

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS
TISULAR EN ENDOMETRIOS DE MUJERES CON
SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA
PRESENTADA POR:

KETTY BACALLAO FERNÁNDEZ

Directores de Tesis

Prof. Dra. Maria Margarita Vega Blanco

Prof. Dr. Hernán Lara Peñaloza

2007

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

KETTY BACALLAO FERNÁNDEZ

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de defensa de tesis rendido el _____ de _____ del 2007.

Directores de Tesis:

Dra. Margarita Vega Blanco

Dr. Hernán Lara Peñaloza

Comisión Informante de Tesis:

Dra. Jenny Fiedler (Presidente)

Dr. Enrique Castellón

Dr. David Vantman

Dr. Javier Puente

Dra. Maruja Serón

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. ENDOMETRIO HUMANO	1
I.2. SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO, HIPERPLASIA Y CÁNCER ENDOMETRIAL	3
I.3. ESTEROIDES ENDOMETRIALES	5
I.3.1. Biodisponibilidad intracelular	5
I.3.2. Enzimas del metabolismo esteroidal	6
I.3.3. Globulina ligante de hormonas sexuales (SHBG).....	10
I.4. RECEPTORES ESTEROIDALES Y CO-REGULADORES	10
I.5. HOMEOSTASIS TISULAR (PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS)	13
I.5.1. Proliferación (ciclo celular, ciclina D1, ciclina E, p27).....	13
I.5.2. <u>Apoptosis</u>	20
I.6. VÍA DE SEÑALIZACIÓN TGF- β	21
I.7. VÍA DE SEÑALIZACIÓN Wnt/ β -CATENINA	24
II. HIPÓTESIS	28
III. OBJETIVOS GENERALES	29
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
V.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	32
V.1.1. Controles (ENp).....	32
V.1.2. Pacientes con SOP (ESOP).....	32
V.1.3. Pacientes SOP con hiperplasia endometrial (ESOPH)	33
V.1.4. Pacientes no SOP con hiperplasia endometrial (HE)	33
V.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	34
V.3. ESTUDIOS <i>EX-VIVO</i>	34
V.4. ESTUDIOS <i>IN-VITRO</i>	34
V.4.1. Cultivos de explantes de tejidos	35

V.4.2. Cultivo de células endometriales, epiteliales y estromales.....	35
V.5. ANÁLISIS MORFOLÓGICO.....	36
V.6. EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS ESTEROIDES INTRACELULARES Y EN LOS MEDIOS DE CULTIVO:.....	36
V.7. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA	36
V.7.1. Reacción de polimerización en cadena de DNA complementario (RT-PCR).....	36
V.8. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	41
V.8.1. Sulfatasa.....	41
V.8.2. Sulfotransferasa (EST).....	41
V.8.3. 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD) tipo 2	42
V.9. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN PROTEICA	42
V.9.1. SDS-PAGE y análisis de western blot (WB).....	42
V.9.2. Estudios de IHQ.....	46
V.10. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN	48
V.10.1. Expresión de la proteína Ki67	48
V.10.2. Expresión de histona H3 fosforilada en Ser 10 (pH3).....	49
V.11. ESTUDIOS DE APOPTOSIS	49
V.11.1. Método fluorescente de detección de fragmentación del DNA (TUNEL)	49
V.12. ANALISIS ESTADÍSTICO	49
VI. RESULTADOS	51
VI.1. OBJETIVO ESPECÍFICO 1:	51
VI.1.1. Características clínicas y metabólicas de las pacientes en estudio.....	51
VI.1.2. Presencia de mRNA, proteína y/o actividad ex-vivo de enzimas del metabolismo esteroidal en endometrio humano.....	53
VI.2. OBJETIVO ESPECÍFICO 2:	63
VI.2.1. Niveles de mRNA y proteína para SHBG.....	63
VI.3.1. Concentración de esteroides en tejido endometrial.....	66
VI.4. OBJETIVO ESPECÍFICO 4:	67
VI.4.1. Expresión de mRNA y proteína de co-reguladores esteroidales	67
VI.4.2. Fosforilación en Ser 118 del REα.....	71
VI.5. OBJETIVO ESPECÍFICO 5:	72
VI.5.1. Presencia del regulador de ciclo celular ciclina D1	72

VI.5.2. Niveles de ciclina E.....	75
VI.5.3. Inhibidor del ciclo celular p27.....	77
VI.6. OBJETIVO ESPECÍFICO 6:	79
VI.6.1. Smad 2,3 y sus formas fosforiladas.....	79
VI.6.2. Inmunotinción para Smad4	80
VI.7. OBJETIVO ESPECÍFICO 7:	85
VI.7.1. Proteína β -catenina.....	85
VI.8. OBJETIVO ESPECÍFICO 8:	89
VI.8.1. Proliferación celular	89
VI.8.2 Estudios de apoptosis	92
VI.9. OBJETIVO ESPECÍFICO 9:	94
VI.9.1. Producción de E ₂ in-vitro	94
VI.9.2. Producción de DHT in-vitro.....	94
VI.10.1. Semicuantificación de los niveles proteicos de pSmad2 y Smad4 en explantes endometriales cultivados con estímulos hormonales.....	97
VII. DISCUSIÓN.	104
VIII. CONCLUSIONES.....	118
IX. PROYECCIONES.....	120

A mis padres y hermana...
A mi pequeño hijo y a mi esposo..
A ustedes...

ii. AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a mis padres y a mi hermana. A mi madre Luz Marina por darme la inquietud y el amor por el conocimiento y a mi padre Reinaldo por heredarme la energía necesaria para andar siempre un paso más allá. A ambos por ser el primer y más importante ejemplo de mi vida y darme siempre todo su amor y apoyo. A mi hermana Mirela, por su apoyo y preocupación, por sus consejos y todo el cariño que nos une.

La realización de este trabajo no hubiera sido posible sin la compañía, amor y comprensión de mi esposo. A ti Rafael, por ayudarme en cada paso que he dado y, lo más importante, por amarme.

A mi hijito Héctor por alegrar cada día de mi vida.

A mi suegra Gladys cuya ayuda fue muy importante en las etapas finales de realización de esta tesis.

Quiero agradecer al gobierno de Chile que me permitió integrarme a la sociedad chilena y a CONICYT por financiar este trabajo.

A todos los profesores del programa de doctorado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas por los conocimientos que me entregaron.

Quiero agradecer especialmente a mis tutores. A la Dra. Margarita Vega por permitirme realizar la tesis en su laboratorio, por ser una excelente tutora, por las enseñanzas científicas, tanto en el aspecto teórico como metodológico. Además, por el cariño, y los consejos y por su apoyo en el plano personal. Al Dr. Hernán Lara que ha enriquecido con sus conocimientos y experiencia este trabajo doctoral. A ambos por estar presentes siempre en el momento en que los he necesitado.

A la comisión evaluadora, por contribuir a mi formación científica y por todas las críticas que enriquecieron esta tesis.

Quiero dar las gracias a todos los integrantes del IDIMI. En el Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI), Hospital San Borja Arriarán, se realizó la mayor parte de este trabajo, en esta institución siempre me sentí rodeada de amor y cariño. En el plano científico y laboral recibí todo el apoyo que necesité y en el plano personal conocí personas de gran calidad humana.

Quiero agradecer especialmente a mi gran amiga Patricia López, además, a Cecilia Johnson, Angélica Boric, Andrea Castro, Olguita, Paulina y Cecilia Lardone, por hacer de mi paso por el IDIMI una experiencia que siempre recordaré con una sonrisa.

En nuestro pequeño laboratorio del IDIMI, grande en cualquier otro aspecto que no fuese su espacio físico, nació y creció este trabajo. Con la ayuda incalculable de Mabel Anido y la Dra. Rosita Smith. A ambas, muchas gracias por su apoyo y por todo el cariño que me entregaron.

A mis amigas Alejandra Villavicencio y Marisa Clementi por contribuir en mi formación y apoyarme en mis primeros pasos en el laboratorio. A mi amiga Carla Avellaira. A las tres por su cariño y amistad.

Durante este trabajo tuve la oportunidad de compartir y colaborar con otros estudiantes que fueron importantes en el desarrollo de esta tesis y con los cuales terminamos siendo excelentes amigos. A Macarena Lépez y Luis León por su ayuda y por ser excelentes compañeros y amigos. A la Alejandra, la Marcela, Carlos y Rodrigo que alegran el quehacer diario del laboratorio

A mis amigos Betty, Vladimir, Acela, Boris y Mayte por toda la ayuda que me han brindado en estos años y por su preocupación.

Quisiera agradecer a la Dra. Carmen Romero, Verónica Tapia, Jaime Espinoza y a todo el personal del Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción del Hospital Clínico Universidad de Chile. En este laboratorio se realizó la última parte de este trabajo de tesis. Muchas gracias por hacer de este laboratorio también el nuestro.

Agradezco al Dr. Luis Valladares y a los integrantes del Laboratorio de Hormonas y Receptores que tan gentilmente nos colaboraron en la realización de los ensayos de actividad enzimática. Además, al Dr. Fernando Gabler por su valiosa colaboración en la clasificación de las muestras, a los Clínicos, entre los cuales deseo destacar el apoyo de la Dra. Teresa Sir en la obtención de las biopsias endometriales.

Finalmente, a todas las mujeres que aceptaron donar una parte del tejido obtenido por biopsia endometrial para la realización de esta tesis doctoral.

A todos los que compartieron conmigo estos últimos cuatro años.

Muchas Gracias...

iii. FINANCIAMIENTO

Esta tesis de doctorado se realizó en:

Laboratorio Biología Celular del Endometrio

Instituto de Investigaciones Materno Infantil, Facultad de Medicina (Campus Centro), Universidad de Chile, Hospital Clínico San Borja Arriarán

Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción

Hospital Clínico Universidad de Chile

Fue financiada por los siguientes proyectos:

Proyecto FONDECYT 1050098

Investigador Responsable: Dra. Margarita Vega

Beca de apoyo a la realización de tesis doctoral AT:24050052

Beca CONICYT para estudios de doctorado

Beca CONICYT de Término de Tesis

iv: PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS ORIGINADAS DE ESTA TESIS

PUBLICACIONES

Bacallao K, Lépez M, and Vega M. Deregulation of molecules related to cell proliferation in endometria from patients with polycystic ovarian syndrome with and without endometrial hyperplasia (en redacción).

Bacallao K, Leon L, Lara H, Gabler F, Romero C, Valladares L and Vega M. Expression and activities of steroid metabolic enzymes of proliferative endometria from untreated women with Polycystic Ovary Syndrome (en etapa final de elaboración).

Leon L, Bacallao K, Gabler F, Romero C, Valladares L and Vega M. Expression and activities of steroid metabolic enzymes in secretory endometria from untreated women with Polycystic Ovary Syndrome. *Journal of Endocrinology* (enviado).

Villavicencio A, Bacallao K, Gabler F, Fuentes A, Albornoz J, Casals A, Vega M. Deregulation of tissue homeostasis in endometria from patients with polycystic ovarian syndrome with and without endometrial hyperplasia. *Gynecologic oncology* 2007, 104(2): 290-5.

Maliqueo M, Bacallao K, Quezada S, Clementi M, Gabler F, Johnson Mc, Vega M. Sex hormone binding globulin expression on the endometria of women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility* 2007, 87(2): 321-8.

