

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



***“EVALUACIÓN DEL INGRESO DE ESTEROIDES  
SULFATADOS Y SU METABOLIZACIÓN INTRACELULAR.  
IMPLICANCIA EN EL PROCESO DE PROLIFERACIÓN  
CELULAR EN CÉLULAS ENDOMETRIALES DE MUJERES  
CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO”***

Tesis presentada a la Universidad de Chile  
para optar al grado de Doctora en Bioquímica por:

**FRANCISCA LORENA PLAZA PARROCHIA**

Directores de Tesis

Prof. Dra. Margarita Vega B.

Prof. Dr. Luis Valladares B.

SANTIAGO - CHILE  
2014

#### iv. TABLA DE CONTENIDO

	Página
i.Dedicatoria.....	
ii.Agradecimiento.....	
iii.Glosario.....	
iv.Tabla de contenido.....	
v.Índice de Figuras.....	
vi.Financiamiento.....	
vii. Difusión Científica.....	
viii.Resumen.....	
ix.Abstract.....	
I.Introducción.....	33
I.1. Ciclo menstrual y características del endometrio normal.....	33
I.2. El síndrome de ovario poliquístico (PCOS).....	35
I.2.1. Alteraciones moleculares en endometrios de mujeres con PCOS (PCOSE).....	37
I.3. Mecanismos de acción de los esteroides.....	39
I.3.1. Mecanismos canónicos.....	39
I.3.2. Mecanismos no canónicos.....	42
I.4. Moléculas involucradas en ciclo celular.....	46
I.5. Orígenes de los esteroides.....	48
I.5.1 Transportadores de esteroides sulfatados.....	50
I.5.2 Enzimas de la metabolización de esteroides.....	53
I.5.2.1. Enzimas sulfatasa y sulfotransferasa.....	53
I.5.2.2. Enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteroide dehidrogenasa.....	54
I.5.2.3. Enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide dehidrogenasa/ $\Delta$ 5- $\Delta$ 4 isomerasa.....	55

I.5.2.4. Enzima 5 $\alpha$ -reductasa.....	56
I.5.2.5. Enzimas P450arom.....	57
I.5.3. Esteroides y su rol en proliferación.....	58
I.5.3.1. DHEA y DHEAS.....	58
I.5.3.2. Testosterona, DHT y Androstenediona.....	59
I.5.3.3. Progesterona.....	60
I.5.3.4. Estradiol.....	61
I.5.3.5. Otros esteroides.....	61
I.5.3.6. Androstenediol, su metabolización y actividad.....	61
II.Hipótesis.....	66
III.Objetivo General.....	67
IV.Objetivos Específicos.....	67
V.Materiales y Métodos.....	68
V.1. Diseño Experimental.....	68
V.2. Estudios <i>Ex vivo</i> .....	70
V.2.1. Obtención de Muestras.....	70
V.2.1.1. Endometrios de Mujeres Controles (CE).....	70
V.2.1.2. Endometrios de Mujeres con PCOS (PCOSE).....	70
V.2.2. Preparación de las muestras.....	72
V.2.2.1. Estudio morfológico y fechaje histológico.....	72
V.2.3. Actividad Enzimática de 3 $\beta$ -HSD; metabolización de androstenediol a testosterona-cromatografía en capa fina (TLC).....	74
V.2.4. Extracción y purificación de esteroides- ELISA.....	75
V.2.5. Reacción Transcriptasa Reversa y Polimerasa en Cadena (RT-PCR).....	76
V.3. Estudios <i>in vitro</i> .....	78
V.3.1. Cultivo Celular.....	78
V.3.2. Captación de DHEAS tritiada.....	80

