" és el coeficient de correlació i "p" el p-valor. Cada punt representa el valor de (A) CD46 vs CD59, (B) CD46 vs CD55 i (C) CD55 vs CD59 per a cada pacient.

6.DISSCUSSIÓ

Aquesta tesis ens mostra els resultats de l'acció de varis antioxidants (NAC, quercetina, catequina i vitamina E) en un model d'oxidació *in vitro* de les cèl·lules implicades en la implantació embrionària (cèl·lules endometrials i de trofoblast). Per altra banda, també s'avalua un tractament combinat de vitamina E i pentoxifilina *in vivo*, en pacients infèrtils remesos a tècniques de reproducció assistida.

Les cèl·lules *per sé* tenen uns sistemes d'antioxidants endògens que les protegeixen dels efectes nocius de les ROS. Aquests mecanismes i la incorporació d'antioxidants exògens per la dieta fan que hi hagi un equilibri entre les ROS generades fisiològicament i els antioxidants. Quan les ROS es mostren augmentades, generalment lligada a la fisiopatologia d'algunes malalties, l'administració d'un suplement amb antioxidants exògens pot exercir un efecte beneficiós. Aquesta tesis està centrada en estudiar l'efecte de l'administració d'antioxidants en les cèl·lules implicades en la implantació embrionària i en patologies que causen baixes taxes d'embaràs.

S'ha establert un model d'oxidació *in vitro* tant de cèl·lules endometrials com de cèl·lules de trofoblast, emprant el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) com agent oxidant. El H_2O_2 s'utilitza àmpliament en la literatura per a l'estudi de l'estrès oxidatiu *in vitro*, variant el període d'incubació i la concentració d'aquest en el cultiu cel·lular. Nosaltres hem oxidat les cèl·lules durant 3 hores, com va realitzar Peng i col.⁹⁵ en el seu treball. Aquesta incubació, però, és bastant llarg si el comparem amb la majoria d'estudis realitzats⁹⁶, on s'utilitza una incubació de H_2O_2 durant 15, 30 o 60 minuts. Nosaltres vam voler provocar una oxidació més prolongada, aproximant-nos a un estrès més crònic present en patologies com l'endometriosi, la preeclàmpsia o l'obstrucció de trompes de Fal·lopi.

La susceptibilitat cel·lular al H_2O_2 és diferent segons les cèl·lules en les quals estem treballant i el temps d'incubació. Rah i col.⁹⁷ van descriure que les cèl·lules endotelials vasculares mantenen la viabilitat cel·lular en un 68% quan s'incubaven amb 10mM de H_2O_2 durant 24 hores. Nosaltres hem observat que la viabilitat de les cèl·lules endometrials i de trofoblast comença a disminuir entorn a una oxidació de 1,5-2mM de H_2O_2 durant 3 hores. Malgrat això, les cèl·lules de trofoblast són més sensibles a l'oxidant ja que petites variacions en la concentració de H_2O_2 provoca una disminució més acusada en la viabilitat d'aquestes cèl·lules que en les cèl·lules endometrials.

En el cas de les cèl·lules endometrials els resultats de viabilitat pel mètode de MTT es van corroborar amb el percentatge de cèl·lules vives mitjançant el mètode de l'externalització de la fosfatidilserina. En ambdós mètodes, la disminució de la viabilitat observada per a cada tipus de citotoxicitat (nul·la, moderada i severa) és estadísticament diferent entre elles. Si comparem aquests dos mètodes, els resultats obtinguts pel mètode de MTT té valors inferiors als observats pel mètode de l'externalització de la fosfatidilserina a les 24h després de l'oxidació. Aquesta diferència és deguda a que el primer mètode avalua l'activitat cel·lular, més concretament l'activitat mitocondrial i el segon mètode descriu la cèl·lula viva no apoptòtica. Per tant, aquelles cèl·lules que estan sotilment danyades per l'estrès oxidatiu tindran disminuït el seu metabolisme cel·lular però no entren en el procés apoptòtic ni necròtic.

Varis estudis han demostrat l'acció antioxidant i antiinflamatòria del NAC. Sadowska i col.⁹⁸ van escriure una ampla revisió d'aquest efectes *in vivo* i *in vitro* en diferents tipus cel·lulars, espècies animals i en diferents patologies humanes. Aquest antioxidant pot restablir l'estat redox intracel·lular i modular les vies de transcripció sensibles a l'oxidació. L'acció antioxidant del NAC actua bàsicament, per dos mecanismes. Per una banda, pot actuar directament capturant els radicals lliures del medi de cultiu, i per altra banda com a precursor de la síntesi del glutatió (GSH), antioxidant cel·lular.

Alexandre i col.⁹⁹ van observar que el NAC i el GSH disminuïa la citotoxicitat del paclitaxal, un agent anticancerigen, en cèl·lules epitelials de pulmó *in vitro*. Van demostrar que aquesta citotoxicitat estava mediada per l'acumulació del H₂O₂ intracel·lular i que l'administració d'aquests antioxidants decreixia tant el H₂O₂ intracel·lular com la citotoxicitat produïda. Luo i col.¹⁰⁰ van demostrar l'acció antioxidant del NAC *in vivo* en disminuir l'estrès oxidatiu que produïa l'agent antitumoral cis-platí en rates. D'acord amb aquests autors, els nostres resultats mostren que el NAC protegeix eficientment de la citotoxicitat produïda pel H₂O₂ tant en les cèl·lules endometrials com en les cèl·lules de trofoblast (figura 20 i 24).

La capacitat antioxidant dels flavonoides depèn de la seva estructura molecular⁷⁸ i de l'afinitat i permeabilitat a la membrana plasmàtica cel·lular per a poder incorporar-se a la cèl·lula^{101,102}. Segons Bors i col.⁷⁸, els flavonoides poden contenir fins a tres zones de la molècula que defineixen el seu potencial antioxidant i/o la captura de les ROS (figura

8F). La quercetina té aquestes tres zones antioxidants i la catequina només en té una. A part, l'eficiència en l'activitat antioxidant també depèn de la naturalesa del radical lliure i el seu mecanisme específic de la reacció neutralitzadora¹⁰³.

Varis autors han demostrat que la quercetina confereix major protecció cel·lular que la catequina vers a la citotoxicitat del H₂O₂. Rice-Evans i col.¹⁰⁴ van comparar l'índex de l'activitat antioxidant equivalent al Trolox (TEAC) de diversos flavonoides i la quercetina era l'agent que presentava major activitat antioxidant. La catequina presentava, aproximadament, la meitat de l'activitat antioxidant de la quercetina. Més recentment, Zhang i col.¹⁰⁵ descriuen que tant la quercetina com la catequina mostraven una acció protectora vers la citotoxicitat del H₂O₂ en limfòcits T humans, encara que la quercetina presentava major eficiència que la catequina. Ambdós autors, atribueixen aquests resultats a l'estructura molecular descrita per Bors i col. Els nostres resultats també mostren que la quercetina protegeix a les cèl·lules, tant les endometrials com les de trofoblast, de la citotoxicitat provocada pel H₂O₂. Malgrat això, nosaltres no observem que la catequina millori la viabilitat cel·lular que es veu disminuïda per l'estrès oxidatiu, quan la comparem amb les cèl·lules controls. Creiem que la capacitat antioxidant d'aquest flavonoide no és suficient pel grau d'estrès oxidatiu que hem produït, és a dir, no pot neutralitzar gran part del H₂O₂ que hem addicionat en el cultiu cel·lular i per tant, el dany cel·lular que ocasiona l'oxidant és elevat.

La vitamina E és el major antioxidant lipofílic d'origen exogen que es troba en els teixits humans. Principalment, protegeix la membrana lipídica i estructures lipoproteiques contra la peroxidació lipídica ocasionada per l'estrès oxidatiu. La seva capacitat antioxidant rau en el grup hidroxil en l'anell aromàtic. Aquest grup dona l'hidrogen que estabilitza al radical lliure d'oxigen i la vitamina E forma un radical relativament estable que torna a la seva estructura inicial gràcies a substàncies com l'àcid ascòrbic (figura 10B). Malgrat aquestes propietats antioxidants ben establertes, l'eficiència del suplement de vitamina E en pacients que pateixen patologies que cursen amb estrès oxidatiu no està molt clara^{81,106,107,108}.

S'observa, també, una manca de consens entre els efectes beneficiosos de la vitamina E *in vitro*. Lopaczynski i Zeisel¹⁰⁹ van demostrar l'efectivitat del pretractament del NAC amb combinació a la vitamina E en l'apoptosi induïda per irradiació de 5Gy en cèl·lules

leucèmiques humanes. Aquesta apoptosi van determinar que estava mediada per ROS. Més recentment Dam i col.¹¹⁰ van mostrar que en individus sans, la teràpia amb α -tocoferol inhibia, *in vitro*, la peroxidació lipídica induïda pel H_2O_2 en un cultiu primari de cèl·lules endotelials extretes de la vena umbilical. Per altra banda, altres autors^{111,112}, d'acord amb els nostres resultats, no observaven que la vitamina E reduís els efectes nocius de l'estrès oxidatiu. Osakada i col.¹¹¹ revelaven que α -tocoferol no disminuïa la mort neuronal que induïen amb el H_2O_2 , quan aquest dos agents es trobaven simultàniament en el cultiu. D'aquesta mateixa manera, Wu i col.¹¹² tampoc van observar cap efecte antioxidant del α -tocoferol vers el H_2O_2 en les cèl·lules Caco-2. Nosaltres hem mostrat que α -tocoferol administrat abans, durant o després de l'estrès oxidatiu amb H_2O_2 no millora la viabilitat en les cèl·lules endometrials.

El α -tocoferol en aquest estudi s'ha inclòs en 3 tipus de liposomes (SPC, SPC/DPPA i HSPC/DPPA), ja que la naturalesa lipofílica d'aquest agent antioxidant no permet dissoldre'l en un medi aquós. Hem observat que tots els diferents tipus de liposomes s'incorporen a la membrana lipídica de les cèl·lules endometrials però amb una eficiència diferent. La cinètica d'incorporació del liposomes depèn de la fluïdesa de membrana dels liposomes. D'aquesta manera, HSPC/DPPA- Vit E és l'estructura més rígida de les 3 i és aquesta la que presenta la incorporació més lenta en la cèl·lula (el 61% de la seva incorporació es presenta entre les 6 i 24 hores de cultiu). En canvi, el SPC- Vit E és el liposoma que té una temperatura de transició més baixa i quasi el 75% de la seva incorporació es produeix durant la primera hora de cultiu amb les cèl·lules endometrials (Taula II).

L'ús dels antioxidants inclosos en liposomes estan àmpliament estudiats. Elliot i col.¹¹³ van demostrar que la preincubació de vitamina E inclosa en liposomes no protegia de l'acció oxidant del H_2O_2 . El peròxid d'hidrogen disminuïa la transcripció mitocondrial en la línia cel·lular de limfòcits Molt-17. Malgrat això, mostraven que els liposomes que contenen β -carotè podia revertir, parcialment, aquesta supressió transcripcional causada per l'estrès oxidatiu. Per altra banda, recentment, Wigenstam i col.¹¹⁴ van demostrar l'acció beneficiosa del α -tocoferol inclosa en liposomes en evitar l'acció inflamatòria induïda pel melfalan en els pulmons de ratolins. El nostre grup vam mostrar que la vitamina E prevenia l'acció inflamatòria provocada per l'administració de LPS

intraperitoneal en ratolins. La teràpia oral amb vitamina E inclosa en liposomes abans de la injecció de LPS, incrementava els embrions viables i disminuïa la població de macròfags ROS-positius en el peritoneu del ratolí respecte als animals tractats només amb LPS (annex II)⁷⁰.

L'efecte antioxidant dels agents estudiats, si n'hi ha, es produeix quan l'oxidant i l'antioxidant romanen conjuntament en el cultiu. Aquest és el període que comparteixen tots els tractaments que presenten l'acció antioxidant en les cèl·lules endometrials (figura 13). L'acció més efectiva i potent és la capacitat de l'antioxidant per a neutralitzar, directament, el H₂O₂. La preincubació o postincubació d'aquests agents antioxidants no augmenta la seva eficiència en el nostre model cel·lular. Chen i col.¹¹⁵ van observar l'acció antioxidant de la preincubació del NAC en cèl·lules neuronals oxidades, posteriorment, amb H₂O₂ sol (0.1mM). Aquest pretractament reduïa la generació de ROS intracel·lular, la mort i el canvi de morfologia de la cèl·lula que es produïa amb l'oxidació. Segons els nostres resultats *in vitro*, la preincubació o la postincubació amb els agents antioxidants no van mostrar una disminució/reversió del dany oxidatiu. És per aquesta raó, que en els posteriors experiments únicament es va utilitzar el cotractament oxidant/antioxidant, tant per a l'establiment del model d'oxidació de les cèl·lules de trofoblast com per a l'anàlisi dels processos d'apoptosi i cicle cel·lular d'ambdós tipus cel·lulars.

Els nivells de ROS poden regular el destí de les cèl·lules de l'embrió i modular-lo cap a la proliferació, diferenciació, apoptosi o necrosi. Quan aquests nivells són baixos, les cèl·lules tendeixen a proliferar i si són moderats a diferenciar-se. La mort cel·lular (apoptosi o necrosi) succeeix quan l'oxidació és alta¹¹⁶. El tipus de mort cel·lular que provoca l'estrès oxidatiu depèn tant del tipus cel·lular que s'està estudiant, de l'agent oxidant que s'utilitza i de la magnitud de l'oxidació que es produeix. La mort cel·lular per necrosi o l'apoptosi fisiològica produeix unes conseqüències diferents, ja que s'indueix la inflamació o no en el teixit, respectivament. Ara bé, en la inducció d'apoptosi provocada per l'estrès oxidatiu també induiria la inflamació.

En aquesta tesis, hem mesurat l'apoptosi mitjançant 2 mètodes en els dos tipus cel·lulars: l'activació de la caspasa-3 i l'externalització de la fosfadilserina. Vam observar, però, que en les cèl·lules de trofoblast el mètode de l'externalització de la

fosfatidilserina no es podia dur a terme. La tripsinització que s'efectua danya la membrana cel·lular, provoca que l'anexina pogui entrar en la cèl·lula i tenyir la fosfatidilserina que es troba en la capa interna de la membrana plasmàtica. Per tant, en condicions normals observàvem falsos positius per aquesta tinció.

L'externalització de la fosfatidilserina ens mostra si la mort es provoca per apoptosi. Existeix molta controvèrsia entre autors que diuen que les cèl·lules que han patit apoptosi i que es troben en una fase d'apoptosi tardana, es poden distingir o no de les cèl·lules que han patit necrosi utilitzant aquesta tècnica^{117,118}. Per una banda, hi ha autors com Kaur i col.¹¹⁷ que creuen que en l'apoptosi tardana i en la necrosi no es conserva l'integritat de la membrana i per tant, la tinció amb l'anexina (An) es dóna quan la fosfatidilserina està en la cara externa i la interna de la membrana cel·lular. Aquestes cèl·lules, doncs, no es poden diferenciar entre si i es tenyeixen tant amb el iodur de propidi com amb l'anexina (An+/PI+). Per altra banda, altres autors com Augustin i col.¹¹⁸ pensen que el marcatge de la fosfatidilserina es dóna únicament en les cèl·lules apoptòtiques i la tinció amb iodur de propidi diferenciarà si aquesta apoptosi és primerenca (An+/PI-) o tardana (An+/PI+). La necrosi es diferencia amb la manca de tinció de la fosfatidilserina i el marcatge amb iodur de propidi. D'acord amb Kaur i col., nosaltres hem considerat que les cèl·lules que són iodur de propidi positives són cèl·lules mortes, independentment de com s'hagués iniciat aquest procés.

Les caspases estan activades en l'apoptosi de l'endometri i en línies cel·lulars endometrials com la HHUA¹¹⁹. Otsuki¹¹⁹ va analitzar l'activitat de les caspases-3, -8 i -9 i van observar que tenien major expressió en el final la fase secretora del cicle menstrual i que la caspasa-3 era la proteasa que major expressió tenia. Aquest mateix patró s'observava en les cèl·lules HHUA quan s'indueix l'apoptosi amb un anticòs anti-Fas. De la mateixa manera, les cèl·lules de trofoblast també expressen aquesta caspasa quan s'indueix l'apoptosi amb l'estatina simvastatina, tractament que es dóna per a disminuir els nivells de colesterol plasmàtics¹²⁰. El procés d'externalització de la fosfatidilserina en l'apoptosi induïda per H₂O₂ s'ha observat tan en cèl·lules endometrials¹²¹ com en cèl·lules del trofoblast¹²².

Yang i col.¹²¹ van observar que les cèl·lules estromals de l'endometri (ESC) de pacients amb adenomiosi eren més resistents a la inducció *in vitro* de l'apoptosi/mort

cel·lular mitjançant 200µM de H₂O₂, comparat amb les ESC obtingudes del grup control. Els nostres resultats mostren que el H₂O₂, en condicions que produeixen una citotoxicitat moderada, provoca la mort de les cèl·lules endometrials majoritàriament mitjançant apoptosi. El percentatge de cèl·lules mortes és molt semblant al percentatge de cèl·lules apoptòtiques, fet que ens fa pensar que les cèl·lules mortes són majoritàriament les cèl·lules que romanen en un estadi d'apoptosi tardana. En condicions de citotoxicitat severa, creiem que la mort cel·lular es produeix mitjançant apoptosi i necrosi, ja que el percentatge d'apoptosi és molt inferior als nivells de mort cel·lular i per tant, pot haver-hi un altre origen d'aquesta mort cel·lular, la necrosi (figura 27). Dennerly¹²³ va revisar aquest efecte dosi depenen on, segons el grau d'estrès oxidatiu que es produïa, podia provocar apoptosi en un estrès oxidatiu lleu i apoptosi/necrosi en un estrès oxidatiu elevat.

L'apoptosi primerenca analitzada mitjançant l'externalització de la fosfatidilserina per citometria i l'activació de la caspasa-3 en les cèl·lules endometrials donen resultats molt semblants. L'increment observat en l'activitat de la caspasa-3 en condicions de citotoxicitat moderada (CM) i severa (CS) (1,81 i 3,5, respectivament) (figura 25), es detecta, també, en el percentatge cel·lular de cèl·lules apoptòtiques Ann+/ PI- a les 24 hores (control: 3,1%; CM: 6,02%; CS: 11,78%) (figura 27B). Com era d'esperar, aquest increment és significatiu quan augmenta la citotoxicitat, en ambdós tècniques.

Tjoa i col.¹²⁴ van observar que l'estrès oxidatiu induïa mort cel·lular en explants de cèl·lules de trofoblast extrets de placenta humana. Van demostrar que aquesta mort es realitzava mitjançant una barreja d'apoptosi i de necrosi en condicions d'hipòxia-reoxigenació i que l'apoptosi es donava, majoritàriament, en les cèl·lules del sincitiotrofoblast. D'acord amb aquest resultat, Heazell i col.¹²⁵ van trobar aquests dos tipus de mort cel·lular quan aquests mateixos explants es cultivaven en condicions d'hipòxia (1% O₂). Malgrat això, diferien amb Tjoa i col. en que observaven l'apoptosi en les cèl·lules de citotrofoblast i la necrosi en les cèl·lules de sincitiotrofoblast. Moll i col.¹²⁶ van incubar aquest tipus cel·lular amb 1mM de peròxid d'hidrogen durant 48h i van observar apoptosi predominantment localitzada en les cèl·lules de sincitiotrofoblast. Ells, però, no van observar la inducció de necrosi en les cèl·lules de trofoblast.

Nosaltres no hem observat apoptosi cel·lular induïda pel H_2O_2 en les cèl·lules de trofoblast mitjançant l'activació de la caspasa-3. Malgrat que augmentàvem la citotoxicitat produïda per l'agent oxidant, això no es correlacionava amb un increment de l'activitat de la caspasa-3, com hem descrit anteriorment amb les cèl·lules endometrials. Aquest fet ens fa pensar en dos possibilitats: que la mort cel·lular que produïm és, exclusivament, mitjançant necrosi cel·lular o bé que l'apoptosi produïda es doni per l'activació d'una via caspasa-independent, com per exemple la calpaïna, com hipotitzaven Yang i col.¹²¹.

Hem analitzat l'acció dels antioxidants en la inducció de l'apoptosi i/o necrosi. Pollicita i col.¹²⁷ van observar que el virus de la immunodeficiència humana-1 produïa estrès oxidatiu i apoptosi en cèl·lules neuronals quan s'efectuava 3 i 5 dies d'exposició al virus. El tractament amb 1mM de NAC reduïa l'inducció d'apoptosi per aquest virus, encara que en les condicions més severes que van testar (5 dies) aquesta inhibició no era total. Per altra banda, Katoh i col.¹²⁸ van observar que el 100 μ M de H_2O_2 induïa la mort cel·lular de la línia cel·lular leucèmica HL60 mitjançant necrosi. Aquesta mort s'inhibia parcialment per la incubació de 1mM de NAC. Alexander i col.⁹⁹ van observar que el NAC inhibia l'apoptosi de les cèl·lules epitelials de pulmó induïda per l'agent anticancerígen paclitaxal.

D'acord amb aquests autors, els nostres resultats mostren que 15mM de NAC és capaç d'inhibir totalment la mort cel·lular en les cèl·lules endometrials ja sigui produïda per necrosi o apoptosi. El motiu pel qual nosaltres podem inhibir totalment l'apoptosi i/o la necrosi en el nostre model cel·lular podria ser que les concentracions de NAC utilitzades són les màximes que no danyava les nostres cèl·lules. En els altres treballs, la concentració del NAC utilitzada és inferior que la nostra.