Avellaira C, Villavicencio A, Bacallao K, Romero C, Gabler F, Wells P, Vega M. Expression of molecules associated with tissue homeostasis in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome.. *Human reproduction* 2006, 21(12): 3116-21.

Villavicencio A, Bacallao K, Avellaira C, Gabler F, Fuentes A, Vega M. Androgen and estrogen receptors and co-regulators levels in endometria from patients with polycystic ovarian syndrome with and without endometrial hyperplasia. *Gynecologic oncology* 2006, 103(1): 307-14.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

Internacionales:

Bacallao K, Fornés R, León L, Villavicencio A, Avellaira C, Anido M, Romero C, Vega M. Alteraciones moleculares asociadas a insulina-resistencia en endometrios de pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico. XX Reunión Bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana, país: Argentina. 2007.

Fornés R, León L, Lepez M, Bacallao K, Gabler F, Cortínez A, Vega M. Expresión de moléculas de la vía de señalización inducida por insulina en endometrios de mujeres con síndrome de ovario poliquístico. XX Reunión Bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana, país: Argentina. 2007.

Bacallao K, Anido M, Lepez M, Navarrete K, Leon L, Romero C, Soto E, Gabler F, Vega M. Deregulation of cell proliferation molecules in human endometria. 12th Internacional Congreso on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, país: Grecia. 2006.

Bacallao K, Avellaira C, Villavicencio A, Anido M, Fuentes A, Soto E, Gabler F, Vega M. Determinación de la supervivencia celular en endometrios de pacientes con síndrome de ovario poliquístico sin y con hiperplasia endometrial. XIX Reunión Bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana, país: Colombia, 2005.

Nacionales:

Bacallao K, León L, Navarrete K, Sir-Petermann T, Valladares L, Lara H, Lépez M, Anido M, Vega M. Alteraciones moleculares en endometrios de pacientes con síndrome de ovario poliquístico. XVII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo, país: Chile, 2006.

León L, Bacallao K, Anido M, Lépez M, Soto E, Muñoz Y, Vega M. Expresión y actividad de enzimas del metabolismo esteroidal en endometrios de fase secretora de mujeres con síndrome de

ovario poliquístico (SOP). XVII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo, país: Chile, 2006.

Lépez M, Anido M, Bacallao K, Gabler F, Soto E, Romero C, Sánchez F, Vega M. Inmunodetección de ciclina D1 y β -catenina en endometrios de mujeres con síndrome de ovario poliquístico. XVII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo, país: Chile, 2006.

Bacallao K, Gabler F, Villavicencio A, Sir-Petermann T, García V, Anido M, Vega M. Cambios en la expresión y actividad de reguladores del ciclo celular en endometrios de pacientes con síndrome de ovario poliquístico. XVI Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo, país: Chile, 2005.

Avellaira C, Bacallao K, Villavicencio A, Gabler F, Fuentes A, Anido M, Vega M. Receptor de andrógenos y su regulación en endometrios de mujeres con síndrome de ovario poliquístico. XVI Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo, país: Chile, 2005.

Villavicencio A, Goyeneche A, Telleria C, Bacallao K, Gabler F, Wells P, Albornoz J, Vega M. Proteínas involucradas en el aumento de la supervivencia celular en endometrios de pacientes con síndrome de ovario poliquístico. XVI Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo, país: Chile, 2005.

v. RESUMEN

Los esteroides ováricos, principalmente 17β -estradiol (E_2) y progesterona (P_4), ejercen acciones regulatorias sobre el endometrio asociadas a cambios morfológicos, con una ciclicidad mensual. Esto permite clasificar al endometrio en endometrio de fase proliferativa o secretora, cada una de estas fases con características propias. En los últimos años se le ha dado especial importancia al hecho de que las concentraciones tisulares de los esteroides en los tejidos sensibles a ellos, no se relacionan directamente con las concentraciones hormonales en la sangre. Se ha planteado que los tejidos sensibles a esteroides podrían regular *in-situ* las concentraciones de éstos. De este modo, en patologías como el síndrome de ovario poliquístico (SOP), que se caracteriza por alteraciones endocrino-metabólicas importantes, podemos esperar que los endometrios de estas pacientes posean un metabolismo esteroideal diferente al de los endometrios controles.

El SOP es un desorden frecuente que afecta del 5 al 10 % de las mujeres en edad reproductiva. Se ha establecido que se debe considerar paciente SOP a una mujer si cumple con al menos dos de los siguientes criterios: i) Oligo o anovulación; ii) Signos clínicos o bioquímicos de hiperandrogenismo; iii) Ovarios poliquísticos a la ultrasonografía. Además, se deben excluir otras patologías como hiperplasia adrenal congénita, tumores secretores de andrógenos y síndrome de Cushing's.

Existen evidencias de que el SOP constituye un factor de riesgo para hiperplasia endometrial (HE) y carcinoma endometrial (CE). El riesgo de HE para pacientes SOP se relacionaría de manera importante a la acción mitogénica de E_2 no compensada por P_4 en los ciclos anovulatorios. Además, la asociación entre SOP y CE ha sido sugerida por más de 50 años. En efecto, el Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología (2002) destacó que la anovulación crónica, la obesidad, la hiperinsulinemia y una disminución en la concentración de SHBG (globulina ligante de hormonas sexuales plasmática), características que se observan en pacientes SOP, constituyen factores de riesgo para CE.

En consecuencia, los objetivos de esta tesis fueron establecer si en endometrios SOP se modifica el metabolismo de hormonas esteroidales y la expresión y actividad de proteínas reguladoras de la homeostasis tisular. Así mismo, evaluar *in-vitro* si las condiciones hiperestrogénica (E_2), hiperandrogénica (testosterona-T- o androstenediona-A₄-) y/o hiperinsulínica, contribuyen a

modificar el metabolismo esteroidal, así como, la expresión y activación de moléculas que participan significativamente en vías de señalización relacionadas con proliferación y apoptosis.

Materiales y Métodos: Para llevar a cabo el estudio se utilizaron 23 endometrios de mujeres con fertilidad probada en fase proliferativa del ciclo menstrual (ENp), 28 endometrios de pacientes SOP sin y con hiperplasia endometrial (ESOP, n=18; y ESOPH, n=10, respectivamente), y de mujeres con hiperplasia endometrial (HE, n=10). En el estudio *ex-vivo*, fueron evaluadas las actividades de las enzimas del metabolismo esteroidal Sulfatasa, Sulfotransferasa (EST) y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 1(7 β -HSD) tipo 2; los niveles de mRNA y/o proteína por técnicas de RT-PCR, inmunohistoquímica (IHQ) y/o western blot (WB) de las enzimas del metabolismo esteroidal ya mencionadas, además de las de P450-aromatasa y 5 α -reductasa. Adicionalmente, se determinó el nivel génico y proteico de la proteína SHBG que podría regular la actividad de los esteroides *in-situ*; y las concentraciones de esteroides intracelulares por radioinmunoensayo (RIA) (E₂, P₄, A₄, T); la forma fosforilada del receptor de estrógenos en Ser 118 (pRE α -Ser118); los co-reguladores de receptores esteroidales ARA70 y NCoR y β -catenina; las proteínas Smad2, Smad3, Smad4 y sus formas fosforiladas; ciclina D1, E y el inhibidor de ciclina p27. Se determinó, además, el grado de proliferación por IHQ para Ki67 e histona H3 fosforilada en Ser 10 (pH3) y apoptosis por TUNEL e IHQ de Caspasa-3. En los estudios *in-vitro* se investigó la acción de insulina, E₂ y A₄ adicionados al medio de cultivo de endometrios controles sobre los niveles de las formas fosforiladas de las proteínas Smad2 y 3 (pSmad2 y pSmad3). Además, se determinó el efecto de la T adicionada al medio de cultivo de explantes endometriales normales de fase proliferativa y secretora, sobre la producción de E₂ y de dihidrotestosterona (DHT). Se realizó el mismo estudio para células estromales y epiteliales cultivadas aisladamente.

Los resultados obtenidos *in-vitro* para la P450-aromatasa muestran que existe un aumento de E₂ al adicionar andrógenos al sistema de cultivo de células endometriales. No obstante, no se encontró mRNA ni proteína para P450-aromatasa en los grupos de endometrios analizados *ex-vivo*. Lo anteriormente expuesto nos permite plantear que la aromatización de andrógenos a estrógenos no sería un mecanismo importante para la producción *in-situ* de estrógenos en los endometrios controles y de pacientes SOP analizados en este estudio.

Se observó la presencia de mRNA y de la actividad de sulfatasa y en menor grado, la de EST en los endometrios humanos de todos los grupos analizados. Los niveles de mRNA para las enzimas

sulfatasa y EST en ESOP, respecto a ENp, fueron resultados concordantes con la menor relación entre las actividades Sulfatasa y EST obtenida en los endometrios ESOP y ESOPH respecto al control. Lo anteriormente expuesto podría relacionarse con una menor tendencia a la formación de las formas libres de estos esteroides respecto a las formas sulfatadas; esto contrasta con la menor actividad 17 β -HSD tipo 2 encontrada en los ESOP. Lo anterior indicaría que los ESOP tendrían una menor tendencia a la formación de estrona (E₁) utilizando E₂ como sustrato.

Por otra parte, la enzima 5 α -reductasa tipo 1 fue detectada en ENp, lo que en conjunto con los resultados obtenidos *in-vitro*, sugieren que el endometrio humano posee una alta capacidad de transformación de T en DHT. Adicionalmente, el aumento progresivo encontrado en los niveles de esta enzima en epitelio glandular desde ENp hasta ESOPH, nos inducen fuertemente a plantear que la formación de DHT a partir de T en el epitelio endometrial podría desempeñar un papel importante en el desarrollo de hiperplasia endometrial que se da en algunas pacientes con SOP. Por otro lado, la disminución en los niveles de la enzima 5 α -reductasa en el estroma de ESOP, ESOPH y HE respecto a ENp, sugiere que la DHT podría tener acciones diferentes en las células estromales respecto a las epiteliales. Es importante destacar que el presente trabajo constituye el primero en describir alteraciones en las enzimas del metabolismo esteroide en endometrios de mujeres con SOP.

Otro factor importante en la biodisponibilidad de esteroides es la SHBG. En este trabajo encontramos que los productos génicos mRNA 341pb (mRNA_T) y principalmente mRNA 548pb (mRNA_L), se transcriben en endometrio humano. La menor razón entre los mRNA 548pb/341pb encontrada para los endometrios de pacientes con HE, pudiese significar que la regulación del empalme (splicing) de mRNA para SHBG constituye una transformación importante en el desarrollo de HE no SOP. Por otra parte, encontramos por primera vez la presencia de la proteína SHBG en endometrio humano. Esta proteína resultó estar presente en todos los endometrios estudiados, por lo tanto, SHBG podría jugar un papel importante en la regulación de la biodisponibilidad esteroide *in-situ* en estos endometrios, lo cual sería diferente en los ESOP dada la disminución en su expresión.

La alta expresión citoplasmática del co-activador de receptores esteroidales ARA70 en todos los grupos estudiados, unido a los niveles menores del co-represor NCoR en los núcleos de los ESOP, indicaría en conjunto con los resultados expuestos anteriormente, mayor sensibilidad a la acción esteroide en estos endometrios.