V.3.3. Citometría de Flujo.....	81
V.3.4. <i>Western blotting</i> .....	82
V.3.5. Inmunocitoquímica.....	83
V.4. Evaluación Estadística.....	84
VI. Resultados.....	86
VI.1. Objetivo Específico 1.....	86
VI.1.1 <i>Ex vivo</i> : Ensayo de medición de actividad enzimática de 3β-HSD en endometrios de mujeres con PCOS y controles.....	86
VI.1.2. <i>Ex vivo</i> : Evaluación de la concentración de esteroides intratisular en endometrios de mujeres con PCOS y controles.....	88
VI.2. Objetivo Específico 2.....	89
VI.2.1. <i>Ex vivo</i> : Evaluación de los niveles del transcrito y la proteína del transportador OAT4 en endometrios de mujeres PCOS y controles..	90
VI.2.1.1. <i>Ex vivo</i> : Determinación de los niveles del transcrito del transportador OAT4.....	90
VI.2.1.2. <i>Ex vivo</i> : Evaluación del contenido proteico del transportador OAT4.....	90
VI.2.2. <i>In vitro</i> : Evaluación de la proteína de OAT4 en células endometriales obtenidas de cultivo primario.....	92
VI.2.3. Evaluación del contenido proteico de transportadores en tejidos endometriales de mujeres PCOS y controles.....	93
VI.2.3.1. <i>Ex vivo</i> : Determinación de los niveles proteicos de los transportadores OATP-B.....	93
VI.2.3.2. <i>Ex vivo</i> : Evaluación de los niveles proteicos de OATP-D en endometrio.....	93
VI.2.3.3. <i>Ex vivo</i> : Evaluación de los niveles proteicos del transportador OATP-E en endometrio.....	94
VI.2.4. Evaluación del contenido proteico de los transportadores en	

células de cultivo primario endometrial estimuladas con esteroides.....	94
VI.2.4.1. <i>In vitro</i> : Determinación de los niveles proteicos de los transportadores OATP-B.....	94
VI.2.4.2. <i>In vitro</i> : Determinación de los niveles proteicos de los transportadores OATP-D.....	95
VI.2.4.3. <i>In vitro</i> : Determinación de los niveles proteicos de los transportadores OATP-E en células endometriales.....	95
VI.2.5. <i>In vitro</i> : Ensayo de captación de DHEAS en células obtenidas de cultivo primario de endometrio humano bajo estímulos de esteroides.....	98
VI.3. Objetivo Específico 3.....	100
VI.3.1.1. <i>In vitro</i> : Evaluación de la proteína Ki67 en células T-HESC estimuladas con esteroides.....	100
VI.3.1.2. <i>In vitro</i> : Evaluación de la proteína Ki67 en células St-T1b estimuladas con esteroides.....	103
VI.3.2. <i>In vitro</i> : Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo en células T-HESC estimuladas con esteroides.....	105
VI.3.3.1. <i>In vitro</i> : Evaluación de niveles proteicos de p27 en células T-HESC estimuladas con esteroides.....	105
VI.3.3.2. Evaluación de los niveles de p27 en células St-T1b estimuladas con esteroides.....	108
VI.3.4.1. <i>In vitro</i> : Caracterización de los niveles proteicos de ciclina D1 en células T-HESC estimuladas con esteroides.....	110
VI.3.4.2 <i>In vitro</i> : Caracterización de los niveles proteicos de ciclina D1 en células St-T1b estimuladas con esteroides.....	112
VI.4. Objetivo Específico 4.....	114
VI.4.1. Evaluación de p-Akt/Akt realizados en estudios <i>in vitro</i> con estímulos de 48 h.....	114

VI.4.1.1. <i>In vitro</i> : Evaluación de los niveles proteicos de p-Akt en serina 473 y Akt total en células T-HESC estimuladas con esteroides....	114
VI.4.1.2. <i>In vitro</i> : Evaluación de los niveles proteicos de Akt fosforilada en serina 473 y Akt total en células St-T1b estimuladas con esteroides.....	116
VI.4.2. Evaluación de p-Akt/Akt realizada en estudios <i>in vitro</i> con estímulos de 20 min.....	117
VI.4.2.1. <i>In vitro</i> : Evaluación de los niveles proteicos de p-Akt en serina 473 y Akt total en células T-HESC estimuladas con esteroides....	117
VI.4.2.2. <i>In vitro</i> : Evaluación de los niveles proteicos de p-Akt en serina 473 y Akt total en células St-T1b estimuladas con esteroides.....	119
VI.4.3. Evaluación de p-ERK1-2/ERK1-2 realizados en estudios <i>in vitro</i> con estímulos de 48 h.....	120
VI.4.3.1. <i>In vitro</i> : Evaluación de los niveles proteicos de p-ERK1/2 en treonina 202 y tirosina 204 y ERK1/2 total en células T-HESC estimuladas con esteroides.....	120
VI.4.3.2. <i>In vitro</i> : Evaluación de los niveles proteicos de p-ERK1/2 en treonina 202 y tirosina 204 y ERK1/2 total en células St-T1b estimuladas con esteroides.....	122
VI.4.4. Evaluación de p-ERK1-2/ERK1-2 realizada en estudios <i>in vitro</i> con estímulos de 20 min.....	124
VI.4.4.1. <i>In vitro</i> : Evaluación de los niveles proteicos de p-ERK1/2 en treonina 202 y tirosina 204 y ERK1/2 total en células T-HESC estimuladas con esteroides.....	124
VI.4.4.2. <i>In vitro</i> : Evaluación de los niveles proteicos de p-ERK1/2 en treonina 202 y tirosina 204 y ERK1/2 total en células St-T1b estimuladas con esteroides.....	126
VI.4.5. Niveles de reguladores del ciclo bajo estímulos de	