Per altra banda, hem de tenir en compte que aquest efecte antiapoptòtic/antinecròtic del NAC es produeix en cèl·lules cancerígenes, fet que ens podria suggerir que l'ús d'antioxidants podria tenir un efecte advers en pacients amb càncer⁹⁹. El ROS en càncer té múltiples efectes, com el de inhibir la proliferació o el de afavorir-la, segons el grau d'estrès oxidatiu i el tipus de tumor que estiguem tractant. Per això, la possible teràpia anticancerígena s'estudia abordant aquests dos possibles efectes del ROS: inhibint els

antioxidants endògens o induint el ROS en les cèl·lules tumorals¹²⁹ o, per altra banda, implantant la teràpia antioxidant en malalts en càncer¹³⁰.

En quan als flavonoides, la majoria d'autors estan d'acord en que la quercetina i la catequina inhibeixen l'apoptosi o la necrosi induïda per acció del peròxid d'hidrogen^{131,132}, però altres autors, com nosaltres no trobem aquest efecte dels flavonoides^{133,134}. Sasaki i col.¹³³ van descriure que un cotractament de la quercetina amb 0,1mM de H₂O₂ no tenia un efecte protector de la necrosi en cèl·lules neuronals de rata. Per altra banda, Mercer i col.¹³⁴ van observar que la catequina no protegia de l'apoptosi que provocava el H₂O₂ en el cultiu de cèl·lules mesencefàliques embrionàries de rata. Malgrat això, la catequina tenia un efecte antiapoptòtic quan l'inductor de l'estrès oxidatiu era el hidrocloreur de n-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridini o el rotenon, entre altres agents.

Els nostres resultats mostren que els flavonoides disminueixen l'apoptosi i la necrosi en condicions de citotoxicitat moderada o citotoxicitat severa a 24h, malgrat que aquesta disminució no sigui estadísticament significativa. L'augment de cèl·lules vives observat en l'administració d'aquests agents es podria explicar per una lleugera inhibició d'aquests antioxidants en l'apoptosi/necrosi cel·lular (figura 28).

L'anàlisi del cycle cel·lular de les cèl·lules endometrials i de trofoblast ens mostra que, *per sé*, tenen una distribució cel·lular en cada fase del cycle molt diferent (figura 29). Aquesta distribució és intrínseca en cada línia i tipus cel·lular. Takai i col.¹³⁵ van analitzar el cycle de 3 línies cel·lulars endometrials humanes (Ishikawa, HHUA i la HEC-1B) i de 2 línies cel·lulars d'ovari humà (SK-OV-3 i OMC-3). Cadascuna d'elles té un percentatge de cèl·lules en cada fase del cycle més o menys diferent respecte una altra línia, independentment de que siguin cèl·lules endometrials o ovàriques. Malgrat això, en totes aquestes línies cel·lulars, el tractament amb bufalina (una medicina tradicional xinesa) afecta de la mateixa manera, augmentant la població en la fase G0/G1 del cycle.

Cong i col.¹³⁶ i Stöter i col.¹³⁷ han analitzat el cycle cel·lular de la línia cel·lular endometrial RL-95-2 (utilitzada en aquest estudi) i de les cèl·lules de trofoblast AC1-M88 (un altre subclon de l'híbrid de coriocarcinoma-trofoblast ACH1P), respectivament. En el primer estudi, el percentatge de cèl·lules endometrials en cada

fase del cicle és de 54,5%, 27,2% i 18,3% en les fases G0/G1, S i G2/M, respectivament. Aquests percentatges són lleugerament diferents dels obtinguts per nosaltres. Això és degut, segurament, perquè Cong i col. van sincronitzar les cèl·lules 48 hores abans del seu anàlisi. La sincronització de les cèl·lules s'utilitza quan es vol analitzar una proteïna en particular, com per exemple la inducció de ciclins o la fosforilació de quinases¹³⁶. Stöter i col.¹³⁷ van descriure el perfil del cicle cel·lular obtingut amb les cèl·lules AC1-M88 i era molt semblant al obtingut en el nostre estudi. En aquest cas, tampoc es va sincronitzar les cèl·lules.

Pel que fa al cicle cel·lular, els nostres resultats indiquen que el tractament amb H₂O₂ provoca una acumulació de les cèl·lules en la fase G2/M tant en les cèl·lules endometrials com en les cèl·lules de trofoblast. Aquesta es mostra tant en la citotoxicitat nul·la com moderada, tenint un destí final cel·lular ben diferenciat. En la citotoxicitat nul·la, les cèl·lules poden tornar al perfil del cicle cel·lular obtingut abans de l'oxidació. En canvi, en la citotoxicitat moderada, l'acumulació de cèl·lules en aquesta fase del cicle, es fa més acusada o es manté a les 48h en les cèl·lules endometrials i en les cèl·lules de trofoblast, respectivament (figura 30).

D'acord amb els nostres resultats, altres autors han descrit que l'estrès oxidatiu interfereix en el cicle cel·lular de les cèl·lules. Wu i col.¹³⁸ van observar que un oli soluble de l'all, el disulfur de dialil (DADS) incrementava el ROS intracel·lular en cèl·lules epitelials de pulmó. Aquest oli provocava una aturada del cicle cel·lular en la fase G2/M a les 24 hores en cultiu. Més recentment, Li i col.¹³⁹ han vist que el peròxid d'hidrogen indueix l'aturada del cicle en la fase G2/M en osteoblasts humà i de ratolí d'una manera dosi i temps depenent.

S'ha analitzat la relació entre l'aturada del cicle cel·lular i l'apoptosi. Takai i col.¹³⁵ van mostrar que la bufalina induïa l'aturada cel·lular en G0/G1 i l'apoptosi en varies línies cel·lulars d'endometri. Nilkaeo i col.¹⁴⁰ van demostrar que el tractament amb diversos agents antipalúdics induïen l'aturada del cicle cel·lular en diferents fases del cicle segons el fàrmac utilitzat i la inducció d'apoptosi en la línia cel·lular de trofoblast JAR. Per altra banda, Drukteinis i col.¹⁴¹ van analitzar l'efecte d'un component del fum del cigar, el benzo[a]pirè, en la línia cel·lular de trofoblast JEG-3. Aquest agent tòxic induïa l'aturada del cicle cel·lular en la fase G2/M però aquesta no anava acompanyada

d'un increment en l'apoptosi. Els nostres resultats mostren que el peròxid d'hidrogen provoca una aturada o alentiment de les cèl·lules en la fase G2/M del cicle de les cèl·lules de trofoblast en condicions citotoxicitat moderada i que no va acompanyada amb un increment de l'apoptosi. En canvi, en les cèl·lules endometrials es produeix l'aturada del cicle cel·lular en G2-M i també la inducció d'apoptosi.

Els antioxidants també poden influenciar en la inducció de l'aturada del cicle cel·lular per diferents agents. D'acord amb els nostres resultats, Wu i col.¹³⁸ van determinar que el tractament amb NAC inhibia l'aturada del cicle cel·lular i apoptosi provocada pel DADS, l'agent inductor del ROS intracel·lular.

La gran majoria d'estudis es centren en l'acció citotòxica dels flavonoides i com aquesta acció modula el cicle cel·lular o indueix en l'apoptosi de la cèl·lula. Tanigawa i col.¹⁴² van determinar que la quercetina, a una concentració de 80µM, inhibia el 50% de l'activitat metabòlica del cultiu de cèl·lules de càncer de fetge (IC50) i produïa una aturada del cicle cel·lular en la fase G2/M i apoptosi. Nosaltres hem analitzat l'acció antioxidant dels flavonoides (quercetina i catequina) a una concentració que no interferia en el cicle cel·lular de les cèl·lules ni produïa apoptosi o necrosi. Hem observat que la quercetina té més capacitat antioxidant que la catequina, és a dir, front a l'estrès oxidatiu en el cultiu, l'addició de quercetina manté les freqüències cel·lulars de cada fase del cicle semblants al control. La catequina, en canvi, no s'ha observat aquesta acció antioxidant.

En aquesta tesi hem volgut estudiar l'efecte que els antioxidants tenen sobre possibles marcadors de la infertilitat femenina i paràmetres morfològics de l'endometri. En col·laboració amb la dra. N. Lédée-Bataille, hem avaluat un tractament antioxidant *in vivo*, en pacients remeses al laboratori de reproducció assistida. Existeixen pocs assaigs clínics de tractaments antioxidants en pacients infèrtils o que tenen baixa taxa de fertilitat que siguin concloents ja sigui perquè no tenen un nombre de pacients suficients o perquè els resultats són massa heterogènics. Recentment, Clarke i col.¹⁴³ van escriure una revisió que es centrava en el paper que la vitamina E exerceix en la salut i en el tractament de certes patologies, com per exemple la preeclàmpsia. L'estrès oxidatiu està involucrada en la seva patogènesi i malgrat que l'ús d'antioxidants en aquesta malaltia semblaria potencialment beneficiós, hi ha estudis que no ho afirmen. Per altra banda, en

els laboratoris de reproducció assistida, les taxes de fertilitat són més baixes del que s'esperen malgrat els avenços tecnològics que s'han produït en els últims anys. Una de les possibles causes és l'efecte nociu que l'estrès oxidatiu té en aquest procés^{144,145}, però encara manquen estudis per confirmar si el tractament antioxidant podria millorar aquesta situació i quin és el tractament òptim.

Hem analitzat el tractament antioxidant combinat de la pentoxifilina i vitamina E en pacients amb problemes de fertilitat. La pentoxifilina, un derivat de la metilxantina, antagonitza la producció i activitat del TNF α i altres citocines. Encara que el TNF α es necessari en la primera etapa de la implantació embrionària, alts nivells d'aquesta citocina durant l'embaràs s'associen amb baixes taxes d'implantació embrionària, avortaments i preeclàmpsia¹⁴⁶. Per altra banda, la pentoxifilina inhibeix la generació del ROS, protegeix a les cèl·lules de la peroxidació lipídica i és capaç de reduir l'efecte tòxic del peròxid d'hidrogen sobre l'embrió *in vitro*¹⁴⁷. L'aport de vitamina E s'obté generalment de la dieta i actua evitant la peroxidació lipídica de les membranes cel·lulars. Varis estudis clínics van evidenciar que la concentració del suplement de vitamina E que és segura en la majoria d'adults és de 1073mg/dia (o 1600 UI/d)¹⁴⁸. Aquests nivells són bastant més alts que la quantitat de vitamina E que es recomana prendre, que és de 400UI/d. En el nostre estudi, els pacients van rebre un tractament combinat de pentoxifilina (800mg/dia) i vitamina E (1000 UI/dia) durant 2-3 mesos.

En aquest treball s'ha analitzat el gruix i el volum de l'endometri en dones que tenien unes taxes d'implantació embrionària més baixes que els controls. Lédée-Bataille i col.⁸⁸ van mostrar que el gruix de l'endometri incrementava de 4,9mm a 6,2mm després de 6 mesos de tractament amb pentoxifilina i vitamina E en un 72% de les pacients en estudi, fet que semblaria estar associada amb una major predisposició a l'embaràs. Més recentment, Acharya i col.⁸⁷ van trobar que un 73,7% de les pacients sotmeses al tractament amb pentoxifilina i vitamina E durant 3-4 mesos, augmentaven el gruix de l'endometri d'un 4,37mm a 6,05mm, fos quina fos l'etiologia d'aquest endometri prim. Nosaltres hem observat que aquest tractament antioxidant provoca un increment del gruix de l'endometri en un 71% de les pacients i un augment del volum endometrial en un 86% de les pacients en estudi. En concordança amb Friedler i col.⁵⁰ i Raga i col.⁵¹, aquest tractament antioxidant predisposaria a millorar la taxa d'implantació embrionària

en el laboratori de reproducció assistida ja que augmentaria tant el gruix com el volum endometrial.

Resultats previs del nostre grup mostraven un augment de les proteïnes reguladores del complement CD46, CD55 i CD59 en cèl·lules endometrials en condicions d'estrès oxidatiu *in vitro*⁴⁶. Aquest fet ens va suggerir que aquestes proteïnes podrien ser utilitzades com a marcador de infertilitat femenina. En aquesta tesi, hem analitzat l'expressió gènica de les proteïnes CD46, CD55 i CD59 en l'endometri de dones fèrtils i de pacients infèrtils, abans i després del tractament combinat amb pentoxifilina i vitamina E. Hem observat que les tres proteïnes estan incrementades en l'endometri de pacients infèrtils respecte als pacients fèrtils, sent estadísticament diferent en el cas de les proteïnes CD46 i CD59 (figura 35).

Un gran nombre de patologies que provoquen infertilitat poden cursar amb inflamació, estrès oxidatiu i dany cel·lular o tissular. Murray i col.¹⁴⁹ van descriure que les proteïnes reguladores del complement estaven augmentades en el càncer d'endometri. Per contra, Lee i col.¹⁵⁰ no van trobar diferències entre les proteïnes reguladores del complement CD46, CD55 i CD59 de l'endometri de dones fèrtils i pacients amb avortaments espontanis recurrents. Únicament van observar l'augment en l'expressió del receptor de la C5a, que proposen com a marcador en aquest tipus de pacients.

El tractament amb pentoxifilina i vitamina E dels pacients infèrtils disminueix l'expressió de les proteïnes reguladores del complement en l'endometri. Aquest fet ens corrobora la hipòtesis que les cèl·lules o teixit que pateixen estrès oxidatiu o estan danyats augmenten l'expressió de CD46, CD55 i CD59. Faltaria realitzar més estudis per comprovar si aquestes proteïnes poden tenir implicacions clíniques com a biomarcador de mal pronòstic per a l'obtenció de l'embaràs o bé, com a diana terapèutica per a millora les taxes d'implantació de pacients infèrtils.

L'estrès oxidatiu està present en moltes patologies, també és el cas de certes infertilitats. Potencialment, la utilització dels antioxidants podrien disminuir els efectes nocius de l'oxidació. Aquest és el cas dels diversos agents que hem estudiat en aquesta tesi. El NAC és l'antioxidant amb major eficiència en inhibir el dany oxidatiu *in vitro* en cèl·lules implicades en la implantació embrionària, com les cèl·lules endometrials i les de trofoblast. L'administració de vitamina E en el model animal i el tractament combinat

de pentoxifilina i vitamina E en humans, faria pensar en l'utilització d'aquest antioxidant *in vivo* per a millorar les taxes d'implantació embrionària i afavorir el desenvolupament de l'embaràs.

7. CONCLUSIONS

1. Hem estandaritzat i optimitzat un model d'oxidació *in vitro* amb cèl·lules endometrials per a l'estudi de l'acció antioxidant de la n-acetilcisteïna (NAC), la quercetina, la catequina i la vitamina E. Hem definit els graus de citotoxicitat provocada pel peròxid d'hidrogen en: citotoxicitat nul·la (0,1 i 1 mM de H₂O₂), citotoxicitat moderada (2 mM de H₂O₂) i citotoxicitat severa (3 i 5 mM de H₂O₂).
2. Hem estandaritzat i optimitzat un model d'oxidació *in vitro* amb cèl·lules de trofoblast per a l'estudi de l'acció antioxidant de NAC, la quercetina i la catequina. Hem definit els graus de citotoxicitat provocada pel peròxid d'hidrogen en: citotoxicitat nul·la (0,1 i 1 mM de H₂O₂), citotoxicitat moderada (1,5 i 2 mM de H₂O₂) i citotoxicitat severa (2,5 mM de H₂O₂).
3. La vitamina E inclosa en el liposoma neutre en estat fluid (SPC) és la forma que s'incorpora més ràpidament i eficientment a la cèl·lula endometrial.
4. L'addició de NAC, a una concentració de 15mM, presenta una òptima acció antioxidant en les cèl·lules endometrials i de trofoblast. El NAC inhibeix completament la mort cel·lular i l'aturada del cicle cel·lular induïda per l'estrès oxidatiu.
5. La quercetina, a una concentració de 150µM i 25µM en les cèl·lules endometrials i de trofoblast, respectivament, té una eficiència antioxidant inferior a la del NAC. En condicions de citotoxicitat moderada inhibeix la mort cel·lular, encara que aquest efecte no es produeix en condicions de citotoxicitat severa. La catequina, a una concentració de 150µM i 100µM en les cèl·lules endometrials i de trofoblast respectivament, no té cap efecte sobre la inhibició de la mort cel·lular.
6. En les nostres condicions d'estudi *in vitro*, la vitamina E, a una concentració de 8µg/ml, no millora la viabilitat cel·lular de cèl·lules endometrials, ni en condicions de citotoxicitat moderada ni severa.

7. L'efecte dels agents antioxidants estudiats sobre la citotoxicitat, mort i cicle cel·lular es manifesta quan els antioxidants estan presents durant l'estrès oxidatiu. Les condicions de pre- o postractament no tenen cap efecte.
8. L'estrès oxidatiu indueix la mort cel·lular per apoptosi i necrosi en les cèl·lules endometrials. En les cèl·lules de trofoblast, no hem observat la inducció de l'apoptosi en les condicions estudiades.
9. L'estrès oxidatiu provoca un alentiment o aturada del cicle cel·lular en la fase G2/M en les cèl·lules endometrials i de trofoblast.
10. En l'endometri de pacients infèrtils, l'expressió gènica de les proteïnes reguladores del complement CD46 i CD59 augmenta significativament si es compara amb l'expressió gènica d'aquestes proteïnes de l'endometri de dones fèrtils.
11. Els pacients infèrtils que han rebut el tractament combinat de pentoxifilina (800mg/dia) i vitamina E (1000UI/dia) durant 2-3 mesos, mostren una disminució, en el 71% i el 57% del pacients, en la expressió gènica de CD46 i CD59 respectivament, si es compara amb el mateix pacient abans del tractament.
12. L'expressió gènica de la proteïna CD46 té una correlació moderada ($r=0,63$) amb l'expressió gènica de la proteïna CD59. Aquesta correlació és significativa.
13. El tractament combinat amb pentoxifilina i vitamina E incrementa el gruix i el volum endometrial en un 71% i un 86% de les dones, respectivament.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Diedrich K, Fauser BC, Devroey P, Griesinger G. 2007. The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update* 13(4):365-77.
2. Gellersen B, Brosens IA, Brosens JJ. 2007. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin Reprod Med.* 25(6):445-53.
3. Harada T, Kaponis A, Iwabe T, Taniguchi F, Makrydimas G, Sofikitis N, Paschopoulos M, Paraskevaidis E, Terakawa N. 2004. *Hum Reprod Update.* 10(1):29-38. Review.
4. Lessey BA. 2000. Endometrial receptivity and the window of implantation. *Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology* 14 (5); 775-88.
5. Cavagna M, Mantese JC. 2003. Biomarkers of Endometrial Receptivity-A Review. *Placenta* 24: S39-S47.
6. Gilmore AP, Owens TW, Foster FM, Lindsay J. 2009. How adhesion signals reach a mitochondrial conclusion--ECM regulation of apoptosi. *Curr opin cell biol.* 21(5):654-61.
7. Gargett CE, Chan RW, Schwab KE. 2008. Hormone and growth factor signaling in endometrial renewal: role of stem/progenitor cells. *Mol Cell Endocrinol.* 288(1-2):22-9.
8. Huppertz B, Herrler A. 2005. Regulation of proliferation and apoptosi during development of the preimplantation embryo and the placenta. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 75(4):249-61.
9. Fietta P. 2007. Life-or-death fate in the adaptive immune system. *Riv Biol.* 100(2):267-83.
10. Seeman E. 2009. Bone modeling and remodeling. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 19(3):219-33. Review.
11. Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ. 2008. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 22(2):351-84.
12. Karalaki M, Fili S, Philippou A, Koutsilieris M. 2009. Muscle regeneration: cellular and molecular events. *In Vivo* 23(5):779-96.
13. Niklaus AL, Aubuchon M, Zapantis G, Li P, Qian H, Isaac B, Kim MY, Adel G, Pollard JW, Santoro NF. 2007. Assessment of the proliferative status of epithelial cell types in the endometrium of young and menopausal transition women. *Hum Reprod.* 22(6):1778-88.

14. Bartelmez GW. 1957. The form and functions of the uterine blood vessels in the rhesus monkey. *Contrib Embryol Carnegie Inst Wash* 36: 153-82.
15. Speroff L, Vander Wiele RL. 1971. Regulation of the human menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 109: 234-47.
16. Otsuki Y, Misaki O, Sugimoto O, Ito Y, Tsujimoto Y, Akao Y. 1994. Cyclic bcl-2 gene expression in human uterine endometrium during menstrual cycle. *Lancet* 344(8914):28-9.
17. Otsuki Y. 2001. Apoptosi in human endometrium: apoptotic detection methods and signaling. *Med Electron Microsc* 34: 166-73.
18. Harada T, Kaponis A, Iwabe T, Taniguchi F, Makrydimas G, Sofikitis N, Paschopoulos M, Paraskevaïdis E, Terakawa N. 2004. Apoptosi in human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod Update*. 10(1):29-38.
19. Meresman GF, Augé L, Barañao RI, Lombardi E, Tesone M, Sueldo C. 2002. Oral contraceptives suppress cell proliferation and enhance apoptosi of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. *Fertil. Steril.* 77(6):1141-7.
20. Yang JH, Wu MY, Chen CD, Chen MJ, Yang YS, Ho HN. 2007. Altered apoptosi and proliferation in endometrial stromal cells of women with adenomyosis. *Hum Reprod.* 22(4):945-52.
21. Kar M, Ghosh D, Sengupta J. 2007. Histochemical and morphological examination of proliferation and apoptosi in human first trimester villous trophoblast. *Hum Reprod.* 22(11):2814-23.
22. Huppertz B, Herrler A. 2005. Regulation of proliferation and apoptosi during development of the preimplantation embryo and the placenta. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75(4):249-61.
23. Burton GJ, Skepper JN, Hempstock J, Cindrova T, Jones CJ, Jauniaux E. 2003. A reappraisal of the contrasting morphological appearances of villous cytotrophoblast cells during early human pregnancy; evidence for both apoptosi and primary necrosi. *Placenta* 24(4):297-305.
24. Arechavaleta-Velasco F, Gomez L, Ma Y, Zhao J, McGrath CM, Sammel MD, Nelson DB, Parry S. 2008. Adverse reproductive outcomes in urban women with adeno-associated virus-2 infections in early pregnancy. *Hum Reprod.* 23(1):29-36.
25. Horne AW, Stock SJ, King AE. 2008. Innate immunity and disorders of the female reproductive tract. *Reproduction* 135(6):739-49.