Por otro lado, se sabe que las modificaciones post-traduccionales de los receptores esteroidales modifican su actividad. Los resultados de esta investigación muestran que la fracción de RE α fosforilada en Ser 118 respecto a RE α total (pRE α Ser118), fue mayor en ESOP, ESOPH y HE respecto a ENp. Lo anterior nos permite sugerir que el aumento en pRE α Ser118 en los endometrios patológicos estudiados, pudiese asociarse a una regulación positiva de la actividad transcripcional del receptor, adicional a los factores anteriormente planteados. Como consecuencia, podría desregular la transcripción de genes involucrados en el control del ciclo celular, y estas alteraciones podrían conducir al desarrollo de hiperplasia endometrial en mujeres SOP.

Por lo tanto, es altamente probable que exista una desregulación del ciclo celular de las células endometriales en estas pacientes. Se sabe que, la ciclina D1, ciclina E y p27 son importantes reguladores del ciclo celular. Los resultados de la evaluación de ciclina D1 mostraron una localización subcelular de preferencia citoplasmática en todos los endometrios analizados; además, los ESOP exhibieron niveles más altos de la proteína, tanto en el compartimiento nuclear como en los citoplasmas celulares, respecto de los endometrios controles. Los mayores niveles de ciclina D1 observados en los núcleos celulares de ESOP respecto a ENp contribuirían a la mayor proliferación celular de estos endometrios. Los niveles superiores observados para esta proteína en los citoplasmas celulares de los ESOP podrían, también, ser importantes en la progresión de la enfermedad hacia hiperplasia y cáncer endometrial.

Otro de los reguladores positivos del ciclo celular analizados en este estudio fue la ciclina E. Esta fue detectada principalmente en las células epiteliales de los grupos de endometrios en estudio, y su expresión fue similar entre los grupos con excepción de los endometrios con HE, para los cuales la acción mayor de ciclina E podría jugar un papel fundamental en la génesis de esta patología. Por lo tanto, podemos sugerir que en los ESOP y ESOPH, aún no existe una desregulación en la expresión de esta proteína. No obstante, la importante reducción de la expresión nuclear de p27, regulador negativo del ciclo celular, en las células estromales de pacientes SOP con y sin hiperplasia, indicarían una menor restricción a la proliferación celular en estos endometrios.

De esta manera, el estudio de la proteína Ki67 reveló un aumento del número de células en ciclo celular en endometrios de pacientes SOP, en ausencia de apoptosis. Esta última fue evidenciada a través de la no detección de caspasa-3-activa ni de la fragmentación del DNA por TUNEL.

Además, medimos el marcador de proliferación celular pH3, cuya inmunotinción fue similar en ESOP respecto a los endometrios controles. Es importante recordar que los ENp presentan una alta capacidad proliferativa. De este modo, los datos de esta investigación sugieren que las pacientes SOP presentan una desregulación de su homeostasis endometrial, con un mayor número de células en ciclo celular de lo cual se infiere que tendrían la potencialidad de atravesar el punto de control del ciclo celular G2/M.

Además, en los ESOP, es de destacar que dado: i) el microambiente hormonal anormal en que funcionan las células endometriales de estas pacientes, ii) la mayor proliferación que presentan estas células, iii) la vida media más prolongada de las células endometriales, por la ausencia de la acción descamatoria cíclica de P₄ (pacientes con oligomenorrea y amenorrea), y iv) la ausencia de apoptosis, sugerimos una alta probabilidad de que las células de estos endometrios acumulen mutaciones que pueden resultar finalmente en hiperplasia y carcinoma endometrial.

Con el propósito de conocer mejor los mecanismos reguladores de la homeostasis en el tejido endometrial, evaluamos la participación de la vía de las Smads en dichos procesos, tanto en tejidos normales como patológicos. Los resultados indican que estas proteínas y sus formas activas se encuentran disminuidas en los ESOP y ESOPH, lo cual sugiere que en los ESOP existe disminución de la actividad supresora del paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular a través de esta vía, induciendo la progresión del ciclo celular.

Al analizar los niveles de la proteína Smad4 *in-vitro* se encontró que E₂ y fundamentalmente A₄ disminuyen la presencia de Smad4 en los núcleos celulares de las células cultivadas. Estos resultados indican que estas proteínas son reguladas por las concentraciones de esteroides.

Otra de las proteínas investigadas en este contexto en los endometrios fue β-catenina. Los niveles superiores de la forma activa de esta proteína encontrados en los ESOP, ESOPH e HE respecto a ENp, constituyen un paso importante en el conocimiento de cuáles son los cambios primarios que pueden ocurrir en un tejido que podrían conducir finalmente a su malignización.

Conclusiones: Concordantemente con nuestra proposición, los resultados obtenidos en esta tesis nos permiten plantear que los endometrios obtenidos de pacientes con SOP poseen una biodisponibilidad esteroideal propia que pudiese alterar la expresión y actividad de reguladores de la homeostasis tisular. Esto tendría como consecuencia un mayor potencial proliferativo de estos endometrios, con el riesgo mayor asociado de hiperplasia y carcinoma endometrial. Además,

proponemos que los ESOP pueden constituir un modelo para el estudio y la mejor comprensión de cuáles son los primeros pasos en la desregulación de la homeostasis celular endometrial. Además, y según los resultados de este trabajo, proponemos que a pesar de la similitud morfológica de ESOPH y HE y del ambiente hormonal similar en que se desarrollan ESOP y ESOPH, estos tres tipos de endometrios son molecularmente diferentes, lo cuál podría ser importante en el manejo terapéutico de estas pacientes.

vi. ABSTRACT

The ovarian steroids, mainly 17β -estradiol (E2) and progesterone (P4), exert regulatory actions on the endometrium, inducing morphologic changes, characterized by monthly cyclicality. This allows to classify the tissue in proliferative or secretory phase endometria, each one of these phases with unique characteristics. In the last years, special importance has been given to the fact that the intracellular concentration of steroids in target tissues are not necessarily a reflection of their hormonal concentration in blood. In fact, It has been reported that target tissues to steroids could regulate *in-situ* their own concentrations. So, in pathologies like the polycystic ovarian syndrome (PCOS) which is characterized by important endocrino-metabolic alterations, we propose that the endometria from these patients have a different steroid metabolism from those control endometria.

The PCOS is a frequent disorder that affects 5 to 10 % of women in reproductive age. To consider a patient to have PCOS , she must fulfill at least two of the following criteria: i) Oligo or anovulación; ii) clinical or biochemical signs of hiperandrogenism; iii) polycystic ovaries to the ultrasonography. Other etiologies, like congenital adrenal hyperplasia, secretory androgen tumors and Cushing's syndrome are considered as exclusion criteria. There are evidences that PCOS constitutes an endometrial risk factor for hyperplasia (EH) and endometrial carcinoma (EC). The risk of EH for PCOS patients could be importantly related to the mitogenic action of E2 unopposed by P₄ in the anovulatory cycles. In addition, the association between PCOS and EC has been suggested by more than 50 years. In fact, the American School of Obstetrics and Gynecology (2002) emphasized that chronic anovulación, obesity, hiperinsulinemia and a diminution in the plasma concentration of sex hormone binding globulin (SHBG), all characteristics observed in PCOS patients, constitute risk factors for the development of EC.

Consequently, the objectives of the present investigation were to establish if in PCOS endometria the steroid metabolisms, as well as, the expression and activity of regulatory proteins of tissue homeostasis differ from that in control tissues. In addition, to evaluate if the *in-vitro* conditions hiperestrogenic (E2), hiperandrogenic (testosterone-T or androstenedione-A₄-) and/or hiperinsulinic, contribute to modify steroid metabolism, as well as, the expression and activation of some molecules related to proliferation and apoptosis.

Materials and Methods: In order to carry out the study, 23 proliferative endometria from women with proven fertility were used (NE), 28 endometria from PCOS patients without and with endometrial hyperplasia (PCOSE, n=18; and HPCOSE, n=10, respectively), and from women with endometrial hiperplasia (EH, n=10). In the *ex-vivo* study, the activities of enzymes of the steroid metabolism Sulfatase, Sulfotransferase (EST) and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD) type 2 were evaluated, the levels of mRNA and/or protein by RT-PCR techniques, immunohistochemistry (IHC) and/or western blot (WB) of enzymes of the steroid metabolism already mentioned, in addition to P450-aromatase and 5 α -reductase. Moreover, gene and protein levels of SHBG were determined. The intracellular steroid concentrations were also measured by radioimmunoassay (RIA) (E2, P4, A4, T); in addition to the determination of the phosphorylated form of estrogen receptor in Ser118 (pER α -Ser118); the co-regulators of steroid receptor ARA70, NCoR and β -catenina; Smad2, Smad3, Smad4 and its phosphorylated forms; cyclin D1, cyclin E and the cyclin inhibitor p27. Also, It was determined the degree of proliferation by IHC for Ki67 and histone H3 phosphorylated in Ser 10 (pH3) and apoptosis by TUNEL and IHC of Caspase-3. In the *in-vitro* studies it was investigated the action of insulin, E2 and A₄ added to culture medium of endometria controls on the levels of the phosphorylated forms of the proteins Smad2 and 3 (pSmad2 and pSmad3). In addition, the effect of the T added to culture medium of normal endometrial explants of proliferative and secretory phase on the production of E2 and dihidrotestosterona (DHT) was determined.

Results: The results obtained *in-vitro* for aromatase in the present work show an increase of E₂ when adding androgens to the culture system of endometrial cells. However, mRNA or protein levels for P450-aromatase were not detected in all groups of endometria analyzed. Thus, the transformation of androgen to estrogens would not be an important mechanism for the *in-situ* production of estrogens in endometria from control and PCOS patients.

The evaluation of the mRNA levels and the activity for enzymes sulfatase and EST showed a lower activity of sulfatase and in smaller degree, the one of EST in the human endometria of all the analyzed groups. The mRNA levels for sulfatase and EST in PCOSE, respect to NE, were in accord with the smaller relationship obtained between sulfatase and EST activities in PCOS endometria and HPCOSE. On the other hand, a smaller activity for 17 β -HSD type 2 was found in PCOSE. Overall, these results suggest that PCOSE would have a smaller desulfonation of strogens and a smaller tendency to the formation of estrone (E1) using E2 substrate.

In addition, the enzyme 5α -reductase type 1 was detected in NE, which altogether with the results obtained *in-vitro*, suggests that the human endometrium has a high capacity to convert T in DHT. Moreover, we found a progressive increase in the levels of this enzyme in epithelium from NE to PCOSE, which strongly indicate that the formation of DHT from T in endometrial epithelium could play an important role in the endometrial development of hyperplasia as observed in some patients with PCOS. On the other hand, the diminution in the levels of 5α -reductase in stroma of PCOSE, HPCOSE, and EH with respect to NE, suggests that DHT could have different actions in the stromal with respect to the epithelial cells. It is important to emphasize that the present work constitutes the first in describing alterations in the enzymes involved in steroid metabolism in endometria from women with PCOS.