androstenediol y antagonistas de receptores de estrógenos.....	128
VI.4.5.1. Respuesta a estímulo con antagonista de receptores de estrógenos ICI 182,780.....	128
VI.4.5.1.1. Niveles de p27 y ciclina D1 bajo estímulos de antagonista de ER $\alpha$ y $\beta$ (ICI 182,780) en células T-HESC.....	128
VI.4.5.1.2. Niveles de p27 y ciclina D1 bajo estímulos de antagonista de ER $\alpha$ y $\beta$ (ICI 182,780) en células St-T1b.....	131
VI.4.5.2. Respuesta a estímulo con MPP dihidrocloruro.....	133
VI.4.5.2.1. Niveles de p27 y ciclina D1 bajo estímulos de antagonista de ER (MPP dihidrocloruro) en células T-HESC.....	133
VI.4.5.2.2. Niveles de p27 y ciclina D1 bajo estímulos de antagonista de ER (MPP dihidrocloruro) en células St-T1b.....	135
VI.4.6. Niveles de reguladores del ciclo bajo estímulos de androstenediol y antagonistas de AR en células St-T1b.....	137
VI.4.7. Estímulos de androstenediol e inhibidor de la transcripción...	138
VI.4.7.1. Efecto de $\alpha$ -amanitina y androstenediol en los niveles p-Akt y p-ERK1/2 en células T-HESC.....	139
VI.4.7.2. Efecto de $\alpha$ -amanitina y androstenediol en los niveles p-Akt y p-ERK1/2 en células St-T1b.....	142
VI.4.8. Estímulos de androstenediol e inhibidor de PI3K y MAPK.....	145
VI.4.8.1.1. Efectos del inhibidor de PI3K, LY-294,002 y androstenediol en los niveles de p27 y ciclina D1 en T-HESC.....	145
VI.4.8.1.2. Efectos del inhibidor de PI3K, LY-294,002 y	



androstenediol en los niveles de p27 y ciclina D1 en St-T1b.....	148
VI.4.8.2.1. Efectos del inhibidor de MEK1/2, U-0126 y	
androstenediol en los niveles de p27 y ciclina D1 en T-HESC.....	150
VI.4.8.2.2. Efectos del inhibidor de MEK1/2, U-0126 y	
androstenediol en los niveles de p27 y ciclina D1 en St-T1b.....	152
VII. Discusión.....	156
VIII. Conclusiones.....	172
IX. Referencias.....	174
X. Anexos.....	192
X.1. Anexo 1. Descripción de células obtenidas de cultivo primario de	
endometrio.....	192
X.1.1. Inmunodetección de vimentina.....	192
X.1.2. Inmunodetección de citoqueratina 7.....	192
X.1.3. Inmunocitoquímica de AR.....	193
X.1.4. Inmunodetección de ER $\beta$ .....	193
X.1.5. Inmunodetección de PRs.....	193
X.1.6. Inmunocitoquímica de integrina $\alpha\beta 3$ .....	194
X.1.7. Inmunodetección de Mucina 1 (MUC1).....	194
X.1.8. Detección de cambios morfológicos asociados a	
predecidualización posterior a estímulos con estradiol y progesterona...	195
X.2. Anexo 2. Descripción de detección de proteína de	
transportadores de aniones orgánicos en células obtenidas de cultivo	
primario, células de las líneas T-HESC y St-T1b.....	196
X.2.1. Determinación de transportadores OAT4, OATP-B, D y E en	
células obtenidas en cultivo primario, T-HESC y St-T1b.....	196
X.3. Anexo 3.....	197
X.3.1. Detección de ER $\alpha$ , $\beta$ y AR en T-HESC y St-	
T1b.....	197