26. Kämmerer U, von Wolff M, Markert UR. 2004. Immunology of human endometrium. *Immunobiology* 209(7):569-74.
27. Tang AW, Alfirevic Z, Quenby S. 2011. Natural killer cells and pregnancy outcomes in women with recurrent miscarriage and infertility: a systematic review. *Hum Reprod.* 25.
28. El Costa H, Casemayou A, Aguerre-Girr M, Rabot M, Berrebi A, Parant O, Clouet-Delannoy M, Lombardelli L, Jabrane-Ferrat N, Rukavina D, Bensussan A, Piccinni MP, Le Bouteiller P, Tabiasco J. 2008. Critical and differential roles of NKp46- and NKp30-activating receptors expressed by uterine NK cells in early pregnancy. *J Immunol.* 181(5):3009-17.
29. Vacca P, Pietra G, Falco M, Romeo E, Bottino C, Bellora F, Prefumo F, Fulcheri E, Venturini PL, Costa M, Moretta A, Moretta L, Mingari MC. 2006. Analysis of natural killer cells isolated from human decidua: Evidence that 2B4 (CD244) functions as an inhibitory receptor and blocks NK-cell function. *Blood* 108(13):4078-85.
30. Kopcow HD, Allan DS, Chen X, Rybalov B, Andzelm MM, Ge B, Strominger JL. 2005. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(43):15563-8.
31. Nagamatsu T, Schust DJ. 2010. The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface. *Reprod Sci.* 17(3):209-18.
32. Ligam P, Manuelpillai U, Wallace EM, Walker D. 2005. Localisation of indoleamine 2,3-dioxygenase and kynurenine hydroxylase in the human placenta and decidua: implications for role of the kynurenine pathway in pregnancy. *Placenta* 26(6):498-504.
33. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. 2010. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 63(6):601-10.
34. Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B, Nanan R. 2009. Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol.* 183(11):7023-30.
35. Guerin LR, Prins JR, Robertson SA. 2009. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Hum Reprod Update* 15(5):517-35
36. Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S. 2004. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod.* 10(5):347-53.

37. Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D, Suzuki D, Sakai M, Ito M, Shima T, Shiozaki A, Rolinski J, Saito S. 2007. Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol.* 149(1):139-45.
38. Miyazaki S, Tsuda H, Sakai M, Hori S, Sasaki Y, Futatani T, Miyawaki T, Saito S. 2003. Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua. *J Leukoc Biol.* 74(4):514-22.
39. Blois SM, Klapp BF, Barrientos G. 2011. Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: unravelling the functions of DC and NK cells. *J Reprod Immunol.* 88(2):86-92.
40. Girardi G, Bulla R, Salmon JE, Tedesco F. 2006. The complement system in the pathophysiology of pregnancy. *Mol Immunol.* 43(1-2):68-77.
41. Girardi G, Prohászka Z, Bulla R, Tedesco F, Scherjon S. 2011. Complement activation in animal and human pregnancies as a model for immunological recognition. *Mol Immunol.*, doi:10.1016/j.molimm.2011.04.011. En premsa.
42. Agostinis C, Bulla R, Tripodo C, Gismondi A, Stabile H, Bossi F, Guarnotta C, Garlanda C, De Seta F, Spessotto P, Santoni A, Ghebrehwet B, Girardi G, Tedesco F. 2010. An alternative role of C1q in cell migration and tissue remodeling: contribution to trophoblast invasion and placental development. *J Immunol.* 185(7):4420-9.
43. Derzsy Z, Prohászka Z, Rigó J Jr, Füst G, Molvarec A. 2010. Activation of the complement system in normal pregnancy and preeclampsia. *Mol Immunol.* 47(7-8):1500-6.
44. Nogawa Fonzar-Marana RR, Ferriani RA, Soares SG, Cavalcante-Neto FF, Teixeira JE, Barbosa JE. 2006. Expression of complement system regulatory molecules in the endometrium of normal ovulatory and hyperstimulated women correlate with menstrual cycle phase. *Fertil Steril.* 86(3):758-61.
45. Rooney IA, Oglesby TJ, Atkinson JP. 1993. Complement in human reproduction: activation and control. *Immunol Res.* 12(3):276-94.
46. Iborra A, Mayorga M, Llobet N, Martínez P. 2003. Expression of complement regulatory proteins [membrane cofactor protein (CD46), decay accelerating factor (CD55), and protectin (CD59)] in endometrial stressed cells. *Cell Immunol.* 223(1):46-51.
47. Fertility assessment and treatment for people with fertility problems. 2004. Disponible en: <http://guidance.nice.org.uk/CG11/Guidance/pdf/English>

48. Bedaiwy MA, Goldberg JM, Falcone T, Singh M, Nelson D, Azab H, Wang X, Sharma R. 2002. Relationship between oxidative stress and embryotoxicity of hydrosalpingeal fluid. *Hum Reprod.* 17:601-4.
49. Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JG. 2005. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil Steril.* 86(3):503-12.
50. Friedler S, Schenker JG, Herman A, Lewin A. 1996. The role of ultrasonography in the evaluation of endometrial receptivity following assisted reproductive treatments: a critical review. *Hum Reprod Update* 2(4):323-35.
51. Raga F, Bonilla-Musoles F, Casañ EM, Klein O, Bonilla F. 1999. Assessment of endometrial volume by three-dimensional ultrasound prior to embryo transfer: clues to endometrial receptivity. *Hum Reprod.* 14(11):2851-4.
52. Chandra J, Samali A, Orrenius S. 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 29:323-33.
53. Taylor CT. 2001. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. *Environ Toxicol Pharm.* 10:189-98.
54. Badia R, Iborra A, Palacio JR, Antich M, Martínez P. 2008. The effect of oxidative environment on immunosuppressive properties of human seminal plasma. *Am J Reprod Immunol.* 60(4):354-60.
55. Ezashi T, Das P, Roberts RM. 2005. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(13):4783-8.
56. Jauniaux E, Poston L, Burton GJ. 2006. Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update.* 12(6):747-55.
57. Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A, Sharma RK. 2000. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *Int J Fertil Womens Med.* 45(5):314-20.
58. Martzuk MM, Dionea L, Guo Q, Kumar TR, Lebovitz RM. 1998. Ovarian function in Superoxide Dismutase 1 and 2 Knockout Mice. *Endo.* 139: 4008-11
59. Agarwal A, Gupta S, Sikka S. 2006. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 18:325-32
60. Gupta S, Goldberg JM, Aziz N, Goldberg E, Krajcir N, Agarwal A. 2008. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril.* 90(2):247-57.

61. Iborra A, Martinez P. 2006. Esterilidad femenina, estrés oxidativo y autoinmunidad. *Revista iberoamericana de fertilidad* 23(3):177-82.
62. Hempstock J, Jauniaux E, Greenwold N, Burton GJ. 2003. The Contribution of Placental Oxidative Stress to Early Pregnancy Failure. *Hum Pathol.* 34:1265-75.
63. Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. 2000. Onset of maternal Arterial Blood Flow and Placental Oxidative Stress. *Am J Pathol.* 157:2111-22.
64. Sugino N, Takiguchi S, Umekawa T, Heazell A, Caniggia I. 2007. Oxidative Stress and pregnancy outcome: A workshop Report. *Placenta* 21:S48-50.
65. Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. 2007. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol.* 8:5-6.
66. Grill S, Rusterholz C, Zanetti-Dällenbach R, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S, Lapaire O. 2009. Potential markers of preeclampsia--a review. *Reprod Biol Endocrinol.* 7:70-84.
67. Soleymanlou N, Jurisica I, Nevo O, Ietta F, Zhang X, Zamudio S, Post M, Caniggia I. 2005. Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4299-308.
68. Fischer UM, Cox CS, Allen SJ, Stewart RH, Mehlhorn U, Laine GA. 2003. The antioxidant N-acetylcysteine preserves myocardial function and diminishes oxidative stress after cardioplegic arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 126:1483-8.
69. Aghdassi E, Wendland BE, Steinhart AH, Wolman SL, Jeejeebhoy K, Allard JP. 2003. Antioxidant vitamin supplementation in Crohn's disease decreases oxidative stress, a randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol.* 98:348-53.
70. Mayorga M, Iborra A, Estany S, Martínez P. 2004. Protective effect of vitamina E in an animal model of LPS-induced inflammation. *Am J Reprod Immunol.* 52(6):356-61.
71. Deneke SM. 2000. Thiol-based antioxidants. *Curr Top Cell Regul.* 36:151-80.
72. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. 1989. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* 6:593-7.
73. Zafarullar M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. 2003. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci.* 60:6-20.

74. Harada M, Kishimoto K, Furuhashi T, Naito K, Nakashima Y, Kawaguchi Y, Hiraoka I. 2003. Infertility observed in reproductive toxicity study of N-acetyl-L-cysteine in rats. *Biol Reprod.* 69(1):242-7.
75. Buhimshi IA, Buhimschi CS, Weiner CP. 2003. Protective effect of N-acetylcysteine against fetal death and preterm labor induced by maternal inflammation. *Am J Obstet Gynecol.* 188:203-8.
76. Middleton EJ. 1998. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol.* 439:175-82.
77. Heim NE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxidant: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem.* 13:572-84.
78. Bors W, Hellwr W, Michel C, Saran M. 1990. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 186:343-56.
79. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K and van Leeuwen PAM. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 74:418-25.
80. Dajas F, Rivera F, Blasona F, Arredondo F, Echeverri C, Lafon L, Morqui A, Heizen H. 2003. Cell culture protection and in vivo neuroprotective capacity of flavonoids. *Neurotox Res.* 5(6):425-32.
81. Clarke MW, Burnett JR, Croft KD. 2008. Vitamin E in human health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 45(5):417-50.
82. Zhang X, Sharma RK, Agarwal A, Falcone T. 2005. Effect of pentoxifylline in reducing oxidative stress-induced embryotoxicity. *J Assist Reprod Genet.* 22(11-12):415-7.
83. Shaw SM, Shah MK, Williams SG, Fildes JE. 2009. Immunological mechanisms of pentoxifylline in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 11(2):113-8.
84. Liu H, Xiong M, Xia YF, Cui NJ, Lu RB, Deng L, Lin YH, Rong TH. 2009. Studies on pentoxifylline and tocopherol combination for radiation-induced heart disease in rats. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 73(5):1552-9.
85. Misirlioglu CH, Demirkasimoglu T, Kucukplakci B, Sanri E, Altundag K. 2007. Pentoxifylline and alpha-tocopherol in prevention of radiation-induced lung toxicity in patients with lung cancer. *Med Oncol.* 24(3):308-11.
86. Moss RW. 2007. Do antioxidants interfere with radiation therapy for cancer? *Integr Cancer Ther.* 6(3):281-92. Review.

87. Acharya S, Yasmin E, Balen AH. 2009. The use of a combination of pentoxifylline and tocopherol in women with a thin endometrium undergoing assisted conception therapies--a report of 20 cases. *Hum Fertil (Camb)*. 12(4):198-203.
88. Lédée-Bataille N, Olivennes F, Lefaix JL, Chaouat G, Frydman R, Delanian S. 2002. Combined treatment by pentoxifylline and tocopherol for recipient women with a thin endometrium enrolled in an oocyte donation programme. *Hum Reprod*. 17(5):1249-53.
89. Way DL, Grosso DS, Davis JR, Surwit EA, Christian CD. 1983. Characterization of a new human endometrial carcinoma (RL95-2) established in tissue culture. *In Vitro* 19(3 Pt 1):147-58.
90. Frank HG, Gunawan B, Ebeling-Stark I, Schulten HJ, Funayama H, Cremer U, Huppertz B, Gaus G, Kaufmann P, Füzesi L. 2000. Cytogenetic and DNA-Fingerprint Characterization of Choriocarcinoma Cell Lines and a Trophoblast/Choriocarcinoma Cell Hybrid. *Cancer Genet Cytogenet*. 116(1):16-22.
91. Verbeke G, Molenberghs G. 1997. *Linear Mixed Models in Practice. A SAS-oriented approach*. Ed. Springer.
92. Aitchison J. 1982. The Statistical Analysis of Compositional Data. *J. of the Royal Statistical Society* 44 (2):139-77.
93. Egozcue JJ, Pawlowsky-Glahn V, Mateu-Figueras G, Barceló-Vidal C. 2003. Isometric Logratio Transformations for Compositional Data Analysis. *Mathematical Geology* 35(3):279-300.
94. McCullagh P, Nelder JA. 1989. *Generalized linear models*. 2nd ed. Ed. London: Chapman & Hall.
95. Peng W, Kuo SM. 2003. Flavonoid Structure affects the inhibition of lipid peroxidation in Caco-2 intestinal cells at physiological concentrations. *J Nutr* 133: 2184-7.
96. Grune T, Reinheckel T, North JA, Li R, Bescos PB, Shringarpure R, Davies KJ. 2002. Ezrin turnover and cell shape changes catalyzed by proteasome in oxidatively stressed cells. *FASEB J*. 16(12):1602-10.
97. Rah DK, Han DW, Baek HS, Hyon SH, Park JC. 2005. Prevention of reactive oxygen species-induced oxidative stress in human microvascular endothelial cells by green tea polyphenol. *Toxicol Lett*. 155(2):269-75.

98. Sadowska AM, Manuel-Y-Keenoy B, De Backer WA. 2007. Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: discordant in vitro and in vivo dose-effects: a review. *Pulm Pharmacol Ther.* 20(1):9-22.
99. Alexandre J, Batteux F, Nicco C, Chéreau C, Laurent A, Guillevin L, Weill B, Goldwasser F. 2006. Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo. *Int J Cancer.* 119(1):41-8.
100. Luo J, Tsuji T, Yasuda H, Sun Y, Fujigaki Y, Hishida A. 2008. The molecular mechanisms of the attenuation of cisplatin-induced acute renal failure by N-acetylcysteine in rats. *Nephrol Dial Transplant.* 23(7):2198-205.
101. Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo M, Bonina F, Castelli F. 1995. Flavonoids as antioxidant agent: importante of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med.* 19:481-86.
102. Arora A, Byrem TM, Fair MG, Strasburg GM. 2000. Modulation of liposomal membrana fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Arch Biochem Biophys.* 373:102-9.
103. Edenharder R, Grünhage D. 2003. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat Res.* 540(1):1-18.
104. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 20(7):933-56.
105. Zhang J, Stanley RA, Adaim A, Melton LD, Skinner MA. 2006. Free radical scavenging and cytoprotective activities of phenolic antioxidants. *Mol Nutr Food Res.* 50(11):996-1005.
106. Saremi A, Arora R. 2009. Vitamin E and Cardiovascular Disease. *Am J Ther.* 15.
107. Honarbakhsh S, Schachter M. 2009. Vitamins and cardiovascular disease. *Br J Nutr.* 101(8):1113-31.
108. Villar J, Purwar M, Merialdi M, Zavaleta N, Thi Nhu Ngoc N, Anthony J, De Greeff A, Poston L, Shennan A. 2009. World Health Organisation multicentre randomised trial of supplementation with vitamins C and E among pregnant women at high risk for pre-eclampsia in populations of low nutritional status from developing countries. *BJOG.* 116(6):780-8.
109. Lopaczynski W, Zeisel SH. 2001. Antioxidants, programmed cell death, and cancer. *Nutrition Research.* 21 (1):295-307

110. van Dam B, van Hinsbergh VW, Stehouwer CD, Versteilen A, Dekker H, Buytenhek R, Princen HM, Schalkwijk CG. 2003. Vitamin E inhibits lipid peroxidation-induced adhesion molecule expression in endothelial cells and decreases soluble cell adhesion molecules in healthy subjects. *Cardiovasc Res.* 57(2):563-71.
111. Osakada F, Hashino A, Kume T, Katsuki H, Kaneko S, Akaike A. 2004. Alpha-tocotrienol provides the most potent neuroprotection among vitamin E analogs on cultured striatal neurons. *Neuropharmacology* 47(6):904-15.
112. Wu MJ, Wang L, Weng CY, Yen JH. 2003. Antioxidant activity of methanol extract of the lotus leaf. *Am J Chin Med.* 31(5):687-98.
113. Elliott RM, Southon S, Archer DB. 1999. Oxidative insult specifically decreases levels of a mitochondrial transcript. *Free Radic Biol Med.* 26(5-6):646-55.
114. Wigenstam E, Rocksén D, Ekstrand-Hammarström B, Bucht A. 2009. Treatment with dexamethasone or liposome-encapsulated vitamin E provides beneficial effects after chemical-induced lung injury. *Inhal Toxicol.* 21(11):958-64.
115. Chen L, Liu L, Yin J, Luo Y, Huang S. 2009. Hydrogen peroxide-induced neuronal apoptosis is associated with inhibition of protein phosphatase 2A and 5, leading to activation of MAPK pathway. *Int J Biochem Cell Biol.* 41(6):1284-95.
116. Schafer FQ, Buettner GR. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 30(11):1191-212.
117. Kaur D, Hollins F, Saunders R, Woodman L, Sutcliffe A, Cruse G, Bradding P, Brightling C. 2010. Airway smooth muscle proliferation and survival is not modulated by mast cells. *Clin Exp Allergy.* 40(2):279-88.
118. Augustin E, Moś-Rompa A, Nowak-Ziatyk D, Konopa J. 2010. Antitumor 1-nitroacridine derivative C-1748, induces apoptosis, necrosis or senescence in human colon carcinoma HCT8 and HT29 cells. *Biochem Pharmacol.* 79(9):1231-41.
119. Otsuki Y. 2001. Apoptosis in human endometrium: apoptotic detection methods and signaling. *Med Electron Microsc.* 34(3):166-73.
120. Kenis I, Tartakover-Matalon S, Cherepnin N, Drucker L, Fishman A, Pomeranz M, Lishner M. 2005. Simvastatin has deleterious effects on human first trimester placental explants. *Hum Reprod.* 20(10):2866-72.

121. Yang JH, Wu MY, Chen CD, Chen MJ, Yang YS, Ho HN. 2007. Altered apoptosis and proliferation in endometrial stromal cells of women with adenomyosis. *Hum Reprod.* 22(4):945-52.
122. Wiesen JL, Tomasi TB. Dicer is regulated by cellular stresses and interferons. 2009. *Mol Immunol.* 46(6):1222-8.
123. Dennery PA. 2007. Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 81(3):155-62.
124. Tjoa ML, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Bianchi DW, Burton GJ. 2006. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free feto-placental DNA. *Am J Pathol.* 169(2):400-4.
125. Heazell AE, Lacey HA, Jones CJ, Huppertz B, Baker PN, Crocker IP. 2008. Effects of oxygen on cell turnover and expression of regulators of apoptosis in human placental trophoblast. *Placenta.* 29(2):175-86.
126. Moll SJ, Jones CJ, Crocker IP, Baker PN, Heazell AE. 2007. Epidermal growth factor rescues trophoblast apoptosis induced by reactive oxygen species. *Apoptosis* 12(9):1611-22.
127. Pollicita M, Muscoli C, Sgura A, Biasin A, Granato T, Masuelli L, Mollace V, Tanzarella C, Del Duca C, Rodinò P, Perno CF, Aquaro S. 2009. Apoptosis and telomeres shortening related to HIV-1 induced oxidative stress in an astrocytoma cell line. *BMC Neurosci.* 22:10-51.
128. Katoh M, Dodo K, Fujita M, Sodeoka M. 2005. Structure-activity relationship of N-methyl-bisindolylmaleimide derivatives as cell death inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 15(12):3109-13.
129. Fang J, Seki T, Maeda H. 2009. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv Drug Deliv Rev.* 61(4):290-302. Review.
130. Frei B, Lawson S. 2008. Vitamin C and cancer revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(32):11037-8.
131. Kook D, Wolf AH, Yu AL, Neubauer AS, Priglinger SG, Kampik A, Welge-Lüssen UC. 2008. The protective effect of quercetin against oxidative stress in the human RPE in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49(4):1712-20.
132. Zhang B, Safa R, Rusciano D, Osborne NN. 2007. Epigallocatechin gallate, an active ingredient from green tea, attenuates damaging influences to the retina caused by ischemia/reperfusion. *Brain Res.* 1159:40-53.

133. Sasaki M, Nakamura H, Tsuchiya S, Horie S, Kashiwayanagi M, Saito T, Murayama T. 2007. Quercetin-induced PC12 cell death accompanied by caspase-mediated DNA fragmentation. *Biol Pharm Bull.* 30(4):682-6.
134. Mercer LD, Kelly BL, Horne MK, Beart PM. 2005. Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. *Biochem Pharmacol.* 69(2):339-45.
135. Takai N, Ueda T, Nishida M, Nasu K, Narahara H. 2008. Bufalin induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cells. *Int J Mol Med.* 21(5):637-43.
136. Cong L, Gasser J, Zhao J, Yang B, Li F, Zhao AZ. 2007. Human adiponectin inhibits cell growth and induces apoptosis in human endometrial carcinoma cells, HEC-1-A and RL95 2. *Endocr Relat Cancer.* 14(3):713-20.
137. Stöter M, Bamberger AM, Aslan B, Kurth M, Speidel D, Löning T, Frank HG, Kaufmann P, Löhler J, Henne-Bruns D, Deppert W, Knippschild U. 2005. Inhibition of casein kinase I delta alters mitotic spindle formation and induces apoptosis in trophoblast cells. *Oncogene.* 24(54):7964-75.
138. Wu XJ, Kassie F, Mersch-Sundermann V. 2005. The role of reactive oxygen species (ROS) production on diallyl disulfide (DADS) induced apoptosis and cell cycle arrest in human A549 lung carcinoma cells. *Mutat Res.* 579(1-2):115-24.
139. Li M, Zhao L, Liu J, Liu AL, Zeng WS, Luo SQ, Bai XC. 2009. Hydrogen peroxide induces G2 cell cycle arrest and inhibits cell proliferation in osteoblasts. *Anat Rec.* 292(8):1107-13.
140. Nilkaeo A, Bhuvanath S, Praputbut S, Wisessombat S. 2006. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in JAR trophoblast by antimalarial drugs. *Biomed Res.* 27(3):131-7.
141. Drukteinis JS, Medrano T, Ablordepey EA, Kitzman JM, Shiverick KT. 2005. Benzo[a]pyrene, but not 2,3,7,8-TCDD, induces G2/M cell cycle arrest, p21CIP1 and p53 phosphorylation in human choriocarcinoma JEG-3 cells: a distinct signaling pathway. *Placenta* 26 (Suppl A):S87-95.
142. Tanigawa S, Fujii M, Hou DX. 2008. Stabilization of p53 is involved in quercetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 72(3):797-804.
143. Clarke MW, Burnett JR, Croft KD. 2008. Vitamin E in human health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 45(5):417-50. Review.