Another important factor in the bioavailability of steroids is the SHBG. In this work we found that the gene products mRNA 341pb (mRNAT) and mainly mRNA 548pb (mRNAL), are transcribed in human endometrium. The smaller rate between mRNA 548pb/341pb found for the endometria from patients with EH could mean that the regulation of the splicing of mRNA for SHBG constitutes an important transformation in the development of hyperplasia in endometria from women not bearing PCOS. On the other hand, we reported for the first time the presence of SHBG protein in human endometrium. This protein turned out to be present in all endometria studied, therefore, SHBG could play an important role in the regulation of steroid *in-situ* bioavailability in these endometria, which would be different in PCOSE given the diminution in its expression.

The high cytoplasmic expression of the co-activator of steroidal receptors ARA70 in all the groups studied, together with the smaller levels of the co-repressor NCoR in the nuclei of the ESOP, and the results previously exposed, would indicate a greater sensitivity to the steroid action in these endometria.

On the other hand, it is known that the post-traductional modifications of the steroid receptors modify their activity. The results of this investigation show that the fraction of ER α phosphorylated in Ser 118 with respect to total ER α (pER α Ser118), was greater in PCOSE, HPCOSE and EH with respect to NE. Therefore, the increase in pER α Ser118 in the pathological endometria, could be associated to a positive regulation of the transcriptional activity of the receptor, in addition to the factors previously discussed. Consequently, it could deregulate the

transcription of estrogen-dependent genes involved in the control of the cellular cycle, and these alterations could lead to the endometrial development of hyperplasia in women with PCOS.

Therefore, it is highly probable a deregulation of the cell cycle of endometrial cells in these patients. As known, cyclin D1, cyclin E and p27 are important regulators of the cell cycle. The immunolocalization of cyclin D1 was preferentially cytoplasmatic in all endometria analyzed; in addition, ESOP exhibited higher levels of the protein, in the nuclear as in the cytoplasmic compartment, respect to the control endometria. The greater levels of cyclin D1 observed in the cell nucleus of PCOSE with respect to NE, would contribute to the greater cellular proliferation of these endometria. The observed higher levels for this protein in cellular cytoplasm of the PCOSE could, also, be important in the progression of the disease towards hyperplasia and endometrial cancer.

The other positive regulator of the cell cycle analyzed in this study was cyclin E, which was detected mainly in the epithelial cells of the groups of endometria in study. Its expression was similar between the groups with exception to the endometria with hyperplasia, for which the greater action of cyclin could play a fundamental role in the genesis of this pathology. Therefore, we can suggest that in PCOSE and HPCOSE, a deregulation in the expression of this protein has not yet been produced. However, the important reduction in the nuclear expression of p27, negative regulator of the cell cycle, in stroma of endometria from PCOS patients with and without hyperplasia, would indicate a smaller restriction to cellular proliferation in these endometria.

In fact, the higher levels of Ki67 protein revealed an increase in the number of cells in cell cycle in PCOSE concomitantly with the absence of apoptosis. The absent of cell death was demonstrated through the non-detection of neither active caspasa-3 nor DNA fragmentation assessed by TUNEL. In addition, we measured the marker of cell proliferation pH3, whose immunostain was similar in PCOSE with respect to the control endometria. It is important to remember that the NE presents a high proliferative capacity. Therefore, the data of this investigation suggest that PCOS patients display a deregulation of their endometrial homeostasis, with a greater number of cells in cell cycle. So, it is inferred that they would have the potentiality to cross the checkpoint from G2/M of the cell cycle.

In addition, in PCOSE, it is important to emphasize that given: i) the abnormal hormonal microenvironment in which the endometrial cells exist, ii) the greater proliferation exhibited by these cells, iii) the prolonged average life of endometrial cells, due to the absence of cyclic desquamatory action of P₄ (patients with oligomenorrhea and amenorrhoea), and IV) the absence of apoptosis; so, we suggest a high probability that the cells of these endometria accumulate mutations which can finally result in hyperplasia and endometrial carcinoma.

In order to know better the regulating mechanisms of homeostasis in the endometrial tissue, we evaluated the pathway of Smads in these processes, in normal and pathological tissues. The results indicate that these proteins and their active forms are diminished in PCOSE and HPCOSE, which suggests that in PCOSE exists a diminution of the suppressive activity of the passage of the G1 to the S phase of the cell cycle through this route, inducing the progression of the cellular cycle. When analyzed the levels *in-vitro* of Smad4 protein, it was found that E₂ and, particularly, A₄ diminishes the level of Smad4 in the cellular nuclei of cultured cells. These results indicate that these proteins may be regulated by the steroid concentrations.

Other protein investigated in this context in the endometria, was β -catenina. The higher levels of the active form of this protein found in the PCOSE, HPCOSE and EH with respect to NE, constitute an important step in the knowledge of which are the primary changes that could happen in a tissue which could lead finally to its malignization.

Conclusions: Concordantly with our proposal, the results obtained in this thesis allow us to expose that the endometria obtained from patients with PCOS must have a unique steroids bioavailability that could alter the expression and activity of regulators of tissue homeostasis. This would lead to the greater proliferative potential observed in this endometria, with the greater risk associated to hyperplasia and endometrial carcinoma. In addition, we propose that PCOSE may constitute a model for the study and the best understanding of which are the first steps in the deregulation of the endometrial cellular homeostasis. In addition, and according to the results of this work, we propose that in spite of the morphologic similarity of HPCOSE and EH and of the similar hormonal environment in which PCOSE and HPCOSE are developed, these three types of endometria are molecularly different, which could be important in the therapeutic handling of these pathologies.

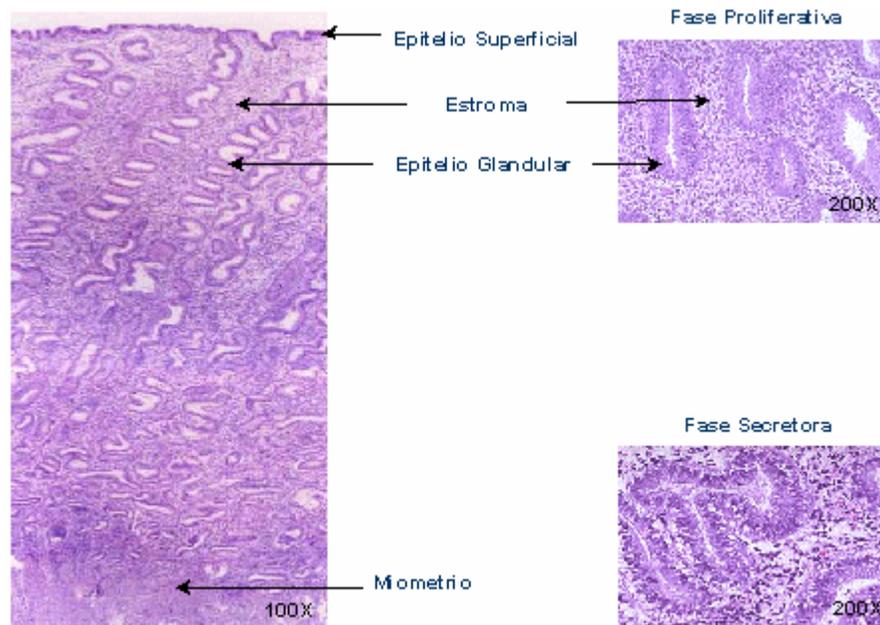
I. INTRODUCCIÓN

I.1. ENDOMETRIO HUMANO

La capa que reviste la luz interior del útero se conoce como endometrio, que está constituido por dos regiones: capa funcional y basal. La capa funcional consta de un epitelio superficial, el cual se invagina dando origen a las glándulas uterinas tubulares (epitelio glandular) (Cormack DH, 1990) y de un estroma constituido por fibroblastos, células endoteliales, células musculares lisas y leucocitos. Además, otro importante componente de todo este microambiente celular lo constituye la matriz extracelular (MEC), la que en el endometrio humano presenta variaciones en su constitución molecular a través del ciclo menstrual (Salomonsen LA & Nancarrow CD, 1994). La MEC está formada por la membrana basal en la que descansan las células epiteliales, y por una matriz intersticial rica en colágeno en la que se localizan los fibroblastos, y que además, rodea al endotelio de los vasos y a las células deciduales (Salomonsen LA & Nancarrow CD, 1994).

La morfología y la función de las células endometriales están fuertemente influenciadas por los cambios cíclicos que ocurren en la síntesis de esteroides sexuales por el ovario. Estos cambios producen características determinadas en la arquitectura endometrial, lo que llevó a Noyes (Noyes RW, 1975), en la década de los 50, a establecer una serie de criterios que permiten determinar el día del ciclo en el cual se encuentra el tejido endometrial. Basado en lo anterior, es factible definir en el endometrio dos etapas principales a través del ciclo menstrual: la fase proliferativa y la fase secretora, cada una con sus características morfológicas propias (Figura 1).

Figura 1: Histología del endometrio humano normal. Este tejido está constituido por una capa funcional hacia la luz del útero, una capa basal intermedia y una capa muscular (Miometrío). La capa funcional está constituida por epitelio superficial, epitelio glandular y estroma. El endometrio funciona con una ciclicidad mensual a través de las fases proliferativa y secretora cada una con características morfológicas propias.



El aumento en los niveles circulantes de 17β -estradiol (E_2) en la fase folicular del ciclo menstrual como consecuencia del crecimiento del folículo ovárico, promueve la proliferación celular endometrial y el crecimiento del tejido, desde 2 mm aproximadamente después de la fase de reparación postmenstrual, a 10–12 mm en el período periovulatorio (Giudice LC, 2003). Después de la ovulación, el endometrio experimenta una serie de cambios incluyendo la inhibición de la proliferación celular, de la síntesis de DNA y la actividad mitótica. El endometrio experimenta, además, un proceso de diferenciación que lo prepara para la implantación. La inhibición de la proliferación epitelial está bajo el control de la progesterona (P_4), responsable por ejemplo, de la disminución de la expresión del receptor de estrógeno alfa ($RE\alpha$) en el epitelio endometrial y de la inducción de las enzimas metabolizantes de estrógenos, sulfotransferasa y 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD) tipo 2 (Talbi S, 2006; Gurpide E, 1976; Falany JL & Falany CN, 1996), las cuales minimizan el efecto de E_2 en el endometrio.

Las mujeres que padecen patologías caracterizadas por trastornos endocrinos, como es el síndrome de ovario poliquístico (SOP), pueden ser anovulatorias u oligo-ovulatorias. En el caso de ciclos anovulatorios, P₄ no ejerce su rol regulatorio. Así, el endometrio de estas pacientes está en un estado de una respuesta a E₂ no compensada por la acción de la P₄ y no experimenta los cambios secuenciales de expresión génica y bioquímicos que resultan en una normal proliferación, diferenciación y descamación del tejido (Talbi S, 2006). Como consecuencia de esto, los endometrios de estas pacientes pueden evolucionar hacia hiperplasia y cáncer endometrial (Elliott JL, 2001; Cheung AP, 2001).