X.4. Anexo 4.....	198
X.4.1. Curvas dosis-respuesta y tiempo respuesta de esteroides.....	198
X.4.1.1. Curva dosis-respuesta de p27 bajo estímulos de androstenediol.....	198
X.4.1.2. Curvas dosis-respuesta de los niveles de p27 en células T-HESC estimuladas con estradiol.....	199
X.4.2. Curva de estandarización del ensayo de captación de [ <sup>3</sup> H] DHEAS.....	199
X.4.2.1. Curva Tiempo-Respuesta de ensayo de captación de [ <sup>3</sup> H] DHEAS.....	199
X.4.2.2. Curva dosis-respuesta de [ <sup>3</sup> H] DHEAS.....	200
X.5. Anexo 5. Cinética de Fosforilación con estímulo de androstenediol.....	201
X.5.1. Fosforilación de Akt a tiempos crecientes de estímulo con androstenediol.....	201
X.5.2. Fosforilación de ERK1/2 a tiempos crecientes de estímulo con androstenediol.....	203
X.6. Anexo 6. Consentimientos Informados.....	207

## v. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Fig 1. Metabolización de esteroides desde el precursor adrenal dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS)	63
Fig 2. Diseño experimental. I. Ensayos <i>ex vivo</i> y II. Estudios <i>in vitro</i>	68-69
Fig 3. Ensayo de actividad enzimática de 3 $\beta$ -HSD en tejidos endometriales controles (CE) y de mujeres con PCOS (PCOSE)	87
Fig 4. Cuantificación de androstenediol en tejidos endometriales controles (CE) y de mujeres con PCOS (PCOSE)	88
Fig 5. I- RT-PCR de transportador OAT4. II- Western blot de OAT-4, en tejidos endometriales	91
Fig 6. Western blot de OAT-4 en células endometriales obtenidas de cultivo primario estimuladas con esteroides	92
Fig 7. Evaluación de los niveles proteicos del transportador I- OATP-B, II- OATP-D y III- OATP-E por la técnica de western blot en endometrios	96
Fig 8. Evaluación de los niveles proteicos del transportador I- OATP-B, II- OATP-D y III- OATP-E por western blot en células obtenidas de cultivo primario endometrial estimuladas con esteroides	97
Fig 9. Ensayo de captación de [ $^3$ H] DHEAS en células obtenidas de un cultivo primario estimuladas con esteroides	99
Fig 10. Inmunocitoquímica de marcador de ciclo celular Ki67 en células T-HESC estimuladas con esteroides	102
Fig 11. Inmunocitoquímica de marcador de ciclo celular Ki76 en	104

	células St-T1b estimuladas con esteroides	
Fig 12.	Gráfico de la densitometría y fotografía de western blot de p27 en T-HESC estimuladas con esteroides	107
Fig 13.	Microfotografías de inmunocitoquímica de la proteína p27 en células T-HESC estimuladas con esteroides	108
Fig 14.	Densitometría y fotografía de western blot de p27 en células St-T1b estimuladas con esteroides	109
Fig 15.	Gráfico de la densitometría y fotografía de western blot de ciclina D1 en T-HESC estimuladas con esteroides	111
Fig 16.	Microfotografías de inmunocitoquímica de la proteína ciclina D1 en células T-HESC estimuladas con esteroides	112
Fig 17.	Western blot de ciclina D1 en células St-T1b estimuladas con esteroides	113
Fig 18.	Western blot de p-Akt en células T-HESC estimuladas con esteroides	115
Fig 19.	Western blot de p-Akt en serina 473 en células St-T1b estimuladas con esteroides	117
Fig 20.	Western blot de p-Akt en serina 473 en células T-HESC estimuladas con esteroides por 20 min	118
Fig 21.	Western blot de p-Akt en serina 473 en células St-T1b estimuladas con esteroides por 20 min	119
Fig 22.	Western blot de p-ERK1/2 treonina 202 y tirosina 204 en células T-HESC estimuladas con esteroides	121
Fig 23.	Western blot de p-ERK1/2 treonina 202 y tirosina 204 en células St-T1b estimuladas con esteroides	123
Fig 24.	Western blot de p-ERK1/2 treonina 202 y tirosina 204 en células T-HESC estimuladas con esteroides por 20 min	125
Fig 25.	Western blot de p-ERK1/2 treonina 202 y tirosina 204 en	127