-
144. Martín-Romero FJ, Miguel-Lasobras EM, Domínguez-Arroyo JA, González-Carrera E, Alvarez IS. 2008. Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 17(5):652-61.
145. Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JG. 2006. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil Steril*. 86(3):503-12.
146. Staun-Ram E, Shalev E. 2005. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol*. 3:56.
147. Zhang X, Sharma RK, Agarwal A, Falcone T. 2005. Effect of pentoxifylline in reducing oxidative stress-induced embryotoxicity. *J Assist Reprod Genet*. 22(11-12):415-7.
148. Hathcock JN, Azzi A, Blumberg J, Bray T, Dickinson A, Frei B, Jialal I, Johnston CS, Kelly FJ, Kraemer K, Packer L, Parthasarathy S, Sies H, Traber MG. 2005. Vitamins E and C are safe across a broad range of intakes. *Am J Clin Nutr*. 81(4):736-45.
149. Murray KP, Mathure S, Kaul R, Khan S, Carson LF, Twiggs LB, Martens MG, Kaul A. 2000. Expression of complement regulatory proteins-CD35, CD46, CD55, and CD59-in benign and malignant endometrial tissue. *Gynecol Oncol*. 76(2):176-82.
150. Lee J, Oh J, Choi E, Park I, Han C, Kim do H, Choi BC, Kim JW, Cho C. 2007. Differentially expressed genes implicated in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Int J Biochem Cell Biol*. 39(12):2265-77.

9. ANNEXOS

ANNEX I

Antioxidant activity of *N*-acetylcysteine, flavonoids and α -tocopherol on endometrial cells in culture

S. Estany^{a,1}, J.R. Palacio^{a,1}, R. Barnadas^b, M. Sabes^b, A. Iborra^a, P. Martínez^{a,*}

^a *Universidad Autónoma de Barcelona, Instituto de Biotecnología y de Biomedicina, Campus de Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain*

^b *Universidad Autónoma de Barcelona, Unidad de Biofísica, Centro de Estudios en Biofísica, Facultad de Medicina, Campus de Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain*

Received 27 September 2006; received in revised form 18 December 2006; accepted 26 January 2007

Abstract

An appropriate local environment is necessary for successful implantation. Oxidative stress is implicated in the pathogenesis of several pathologies, and may contribute to early pregnancy failure. Antioxidant therapies have been studied in infertility. In this study, we have assessed the antioxidant activity of *N*-acetylcysteine (NAC), flavonoids (quercetin, catechin) and α -tocopherol in an oxidative model of endometrial cells (RL95). Endometrial cells were incubated at several hydrogen peroxide concentrations. Antioxidant effects of NAC (15 mM), quercetin (150 μ M), catechin (150 μ M) and α -tocopherol included in liposomes (1.6 μ g) were assessed by measuring cell viability by the MTT assay. α -Tocopherol-liposomes taken up by endometrial cells were assessed by HPLC. All liposomes used were able to introduce α -tocopherol into cells. The antioxidant effect of NAC and quercetin improved the viability of oxidised cells, and this effect was observed when the oxidant and antioxidant were coincubated. No viability change occurred when the antioxidant was added before or after the oxidant. The antioxidant effect of NAC was better than that of quercetin. When catechin or α -tocopherol were used in the same conditions, no antioxidant effect was detected in cells in culture. These results demonstrate that NAC and quercetin are good H_2O_2 scavengers.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Endometrial cell; Oxidative stress; *N*-Acetylcysteine; Flavonoid; α -Tocopherol

1. Introduction

Oxidative stress is generated by an imbalance between oxidants and antioxidants in favour of oxidants, which may cause tissue damage. Oxidative stress associated with chronic inflammatory conditions can have detrimental effects mediated by the ability of reactive oxygen species (ROS) to induce cell death in a number

of different cell types. (Agarwal et al., 2005; Iborra et al., 2005).

ROS include several molecules and radicals, such as the superoxide radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (OH) and others. Under physiological conditions, ROS are constantly generated within cells by several intracellular oxidase enzymes and by mitochondrial respiration. H_2O_2 , which easily diffuses inside and outside cells, is able to modulate multiple cellular processes: cell proliferation, signal transduction pathways, gene expression, DNA damage, apoptosis and necrosis (Agarwal et al., 2005; Stone and Yang, 2006). Although H_2O_2 is not a radical *per se*, it is the primary precursor for the generation of hydroxyl radicals by

* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 2804; fax: +34 93 581 2011.

E-mail address: paz.martinez@uab.es (P. Martínez).

¹ They contributed equally to this work.

Fenton reaction, and this is highly reactive with cellular macromolecules such as DNA, lipids and proteins.

Oxidative stress is involved in the pathogenesis of several diseases and, in the last decade, more diseases have been related to oxidation. For instance, some studies on several neurodegenerative diseases (Gilgun et al., 2001), cardiovascular disease (Black and Garbutt, 2002), cancer (Senthil et al., 2004) and, recently, some male and female infertility diseases (Agarwal et al., 2003) describe the relationship between these pathologies and oxidative stress. Recently, the presence of ROS in reproductive tissue, in peritoneal fluid of patients with endometriosis and in follicular fluid of infertile patients undergoing *in vitro* fertilization has been demonstrated (Agarwal et al., 2003, 2005). The embryotoxicity of ROS has also been described (Bedaiwy et al., 2002). Moreover, oxidative stress in endometrial cells could have a role in the low implantation rates described in some pathologies. For these reasons, antioxidant therapy turns out to be important in the treatment of many pathologies (Abudu et al., 2004; Marchand, 2002; Zafarullah et al., 2003).

Compounds with antioxidant properties have been widely studied, among them *N*-acetylcysteine (NAC), a sulfhydryl-containing antioxidant, which has been used in antioxidant therapy because of its role in reducing endothelial dysfunction, the inflammatory process, fibrosis or cartilage erosion (Buhimschi et al., 2002; Zafarullah et al., 2003). Another important group of compounds with antioxidant activity is flavonoids, a polyphenolic molecule present in fruits, vegetables and seeds. Flavonoids have many biological and pharmacological activities with antioxidative, antiallergic, antiviral, antiinflammatory and antitumoral effects (Nijveldt et al., 2001). Flavonoids are divided into six groups based on their molecular structure: flavanol, flavone, flavonol, flavanone, isoflavone and anthocyanidin (Rice-Evans et al., 1996). Quercetin and catechin belong to flavonol and flavanol, respectively, and they have been widely studied because of their high free radical-scavenging activity.

Tocopherols are a group of vegetable molecules with lipophilic characteristics and phenol antioxidant properties. The principal tocopherol in mammalian tissue is α -tocopherol, although significant quantities of γ -tocopherol are also present. Although many studies have shown that α -tocopherol reduces lipid peroxidation (John et al., 2001) and protects cells from oxidative stress (Kalender et al., 2004), its applicability in human diseases is disputed (Morris and Carson, 2003; Vivekananthan et al., 2003).

Oxidation and inflammation have an enormous influence in the pathogenic process of several diseases and

it is of interest to research the antioxidant ability of some antioxidants in the prevention and development of these pathologies. Using optimal doses of antioxidant agents, we could inhibit both oxidative biochemical modifications and tissue inflammation. In this study, the antioxidant capacity of NAC, quercetin, catechin and α -tocopherol has been evaluated to prevent H_2O_2 -induced cell cytotoxicity in the *in vitro* oxidative model with endometrial cells.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and oxidative treatment

The human endometrial carcinoma cell line (RL95-2) was obtained from American Type Culture Collection (ATCC). Cells were grown until confluence at 37 °C in a humidified atmosphere of 10% CO_2 in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technologies) supplemented with several growth factors [bovine insulin (0.05 μ g/ml), transferrin (0.05 μ g/ml), glutathione (0.1 μ g/ml), hydrocortisone (0.02 μ g/ml)], antibiotics (1% of a mixture of penicillin, streptomycin and fungizone) (Sigma) and 10% fetal calf serum (FCS) (Life Technologies).

Cell culture was trypsinised using 0.05% trypsin with 0.53 mM EDTA in Hanks' Balanced Salt Solution (Gibco). Cells were cultured in 96-well plates (BD Falcon) at 2.5×10^4 cells/well and allowed to attach overnight in culture conditions. Before starting experiments, cell morphology aspect was assessed by optical microscopy.

For oxidative experiments, the cell culture in 96-well plates was rinsed twice with sterile phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, and incubated with increasing concentrations of H_2O_2 (10^{-6} to 10^2 mM) in DMEM for 3 h. Then, H_2O_2 cytotoxicity was analysed just after oxidative conditions and after 3 h oxidation + 24 h in DMEM-supplemented medium.

2.2. Assessment of cell viability by succinate dehydrogenase activity (MTT assay)

The 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay assesses the reduction of MTT to formazan catalysed by mitochondrial dehydrogenase. Before analysis, the culture was washed once. Then, 100 μ l/well of 0.5 mg/ml MTT (Sigma) in supplemented DMEM medium was added to the culture and incubated for 3 h. Preliminary experiments showed that the maximum reduction of MTT was obtained at 2 h and maintained until 4 h total time (data not shown). The

reduced MTT was solubilised in DMSO (Sigma) and colorimetric evaluation of formazan performed at 492 nm using a 96-well microplate reader (Anthos Reader 2001, Cytelk).

Succinate dehydrogenase activity by MTT correlates to the number of viable cells in the culture in the range between 5×10^3 and 5×10^4 cells/well ($r^2 = 0.96$) (data not shown).

2.3. Evaluation of cell cytotoxicity

The cytotoxic effect of H_2O_2 was classified into three grades: (a) light cytotoxicity (LC), in which cell viability was $\geq 85\%$ compared to untreated cells, (b) moderate cytotoxicity (MC) when cell viability was between 85% and 50%, and (c) high cytotoxicity (HC) when cell viability was $\leq 50\%$.

2.4. Treatment of antioxidants

2.4.1. NAC, quercetin, catechin and α -tocopherol

Stock solution of NAC was freshly prepared in DMEM at a concentration of 600 mM. Amounts of 150 mM quercetin and catechin were prepared in DMSO. All stocks were sterilised by filtration with a $0.22 \mu\text{m}$ membrane (Millipore).

α -Tocopherol was encapsulated in liposomes. Two neutral soybean phospholipids were used: a natural soybean phosphatidylcholine (SPC) (Epikuron 200) and a hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC) (Epikuron 200 SH), both obtained from Degussa (Düsseldorf, Germany). The saturated and negatively charged phospholipid at neutral pH, dipalmitoyl-phosphatidic acid (DPPA), came from Lipoid (Ludwigshafen, Germany). Three kinds of liposomes were used: SPC, SPC/DPPA and HSPC/DPPA. All reagents were purchased from Sigma, except when specified.

Preliminary experiments were carried out by incubating endometrial cells with increasing concentrations of NAC (from 3 to 100 mM), quercetin (from 10 to 1000 μM), catechin (from 50 to 1000 μM) and $\pm\alpha$ -tocopherol (from 0.026 to 26 μg) in culture medium for 24 h. The experimental conditions were defined by those concentrations at which there was no cytotoxic effect in the cell culture (data not shown). The optimal concentrations were 15 mM NAC, 150 μM quercetin/catechin and 1.6 μg α -tocopherol/well.

2.4.1.1. Liposome preparation. Three liposome formulations were obtained in order to encapsulate α -tocopherol: fluid-state neutral liposomes obtained with SPC, fluid-state charged liposomes containing

SPC and DPPA (9:1, w/w), and gel-state charged liposomes obtained with HSPC and DPPA (9:1, w/w). Final phospholipid concentration was 40 mg/ml. In the case of liposomes containing α -tocopherol, the phospholipid/ α -tocopherol ratio was 40:7 (w/w). All suspensions composed of hydrogenated phospholipids were processed at 55 °C. For the preparation of the liposome suspensions, the appropriate amount of lipids (with or without α -tocopherol) was dissolved in chloroform/methanol 2:1 (v/v) in a round-bottomed flask. A homogeneous thin film was obtained by rotatory evaporation. Chloroform traces were eliminated by lyophilisation. Films were then hydrated with PBS, vortexed and, occasionally, sonicated. The obtained liposomes were down-sized by high-pressure homogenisation using a Microfluidizer 110S (Microfluidics; Newton, MA) working in the recirculation mode for 4 min at 4 bars of inlet pressure.

2.4.1.2. Liposome characterisation. Size distribution of liposomes was measured by dynamic light-scattering using a UPA 150 ultra-fine particle-analyser spectrometer (Microtrac; Montgomeryville, PA). All samples were diluted in PBS to obtain a satisfactory signal in the detector. Analysis acquisition time was 10 min. Results are expressed as volume distribution and presented as the mean diameter and width (half the central range of the measured particle-size distribution that contains 68% of the vesicles).

2.4.2. Measurement of $\pm\alpha$ -tocopherol incorporation by cells

Cells were incubated with 1.6 μg α -tocopherol/well for 1, 3, 6 and 24 h. After this time, supernatants of three wells were obtained, mixed with an equal volume of water and 0.1% trifluoroacetic acid and quantified by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) (Beckman System Gold, Detector 166).

The quantification by RP-HPLC analyses was carried out on a 4.6 mm \times 250 mm C18 column (Vydac) and a C4 pre-column. Solution A was water containing 0.1% trifluoroacetic acid and solution B was acetonitrile: methanol (70:30) containing 0.1% trifluoroacetic acid. A linear gradient of mixed solution B/A from 85 to 100% solution B over 24 min was applied at a flow rate of 1 ml/min and the detection was performed at 295 nm (Fig. 1). A standard curve ($r^2 = 0.99$) (Table 2) for α -tocopherol was obtained in the same conditions using triplicate samples ranging from 3 to 20 μg , which were dissolved in the same cell medium. Quantification was performed by integration of the peak area corresponding to α -tocopherol.

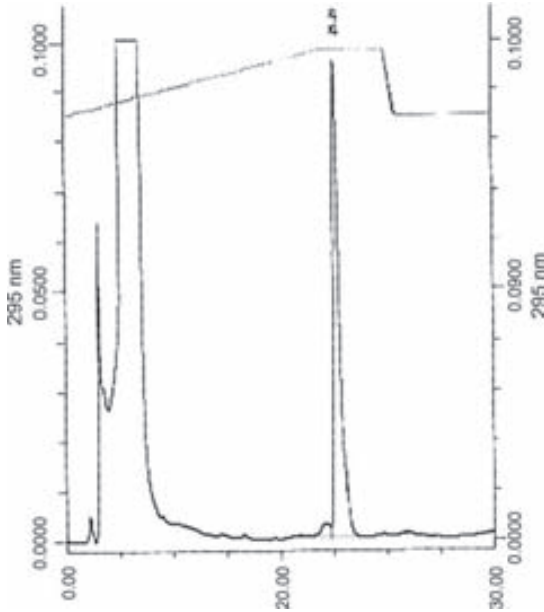


Fig. 1. Detection of $\pm\alpha$ -tocopherol by HPLC.

2.5. Experimental design

Five types of treatments were analysed in this study depending on the antioxidant used: (1) pre-treatment (Pre-T), which was carried out by incubating cells for 24 h with antioxidant. Then, cells were incubated with H_2O_2 for 3 h in DMEM. Enriched medium was added for another 24 h. (2) Co-treatment (Co-T), in which cells were incubated with H_2O_2 and antioxidant together. (3)

Post-treatment (Post-T), which was carried out by incubating the oxidative agent alone and, after washing the culture once with PBS, the antioxidant was added in the enriched medium for 24 h. (4) CoPost-T, which was the same as Treatment 2 and a 24 h antioxidant post-incubation. (5) PreCoPost-T, where cells were treated with antioxidant for 24 h before oxidation. Antioxidants during oxidative treatment and for another 24 h were present (Fig. 2).

For NAC, quercetin and catechin, experiments 2, 3, 4 and 5 of those mentioned above were performed. The treatments used for α -tocopherol were 1, 2, 4 and 5.

The antioxidant activity of NAC, quercetin, catechin and α -tocopherol was assessed in the oxidative model. Five concentrations of hydrogen peroxide (0.1, 1, 2, 3 and 5 mM) were used, plus the control (without H_2O_2).

2.6. Data presentation and statistical analysis

The final data have been obtained after considering the background values. Numerical values of experimental data are expressed as a mean percentage \pm standard error (S.E.). The absorbance of the control cells (cells with the same treatment but without the oxidative agent) was considered as being 100% of cell viability. All experiments were repeated three times.

Statistical analyses were performed using SPSS statistical software. Differences among groups were tested by one-way analysis of variance (ANOVA). Each ANOVA test yielding significant effects was followed by a Student–Newman–Keuls test. A value of $P < 0.05$ was used to indicate significant differences.

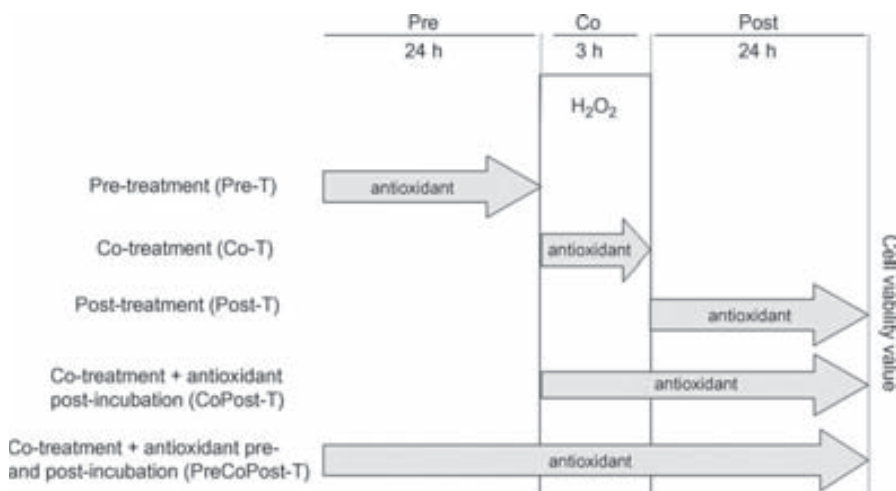


Fig. 2. Experimental design. Arrows indicate the presence of antioxidant in the treatments.

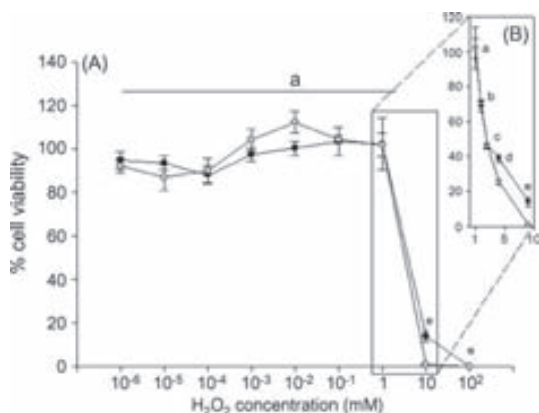


Fig. 3. (A and B) Percentage of cell viability incubated in the presence of H_2O_2 for 3 h. Cell viability was assessed just after 3 h in H_2O_2 (●) and after 3 h in H_2O_2 + 24 h in the DMEM-supplemented medium (○). Different letters indicate a significant difference between groups.

Table 1
Size of liposomes obtained by high-pressure homogenisation

Liposome	Diameter (%)	Width (%vol; nm)
SPC	63.3 ± 11.5 (n=3)	39.7 ± 10.5 (n=3)
SPC/ α -toc	149 ± 71 (n=2)	67.0 ± 24.0 (n=2)
SPC/DPPA	53.7 ± 11.2 (n=3)	29.7 ± 9.6 (n=3)
SPC/DPPA/ α -toc	87.5 ± 14.8 (n=2)	49.0 ± 15.6 (n=2)
HSPC/DPPA	60.0 ± 22.8 (n=4)	27 ± 13.2 (n=4)
HSPC/DPPA/ α -toc	116.7 ± 21.6 (n=3)	79.0 ± 30.3 (n=3)

Data shown in Table 2 have been calculated by subtracting the quantity of α -tocopherol at time 0 h (n=3).

3. Results

3.1. Oxidative model conditions

RL95-2 cell viability, cultured in the presence of H_2O_2 , was measured immediately after oxidation (3 h) and 24 h after the oxidative period (Fig. 3). Our results indicate that, at 1 mM and below, cell viability was higher than 85%; this was considered light cytotoxicity (LC) (Fig. 3A). In contrast, H_2O_2 concentrations higher than 1 mM were less tolerated by cells and impaired cell viability.