I.2. SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO, HIPERPLASIA Y CÁNCER ENDOMETRIAL

El SOP es un desorden endocrino-metabólico común que afecta del 5 al 10% de las mujeres en edad reproductiva (Kidson W, 1998). Esta enfermedad se caracteriza por una variedad de signos y síntomas, entre los que destacan la presencia de irregularidades menstruales, hiperandrogenismo, hirsutismo, obesidad, infertilidad, abortos recurrentes, insulino-resistencia y la presencia de ovarios poliquísticos visualizados por ultrasonido pélvico (Futterweit W, 1999). El grupo de trabajo para la promoción de consenso en SOP (The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, Rotterdam, The Netherlands) (Rotterdam, 2004), revisó los criterios diagnósticos que han sido utilizados para SOP. De esta manera, se ha establecido que se debe considerar paciente SOP a una mujer si cumple con al menos dos de los siguientes criterios: i) Oligo o anovulación; ii) Signos clínicos o bioquímicos de hiperandrogenismo; iii) Ovarios poliquísticos a la ultrasonografía; se debe excluir otras patologías como hiperplasia adrenal congénita, tumores secretores de andrógenos y síndrome de Cushing's. Por otra parte, el SOP parece ser un desorden oligogénico y sus bases genéticas aún no son totalmente conocidas (Xita N, 2002). Además, existen evidencias de que el SOP constituye un factor de riesgo para diabetes mellitus tipo 2, enfermedad cardiovascular, hiperplasia endometrial y cáncer endometrial (Wild S, 2000; Benitez R, 2001; Giudice LC, 2006; Pillay OC, 2006).

Por otro lado, la hiperplasia endometrial es un desorden ginecológico frecuente, caracterizado por un aumento en el número de células epiteliales y que se puede clasificar histológicamente en hiperplasia simple o compleja con o sin atipia (Buckley CH, 1989). El riesgo de hiperplasia

endometrial para pacientes SOP es debido a que los endometrios de estas pacientes están sometidos a estimulación estrogénica no compensada por P₄. Además, la hiperinsulinemia característica de un gran porcentaje de pacientes SOP (50-60%), puede contribuir al desarrollo de neoplasia endometrial, debido a la actividad mitogénica de la insulina mediada a través de sus receptores (Segreti EM, 1997). En este contexto, un estudio indicó que el 35.7% de las mujeres SOP estudiadas presentaba hiperplasia endometrial. De ellas, 60, 15 y 25% fueron clasificadas como hiperplasia simple, compleja e hiperplasia con atipia citológica, respectivamente (Cheung AP, 2001). Sin embargo, la naturaleza multifactorial del SOP y su heterogeneidad hace difícil conocer qué factores (obesidad, hiperinsulinemia, concentraciones alteradas de factores de crecimiento, predisposición genética), son causa de riesgo para el desarrollo de hiperplasia endometrial.

A pesar que en la actualidad no existen evidencias epidemiológicas sólidas que demuestren que la presencia de SOP es un factor de riesgo para cáncer endometrial (Hardiman P, 2003), una asociación entre ambos ha sido sugerida por más de 50 años (Giudice LC, 2006; Pillay OC, 2006; Hardiman P, 2003). En efecto, un artículo publicado por el Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología (2002) destaca que la anovulación crónica, la obesidad, la hiperinsulinemia y una disminución en la concentración de SHBG plasmática, que se observan en pacientes SOP, son factores de riesgo para cáncer endometrial (ACOG, 2002). Además, en los últimos años se le ha dado especial importancia a esta asociación y se ha sugerido la necesidad de evaluación del endometrio de pacientes con SOP por biopsia si el grosor endometrial es mayor de 4 mm, dado el riesgo significativo de desarrollar hiperplasia y/o cáncer endometrial (Giudice LC, 2006; Ehrmann DA, 2005). Adicionalmente, Pillay y col, (2006) han demostrado recientemente que existe una asociación entre SOP y cáncer endometrial en mujeres pre-menopáusicas (Pillay OC, 2006).

En consecuencia, dado que en mujeres con trastornos endocrinos como es el SOP, la función y supervivencia de las células endometriales están afectadas pudiendo inducir infertilidad, hiperplasia y cáncer endometrial, la comprensión de como los esteroides modifican los mecanismos involucrados en la viabilidad celular endometrial es fundamental para entender esta patología y su abordaje desde un punto de vista diagnóstico y terapéutico.

I.3. ESTEROIDES ENDOMETRIALES

I.3.1. Biodisponibilidad intracelular

La progresión cíclica mensual del endometrio humano, a través de sus fases proliferativa y secretora, ocurre bajo el control de las hormonas ováricas, principalmente E₂ y P₄. La producción ovárica de E₂ durante la fase proliferativa estimula la proliferación de las células endometriales, mientras que los altos niveles de P₄ producidos durante la fase secretora estimulan la diferenciación de dicho tejido, preparándolo para la implantación del blastocisto en el caso de un ciclo concepcional. Los esteroides actúan en el endometrio humano a través de la unión a sus receptores, lo cual regula la transcripción de genes relacionados a la diferenciación y a la homeostasis tisular, o sea, al balance entre los procesos de proliferación y apoptosis. Además, la acción esteroidea depende de las concentraciones intracelulares de los esteroides (Falany JL, 1998).

Aunque el endometrio es un órgano sensible a la estimulación hormonal, los niveles esteroidales plasmáticos no son necesariamente un reflejo de las concentraciones intracelulares de estas hormonas en dicho tejido. Lo anterior se basa fundamentalmente en que el endometrio posee el conjunto de enzimas metabolizantes de esteroides. En efecto, aunque los ovarios producen cantidades significativas de E₂ durante la fase secretora, el endometrio secretor es menos sensible a estos efectos. Esto se explica principalmente porque el metabolismo *in-situ* de esteroides permite al endometrio regular la disponibilidad de las formas activas de estas moléculas (Brooks SC, 1983). En este contexto, se ha planteado que en el endometrio secretor, el 80 al 90% del E₂ intracelular, la forma estrogénica de mayor afinidad por el receptor de estrógenos, es convertido a formas esteroidales de muy baja o nula actividad. (Hahnel R, 1973; Casey ML, 1994; Hsueh AJ, 1976).

Además, la síntesis y metabolismo estrogénico *in-situ* parece jugar un papel fundamental en el desarrollo y progresión de varias neoplasias epiteliales dependientes de estrógenos, incluyendo el carcinoma de mama. En este sentido, varios estudios realizados en tejido tumoral mamario han establecido que las concentraciones de estrona (E₁), E₂ y sus formas sulfatadas son varias veces más altas que aquellas encontradas en el plasma o en el área normal de la mama de la misma mujer; esto sucede a pesar de la presencia de bajos niveles de estrógenos circulantes (Pasqualini

JR, 1996). Sin embargo, la información sobre las concentraciones de estrógenos en tejido de carcinoma endometrial es limitada e inconsistente (Ito K, 2006).

Por lo tanto, es indudable que la actividad de las enzimas del metabolismo esteroidal tiene un papel regulatorio clave en la acción biológica de los esteroides en tejido mamario y probablemente en tejido endometrial.

I.3.2. Enzimas del metabolismo esteroidal

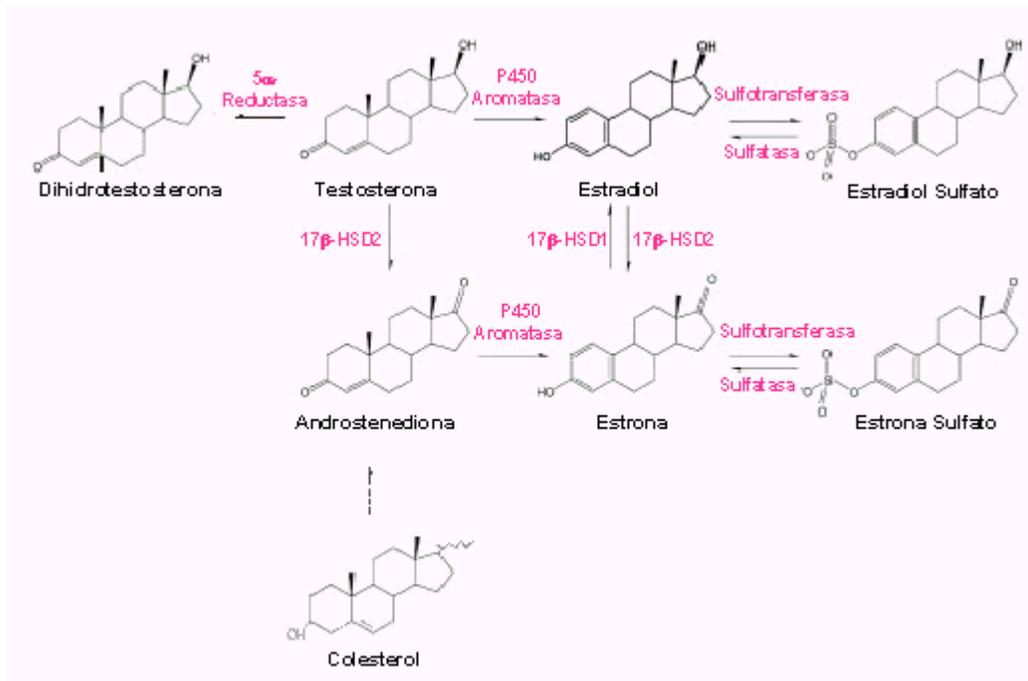
I.3.2.1. Sulfotransferasa

La sulfatación es un mecanismo importante en la síntesis, metabolismo y regulación de los esteroides en muchos tejidos humanos. Hasta el momento, se conocen tres sulfotransferasas citosólicas humanas capaces de sulfatar estrógenos: la dehidroepiandrosterona sulfotransferasa, la fenol sulfotransferasa (FST) y la estrógeno sulfotransferasa (EST o SULT1E1). Dos de estas sulfotransferasas han sido detectadas en endometrio humano: la FST, cuya expresión es tanto en fase proliferativa como en fase secretora del ciclo menstrual y la EST que se ha establecido que se expresa durante la fase secretora (Falany JL, 1998).

La EST cataliza la transferencia del grupo sulfato desde la molécula 3-fosfoadenosina-5-fosfosulfato a E₂ (Figura 2). La sulfatación de E₂ impide su unión y posterior activación del RE α (Dooley TP, 2000). EST es la sulfotransferasa relevante en la modulación de la respuesta de tejidos humanos que son positivos para el RE α , como es el caso del endometrio (Falany JL, 1998). Además, la enzima se expresa en una variedad de tejidos incluyendo ovario, cerebro, piel e hígado, entre otros (Zhang H, 1998).

Se conoce que la mayor disponibilidad de E₂ se relaciona fuertemente con el desarrollo y la patogénesis de desordenes proliferativos endometriales, incluyendo hiperplasia endometrial y carcinoma, especialmente el carcinoma de tipo endometriode (Falany JL & Falany CN, 1996; Cheung AP, 2001; Hardiman P, 2003) y además, que la expresión de la enzima EST es importante en la génesis de otros carcinomas, como cáncer de mama (Sasano H, 2006).

Figura 2. Metabolismo de esteroides. La figura muestra las enzimas necesarias para el metabolismo esteroide. Los tejidos sensibles a la acción esteroide pueden expresar las enzimas necesarias para modular *in-situ* las concentraciones esteroideas



I.3.2.2. Sulfatasa.