	células St-T1b estimuladas con esteroides por 20 min	
Fig 26.	Gráfico de la densitometría y fotografía de western blot de p27 y ciclina D1 en T-HESC estimuladas con esteroides e ICI 182,780	130
Fig 27.	Gráfico de la densitometría y fotografía de western blot de p27 y ciclina D1 en St-T1b estimuladas con esteroides e ICI 182,780	132
Fig 28.	Gráfico de la densitometría y fotografía de western blot de p27 y ciclina D1 en T-HESC estimuladas con esteroides y MPP dihidrocloruro	134
Fig 29.	Western blot de p27 y ciclina D1 en St-T1b estimuladas con esteroides y MPP dihidrocloruro	136
Fig 30.	Western blot de p-Akt en serina 473 en células T-HESC estimuladas con esteroides y $\alpha$ -amanitina	139
Fig.31.	Western blot de p-ERK1/2 treonina 202 y tirosina 204 en células T-HESC estimuladas con esteroides y $\alpha$ -amanitina	141
Fig 32.	Western blot de p-Akt en serina 473 en células St-T1b estimuladas con esteroides y $\alpha$ -amanitina	143
Fig 33.	Western blot de p-ERK1/2 treonina 202 y tirosina 204 en células St-T1b estimuladas con esteroides y $\alpha$ -amanitina	144
Fig 34.	Western blot de p27 y ciclina D1 en T-HESC estimuladas con esteroides y LY-294,002	147
Fig 35.	Western blot de p27 y ciclina D1 en St-T1b estimuladas con esteroides y LY-294,002	149
Fig 36.	Western blot de p27 y ciclina D1 en T-HESC estimuladas con esteroides U-0126	151
Fig 37.	Western blot de p27 y ciclina D1 en St-T1b estimuladas con esteroides U-0126	153

Fig 38.	Esquema resumen de los resultados obtenidos en I-modelo <i>ex vivo</i> II-modelo <i>in vitro</i> .	171
Fig 39.	Microfotografías de inmunocitoquímica de vimentina y citoqueratina 7 en células obtenidas desde un cultivo primario y células T-HESC	193
Fig 40.	Microfotografías de AR, de ER $\beta$ y progesterona, además de mucina 1 e integrina $\alpha V\beta 3$	194
Fig 41.	Microfotografía de células obtenidas desde cultivo primario basal y estimuladas con 10 nM de estradiol y 100 nM de progesterona	195
Fig 42.	Western blot de transportadores I- OAT4; II- OATP-B, III- OATP-D y IV- OATP-E en células obtenidas desde un cultivo primario, células T-HESC y St-T1b	196
Fig.43.	Inmunocitoquímica de ER $\alpha$ , ER $\beta$ y western blot del AR y $\beta$ -actina en células T-HESC y St-T1b	197
Fig 44.	Gráfico y fotografía representativa de western blot de p27 describiendo una curva dosis-respuesta en células T-HESC bajo estímulo con androstenediol	198
Fig 45.	Gráfico y fotografía representativa de western blot de p27, curva dosis-respuesta de estímulos con estradiol a 10-100-1000 nM en células T-HESC por 48 h	199
Fig 46.	Curva tiempo-respuesta para el ensayo de captación de [ $^3$ H] DHEAS realizado en células obtenidas de cultivo primario de endometrio humano.	200
Fig 47.	Curva dosis-respuesta del ensayo de captación de [ $^3$ H] DHEAS en células obtenidas de un cultivo primario	200
Fig 48.	Western blot de cinética de fosforilación de Akt en serina 473 en células T-HESC estimuladas con 100 nM de	201

	androstenediol a 5-10-15-20-25 min	
Fig 49.	Western blot de cinética de fosforilación de Akt en serina 473 en células St-T1b estimuladas con 100 nM de androstenediol a 5-10-15-20-25 min	202
Fig 50.	Western blot de cinética de fosforilación de ERK1/2 en células T-HESC estimuladas con 100 nM de androstenediol a 5-10-15-20-25 min	204
Fig 51.	Western blot de cinética de fosforilación de ERK1/2 en células St-T1b estimuladas con 100 nM de androstenediol a 5-10-15-20-25 min	205
Tabla 1.	Niveles séricos de hormonas evaluadas en pacientes en estudio	73
Tabla 2.	Resultados de citometría de flujo en células T-HESC estimuladas con esteroides	105
Tabla 3.	Cinética de Fosforilación de Akt en T-HESC y St-T1B	202
Tabla 4.	Cinética de Fosforilación de ERK1/2 en T-HESC Y St-T1B	206