Table 2
 α -Tocopherol incorporation by cells, measured by HPLC

Liposome	α -Tocopherol (μ g)			
	1 h	3 h	6 h	24 h
SPC/vitamin E	0.86 ± 0.16	0.97 ± 0.15	0.99 ± 0.07	1.17 ± 0.02
SPC/DPPA/vitamin E	0.33 ± 0.13	0.53 ± 0.18	0.70 ± 0.2	0.72 ± 0.06
HSPC/DPPA/vitamin E	0.3 ± 0.2	0.32 ± 0.05	0.35 ± 0.06	0.9 ± 0.24

Thus, at 2 mM H_2O_2 , cell viability was between 50 and 85%; this was defined as moderate cytotoxicity (MC). Viability decreased to below 50% at concentrations of 3 mM H_2O_2 or higher and cell cytotoxicity was considered high (HC). No differences were found when the measurement was performed at 3 h or after 3 h oxidation + 24 h in DMEM-supplemented medium.

Based on cell viability, the H_2O_2 concentrations used to test the antioxidant activity were: (a) two concentrations of H_2O_2 that were not cytotoxic (0.1 and 1 mM); (b) a concentration that caused moderate cytotoxicity (2 mM); and (c) two concentrations that caused high cytotoxicity (3 and 5 mM).

3.2. α -Tocopherol incorporation

Liposomes showed an average diameter close to or ≤ 100 nm and with a small width, so they could be classified as small vesicles (Table 1). The incorporation of α -tocopherol in the liposome bilayer increased both the size and width of all liposome suspensions. This incorporation of α -tocopherol had different kinetics and efficiency according to the kind of liposome. SPC/ α -toc was taken up by cells more quickly and efficiently than the others (Table 2). The maximum quantity of α -tocopherol incorporated with this kind of liposome was 1.17 μ g, whereas it was 0.9 μ g with HSPC/DPPA/ α -toc liposomes and only 0.72 μ g with SPC/DPPA/ α -toc liposomes. On the other hand, cells treated with SPC/ α -toc liposomes incorporated 73.5% of the maximum α -tocopherol that they could include, during the first hour. On the contrary, similar rates were obtained after 3 h with SPC/DPPA/ α -toc liposomes. HSPC/DPPA/ α -toc liposomes only achieved 38.9% of α -tocopherol after 6 h. We considered that the maximum incorporation in all cases was obtained after 24 h of cell incubation with liposomes.

3.3. Antioxidant activity

The results obtained under coincubation conditions (treatments 2, 4 and 5, defined in Section 2) always follow the same profile, with no statistical differences among them. Under these conditions, H_2O_2 cytotoxic-

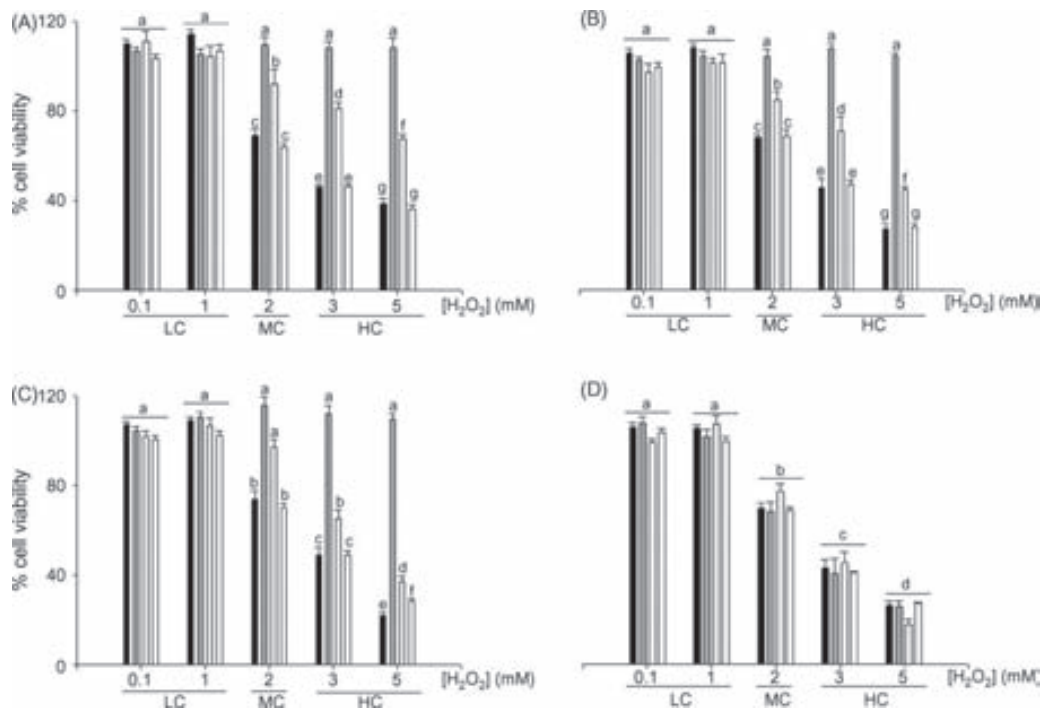


Fig. 4. Viability percentage in the oxidative model after different kinds of treatments and antioxidants. LC: light cytotoxicity ($\geq 85\%$ viability); MC: moderate cytotoxicity (85–50% viability); HC: high cytotoxicity ($\leq 50\%$ viability). (A) Co-treatment, (B) co-treatment + antioxidant post-incubation, (C) co-treatment + antioxidant pre- and post-incubation, (D) post-treatment. (■) No antioxidant, (■) NAC, (□) quercetin, (□) catechin. Different letters indicate a significant difference between groups.

ity, which caused a decrease of cell viability, was reduced by addition of NAC in the culture (Fig. 4). Even at high concentrations of H_2O_2 (from 2 to 5 mM), cell viability was maintained by the addition of this antioxidant. In contrast, other antioxidants (catechin and α -tocopherol) were not able to protect cell cultures from the H_2O_2 cytotoxic effect. Addition of quercetin (150 μM) in the culture slightly increased cell viability compared to cells without this antioxidant. Thus, the best antioxidant activity was shown by NAC. Quercetin has better antioxidant activity than catechin or α -tocopherol in liposomes. When antioxidants were added after the oxidative period with H_2O_2 , they had no influence on cell viability.

All treatments were applied to assess the antioxidant effect of α -tocopherol, with the exception of treatment 3. As shown in Fig. 5, neither of these treatments nor several liposome kinds showed an improvement of cell viability.

4. Discussion

Cells protect themselves against the deleterious effects of ROS by using a variety of mechanisms. The

effects of ROS are moderated by endogenous enzymes and by dietary antioxidants that accumulate within cells. We have demonstrated the antioxidant effect of NAC and quercetin to decrease H_2O_2 cytotoxicity by using the endometrial cell model.

The sensitivity of several cell lines to H_2O_2 is different. For instance, human neuroblastoma SH-SY5Y cells are more sensitive to exposure to H_2O_2 than human peripheral blood mononuclear cells or rat thymocytes. Thus, the viability of human neuroblastoma cells cultured in 0.4 mM H_2O_2 for 2 h was only around 65%. In contrast, more than 95% cell viability was observed with 5 mM H_2O_2 for 50 min of incubation in human mononuclear cells and rat thymocytes (Bechoua et al., 1999; Gao et al., 2001). The RL95 human endometrial carcinoma cell line used in this study has an intermediate sensitivity. Endometrial cell viability is 68.9% at 2 mM H_2O_2 for 3 h. The oxidative model used in this work was performed using low concentrations of H_2O_2 so that cell viability decreased. Thus, the effect of antioxidants could be evaluated. It is now well established that generation or addition of ROS can cause cell death by either apoptosis or necrosis (Curtin et al., 2002). Increase of H_2O_2 (2, 3

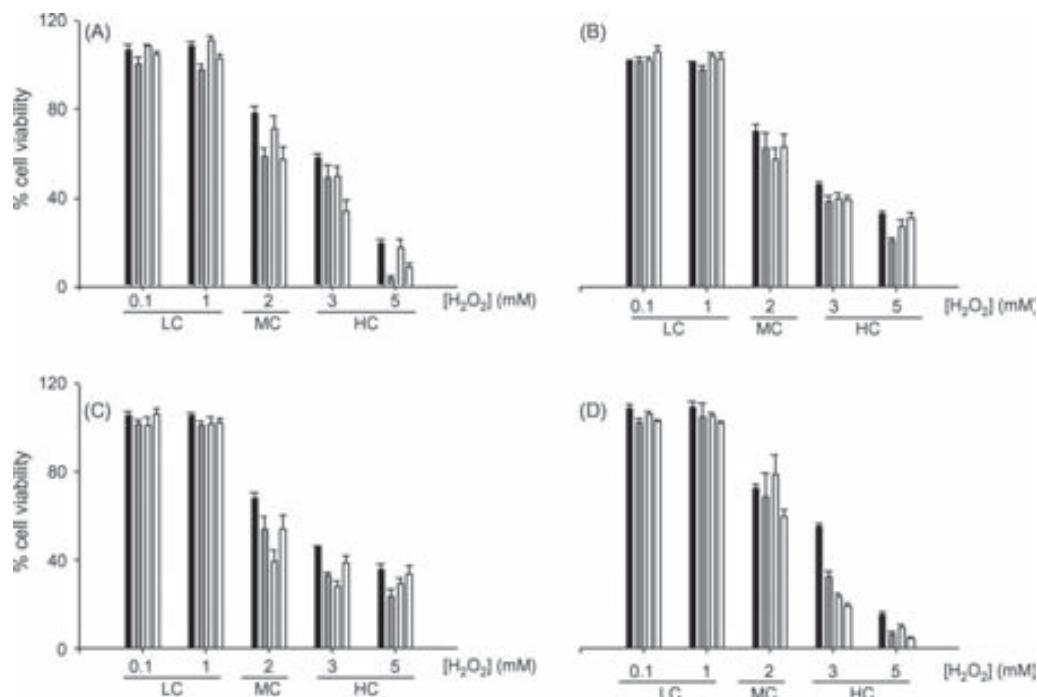


Fig. 5. Viability percentage of oxidative model after different kinds of α -tocopherol/liposome treatments. LC: light cytotoxicity ($\geq 85\%$ viability); MC: moderate cytotoxicity (85–50% viability); HC: high cytotoxicity ($\leq 50\%$ viability). (A) Pre-treatment, (B) co-treatment, (C) co-treatment + antioxidant post-incubation, (D) co-treatment + antioxidant pre- and post-incubation. (■) Liposome without α -tocopherol, (■) SPC/ α -toc, (□) SPC/DPPA/ α -toc, (□) HSPC/DPPA/ α -toc.

and 5 mM) in our experimental model induced oxidative stress and loss of cell viability. As discussed later, both NAC and quercetin have antioxidant effects and inhibit cell death, but it cannot be distinguished by the SDA method if cell death is by apoptosis or necrosis.

In order to assess the pro-oxidant effect of phenolic compounds at high concentrations previously observed by Laughton et al. (1989), a cytotoxic curve was performed for all antioxidants studied. No antioxidant concentrations used in this study affected cell viability.

Several studies have demonstrated the anti-inflammatory and anti-oxidative properties of NAC. A review by Sadowska et al. (2007) summarizes the *in vitro* and *in vivo* results on some cell types. NAC, a thiol compound, is rapidly metabolised to cysteine, which is a direct precursor in the synthesis of intracellular reduced glutathione (GSH). The concentrations of NAC that effectively increase GSH synthesis vary depending on the cell type. NAC can also act as a direct ROS scavenger of free radicals. The antioxidant properties of NAC restore the intracellular redox status and may also modulate the activity of redox-sensitive cell signalling and transcription pathways. One of the most important

transcription factors, nuclear factor-kB (NF-kB), which regulates a variety of proinflammatory genes, may be inhibited by NAC. This anti-inflammatory effect, *in vivo* or *in vitro*, is NAC dose-dependent (Sadowska et al., 2007). Some authors have demonstrated that NAC interaction with H_2O_2 is less efficient than other oxygen radicals (Aruoma et al., 1989; Moldéus and Cotgreave, 1994), but is still able to inhibit H_2O_2 -mediated cell death (Lee et al., 2002; Sentürker et al., 2002). NAC can also abolish the apoptosis of myeloleukaemic cells after lectin-II stimulation, induced by the generation of intracellular H_2O_2 (Kim et al., 2003). In the same way, our results show that NAC was a much better antioxidant than flavonoids in our oxidative model, probably due to rapid metabolism within the cell and the two pathways in which it is involved: GSH formation and free radical-scavenging. NAC efficiently protects against H_2O_2 cytotoxicity (Fig. 4A–C).

Flavonoids can prevent injury caused by ROS in various ways (Cao et al., 1997), one of which is direct scavenging of free radicals (Hanasaki et al., 1994). Flavonoids are oxidised by radicals, resulting in a more stable and less-reactive radical. Thus, flavonoids sta-

bilise ROS by reacting with the compound that has the radical (Esposito et al., 2002). The radical-scavenging potency of flavonoids is thought to be closely linked to their molecular structure; specifically, three parts have previously been described (Bors et al., 1990; Rice-Evans et al., 1996). Moreover, radical-scavenging activities will depend on the nature of the radical and its specific reaction mechanism (Edenharder and Grünhage, 2003). Quercetin satisfies all of the antioxidant flavonoid structural requirements shown by Bors et al. (1990) and is also an effective protector for H₂O₂ cytotoxicity (Gao et al., 2001). Its structure confers an enhancement of the Trolox Equivalent Antioxidant Activity (TEAC) value up to 4.7 ± 0.1 mM, compared to catechin with approximately half of its antioxidant activity (2.4 ± 0.05 mM) (Rice-Evans et al., 1996). In agreement, our results show that quercetin has more antioxidant capacity than catechin. We compared flavonoids also with other groups of antioxidants (sulfhydryl-containing antioxidant or lipophilic antioxidant). Although quercetin was found to possess the highest protective effect among the flavonoids studied by Horvathova et al. (2003) against H₂O₂ cytotoxicity, our results indicate that NAC was more effective than quercetin (Fig. 4A–C).

The major antioxidant effect that occurred in our experiments was during co-treatment of antioxidants and the oxidant together. This period is shared by treatments that present cell viability improvement by antioxidants in oxidised cells. Hence, we suggest that the most effective and potent antioxidant effect which happened was the capacity of the antioxidant to scavenge H₂O₂. Otherwise, no antioxidant effect at pre-treatment or post-treatment was observed when any antioxidants were used in our conditions. We suggest that the improvement of cellular antioxidant status during the pre-treatment stage is not enough to prevent cell damage produced by the H₂O₂ concentrations used in this study.

α -Tocopherol is the major lipophilic antioxidant of exogenous origin found in tissues. It can react with radicals such as the lipid peroxy radical and may play a role in the inhibition of lipid peroxidation in cellular membranes. Furthermore, it has been proposed that α -tocopherol mainly degrades H₂O₂ by increasing the intracellular level of glutathione (Shimpuku et al., 2000). Despite its antioxidant properties, α -tocopherol's efficacy to prevent some pathologies in humans is far from unanimous (Morris and Carson, 2003; Vivekananthan et al., 2003). *In vitro*, there is also controversy regarding its properties. Lopaczynski and Zeisel (2001) have demonstrated the effectiveness of pre-treatment with NAC and α -tocopherol on 5 Gy irradiation-induced apoptosis, mediated by ROS, in the human leukaemia cell

line. Recent studies have shown that preincubation with α -tocopherol inhibited, in a dose-dependent way, lipid peroxidation induced by H₂O₂ in endothelial cells (Dam et al., 2003).

Otherwise, similar to our results, studies by Osakada et al. (2004) revealed that α -tocopherol, simultaneously added to H₂O₂, did not affect H₂O₂-induced neuronal death. However, they found that α -tocotrienol, another form of vitamin E, provided the most potent protection in these conditions. In the same way, Wu et al. (2003) did not observe any α -tocopherol antioxidant effect when Caco-2 cells were co-treated with H₂O₂ and the antioxidant. Instead, they found a dose-dependent protective effect of methanol extract of the lotus leaf in their conditions. We have shown that α -tocopherol included in liposomes, administered before, during or after the H₂O₂ oxidation stage, did not improve endometrial cell viability in our conditions.

The lipophilic nature of α -tocopherol is not soluble in culture medium. For this reason, α -tocopherol was included in three different kinds of liposomes (SPC, SPCPA and HSPCPA) in order to determine the most efficient one to be taken up by cells. All of them could be incorporated by cells, but in a different way. We suggest that the kinetics of α -tocopherol incorporation depends mostly on the fluidity of the liposome membrane. So, HSPC/DPPA/ α -toc liposome is the most rigid one and, therefore, α -tocopherol was incorporated later. On the other hand, SPC/ α -toc liposomes have the lowest transition temperature and the major amount of α -tocopherol is transferred during the first hour (Table 2).

Cells could be loaded with some lipophilic compounds using a liposome delivery system. Elliott et al. (1999) used an α -tocopherol- and β -carotene-containing liposome to preincubate a lymphocyte cell line. They showed that β -carotene was able to protect partially against suppression on the mitochondrial transcript by H₂O₂. In contrast, α -tocopherol provided no protection in relation to its suppression. On the contrary, the effectiveness of α -tocopherol *in vivo*, when included in the liposome, has been demonstrated by some authors. Galactose-fed rats, which induce cataracts by both osmotic stress due to galactitol accumulation and severe oxidation stress, were treated by topical instillation of vitamin E liposome solution into each eye and cataract progression was retarded (Ohta et al., 1999). Our group has previously demonstrated the protective effect of vitamin E in a LPS-induced inflammation in the mouse; we found that vitamin E orally administered before or after the injection of LPS increased viable embryos and decreased the percentage of ROS-positive peritoneal cells (Mayorga et al., 2004).

In conclusion, the antioxidant effect of several compounds and several kinds of treatment have been evaluated in an *in vitro* oxidative model of endometrial cells. NAC and quercetin had an antioxidant effect under oxidative conditions, but NAC had better antioxidant activity than quercetin. Antioxidants are effective only when they are co-incubated with the oxidising agent in this *in vitro* model. No antioxidant activity was observed when catechin and α -tocopherol were used.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FIS) PI030260 and by the European Network of Excellence, EMBIC, reference LSHM-CT-2004-512040. The English of this manuscript was read and corrected by a native, English-speaking instructor of English from the Universidad Autónoma de Barcelona.

References

- Abudu, N., Miller, J.J., Attaelmannan, M., Levinson, S.S., 2004. Vitamins in human arteriosclerosis with emphasis on vitamin C and vitamin E. *Clin. Chim. Acta* 339, 11–25.
- Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R.K., 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3, 28.
- Agarwal, A., Saleh, R.A., Bedaiwy, M.A., 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* 79, 829–843.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J., 1989. The antioxidant action of *N*-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.* 6, 593–597.
- Bechoua, S., Dubois, M., Dominguez, Z., Goncalves, A., Nemoz, G., Lagarde, M., Prigent, A.F., 1999. Protective effect of docosahexaenoic acid against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* 57, 1021–1030.
- Bedaiwy, M.A., Goldberg, J.M., Falcone, T., Singh, M., Nelson, D., Azab, H., Wang, X., Sharma, R., 2002. Relationship between oxidative stress and embryotoxicity of hydrosalpingeal fluid. *Hum. Reprod.* 17, 601–604.
- Black, P.H., Garbutt, L.D., 2002. Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J. Psychosom. Res.* 52, 1–23.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M., 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 186, 343–355.
- Buhimschi, I.A., Buhimschi, C.S., Weiner, C.P., 2002. Protective effect of *N*-acetylcysteine against fetal death and preterm labor induced by maternal inflammation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 188, 203–208.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 749–760.
- Curtin, J.F., Donovan, M., Cotter, T.G., 2002. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol. Methods* 265, 49–72.
- Dam, B., Hinsbergh, V.W.M., Stehouwer, C.D.A., Versteilen, A., Dekker, H., Buytenhek, R., Princen, H.M., Schalkwijk, C.G., 2003. Vitamin E inhibits lipid peroxidation-induced adhesion molecule expression in endothelial cells and decreases soluble cell adhesion molecules in healthy subjects. *Cardiovasc. Res.* 57, 563–571.
- Edenharder, R., Grünhage, D., 2003. Free radical-scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by *tert*-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res.* 540, 1–18.
- Elliott, R.M., Southon, S., Archer, D.B., 1999. Oxidative insult specifically decreases levels of a mitochondrial transcript. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 646–655.
- Esposito, E., Rotilio, D., Matteo, M., Giulio, C., Cacchio, M., Algeri, S., 2002. A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiol. Aging* 23, 719–735.
- Gao, Z., Huang, K., Xu, H., 2001. Protective effects of flavonoids in the roots of *Scutellaria Baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in hs-sy5y cells. *Pharmacol. Res.* 43, 173–178.
- Gilgun, Y., Melaned, E., Offen, D., 2001. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 40, 959–975.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S., 1994. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 16, 845–850.
- Horvathova, K., Novotny, L., Vachalkova, A., 2003. The free radical scavenging activity of four flavonoids determined by comet assay. *Neoplasia* 5, 291–295.
- Iborra, A., Palacio, J.R., Martínez, P., 2005. Oxidative stress and autoimmune response in the infertile woman. *Chem. Immunol. Allergy* 88, 150–162.
- John, S., Kale, M., Rathore, N., Bhatnagar, D., 2001. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J. Nutr. Biochem.* 12, 500–504.
- Kalender, S., Kalender, Y., Ogutcu, A., Uzunhisarcikli, M., Durak, D., Açikgoz, F., 2004. Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E. *Toxicology* 202, 227–235.
- Kim, M.S., Lee, J., Lee, K.M., Yang, S.H., Choi, S., Chung, S.Y., Kim, T.Y., Jeong, W.H., Park, R., 2003. Involvement of hydrogen peroxide in mistletoe lectin-II-induced apoptosis of myeloleukemic U937 cells. *Life Sci.* 73, 1231–1243.
- Laughton, M.J., Halliwell, B., Evans, P.J., Houlst, J.R., 1989. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem. Pharmacol.* 38, 2859–2865.
- Lee, W.R., Shen, S.C., Lin, H.Y., Hou, W.C., Yang, L.L., Chen, Y.C., 2002. Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca²⁺-dependent endonuclease. *Biochem. Pharmacol.* 63, 225–236.
- Lopaczynski, W., Zeisel, S., 2001. Antioxidants, programmed cell death, and cancer. *Nutr. Res.* 21, 295–307.
- Marchand, L.L., 2002. Cancer preventive effects of flavonoids—a review. *Biomed. Pharmacother.* 56, 296–301.
- Mayorga, M., Iborra, A., Estany, S., Martínez, P., 2004. Protective effect of vitamin E in an animal model of LPS-induced inflammation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 52, 356–361.
- Moldéus, P., Cotgreave, I.A., 1994. *N*-Acetylcysteine. *Methods Enzymol.* 234, 482–493.
- Morris, C.D., Carson, S., 2003. Routine vitamin supplementation to prevent cardiovascular disease: a summary of the evidence for the

- U.S. preventive services task force. *Ann. Intern. Med.* 139, 56–70.
- Nijveldt, R.J., Nood, E., Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., Norren, K., Leeuwen, P.A.M., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 418–425.
- Ohta, Y., Yamasaki, T., Niwa, T., Majima, Y., Ishiguro, I., 1999. Preventive effect of topical vitamin E-containing liposome instillation on the progression of galactose cataract. Comparison between 5-week- and 12-week-old rats fed a 25% galactose diet. *Exp. Eye Res.* 68, 747–755.
- Osakada, F., Hashino, A., Kume, T., Katsuki, H., Kaneko, S., Akaike, A., 2004. α -Tocotrienol provides the most potent neuroprotection among vitamin E analogs on cultured striatal neurons. *Neuropharmacology* 47, 904–915.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 20, 933–956.
- Sadowska, A.M., Manuel-y-Keenoy, B., De Backer, W.A., 2007. Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: Discordant in vitro and in vivo dose-effects: a review. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 20, 9–22.
- Senthil, K., Aranganathan, S., Nalini, N., 2004. Evidence of oxidative stress in the circulation of ovarian cancer patients. *Clin. Chim. Acta* 339, 27–32.
- Sentürker, S., Tschirret-Guth, R., Morrow, J., Levine, R., Shacter, E., 2002. Induction of apoptosis by chemotherapeutic drugs without generation of reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 262–272.
- Shimpuku, H., Tachi, Y., Shinohara, M., Ohura, K., 2000. Effect of vitamin E on the degradation of hydrogen peroxide in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Life Sci.* 68, 353–359.
- Stone, J.R., Yang, S., 2006. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 243–270.
- Vivekananthan, D.P., Penn, M.S., Sapp, S.K., Hsu, A., Topol, E.J., 2003. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 361, 2017–2023.
- Wu, M.J., Wang, L., Weng, C.Y., Yen, J.H., 2003. Antioxidant activity of methanol extract of the lotus leaf (*Nelumbo nucifera* Gertn.). *Am. J. Chin. Med.* 31, 687–698.
- Zafarullah, M., Li, W.Q., Sylvester, J., Ahmad, M., 2003. Molecular mechanisms of *N*-acetylcysteine actions. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 6–20.