Otra de las enzimas importantes en la biodisponibilidad de estrógenos en los tejidos es la sulfatasa. La sulfatasa de esteroides o sulfatasa de estrona o arilsulfatasa C es una enzima microsomal, localizada principalmente en el retículo endoplásmico y en la envoltura nuclear (Stein C, 1989), y es la responsable de la producción de los esteroides 3 β hidroxilados a partir de sus precursores sulfatados (Figura 2) (Dibbelt L, 1991). Utilizando técnicas de inmunohistoquímica (IHQ), RT-PCR y actividad enzimática, ha sido posible detectarla en testículo, ovario, glándulas adrenales, placenta, próstata, piel, cerebro, pulmón fetal, aorta, linfocitos de sangre periférica, riñón y huesos (Dooley TP, 2000). Esta enzima se ha encontrado por técnica de IHQ en la capa basal del epitelio endometrial normal (Ezaki K, 2001). Además, la actividad sulfatasa ha sido implicada en un número de condiciones patológicas diferentes, por ejemplo, en cáncer de mama, en el cual el desarrollo de inhibidores potentes y selectivos de la sulfatasa aparece como una estrategia prometedora de quimioprevención (Foster PA, 2006; Purohit A, 2003).

En mujeres post-menopáusicas con cáncer de mama, los bajos niveles de estrógenos en plasma y en el área de la mama considerada normal, contrastan con las concentraciones elevadas de los estrógenos en el tejido tumoral mamario, como se describió anteriormente (Pasqualini JR, 1996; Van Landeghem AA, 1985). Esto lleva a considerar que las altas concentraciones de estrona Sulfato (E_1S) en la sangre, así como en el estroma mamario, pueden actuar como un reservorio para la formación de estrógenos biológicamente activos vía acción de esteroide sulfatasa.

Por otro lado, se ha sugerido que es el balance entre las actividades de las enzimas sulfatasa y EST en la célula, más que la actividad independiente de estas dos enzimas, el que juega un rol importante en la regulación de los niveles de esteroides activos *in-situ* en tejidos dependientes de esteroides para su función, como es el caso del endometrio humano (Utsunomiya H, 2004).

Adicionalmente, la formación de estrógenos y andrógenos activos en los tejidos también depende de otras enzimas, especialmente de las actividades de las isoformas para la enzima 17β -HSD.

1.3.2.3. 17β -HSD

Existen al menos doce isoformas de esta enzima. Las formas diferentes para esta enzima son codificadas por genes diferentes, no homólogos, poseen distintas secuencias aminoacídicas y, además, poseen diversas localizaciones subcelulares, así como, cofactores y preferencias por sustrato (Mindnich R, 2004). Por nomenclatura, las isoformas con números impares catalizan reacciones de reducción y las pares reacciones de oxidación (Mindnich R, 2004). En efecto, las enzimas 17β -HSD tipo 1, 5 y 7 catalizan la conversión de E_1 a E_2 y, por ende, produce el estrógeno activo; en tanto, las formas 2, 4, 8 y 10 catalizan la reacción que inactiva al estrógeno (Figura 2) (Luu-The V, 2001).

Tanto la 17β -HSD tipo 1 como la tipo 2 regulan los niveles de E_2 en los tejidos y modulan sus acciones estrogénicas en tejidos blancos para estrógenos, como el endometrio (Miettinen MM, 1996; Labrie F, 1997). Por lo tanto, el análisis de la expresión y actividad de estas enzimas en el endometrio humano y sus desordenes es necesaria para la comprensión de los fenómenos biológicos relacionados a la acción de los estrógenos.

La 17β -HSD tipo 1 se expresa en placenta, ovarios, hígado y tejido neuronal, entre otros. Por su parte, la 17β -HSD tipo 2 es la enzima responsable de la transformación de E_2 en E_1 y ha sido detectada en mama, endometrio humano normal, hiperplasia y cáncer endometrial. Es conocido

que la 17β -HSD2 tiene una actividad 10 veces mayor en el endometrio control de fase secretora del ciclo menstrual respecto a la fase proliferativa, lo cual es una consecuencia de la acción de la P_4 en esta fase (Satyaswaroop PG, 1982; Kitawaki J, 2000). Por otra parte, la 17β -HSD tipo 4 ha sido observada sólo en endometrio normal. Sin embargo, las otras formas de la enzima aún no han sido analizadas en endometrio humano (Mindnich R, 2004; Simpson ER, 1994).

I.3.2.4. P450-aromatasa

La enzima P450-aromatasa (P_{450} AROM o aromatasa o estrógeno sintetasa) cataliza la aromatización de andrógenos a estrógenos (Figura 2). La actividad aromatasa se encuentra presente en tejidos endocrinos, tales como ovario y placenta, y en varios tejidos no endocrinos, tales como cerebro y tejido adiposo (Simpson ER, 1994). Estudios previos indican que esta enzima se expresa en el endometrio de mujeres con desórdenes benignos y malignos del tracto reproductivo como endometriosis (Johnson MC, 2004), cáncer e hiperplasia endometrial (Sasano H & Harada N, 1994; Bulun SE, 1994). Sin embargo, la expresión de ella es controversial en mujeres sanas (Johnson MC, 2004) y se desconoce su expresión en endometrio de pacientes con SOP.

I.3.2.5. 5α -reductasa

Esta enzima transforma testosterona (T) a 5α -dihidrotestosterona (DHT), que es el andrógeno de actividad más potente y es no aromatizable (Figura 2). De esta forma, los niveles de esta enzima determinarán una mayor disponibilidad de la forma más activa de los andrógenos o una mayor disponibilidad de la T aromatizable a E_2 . Existen dos isoformas para esta enzima, la tipo 1 y la tipo 2 y ambas han sido encontradas en el ovario y en el endometrio humano normal en todas las fases del ciclo menstrual, expresándose también en carcinoma endometrial, pero no en hiperplasia endometrial (Ito K, 2002).

Por otra parte, a pesar de haberse encontrado una actividad 5α -reductasa mayor en folículos ováricos de pacientes SOP y que los tejidos periféricos de estas pacientes muestran esta actividad enzimática aumentada, se desconoce si la enzima se expresa en endometrios de pacientes con SOP (Jakimiuk AJ, 1999; Fassnacht M, 2003).

I.3.3. Globulina ligante de hormonas sexuales (SHBG)

Otra proteína que puede ser importante en la disponibilidad local de esteroides es la SHBG. En el humano, corresponde a una glicoproteína plasmática homodimérica de 93 kDa, producida por el hepatocito bajo el control de varias hormonas y reguladores metabólicos. Se han descrito dos variantes para el mRNA de la SHBG, una que corresponde a la forma silvestre o *wild type*, la cual tiene 8 exones separados por dos intrones. La otra forma, corresponde a la pérdida de 208 pb y que causa un cambio en el marco de lectura (Bérubé D, 1990; Misao R, 1994). Además, la SHBG es la principal reguladora de las concentraciones de T y E₂ libres en el plasma (Hammond GL, 1990), por lo que la medida de sus concentraciones permite estimar la cantidad de esteroide libre circulante. Niveles plasmáticos de SHBG anormalmente bajos se observan en pacientes SOP y se relacionan a la condición de hiperandrogenismo (Anderson DC, 1974). Adicionalmente, por técnica de Northern Blot, se ha detectado el mRNA en endometrio humano. En este tejido se ha observado además, que el mRNA de SHBG presenta una mayor expresión durante la fase secretora (Misao R, 1994).

Sin embargo, no se conoce si la proteína para SHBG se expresa en endometrios humanos normales ni en endometrios SOP por lo que sería importante su detección. Esta proteína podría modular *in-situ* la disponibilidad de esteroides y de este modo, jugar un papel fundamental en la regulación de la homeostasis tisular.

I.4. RECEPTORES ESTEROIDALES Y CO-REGULADORES

Las acciones de los esteroides en el endometrio humano normal son en gran parte mediadas por receptores específicos, cuya expresión está altamente regulada por las concentraciones de esteroides. Existen dos isoformas conocidas para el receptor de estrógenos: RE α y RE β , las cuales difieren en sus funciones fisiológicas (Gustafsson JA, 2000; Katzenellenbogen BS, 2000), siendo predominante la expresión del subtipo α , tanto en endometrio normal como en cáncer endometrial (Fujimoto J, 2002). El RE α es regulado positivamente por E₂, alcanzando su máxima expresión en el endometrio de fase proliferativa tardía, tanto en el epitelio como en estroma; su expresión en el epitelio es inhibida marcadamente en la fase secretora media en respuesta a P₄ y también disminuye sus niveles en el estroma. Por otro lado, el RE β se expresa principalmente en el epitelio endometrial (Giudice LC, 2006; Villavicencio A, 2006).

Por su parte, en mujeres normo-ovulatorias el receptor de andrógenos (RA) se expresa en ambos compartimentos celulares del endometrio humano, epitelio y estroma, y disminuye desde la fase proliferativa temprana a la fase secretora (Maliqueo M, 2001; Taylor AH, 2005). En los endometrios de pacientes SOP se ha establecido una expresión aumentada de los receptores esteroidales: RA y RE α (Villavicencio A, 2006; Apparao KB, 2002; Maliqueo M, 2003), sugiriendo una mayor sensibilidad a esteroides. Es importante recordar que las pacientes SOP presentan niveles séricos elevados de andrógenos, sus endometrios están sometidos a una constante exposición a estrógenos, y además, dependiendo de la paciente, a un número variable de ciclos anovulatorios en ausencia de la elevación característica de los niveles de P₄ que ocurre en la fase secretora del ciclo menstrual, y por lo tanto, sin descamación del endometrio (Homburg R, 1996). Se ha observado, también, una expresión aumentada del RE α en hiperplasia y cáncer endometrial en estadios temprano (Gurpide E, 1991; Witek A, 2001; Fujimoto J, 1994). Dado que los receptores esteroidales participan en el control de los procesos de proliferación y apoptosis, la desregulación en los niveles de estos receptores pudiese conducir a hiperplasia y/o cáncer endometrial en pacientes SOP (Schmidt WN, 1979).

Además de la expresión de los receptores esteroidales, se sabe que la actividad de ellos está modulada por los co-reguladores, co-activadores y co-represores, y cambios en los niveles de ellos afectan la actividad esteroidea y el crecimiento celular (Gao X, 2002). Los co-activadores más estudiados son de la familia p160: SRC-1, SRC-2 y SRC-3 y los co-represores son el co-represor del receptor nuclear (NCoR) y el mediador de la silenciación de los receptores de la hormona tiroidea y del ácido retinoico (SMRT) (Leo C & Chen JD, 2000). Se ha demostrado recientemente que la expresión endometrial de algunos co-activadores es cíclica durante el ciclo menstrual, y que aumenta en endometrios de mujeres SOP tratadas con citrato de clomifeno (Gregory CW, 2002). Este resultado se corresponde con datos obtenidos recientemente en nuestro laboratorio por Villavicencio y col. (2006), para la expresión de SRC-3/AIB1 en endometrios de mujeres con SOP, sugiriendo que éste es otro factor para la mayor sensibilidad a la acción de los estrógenos en estos endometrios (Villavicencio A, 2006).

Por otra parte, la proteína asociada al receptor de andrógenos, ARA70 (RFG/ELE1), es un co-regulador que fue descrito inicialmente como co-activador del RA, y actualmente se sabe que puede interactuar con el RA, el receptor de progesterona, receptor de glucocorticoides y RE α . Es

interesante destacar que niveles de expresión del mRNA para ARA70 disminuyen en cáncer de próstata y cáncer de mama, incrementándose en cáncer de ovario (Gao X, 2002).