ANNEX II

Protective Effect of Vitamin E in an Animal Model of LPS-Induced Inflammation

Mayorga M, Iborra A, Estany S, Martínez P. Protective Effect of Vitamin E in an Animal Model of LPS-Induced Inflammation. AJRI 2004; 52:356–361 © Blackwell Munksgaard, 2004

PROBLEM: Many sterility outcomes may be associated to the presence of an inflammatory response that would lead to an inability of the endometrium to support implantation and maintain viable embryos. We have established an animal model of inflammation in which the systemic administration of lipopolysaccharide (LPS) results in a low embryo implantation rate. The purpose of this work was to investigate the effect of the inflammatory agent LPS on embryo viability and to verify the ability of vitamin E to modulate the inflammatory effect of LPS on embryo viability.

METHOD OF STUDY: For pre-implantation studies B6CBAF1 mice, which were intraperitoneally inoculated with LPS (4–10 mg/kg), were used. Mice were also treated with vitamin E (4–10 mg/kg) before or after LPS injection. Embryos were obtained from the oviduct after each treatment.

RESULTS: The LPS produces a decrease in the number of pre-implantational embryos in a concentration dependent manner. The LPS effect can be partially reversed or prevented by vitamin E. Preliminary results show that inflammatory cytokines are secreted by intraperitoneal macrophages in LPS treated mice.

CONCLUSION: Our results demonstrate the ability of vitamin E to avoid an inflammatory environment and to allow viability of embryos.

M. Mayorga, A. Iborra, S. Estany, P. Martínez

Unitat d'Immunologia de la Reproducció, Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

Key words: embryo viability, inflammatory response, lipopolysaccharide, oxidative stress

Address reprint requests to Dr Paz Martínez, Unitat d'Immunologia de la Reproducció, Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain.
E-mail: paz.martinez@uab.es

Submitted March 19, 2002;
revised July 20, 2004;
accepted September 17, 2004.

INTRODUCTION

The implantation process is considered to be the most relevant limiting factor for successful pregnancy.¹ As much as we learn from this process it becomes apparent that the implantation 'knife' has two separated but related cutting edges: one that can be applied to improve fertility, whereas the opposite can be applied to prevent embryo implantation in the uterus. Implantation is not a single event, but a series of developmental phases, known as apposition, adhesion and invasion where endometrial oxidative status also plays a key role.

In normal conditions, there is a balance between oxidant and antioxidant molecules. This balance contributes to normal pregnancy and has regulatory functions such as the increase of membrane fluidity and cellular polarity during the implantation period.² There is some evidence showing how the breakdown of oxidant/antioxidant balance contributes to defective embryo development.³ This could be related to a low total antioxidative capacity (TAC)⁴ because of the

decrease of antioxidant cellular defenses or to an increase in oxidant molecules.

In the field of reproductive medicine we can also find some gynecological pathologies that are related to an oxidative stress, such as endometriosis, tubal obstruction of the Fallopian tubes or genital infections. In endometriosis, the presence of oxidative stress is related to poor quality of the oocyte,⁵ and to bad endometrial receptivity.⁶ Patients with endometriosis have poor *in vitro* fertilization (IVF) outcome in terms of pregnancy rates per cycle and per transfer and reduced implantation rate per embryo replaced.⁷ Embryo implantation can be inhibited by oxidative stress, but the number and quality of embryos also can be affected by oxidation.

In immunological infertility, corticosteroid treatment may reduce or eliminate the immune response related to infertility, thus increasing pregnancy rates.⁸ Our objective in this work is to study in an animal model how an antioxidant therapy (vitamin E) has a positive effect on fertility by preventing or reversing

oxidative stress when embryos are injured by LPS treatment.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The B6CBAF1 (C57BL/6 × CBA) mice were used in fertility experiments and macrophages were obtained from peritoneal fluid. All experiments were approved by the institutional animal ethic committee.

Ability of Vitamin E to Revert LPS Effects in In Vivo Fertility Experiments

Fig. 1 summarizes the procedure used in this work. Female B6CBAF1 mice, 7–8 weeks old, were superovulated by intraperitoneal injection with 5 UI of pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) from Sigma (Madrid, Spain), and 5 IU of human chorionic gonadotrophin (HCG) from Lepori. LPS was obtained from *Salmonella typhimurium* from Sigma. A volume of 300 μ L of LPS, at several concentrations of LPS, ranging from 4 to 10 mg LPS/kg of mice LPS, were injected intraperitoneally at the same time that the HCG hormone, to determine the effect on pregnancy. Two hours later, vitamin E [(+)- α -Tocopherol acid succinate from Sigma] (0, 4, and 10 mg vitamin E/kg mice) was injected in mice to determine the ability of this antioxidant to revert the LPS action. Females were mated with B6CBAF1 males and checked for vaginal plugs the next day. Mated females were killed by CO₂ asphyxia or cervical dislocation and their oviducts were flushed with saline solution. The embryos were collected 58–60 hr after detection of vaginal plug, and the 8–16 cells stage embryos were classified according to their morphology in viable or non-viable embryos or non-fertilized oocytes.

Ability of Vitamin E to Prevent LPS Effects in In Vivo Fertility Experiments

Liposomes were prepared from lyophilized hydrogenated phosphatidylcholine (Lucas Meyer S.A., Barcelona, Spain). Hydrogenated phosphatidylcholine was resuspended by stirring in sterile deionized water at 70°C for 30 min. The suspension was passed five times

in a Microfluidizer 110S equipment (Micro-fluidics) at 70°C and 4 Bar pressure, to reduce liposome size. Liposomes were cooled below 40°C, were mixed with vitamin E, and were passed twice through a Microfluidizer at 4 Bar pressure. The final phospholipid and vitamin E concentrations were 30 and 20 mg/mL, respectively. Liposomes were stored in sterile conditions at 4°C until used.

Female B6CBAF1 mice, 7–8 weeks old, were treated during 5 days with drinking water supplemented with vitamin E (included in liposomes). Then, mice were superovulated by injection of 5 UI PMSG, and 5 IU of HCG, as mentioned above. LPS were injected intraperitoneally at the same time that the HCG hormone, in order to determine the effect on pregnancy. Females were mated with B6CBAF1 males and the embryos were collected as mentioned above. This procedure is showed in Fig. 2.

Isolation of Peritoneal Cells

Peritoneal cells (macrophages, lymphocytes) were isolated under sterile conditions in saline solution, then cells were centrifuged for 10 min at 500 *g*. The supernatant was discarded and the cells were resuspended in 500 μ L of saline solution. After cell counting, 1×10^6 cells were used for flow cytometry and 6×10^6 cells were selected for RNA extraction.

Determination of Reactive Oxygen Species

One million of peritoneal cells were incubated, for 45 min, with 10 mM 2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate (H₂DCFDA) from Molecular Probes (Invitrogen, Barcelona, Spain). This probe is not fluorescent, but when cytosolic reactive oxygen species (ROS) causes the breakdown of the diacetate group the molecule becomes fluorescent. For all mice studied (five for each treatment), 10,000 peritoneal cells were acquired and analyzed by a CellQuest software in a FACScalibur cytometer (Becton Dickinson, Madrid, Spain).

Analysis of the Expression of Interleukin-1 β mRNA

Total RNA from peritoneal macrophages was extracted with Trizol reagent. Integrity of RNAs was checked by ethidium bromide staining in agarose gel

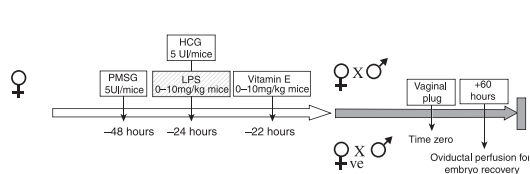


Fig. 1. Reversion of lipopolysaccharide (LPS) effects: protocol of superovulation and LPS/vitamin E treatments.

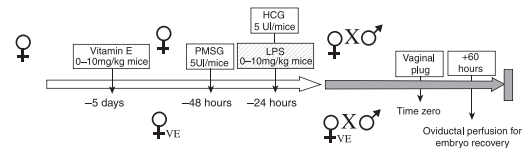


Fig. 2. Prevention of lipopolysaccharide (LPS) effects: protocol of diet administration of vitamin E before superovulation procedure and LPS treatment.

TABLE I. Pair of Primers and Conditions Used in RT-PCR

Molecule	Primer sequence	RT-PCR conditions
IL-1 β	Sense 5'-CCTGTGTAATGAAAGACGGC-3' Antisense 5'-AAGGGAGCTCCTTCACATGC-3'	34 cycles of amplification (95°C for 30 s, 61°C for 25 s, 72°C for 25 s)
GADPH	Sense 5'-CAGGTGTGATTCAATGACGC-3' Antisense 5'-CAGGTGTGATTCAATGACGC-3'	28 cycles of amplification (95°C for 30 s, 61°C for 25 s, 72°C for 25 s)

(1% agarose). One microgram of total RNA was reverse transcribed (RT) into cDNA using 1 μ g of Superscript-II reverse transcriptase and Oligo dT in a final reaction volume of 25 μ L. Amplification was performed in a 25 μ L reaction volume containing 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 10 mM of each dNTPs, 0.5 U of Taq DNA polymerase, 10 pmol of each primer and 5 μ L of RT product. Primer sequences and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) conditions are described in Table I. RT-PCR products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gels containing 0.5 μ g/mL ethidium bromide. After densitometric analysis, mRNA levels were normalized to GADPH mRNA levels.

RESULTS

Vitamin E has a positive effect in reversing LPS effect in mice. As shown in Fig. 3, LPS treatment provokes a decrease in the number of viable embryos. Adminis-

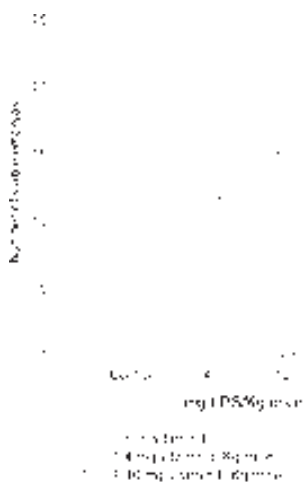


Fig. 3. Effect of lipopolysaccharide (LPS) on the number of viable embryos (mean + S.D.). Vitamin E was inoculated intraperitoneally to revert LPS effects ($n = 10$ mice/treatment).

tration of vitamin E results in an increase of viable embryos in mice treated with 4 mg LPS/kg mice. This effect of vitamin E is low when mice are treated with 10 mg LPS/kg mice. Similar results are found when we studied the preventive effect of vitamin E before stress produced by LPS. Fig. 4 shows the results obtained. LPS alone causes a concentration dependent decrease of viable embryos. In mice pre-treated with vitamin E, the effect of LPS on embryo viability is very small.

The LPS treatment promotes an oxidative stress in peritoneal macrophages. We show in Fig. 5 the percentage (5A) and fluorescence intensity (5B) of cells with cytosolic ROS, measured with the fluorescent probe H₂DCFDA by flow cytometry. The percentage and fluorescent signal is higher in peritoneal macrophages from LPS-treated mice than in peritoneal macrophages either from control mice, or vitamin E treated. It is also important to remark that diet

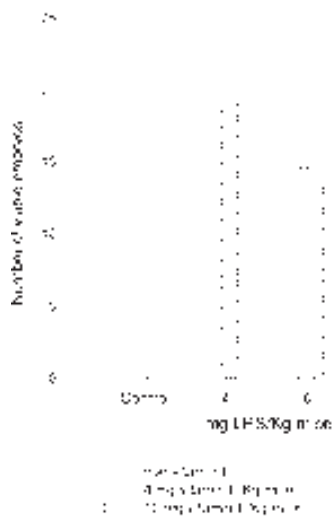


Fig. 4. Effect of LPS on the number of viable embryos (mean + S.D.). Vitamin E was orally administered to mice 5 days before LPS treatment to prevent LPS effects ($n = 10$ mice/treatment).

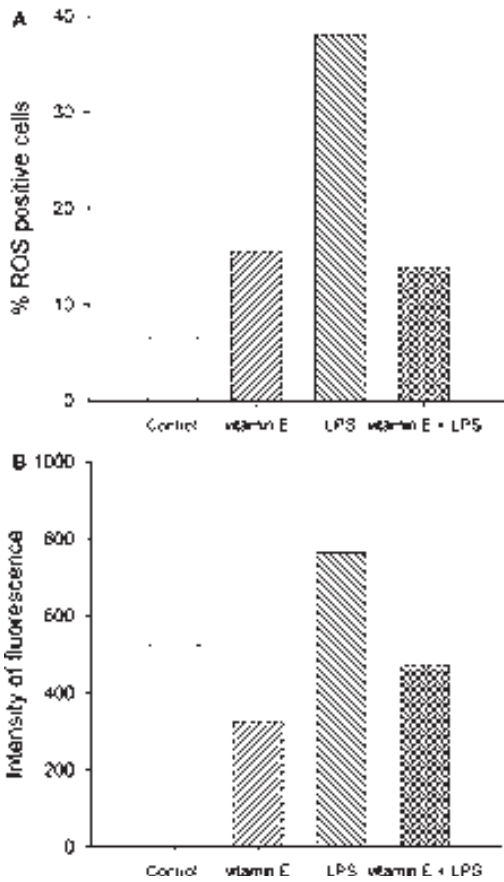


Fig. 5. Expression of cytosolic reactive oxygen species (ROS) measured by flow cytometry. (A) Percentage of ROS positive cells (B) fluorescence intensity of cells ($n = 10$ for each treatment).

supplementation with vitamin E, 5 days before LPS treatment, resulted in a decrease of LPS effect on embryo toxicity, and also on cytosolic ROS generation.

The RT-PCR results show that interleukin (IL)-1 β is increased in LPS treatment, but when diet of mice were supplemented with vitamin E, included in liposomes in water, IL-1 β is not increased in any LPS concentrations used. (Fig. 6).

DISCUSSION

Our results suggest that LPS treatment of mice results in a decrease of embryo viability. The presence of an oxidative stress caused by ROS generated from embryo or from embryo surrounding³ could result in a

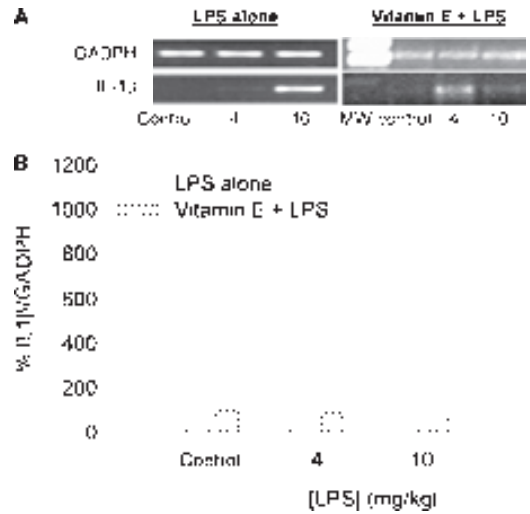


Fig. 6. (A) Expression of IL-1 β mRNA by RT-PCR, (B) densitometric analysis of IL-1 β normalized for GAPDH mRNA expression ($n = 10$ for each treatment).

defective embryo development. The decrease of TAC is related to poor quality of embryos.^{4,5} Some authors have described that gynecological pathologies such as unexplained infertility,⁹ or endometriosis^{5,10} are related to the presence of an oxidative stress. This could help us to explain the poor quality of embryos, the low implantation rates and the low pregnancy rates of these patients.

Embryo quality could be affected by oxidative stress but endometrial receptivity for embryo may be also reduced in oxidative stress as an effect of disturbed expression of cytokines essential for implantation.⁶ In the mid/late luteal phase of endometrium several factors are released contributing to embryo growth an subsequent implantation.¹¹ The presence of an oxidative stress could affect these factors and alter the implantation process.

Thus, it seems important to evaluate the role of antioxidant therapy to improve embryo quality. Our results suggest a positive effect of vitamin E on embryo viability when antioxidant therapy was administered to revert the LPS-oxidative stress effect. However, it seems that the effect of an antioxidant therapy is enhanced when mice were previously treated with a vitamin E diet, in order to prevent the LPS effects in mice (preventive therapy). This effect of vitamin E was described in other reproductive models by other authors. Also, vitamin E is able to revert the negative effects of cyanide on morphological transformations of Syrian hamster embryos,¹² and

may reduce the severity of embryotoxicity in rats.¹³ Vitamin E with pentoxifylline has a positive effect in the reduction of uterine lesions.¹⁴ In another cellular model, with alveolar macrophages, vitamin E reduces cytosolic ROS concentration, related to LPS or IL-1 β or tumor necrosis factor (TNF)- α treatment.¹⁵ These results are similar to those obtained in our experiments. The dose of vitamin E to be administered changes from one author to another. It has been documented that long periods of vitamin E administration have positive effects in mice as well as in humans. In our experiments vitamin E supplementation for 5 days blocks the negative effects of LPS inoculation.

In macrophages, incubation with LPS results in a quick expression of cytosolic ROS, and IL-1 β and TNF- α expression is enhanced after 3 hr of incubation.¹⁶ Our flow cytometry results show that after LPS treatment we have more positive cells for ROS with high ROS concentration than in peritoneal cells from mice control. These results are related to low embryo viability shown in mice. Similar results are described by Bedaiwy et al.,¹⁷ in blastocyst development rates. These low rates are related to high ROS concentrations. Thus, ROS could play an important role on embryo development and may affect their viability. In conclusion, our study shows clearly how vitamin E is able to reduce cytosolic ROS contributing to embryo viability.

We found by RT-PCR mRNA expression for IL-1 β . Similar results for IL-1 β were observed by Hsu et al.¹⁶ Th1 cytokine expression is related to oxidative stress. In contrast, Th2 cytokines such as IL-10 seem to inhibit the cytosolic ROS expression.¹⁸ In our experiments, antioxidant therapy prevents the synthesis of IL-1 β mRNA in mice treated with 10 mg/kg of LPS, and results in an increase on the embryo viability rates. In rat glomerulonephritis model, antioxidant therapy with N-acetyl-cysteine (NAC) reduces ROS synthesis and injury.¹⁹ Our results suggest that cytosolic ROS and the IL-1 β mRNA expression are related to the improvement of embryo viability when mice are pretreated with vitamin E before LPS administration. Future experiments with these molecules could help us to determine their role in the establishment of oxidative stress, in embryo viability, in endometrial embryo receptivity or in the low implantation rates of sterile patients.

REFERENCES

- Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G: Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Hum Reprod* 2002; 17:213–218.
- Duran Reyes G, Gomez Melendez MR, Hicks Gomez JJ: Importance of free radicals during the reproduction cycle. *Ginecol Obstet Mex* 1998; 66:371–376.
- Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y: Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 2001; 7:175–189.
- Paszkowski T, Clarke RN: Antioxidative capacity of preimplantation embryo culture medium declines following the incubation of poor quality embryos. *Hum Reprod* 1996; 11:2493–2495.
- Saito H, Seino T, Kaneko T, Nakahara K, Toya M, Kurachi H: Endometriosis and oocyte quality. *Gynecol Obstet Invest* 2002; 53:46–51.
- Strandell A, Lindhard A: Why does hydrosalpinx reduce fertility? The importance of hydrosalpinx fluid. *Hum Reprod* 2002; 17:1141–1145.
- Pellicer A, Navarro J, Bosch E, Garrido N, Garcia-Velasco JA, Remohi J, Simon C: Endometrial quality in infertile women with endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 943:122–130.
- Wang L, Huang P, Huang X: Analysis on the treatment of 1,020 patients with immunologic infertility. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 1999; 34:234–236.
- Polak G, Koziol-Montewka M, Tarkowski R, Kotarski J: Peritoneal fluid and plasma 4-hydroxynonenal and malonyldialdehyde concentrations in infertile women. *Ginekol Pol* 2001; 72:1316–1320.
- Murphy AA, Santanam N, Parthasarathy S: Endometriosis: a disease of oxidative stress? *Semin Reprod Endocrinol* 1998; 16:263–273.
- Spandorfer SD, Barbat LI, Navarro J, Liu HC, Veeck L, Rosenwaks Z: Importance of the biopsy date in autologous endometrial cocultures for patients with multiple implantation failures. *Fertil Steril* 2002; 77:1209–1213.
- Kamendulis LM, Zhang H, Wang Y, Klaunig JE: Morphological transformation and oxidative stress induced by cyanide in Syrian hamster embryo (SHE) cells. *Toxicol Sci* 2002; 68:437–443.
- Verma RJ, Sherlin DM: Vitamin C ameliorates fluoride-induced embryotoxicity in pregnant rats. *Hum Exp Toxicol* 2001; 20:619–623.
- Letur-Konirsch H, Guis F, Delanian S: Uterine restoration by radiation sequelae regression with combined pentoxifylline-tocopherol: a phase II study. *Fertil Steril* 2002; 77:1219–1226.
- Pathania V, Syal N, Pathak CM, Khanduja KL: Vitamin E suppresses the induction of reactive oxygen species release by lipopolysaccharide, interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in rat alveolar macrophages. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1999; 45:675–686.
- Hsu HY, Wen MH: Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression. *J Biol Chem* 2002; 277:22131–22139.
- Bedaiwy MA, Goldberg JM, Falcone T, Singh M, Nelson D, Azab H, Wang X, Sharma R: Relationship between oxidative stress and embryotoxicity of hydrosalpingeal fluid. *Hum Reprod* 2002; 17:601–604.

18. Dokka S, Shi X, Leonard S, Wang L, Castranova V, Rojanasakul Y: Interleukin-10-mediated inhibition of free radical generation in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280:1196–1202.
19. Mosley K, Waddington SN, Ebrahim H, Cook T, Cattell V: Inducible nitric oxide synthase induction in Thy 1 glomerulonephritis is complement and reactive oxygen species dependent. *Exp Nephrol* 1999; 7:26–34.

ANNEX III: ANÀLISI ESTADÍSTICA DE LA VIABILITAT CEL·LULAR PER A LES CÈL·LULES DE TROFOBLAST

En aquest annex hi ha els resultats obtinguts dels models lineals amb mesures repetides on es van observar diferències globals i que estan descrits en la secció 4.2.5.2 per:

- A. Acció de l'oxidant.
- B. Acció dels antioxidants.

Per cadascuna de les condicions experimentals exposades hi ha:

1. La primera taula (**Type 3 Tests of Fixed Effects**) dona l'estadístic (F Value) i el p-valor ($Pr > F$) per si hi ha diferències globals.
2. La segona taula on hi ha els resultats dels contrastos dos a dos amb la correcció de Tukey aplicada (**Differences of Least Squares Means**). L'Adj P correspon al p-valor ajustat tenint en compte la multiplicitat de contrastos, i l'interval del 95% de confiança definit per Adj Lower i Adj Upper.

A. ACCIÓ DE L'OXIDANT

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
H ₂ O ₂	5	65	215.14	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	H ₂ O ₂ mM	H ₂ O ₂ mM	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
H ₂ O ₂	0	0.1	-4.0949	0.8196	0.05	-13.8557	5.666
H ₂ O ₂	0	1	3.6755	0.8771	0.05	-6.0826	13.4337
H ₂ O ₂	0	1.5	13.105	0.0026	0.05	3.3468	22.8631
H ₂ O ₂	0	2	37.7325	<.0001	0.05	27.7592	47.7059
H ₂ O ₂	0	2.5	86.6523	<.0001	0.05	76.8515	96.4531
H ₂ O ₂	0.1	1	7.7704	0.1918	0.05	-1.9638	17.5046
H ₂ O ₂	0.1	1.5	17.1998	<.0001	0.05	7.4657	26.934
H ₂ O ₂	0.1	2	41.8274	<.0001	0.05	31.8775	51.7773
H ₂ O ₂	0.1	2.5	90.7472	<.0001	0.05	80.9702	100.52
H ₂ O ₂	1	1.5	9.4294	0.0628	0.05	-0.302	19.1608
H ₂ O ₂	1	2	34.057	<.0001	0.05	24.1097	44.0042
H ₂ O ₂	1	2.5	82.9768	<.0001	0.05	73.2025	92.751
H ₂ O ₂	1.5	2	24.6276	<.0001	0.05	14.6803	34.5748
H ₂ O ₂	1.5	2.5	73.5474	<.0001	0.05	63.7731	83.3216
H ₂ O ₂	2	2.5	48.9198	<.0001	0.05	38.9307	58.9089

B. ACCIÓ DELS ANTIOXIDANTS

B.1 CITOTOXICITAT MODERADA. $H_2O_2=1,5$ mM

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
antioxidant	3	20	4.89	0.0104

Differences of Least Squares Means							
Effect	antioxidant	_antioxidant	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
antioxidant	Catechin	NAC	-9.7846	0.3191	0.05	-25.3131	5.7439
antioxidant	Catechin	No antioxidant	3.7681	0.8388	0.05	-8.9126	16.4488
antioxidant	Catechin	Quercetin	-9.9878	0.3027	0.05	-25.5225	5.547
antioxidant	NAC	No antioxidant	13.5527	0.0335	0.05	0.8721	26.2334
antioxidant	NAC	Quercetin	-0.2031	1	0.05	-15.7378	15.3316
antioxidant	No antioxidant	Quercetin	-13.7559	0.0306	0.05	-26.4441	-1.0676

B.2 CITOTOXICITAT MODERADA. H₂O₂ = 2 mM

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
antioxidant	3	19	12.67	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	antioxidant	_antioxidant	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
antioxidant	Catechin	NAC	-30.5982	0.0073	0.05	-53.7453	-7.4511
antioxidant	Catechin	No antioxidant	8.3821	0.6143	0.05	-10.731	27.4952
antioxidant	Catechin	Quercetin	-15.9535	0.246	0.05	-39.1006	7.1936
antioxidant	NAC	No antioxidant	38.9803	<.0001	0.05	19.8672	58.0934
antioxidant	NAC	Quercetin	14.6447	0.3134	0.05	-8.5024	37.7918
antioxidant	No antioxidant	Quercetin	-24.3356	0.0099	0.05	-43.4486	-5.2225

B.3 CITOTOXICITAT SEVERA. H₂O₂ = 2,5 mM

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
antioxidant	3	20	130.34	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	antioxidant	_antioxidant	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
antioxidant	Catechin	NAC	-76.1815	<.0001	0.05	-91.8969	-60.4661
antioxidant	Catechin	No antioxidant	14.8796	0.018	0.05	2.1923	27.5669
antioxidant	Catechin	Quercetin	0.01514	1	0.05	-15.4703	15.5006
antioxidant	NAC	No antioxidant	91.0611	<.0001	0.05	78.0942	104.03
antioxidant	NAC	Quercetin	76.1967	<.0001	0.05	60.4813	91.9121
antioxidant	No antioxidant	Quercetin	-14.8645	0.0181	0.05	-27.5517	-2.1772

ANNEX IV: ANÀLISI ESTADÍSTICA DE L'ACCIÓ ANTIOXIDANT EN L'ACTIVITAT CASPASA-3 EN LES CÈL·LULES ENDOMETRIALS

En aquest annex hi ha els resultats obtinguts dels models lineals generalitzat on es van observar diferències globals i que estan descrits en la secció 4.2.6.1.1 per:

- A. acció de l'oxidant.
- B. acció dels antioxidants.

Per cadascuna de les condicions experimentals hi ha:

1. La primera taula (**Type 3 Tests of Fixed Effects**) dona l'estadístic (F Value) i el p-valor ($Pr > F$) per si hi ha diferències globals.
2. La segona taula on hi ha els resultats dels contrastos dos a dos amb la correcció de Tukey aplicada (**Differences of Least Squares Means**). L'Adj P correspon al p-valor ajustat tenint en compte la multiplicitat de contrastos, i l'interval del 95% de confiança definit per Adj Lower i Adj Upper

A. ACCIÓ DE L'OXIDANT

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
H ₂ O ₂	3	20	77.85	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	citotox	citotox	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
H ₂ O ₂	0	CN	-0.0816	0.1213	0.05	-0.179	0.01582
H ₂ O ₂	0	CM	-0.2541	<.0001	0.05	-0.3437	-0.1646
H ₂ O ₂	0	CS	-0.5423	<.0001	0.05	-0.6352	-0.4494
H ₂ O ₂	CN	CM	-0.1725	0.0003	0.05	-0.2668	-0.07835
H ₂ O ₂	CN	CS	-0.4607	<.0001	0.05	-0.5581	-0.3633
H ₂ O ₂	CM	CS	-0.2882	<.0001	0.05	-0.3777	-0.1986

CN=citotoxicitat nul·la; CM=citotoxicitat moderada; CS=citotoxicitat severa.

B. ACCIÓ DELS ANTIOXIDANTS

B.1 CITOTOXICITAT MODERADA

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Antioxidant	3	15	6.23	0.0058

Differences of Least Squares Means							
Effect	antioxidant	_antioxidant	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
antioxidant	Catechin	NAC	0.17	0.0527	0.05	-0.00169	0.3416
antioxidant	Catechin	No antioxidant	-0.0435	0.8423	0.05	-0.1956	0.1087
antioxidant	Catechin	Quercetin	-0.03947	0.9094	0.05	-0.2111	0.1322
antioxidant	NAC	No antioxidant	-0.2135	0.0052	0.05	-0.3656	-0.06131
antioxidant	NAC	Quercetin	-0.2094	0.0147	0.05	-0.3811	-0.03779
antioxidant	No antioxidant	Quercetin	0.004026	0.9998	0.05	-0.1481	0.1562

B.2 CITOTOXICITAT SEVERA

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
antioxidant	3	14	26.09	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	antioxidant	_antioxidant	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
antioxidant	Catechin	NAC	0.3496	0.0018	0.05	0.1319	0.5672
antioxidant	Catechin	No antioxidant	-0.1533	0.1597	0.05	-0.352	0.04541
antioxidant	Catechin	Quercetin	-0.2574	0.0186	0.05	-0.475	-0.03973
antioxidant	NAC	No antioxidant	-0.5029	<.0001	0.05	-0.7015	-0.3042
antioxidant	NAC	Quercetin	-0.607	<.0001	0.05	-0.8246	-0.3893
antioxidant	No antioxidant	Quercetin	-0.1041	0.4508	0.05	-0.3028	0.09459

ANNEX V: ANÀLISI ESTADÍSTICA DE L'ACCIÓ ANTIOXIDANT MITJANÇANT L'AVAUACIÓ DE L'EXTERNALITZACIÓ DE LA FOSFATIDILSERINA I LA MORT CEL·LULAR EN LES CÈL·LULES ENDOMETRIALS

En aquest annex hi ha els resultats obtinguts dels models lineals generalitzat on es van observar diferències globals i que estan descrits en la secció 4.2.6.2.1 per:

- A. Acció de l'oxidant.
- B. Acció dels antioxidants.

Per cadascuna de les condicions experimentals hi ha:

1. La primera taula (**Type 3 Tests of Fixed Effects**) dóna l'estadístic (F Value) i el p-valor ($Pr > F$) per si hi ha diferències globals.
2. La segona taula on hi ha els resultats dels contrastos dos a dos amb la correcció de Tukey aplicada (**Differences of Least Squares Means**). L'Adj P correspon al p-valor ajustat tenint en compte la multiplicitat de contrastos, i l'interval del 95% de confiança definit per Adj Lower i Adj Upper

A. ACCIÓ DE L'OXIDANT

A.1 Temps=24h

a) Cèl·lules vives (an-/PI-)

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
H ₂ O ₂	2	32	82.06	<.0001

Differences of Least Squares Means						Adj	Adj
Effect	citotox	citotox	Estimate	Adj P	Alpha	Lower	Upper
H ₂ O ₂	0	CM	7.6175	0.0117	0.05	1.5224	13.7126
H ₂ O ₂	0	CS	32.9142	<.0001	0.05	26.3044	39.5239
H ₂ O ₂	CM	CS	25.2967	<.0001	0.05	19.0333	31.5601

b) Cèl·lules apoptòtiques (an+/PI-)

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
H ₂ O ₂	2	32	29.26	<.0001

Differences of Least Squares Means						Adj	Adj
Effect	citotox	citotox	Estimate	Adj P	Alpha	Lower	Upper
H ₂ O ₂	0	CM	-2.8713	0.0276	0.05	-5.467	-0.2756
H ₂ O ₂	0	CS	-8.6227	<.0001	0.05	-11.4376	-5.8079
H ₂ O ₂	CM	CS	-5.7514	<.0001	0.05	-8.4188	-3.0841

c) Cèl·lules mortes (PI+)

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
H ₂ O ₂	2	32	77.86	<.0001

Differences of Least Squares Means						Adj	Adj
Effect	citotox	citotox	Estimate	Adj P	Alpha	Lower	Upper
H ₂ O ₂	0	CM	-4.594	0.0561	0.05	-9.2877	0.09962
H ₂ O ₂	0	CS	-24.2925	<.0001	0.05	-29.3824	-19.2025
H ₂ O ₂	CM	CS	-19.6984	<.0001	0.05	-24.5217	-14.8751

0=no oxidant; CM=citotoxicitat moderada; CS=citotoxicitat severa.

A.2 Temps=48h

a) Cèl·lules vives (an-/PI-)

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
H ₂ O ₂	2	29	759.02	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	citotox	citotox	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
H ₂ O ₂	0	CM	16.9023	<.0001	0.05	12.6505	21.1542
H ₂ O ₂	0	CS	72.4348	<.0001	0.05	67.7711	77.0985
H ₂ O ₂	CM	CS	55.5325	<.0001	0.05	50.71	60.355

b) Cèl·lules apoptòtiques (an+/PI-)

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
H ₂ O ₂	2	29	31.03	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	citotox	citotox	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
H ₂ O ₂	0	CM	-7.4957	0.0007	0.05	-11.921	-3.0703
H ₂ O ₂	0	CS	-15.3563	<.0001	0.05	-20.2104	-10.5023
H ₂ O ₂	CM	CS	-7.8607	0.0016	0.05	-12.88	-2.8414

c) Cèl·lules mortes (PI+)

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
H ₂ O ₂	2	29	333.4	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	citotox	citotox	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
H ₂ O ₂	0	CM	-8.8657	0.0005	0.05	-13.9294	-3.8021
H ₂ O ₂	0	CS	-56.0785	<.0001	0.05	-61.6326	-50.5243
H ₂ O ₂	CM	CS	-47.2127	<.0001	0.05	-52.956	-41.4695

0=no oxidant; CM=citotoxicitat moderada; CS=citotoxicitat severa.

B. ACCIÓ DELS ANTIOXIDANTS

B.1 Cèl·lules vives (*an-/PI-*). Temps= 24h.

a) citotoxicitat severa

Type 3 Tests of Fixed Effects					
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F	
antioxidant	3	15	12.26	0.0003	

Differences of Least Squares Means							
Effect	antioxidant	_antioxidant	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
antioxidant	Catechin	NAC	-21.2433	0.035	0.05	-41.1826	-1.304
antioxidant	Catechin	No antioxidant	11.2993	0.2223	0.05	-4.7763	27.3749
antioxidant	Catechin	Quercetin	-4.9	0.8923	0.05	-24.8393	15.0393
antioxidant	NAC	No antioxidant	32.5427	0.0002	0.05	16.4671	48.6183
antioxidant	NAC	Quercetin	16.3433	0.1279	0.05	-3.596	36.2826
antioxidant	No antioxidant	Quercetin	-16.1993	0.048	0.05	-32.2749	-0.1237

B.2 Cèl·lules vives (an-/PI-) . Temps= 48h.**a) citotoxicitat moderada**

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
antioxidant	3	19	18.47	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	antioxidant	_antioxidant	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
antioxidant	Catechin	NAC	-9.37	0.0215	0.05	-17.5567	-1.1833
antioxidant	Catechin	No antioxidant	8.005	0.017	0.05	1.2451	14.7649
antioxidant	Catechin	Quercetin	0.315	0.9995	0.05	-7.8717	8.5017
antioxidant	NAC	No antioxidant	17.375	<.0001	0.05	10.6151	24.1349
antioxidant	NAC	Quercetin	9.685	0.0171	0.05	1.4983	17.8717
antioxidant	No antioxidant	Quercetin	-7.69	0.0224	0.05	-14.4499	-0.9301

b) citotoxicitat severa

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
antioxidant	3	13	87.71	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	antioxidant	_antioxidant	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
antioxidant	Catechin	NAC	-77.9567	<.0001	0.05	-95.1794	-60.734
antioxidant	Catechin	No antioxidant	-4.0475	0.8385	0.05	-18.3278	10.2328
antioxidant	Catechin	Quercetin	-8.16	0.5263	0.05	-25.3827	9.0627
antioxidant	NAC	No antioxidant	73.9092	<.0001	0.05	59.6288	88.1895
antioxidant	NAC	Quercetin	69.7967	<.0001	0.05	52.574	87.0194
antioxidant	No antioxidant	Quercetin	-4.1125	0.8321	0.05	-18.3928	10.1678

B.3 Cèl·lules apoptòtiques (an+/PI-). Temps= 24h.**a) citotoxicitat severa**

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
antioxidant	3	15	5.06	0.0128

Differences of Least Squares Means							
Effect	antioxidant	_antioxidant	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
antioxidant	Catechin	NAC	6.5633	0.104	0.05	-1.0611	14.1877
antioxidant	Catechin	No antioxidant	-1.7333	0.8475	0.05	-7.8803	4.4137
antioxidant	Catechin	Quercetin	0.5933	0.9958	0.05	-7.0311	8.2177
antioxidant	NAC	No antioxidant	-8.2967	0.0071	0.05	-14.4437	-2.1497
antioxidant	NAC	Quercetin	-5.97	0.1529	0.05	-13.5944	1.6544
antioxidant	No antioxidant	Quercetin	2.3267	0.7002	0.05	-3.8203	8.4737

B.4 Cèl·lules apoptòtiques (an+/PI-). Temps= 48h.

a) citotoxicitat moderada

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
antioxidant	3	19	3.67	0.0307

Differences of Least Squares Means							
Effect	antioxidant	_antioxidant	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
antioxidant	Catechin	NAC	1.5275	0.9498	0.05	-6.5245	9.5795
antioxidant	Catechin	No antioxidant	-5.3568	0.1418	0.05	-12.0056	1.2919
antioxidant	Catechin	Quercetin	-1.9325	0.9053	0.05	-9.9845	6.1195
antioxidant	NAC	No antioxidant	-6.8843	0.0408	0.05	-13.5331	-0.2356
antioxidant	NAC	Quercetin	-3.46	0.6293	0.05	-11.512	4.592
antioxidant	No antioxidant	Quercetin	3.4243	0.4865	0.05	-3.2244	10.0731

b) citotoxicitat severa

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
antioxidant	3	13	9.65	0.0013

Differences of Least Squares Means							
Effect	antioxidant	_antioxidant	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
antioxidant	Catechin	NAC	20.2067	0.0013	0.05	8.2398	32.1735
antioxidant	Catechin	No antioxidant	4.6975	0.527	0.05	-5.2249	14.6199
antioxidant	Catechin	Quercetin	5.1033	0.6071	0.05	-6.8635	17.0702
antioxidant	NAC	No antioxidant	-15.5092	0.0025	0.05	-25.4316	-5.5868
antioxidant	NAC	Quercetin	-15.1033	0.0124	0.05	-27.0702	-3.1365
antioxidant	No antioxidant	Quercetin	0.4058	0.9993	0.05	-9.5166	10.3282

B.5 Cèl·lules mortes (PI+). Temps= 24h.**a) citotoxicitat severa**

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
antioxidant	3	15	11.08	0.0004

Differences of Least Squares Means							
Effect	antioxidant	_antioxidant	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
antioxidant	Catechin	NAC	14.6833	0.0779	0.05	-1.3321	30.6988
antioxidant	Catechin	No antioxidant	-9.567	0.1867	0.05	-22.4791	3.3451
antioxidant	Catechin	Quercetin	4.31	0.8642	0.05	-11.7055	20.3255
antioxidant	NAC	No antioxidant	-24.2503	0.0004	0.05	-37.1624	-11.3382
antioxidant	NAC	Quercetin	-10.3733	0.2827	0.05	-26.3888	5.6421
antioxidant	No antioxidant	Quercetin	13.877	0.0332	0.05	0.9649	26.7891

B.6 Cèl·lules mortes(PI+). Temps= 48h.**a) citotoxicitat moderada**

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
antioxidant	3	19	9.7	0.0004

Differences of Least Squares Means							
Effect	antioxidant	_antioxidant	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
antioxidant	Catechin	NAC	7.84	0.0124	0.05	1.499	14.181
antioxidant	Catechin	No antioxidant	-2.1073	0.6751	0.05	-7.3432	3.1286
antioxidant	Catechin	Quercetin	1.6175	0.889	0.05	-4.7235	7.9585
antioxidant	NAC	No antioxidant	-9.9473	0.0002	0.05	-15.1832	-4.7114
antioxidant	NAC	Quercetin	-6.2225	0.0556	0.05	-12.5635	0.1185
antioxidant	No antioxidant	Quercetin	3.7248	0.2227	0.05	-1.5111	8.9607

b) citotoxicitat severa

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
antioxidant	3	13	29.39	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	antioxidant	_antioxidant	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
antioxidant	Catechin	NAC	57.75	<.0001	0.05	34.8989	80.6011
antioxidant	Catechin	No antioxidant	0.35	0.9999	0.05	-18.5971	19.2971
antioxidant	Catechin	Quercetin	3.0533	0.9787	0.05	-19.7978	25.9044
antioxidant	NAC	No antioxidant	-57.4	<.0001	0.05	-76.3471	-38.4529
antioxidant	NAC	Quercetin	-54.6967	<.0001	0.05	-77.5478	-31.8456
antioxidant	No antioxidant	Quercetin	2.7033	0.9743	0.05	-16.2438	21.6505

ANNEX VI. ANÀLISI ESTADÍSTICA DE L'ACCIÓ ANTIOXIDANT EN CICLE CEL·LULAR PER A LES CÈL·LULES ENDOMETRIALS I DE TROFOBLAST

En aquest annex hi ha els resultats obtinguts de l'anàlisi de dades composicionals on es van observar diferències globals i que estan descrits en la secció 4.2.7.1 per a les cèl·lules endometrials (1) i de trofoblast (2) segons:

- A. Acció de l'oxidant.
- B. Acció dels antioxidants.