Los co-represores NCoR y SMRT inhiben la acción de numerosos factores de transcripción, incluyendo los receptores para hormonas esteroideas. Kershah y col. (2004) indicaron que los niveles de mRNA para los co-represores NCoR y SMRT están elevados en cáncer endometrial respecto a endometrio normal, sugiriendo que estas proteínas pueden jugar un papel en el desarrollo de dicha neoplasia (Kershah SM, 2004). Además, Uchikawa y col. (2003), encontraron que en hiperplasia endometrial la expresión proteica de NCoR es mayor que en endometrio normal (Uchikawa J, 2003). Dadas las variaciones observadas en la expresión génica y proteica del co-regulador NCoR en patologías como hiperplasia y cáncer endometrial, sería interesante conocer la expresión de este co-regulador en endometrios de pacientes con SOP.

Tal como se ha expresado, la actividad de los receptores esteroidales está regulada por la unión de su ligando esteroidal y de co-activadores y co-represores. Más aún, su actividad también está modulada por modificaciones postraduccionales, fosforilaciones y/o acetilaciones, no sólo de las proteínas histonas sino también, de co-reguladores e inclusive de los propios receptores. Así, los receptores esteroidales funcionan no solamente como factores de transcripción sino también como nodos integradores de múltiples señales intracelulares.

En efecto, la fosforilación de residuos de Serina (Ser) en el RE α influye en el reclutamiento de co-activadores potenciando la transcripción, tal como fue demostrado utilizando sistemas de co-transfección para un gen reportero y el receptor en cultivos de líneas celulares (Lannigan DA, 2003). Además, esta fosforilación puede ser potenciada por la unión del ligando y por la activación de quinasas pertenecientes a diversas vías de señalización como por ejemplo: MAPK, AKT y PKA (Lannigan DA, 2003). Los sitios de fosforilación en respuesta a la unión de E $_2$ al RE α son Ser 104, 106, 118; siendo Ser 118 el principal sitio de fosforilación en respuesta a E $_2$. Los sitios de fosforilación en respuesta a la activación de quinasas son: Ser 118 por activación de la vía de las MAPK, Ser 167 por activación de la vía de la PI3K y Ser 236 a través de la vía de PKA.

A pesar de la importancia de las modificaciones post-traduccionales para la actividad del RE α □y de la acción indispensable de este receptor en la regulación de la función endometrial, estas modificaciones no han sido descritas en endometrio humano. □

En consecuencia, para la acción regulatoria de los esteroides en los tejidos, los antecedentes de la literatura señalan, entre otros: i) la importancia de la disponibilidad *in-situ* de esteroides para la función de los tejidos sensibles; ii) La participación de los receptores y co-reguladores esteroidales en el control de la homeostasis tisular y iii) el papel que juegan las fosforilaciones como modificación post-traducciona l moduladora de la actividad de los receptores esteroidales. Por consiguiente, en trastornos endocrino-metabólicos como el SOP, donde el endometrio está expuesto a concentraciones de E₂ no compensadas por P₄, es interesante determinar la actividad de las enzimas del metabolismo esteroi dal y el análisis de los co-reguladores de receptores esteroidales, así como, de las modificaciones post-traduccionales que éstos experimentan en endometrio humano normal y patológico.

I.5. HOMEOSTASIS TISULAR (PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS)

La homeostasis tisular depende de una relación adecuada entre la proliferación, la diferenciación y la muerte celular en el tejido para que éste cumpla correctamente su función (King KL & Cid lowsky JA, 1998).

Dado que el endometrio se encuentra fundamentalmente bajo el control de esteroides sexuales, su homeostasis está regulada por dichas hormonas durante el ciclo menstrual. De esta forma, el endometrio está sujeto a procesos de remodelación, proliferación y diferenciación de las células endometriales, existiendo un balance específico entre proliferación y apoptosis, tanto en el epitelio como en el estroma (Speroff L, 1971; Tabibzadeh S, 1996).

I.5.1. Proliferación (ciclo celular, ciclina D1, ciclina E, p27)

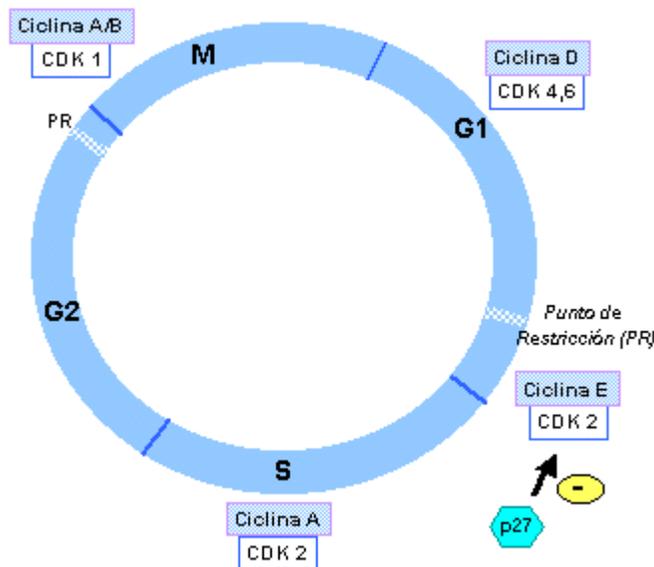
I.5.1.1. Ciclo celular

La progresión del ciclo celular es estrictamente regulada por una red compleja de señales positivas y negativas. El ciclo celular transcurre a través de las fases G₁, S, G₂ y M, cada una de las cuales con características propias (Figura 3). Dado que es esencial identificar y eliminar células proliferando inapropiadamente, la proliferación y la apoptosis son dos procesos íntimamente relacionados y los reguladores de ciclo celular pueden influenciar simultáneamente tanto la proliferación como la apoptosis (Meikrantz W, 1995). La proliferación celular normal es

regulada por la interacción entre ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y productos de genes supresores de tumores. Existen distintos tipos de ciclinas las cuáles son expresadas periódicamente durante el ciclo celular y ejercen sus efectos formando complejos con CDKs (Figura 3).

La duración de los procesos del ciclo celular es monitoreados en los puntos de control del ciclo celular que ocurren en la frontera de la fase G1-S, en la fase S y durante la transición G2-M (Murray A & Hunt T, 1993; Murray A, 1994).

Figura 3. Ciclo Celular. La progresión del ciclo celular a través de las fases G1, S, G2 y M está altamente regulada. En esta regulación participan de manera importante los complejos Ciclina/CDK y las proteínas inhibidoras del ciclo de la familia Cip/Kip, incluyendo p27.



El sistema de control del ciclo celular se basa fundamentalmente en la existencia de dos familias de proteínas: las CDK y las ciclinas. Las CDK permiten la progresión a través del ciclo celular por fosforilación de otras proteínas. La actividad quinasas depende de la presencia de unidades activantes conocidas como ciclinas. Las ciclinas poseen concentraciones fluctuantes a lo largo del ciclo celular según sea requerida o no, en un momento específico del ciclo celular. Por ejemplo, en la mayoría de las circunstancias, la ciclina D se asocia con CDK4 y 6 durante la fase G1 temprana del ciclo celular, mientras que ciclina E activa CDK2 durante la transición de G1 a S.

La ciclina A se une a CDK2 durante la fase S y la transición de la fase G2 a M y el complejo ciclina B/CDK2 funciona durante la transición de G2 a M. Así, son activados complejos específicos ciclina/CDK y su fosforilación de proteínas específicas permite que el ciclo celular continúe (Morgan Do, 1995; Fisher RP, 1997).

La proliferación cíclica es una característica del endometrio humano durante los años fértiles, e indirectamente la hormona folículo estimulante (FSH) y directamente E₂, son las principales hormonas estimuladoras de la proliferación endometrial (Speroff L, 1994). Por otra parte, P₄ contrarresta el efecto de E₂ ya que produce una disminución en los receptores para estrógenos y un aumento en el metabolismo de E₂ a conjugados no activos (Ferenczy A, 1979).

Con respecto al efecto de otros esteroides como los andrógenos, los cuales tienen un efecto tanto proliferativo como apoptótico en otros tejidos reproductivos, poco se sabe de su acción en la fisiología o fisiopatología del endometrio. En células estromales se ha encontrado un aumento en la expresión de receptores de factores de crecimiento al ser estimuladas por andrógenos (Watson H, 1997). Sin embargo, estudios realizados en células del epitelio endometrial han mostrado que los andrógenos provocan una disminución en la proliferación celular y en la secreción de glicodelina, proteína que sirve como marcador de la función endometrial (Tuckerman EM, 2000). Por lo tanto, se desconoce cómo los andrógenos regulan la proliferación celular del endometrio.

I.5.1.2. Ciclina D1

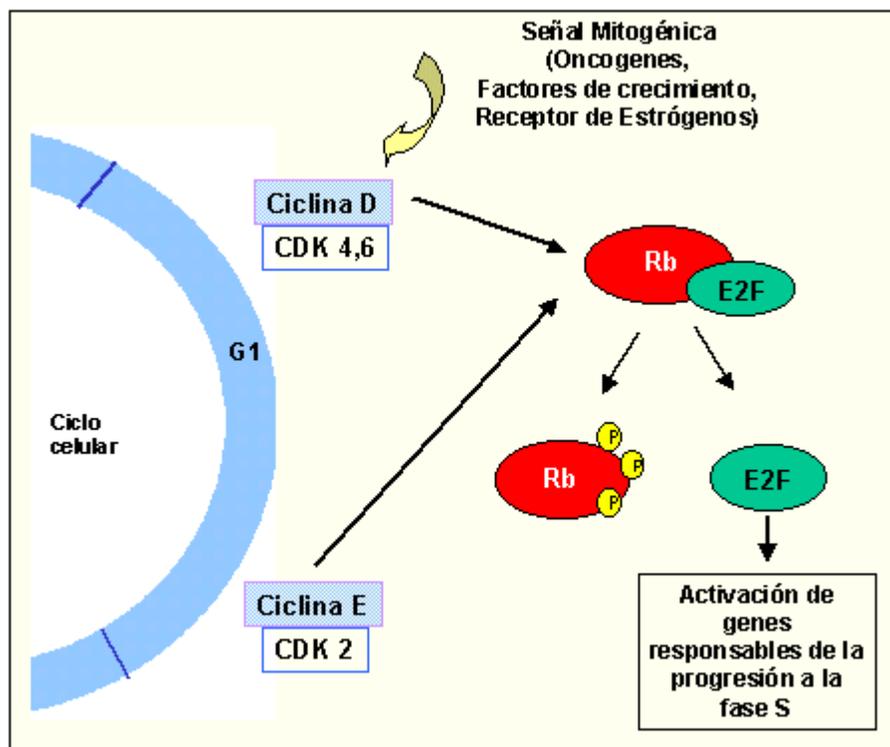
Ciclina D1 es la subunidad regulatoria de las holoenzimas CDK2 y CDK4. Las CDK representan una familia de proteínas quinasas Ser-treonina que se activan después de la unión a una molécula reguladora. Entre estas subunidades regulatorias, la proteína ciclina D1 es especialmente conocida por su rol en tumorigénesis (Fu M, 2004).