Per cadascuna de les condicions experimentals hi ha:

1. La primera taula (Type 3 Tests of Fixed Effects) dona l'estadístic (F Value) i el p-valor ($Pr > F$) per si hi ha diferències globals.
2. La segona taula on hi ha els resultats dels contrastos dos a dos amb la correcció de Tukey aplicada (Differences of Least Squares Means). L'Adj P correspon al p-valor ajustat tenint en compte la multiplicitat de contrastos, i l'interval del 95% de confiança definit per Adj Lower i Adj Upper.

1. LÍNIA ENDOMETRIAL

1.A Acció de l'oxidant

a) Temps =24h

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
H ₂ O ₂	2	12	48.48	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	citotox	citotox	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
H ₂ O ₂	0	CN	-0.6846	<.0001	0.05	-0.8701	-0.4991
H ₂ O ₂	0	CM	-0.3543	0.0007	0.05	-0.5398	-0.1688
H ₂ O ₂	CN	CM	0.3303	0.0013	0.05	0.1448	0.5158

b) Temps =48h

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
H ₂ O ₂	2	10	178.57	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	citotox	citotox	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
H ₂ O ₂	0	CN	-0.3616	<.0001	0.05	-0.4552	-0.268
H ₂ O ₂	0	CM	-0.7369	<.0001	0.05	-0.8449	-0.6288
H ₂ O ₂	CN	CM	-0.3752	<.0001	0.05	-0.4833	-0.2672

0=no oxidant; CN=citotoxicitat nul·la; CM=citotoxicitat moderada.

1. B Acció dels antioxidants

a) Citotoxicitat nul·la. 24h

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
antioxidant	3	10	38.33	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	antioxidant	_antioxidant	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
antioxidant	Catechin	NAC	0.647	<.0001	0.05	0.413	0.881
antioxidant	Catechin	No antioxidant	0.01647	0.9948	0.05	-0.1928	0.2258
antioxidant	Catechin	Quercetin	0.4134	0.0014	0.05	0.1794	0.6474
antioxidant	NAC	No antioxidant	-0.6305	<.0001	0.05	-0.8398	-0.4212
antioxidant	NAC	Quercetin	-0.2335	0.0505	0.05	-0.4675	0.000445
antioxidant	No antioxidant	Quercetin	0.397	0.0008	0.05	0.1877	0.6063

b) Citotoxicitat nul·la. 48h

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
antioxidant	3	10	111.47	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	antioxidant	_antioxidant	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
antioxidant	Catechin	NAC	0.3301	<.0001	0.05	0.2488	0.4113
antioxidant	Catechin	No antioxidant	-0.03578	0.4688	0.05	-0.1084	0.03686
antioxidant	Catechin	Quercetin	0.2581	<.0001	0.05	0.1768	0.3393
antioxidant	NAC	No antioxidant	-0.3658	<.0001	0.05	-0.4385	-0.2932
antioxidant	NAC	Quercetin	-0.072	0.0865	0.05	-0.1532	0.009212
antioxidant	No antioxidant	Quercetin	0.2938	<.0001	0.05	0.2212	0.3665

c) Citotoxicitat moderada. 24h

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
antioxidant	3	10	55.75	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	antioxidant	_antioxidant	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
antioxidant	Catechin	NAC	0.9776	<.0001	0.05	0.7322	1.2229
antioxidant	Catechin	No antioxidant	0.2578	0.0214	0.05	0.03833	0.4773
antioxidant	Catechin	Quercetin	0.2623	0.0357	0.05	0.01692	0.5077
antioxidant	NAC	No antioxidant	-0.7198	<.0001	0.05	-0.9392	-0.5003
antioxidant	NAC	Quercetin	-0.7153	<.0001	0.05	-0.9606	-0.4699
antioxidant	No antioxidant	Quercetin	0.004498	0.9999	0.05	-0.215	0.224

d) Citotoxicitat moderada. 48h

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
antioxidant	3	8	80.52	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	antioxidant	_antioxidant	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
antioxidant	Catechin	NAC	0.3722	<.0001	0.05	0.264	0.4804
antioxidant	Catechin	No antioxidant	-0.04811	0.5203	0.05	-0.1563	0.06012
antioxidant	Catechin	Quercetin	0.3149	<.0001	0.05	0.2067	0.4232
antioxidant	NAC	No antioxidant	-0.4203	<.0001	0.05	-0.5285	-0.3121
antioxidant	NAC	Quercetin	-0.05728	0.3854	0.05	-0.1655	0.05095
antioxidant	No antioxidant	Quercetin	0.363	<.0001	0.05	0.2548	0.4713

2. LÍNIA DE TROFOBLAST

2.A Acció de l'oxidant.

a) Temps =24h

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
H ₂ O ₂	2	15	34.69	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	citotox	citotox	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
H ₂ O ₂	0	CN	-0.2774	<.0001	0.05	-0.372	-0.1828
H ₂ O ₂	0	CM	-0.2476	<.0001	0.05	-0.3549	-0.1404
H ₂ O ₂	CN	CM	0.02978	0.776	0.05	-0.08326	-0.1428

b) Temps =48h

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
H ₂ O ₂	2	13	97.69	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	citotox	citotox	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
H ₂ O ₂	0	CN	-0.4266	<.0001	0.05	-0.5543	-0.2988
H ₂ O ₂	0	CM	-0.6369	<.0001	0.05	-0.7647	-0.5092
H ₂ O ₂	CN	CM	-0.2104	0.0062	0.05	-0.3579	-0.06286

0=no oxidant; CN=citotoxicitat nul·la; CM=citotoxicitat moderada.

2.B Acció dels antioxidants

a) Citotoxicitat nul·la. 24h

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
antioxidant	3	14	17.65	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	antioxidant	_antioxidant	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
antioxidant	Catechin	NAC	-0.04985	0.8155	0.05	-0.2146	0.1149
antioxidant	Catechin	No antioxidant	-0.2716	0.0006	0.05	-0.422	-0.1212
antioxidant	Catechin	Quercetin	0.07117	0.6042	0.05	-0.09363	0.236
antioxidant	NAC	No antioxidant	-0.2218	0.0037	0.05	-0.3722	-0.07132
antioxidant	NAC	Quercetin	0.121	0.19	0.05	-0.04377	0.2858
antioxidant	No antioxidant	Quercetin	0.3428	<.0001	0.05	0.1923	0.4932

b) Citotoxicitat nul·la. 48h

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
antioxidant	3	12	30.07	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	antioxidant	_antioxidant	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
antioxidant	Catechin	NAC	0.08534	0.3607	0.05	-0.06285	0.2335
antioxidant	Catechin	No antioxidant	-0.2594	<.0001	0.05	-0.3698	-0.1489
antioxidant	Catechin	Quercetin	0.001957	1	0.05	-0.119	0.123
antioxidant	NAC	No antioxidant	-0.3447	<.0001	0.05	-0.4844	-0.205
antioxidant	NAC	Quercetin	-0.08338	0.3794	0.05	-0.2316	0.06481
antioxidant	No antioxidant	Quercetin	0.2614	<.0001	0.05	0.1509	0.3718

c) Citotoxicitat moderada. 24h

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
antioxidant	3	12	20.89	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	antioxidant	_antioxidant	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
antioxidant	Catechin	NAC	0.437	<.0001	0.05	0.2694	0.6046
antioxidant	Catechin	No antioxidant	0.1465	0.0945	0.05	-0.02116	0.3141
antioxidant	Catechin	Quercetin	0.2305	0.0072	0.05	0.0629	0.3981
antioxidant	NAC	No antioxidant	-0.2905	0.0012	0.05	-0.4581	-0.1229
antioxidant	NAC	Quercetin	-0.2065	0.015	0.05	-0.3741	-0.03884
antioxidant	No antioxidant	Quercetin	0.08405	0.4733	0.05	-0.08357	0.2517

d) Citotoxicitat moderada. 48h

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
antioxidant	3	10	51.55	<.0001

Differences of Least Squares Means							
Effect	antioxidant	_antioxidant	Estimate	Adj P	Alpha	Adj Lower	Adj Upper
antioxidant	Catechin	NAC	0.1299	0.0561	0.05	-0.00315	0.2629
antioxidant	Catechin	No antioxidant	-0.2542	0.0002	0.05	-0.3628	-0.1456
antioxidant	Catechin	Quercetin	0.1572	0.0059	0.05	0.04859	0.2658
antioxidant	NAC	No antioxidant	-0.3841	<.0001	0.05	-0.5171	-0.251
antioxidant	NAC	Quercetin	0.02733	0.9205	0.05	-0.1057	0.1604
antioxidant	No antioxidant	Quercetin	0.4114	<.0001	0.05	0.3028	0.52

ANNEX VII: SEQÜENCIACIÓ DE L'AMPLIFICAT DE PCRS

En aquest annex hi ha la seqüenciació de l'amplificat de les PCRs de β -actina (BA) i de les proteïnes reguladores del complement (CD46, CD55 i CD59). Aquesta seqüenciació es va realitzar en el Servei de Seqüenciació d'ADN de la Universitat Autònoma de Barcelona.

B. PROTEÍNA DEL COFACTOR DE MEMBRANA (CD46)

CD46

Length: 173

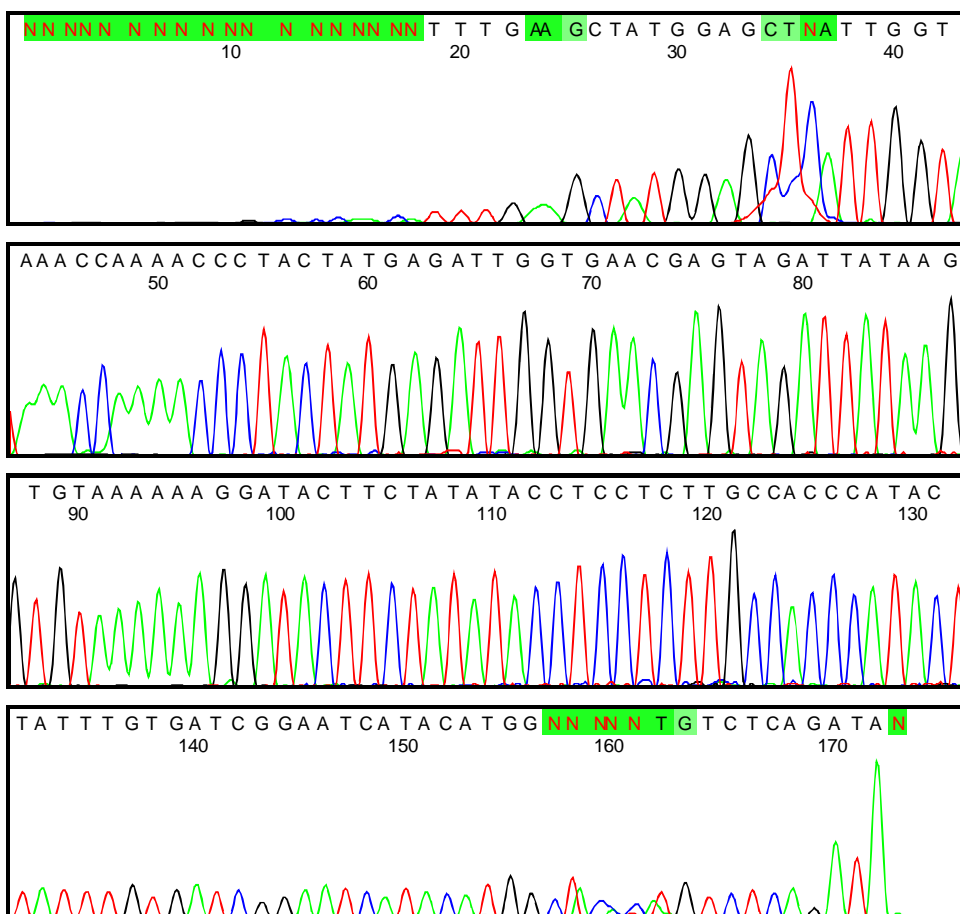
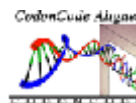
30 de octubre de 2009 23:06:11 CET

Page 1 of 1

q>=20: 144

q>=30: 140

q>=40: 139



C. FACTOR ACCELERADOR DE LA DEGRADACIÓ (CD55)

CD55_1

Length: 297

30 de octubre de 2009 23:49:16 CET

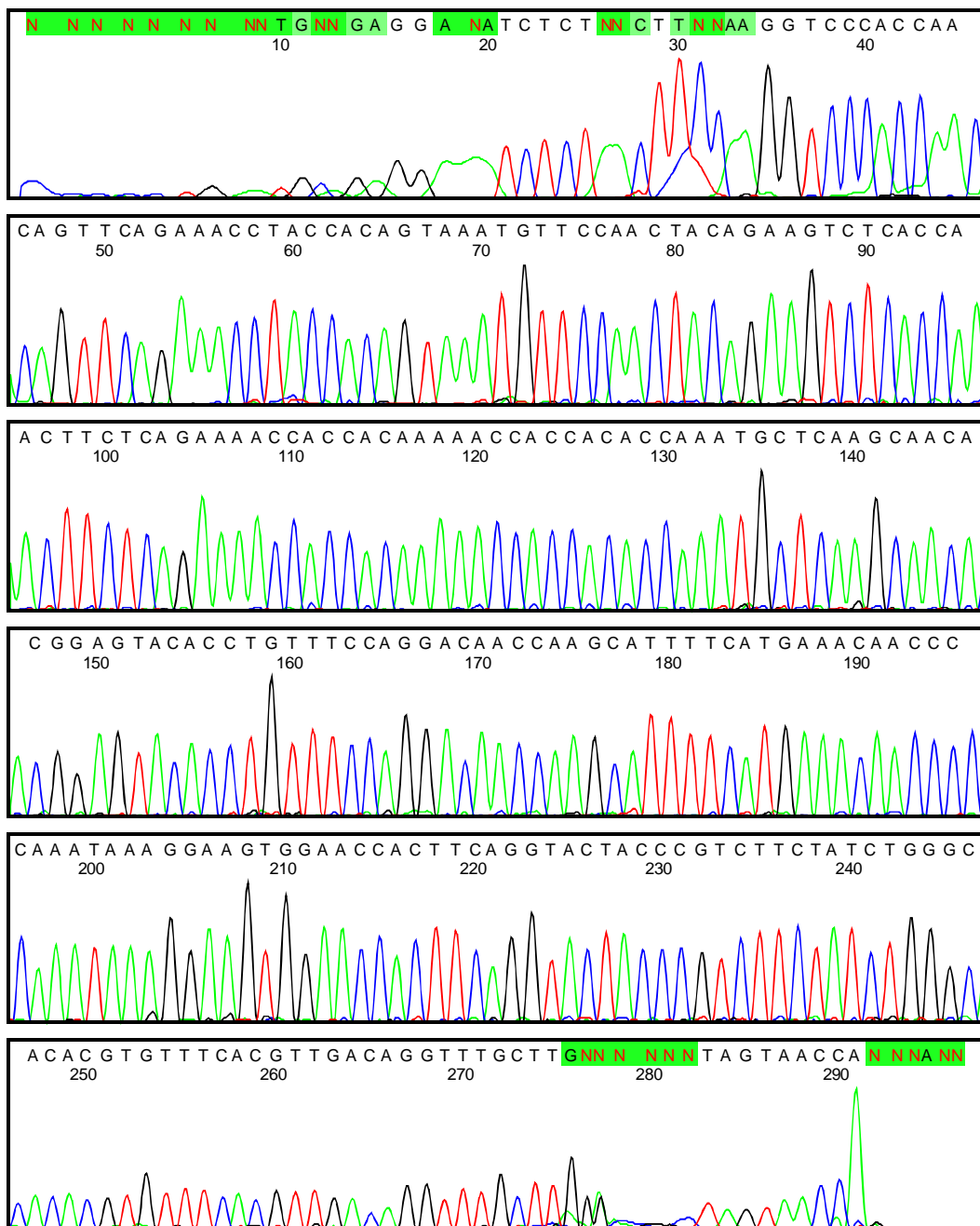
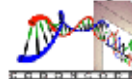
Page 1 of 1

q>=20: 265

q>=30: 258

q>=40: 252

GeneCode Aligner



D. PROTECTINA (CD59)**CD59**

Length: 358

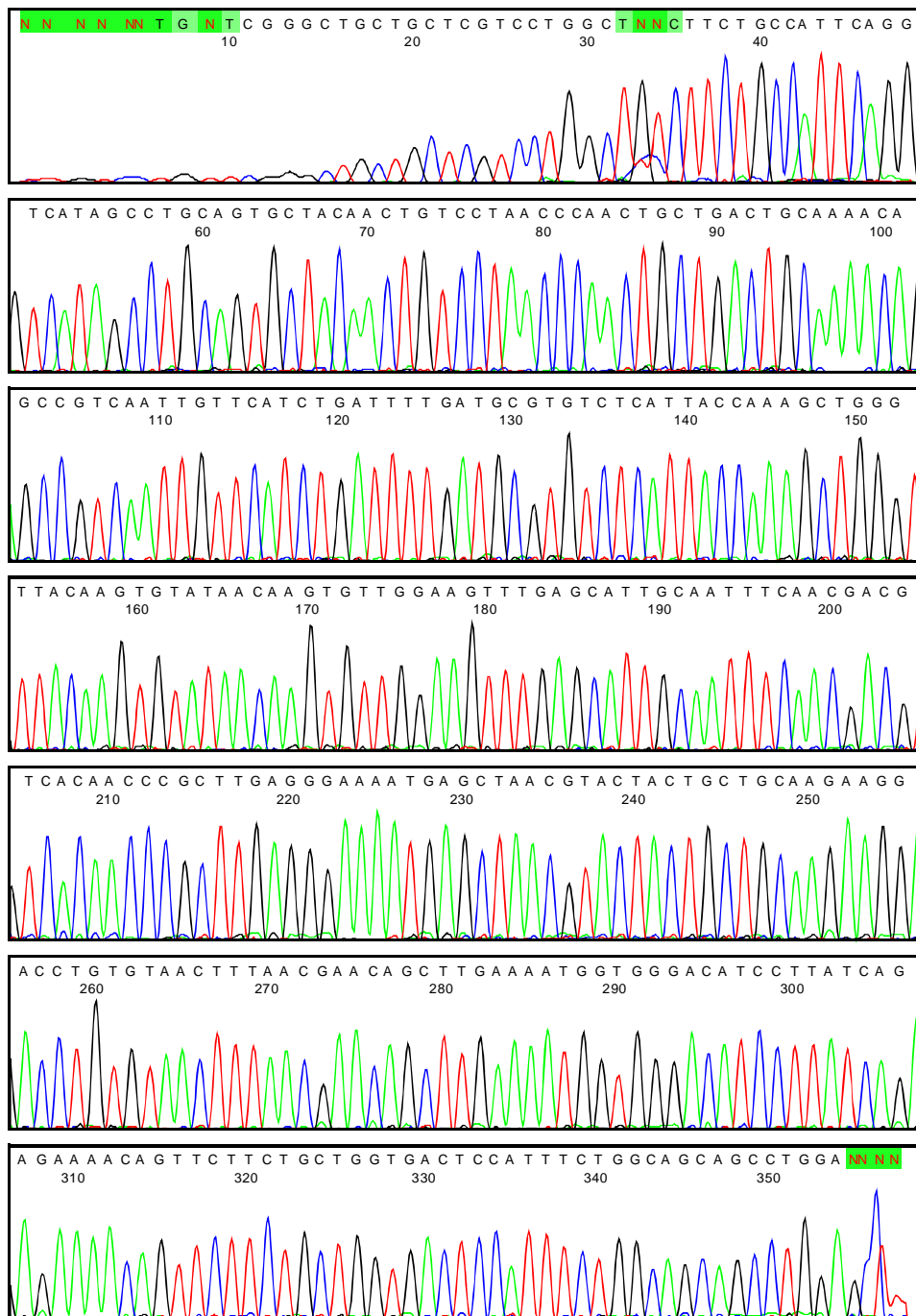
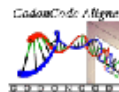
30 de octubre de 2009 23:44:35 CET

Page 1 of 1

q>=20: 344

q>=30: 340

q>=40: 334



Aquest treball ha estat realitzat gràcies al suport del Fondo de investigación Sanitaria (FIS) del Instituto de Salud Carlos III (PI030260) i la Network of Excellence de la Comunidad Europea Sixth Framework Programme (LSHM-CT-2004-512040).