Diferentes estudios concuerdan en que ciclina D1 sirve como un sensor clave e integrador de señales extracelulares de células en la fase G1 temprana a media, mediando su función a través de su unión a CDKs y, además, a través de su participación en la regulación de la transcripción de genes involucrados en el control de los procesos de proliferación y apoptosis. De este modo, ciclina D1 forma asociaciones físicas con más de 30 factores de transcripción o co-reguladores transcripcionales (Wang C, 2004; Inoue K, 1998). Varios receptores nucleares, incluyendo el RA, el RE α \square y el receptor de hormonas tiroideas se unen directamente a ciclina D1. De esta

forma, la transactivación de los receptores nucleares, tanto basal como dependiente de ligando, es regulada por ciclina D1 (Knudsen KE, 1999; Lamb J 2000). Esta ciclina se asocia con p300/CBP-associated factor (P/CAF) y potencia la activación del RE α (McMahon C, 1999). Por otra parte, ciclina D1 reprime la señalización dependiente del RA en una manera que depende de su asociación con P/CAF (Reutens AT, 2001).

La expresión de ciclina D1 es inducida por factores de crecimiento, incluyendo el EGF, IGF-1 (Albanese C, 1999) e IGF-II (Holnthoner W, 2002), y por otras señales oncogénicas que conducen a la expresión y activación de factores de transcripción para el gen de ciclina D1 (Fu M, 2004). Así, los complejos ciclina D/CDK fosforilan la proteína Retinoblastona (Rb) y, junto con la fosforilación secuencial de Rb por ciclina E/CDK2, este proceso inactiva la capacidad de Rb para secuestrar al factor de transcripción E2F. De este modo, E2F libre estimula la transcripción de genes requeridos para la progresión del ciclo celular y la replicación del DNA (Figura 4) (Weinberg RA, 1995; Sherr CJ, 1999). Además, los complejos ciclina D1/CDK4,6 pueden secuestrar a los inhibidores de CDK de la familia Cip/Kip incluyendo p21 y p27, los cuales no podrán unirse a los complejos ciclina E/CDK2 y ciclina A/CDK2, favoreciéndose la progresión del ciclo celular (Sumrejkanchanakij P, 2003).

Figura 4. Progresión del ciclo celular desde la fase G1 a la fase S. Los complejos ciclina D/CDK 2,4 fosforilan a la proteína Retinoblastoma (Rb) que se encuentra formando parte de un complejo con el factor de transcripción E2F. Adicionalmente los complejos ciclina E/CDK2 participan también en la fosforilación de los complejos Rb-E2F. De este modo Rb fosforilada libera E2F y este factor de transcripción puede promover la transcripción de genes necesarios para la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase S.



Por otra parte, es frecuente encontrar en cánceres humanos aberraciones genéticas que se presentan en los circuitos regulatorios que gobiernan el tránsito a través de la fase G1 del ciclo celular, donde la sobre-expresión de ciclina D1 es una de las alteraciones más comúnmente observada (Diehl JA, 2002), constituyendo, además, un factor de riesgo de progresión tumoral y metástasis (Wang C, 2004; Chung DC, 2004). Sin embargo, estas observaciones contrastan con otros estudios que han mostrado carencia de correlación entre niveles altos de expresión de ciclina D1 y una mayor síntesis de DNA en tumores (Oyama T, 1998; Shoker BS, 2001).

En este sentido, se ha establecido que en la mayoría de los tipos de cánceres, incluyendo cáncer de pulmón, mama, sarcoma y colón, la sobre-expresión de ciclina D1 resulta de la inducción de señales oncogénicas más que de una mutación somática clonal o un rearrreglo en el gen para ciclina D1, CCND1. Específicamente, para cáncer de mama primario en el humano, el gen para esta ciclina es amplificado en el 15% y sobre-expresado en 30-50% de los casos (Hosokawa Y, 1998).

Datos de la literatura indican que en el endometrio la expresión de ciclina D1 aumenta progresivamente en las glándulas epiteliales, con la transformación del endometrio normal a uno con hiperplasia y carcinoma, lo que sugiere que dicha ciclina puede jugar un papel en las primeras etapas de la carcinogénesis endometrial (Ruhul Quddus M, 2002). Se sabe que P₄ inhibe

la proliferación endometrial, en parte porque inhibe el reclutamiento de c-jun al promotor de ciclina D1, y consecuentemente, la transcripción de ciclina D1 (Dai D, 2002). En este sentido, Pillay y col. (2006) plantearon que la sobre-expresión de ciclina D1 estaría involucrada en la patogénesis de tumores endometriales en mujeres con morfología de ovarios poliquísticos (Pillay OC, 2006).

Como mencionamos anteriormente, la progresión del ciclo celular desde la fase G1 a la fase S necesita de la fosforilación de la proteína Rb. Esta fosforilación es completada por los complejos ciclina E/CDK2.

I.5.1.3. Ciclina E

La familia ciclina E está constituida por las proteínas ciclina E1 y E2, esta última comparte 47% de homología en la composición aminoacídica con ciclina E1 (Hwang HC & Clurman BE, 2005).

Aunque los estudios en ciclina E2 son limitados, ésta parece poseer una actividad y regulación similares a las de ciclina E1 (Hwang HC & Clurman BE, 2005). En el presente trabajo nos referiremos a la ciclina E1. Este regulador del ciclo celular es responsable de la fosforilación de la proteína Rb, promoviendo la entrada a la fase S del ciclo celular (Sherr CJ & McCormick F, 2002). Por otra parte, dado que su promotor contiene sitios de unión para el factor E2F (Hwang HC & Clurman BE, 2005), esta ciclina es blanco de la acción transcripcional de este factor. De este modo, el complejo ciclina E/CDK2 puede reforzar su propia expresión por regulación positiva (Hwang HC & Clurman BE, 2005).

Es importante considerar que las fases del ciclo celular pudieran ser temporalmente distintas dependiendo del tipo y del microambiente celular. Así, se ha observado que una actividad excesiva de ciclina E induciría a las células a progresar a través de la fase G1 más rápidamente (Ohtsubo M & Roberts JM, 1993; Resnitzky D, 1994).

La ciclina E ha sido estudiada ampliamente en cánceres humanos. Muchos cánceres sobreexpresan la proteína o el mRNA para ciclina E, incluyendo los carcinomas de mama, pulmón, cuello uterino, tracto gastrointestinal, endometrio, linfoma, leucemias, sarcomas y tumores adrenocorticales (Hwang HC & Clurman BE, 2005). El modo más común de activación de la ciclina E en cánceres involucra mutaciones en las vías regulatorias de expresión de ciclina E, más que en el gen para la ciclina E (Hwang HC & Clurman BE, 2005).

En endometrio humano se ha mostrado por IHQ la expresión de ciclina E a lo largo del ciclo menstrual (Dubowy RL, 2003). Además, se ha encontrado la presencia aumentada de ciclina E en adenocarcinoma endometrial (Kato N, 2003); sin embargo, no se conocen los niveles de esta ciclina en endometrios que están en ambientes hiperandrogénicos como es el caso del SOP.

Por otra parte, se sabe que la fosforilación del inhibidor de ciclo celular p27 en la posición T187 por ciclina E/CDK2 estimula la degradación de p27 en la fase S del ciclo celular. De este modo, p27 es a la vez inhibidor y sustrato de ciclina E/CDK2, aunque se desconoce el factor que determina cuál de estas funciones es preponderante en un momento dado (Hwang HC & Clurman BE, 2005).

I.5.1.4. Inhibidor del ciclo celular p27

Mientras que la unión de ciclina es requerida para la actividad de los complejos ciclina/CDK, se han identificado otras proteínas cuya asociación conduce a la inhibición de la actividad CDK e impiden la progresión del ciclo celular. Han sido identificadas dos familias de inhibidores de CDK: la familia de proteínas inhibidoras de quinasas (Cip/Kip) y la familia de inhibidores de CDK4 (INK4). Los miembros de la familia Cip/Kip pueden unirse a la mayoría de los complejos ciclina/CDK y a algunas quinasas no relacionadas a CDK; sin embargo, su efecto inhibitorio lo ejercen principalmente sobre CDK2. Esta familia está compuesta por los inhibidores p21, p57 y p27. La familia INK4 está compuesta por p15, p16, p18 y p19, estos inhibidores interactúan específicamente con CDK4 y 6, pero no con otras CDKs (Johnson DG & Walker CL, 1999).

El inhibidor p27 tiene una presencia ubicua en los distintos tejidos del organismo y es mediador, entre otras funciones, de las respuestas inhibitorias de crecimiento relacionadas al ligando TGF β y a la inhibición por contacto (Johnson DG & Walker CL, 1999). En efecto, se ha visto que ratones carentes de p27 son anormalmente grandes y presentan hiperplasia de múltiples órganos (Johnson DG & Walker CL, 1999).

De este modo, si bien no se ha establecido la carencia total de esta proteína en cánceres, la disminución en sus concentraciones sí ha sido observada para el 60% de los carcinomas humanos, como por ejemplo, en carcinomas de mama, próstata, ovario, piel y colón, entre otros (Slingerland J & Pagano M, 2000). Además, se ha encontrado que este inhibidor puede disminuir

en cánceres humanos a causa de proteólisis acelerada, secuestro por otras proteínas y relocalización citoplasmática (Alkarain A, 2004).

En el caso del endometrio humano normal, se ha encontrado que la expresión de p27 en el compartimento estromal es baja y no cambia apreciablemente durante la fase proliferativa del ciclo menstrual; en tanto, en la fase secretora tardía aumenta su expresión. Sin embargo, la expresión de p27 en el epitelio glandular es nuclear, la cual es mínima hasta el día 16 del ciclo menstrual, haciéndose máxima entre los días 23 a 27 del ciclo (Dubowy RL, 2003; Shiozawa T, 1998).

Shiozawa y col. (1998) plantearon que en hiperplasia endometrial existe una expresión mínima de p27 y que los niveles de este inhibidor se elevan cuando las pacientes son tratadas con P₄ (Shiozawa T, 1998). Aún más, en mujeres premenopáusicas que presentaban cáncer endometrial, se encontró disminuida la expresión de la proteína p27 (Oshita T, 2002).

Es importante destacar que existen numerosos antecedentes que señalan que los complejos ciclina/CDKs y los inhibidores de quinasas de ciclina son regulados por hormonas, entre otros componentes, siendo esta regulación específica para cada señal hormonal (Pestell RG, 1999).

I.5.2. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso esencial para la homeostasis tisular. Este es un proceso altamente regulado, por el cual el organismo puede eliminar células indeseadas sin ejercer una respuesta inflamatoria. La apoptosis participa en diversos procesos fisiológicos, incluyendo el desarrollo embrionario, la gametogénesis masculina y femenina y la respuesta inmune, entre otros (Schwartzman RA & Cidlowski JA, 1993). La apoptosis ocurre, además, en condiciones fisiopatológicas, en las cuales las células se suicidan bajo la acción de controles externos e internos (Allen RT, 1998).

En términos generales, la activación de este proceso puede ser dependiente de estímulos externos (ligando FAS, TNF α , entre otros) e iniciar una cascada de eventos en la membrana celular, ésto se conoce como vía extrínseca. También puede ocurrir una activación independiente del ligando (vía mitocondrial o vía intrínseca), la cual está dada por el desbalance entre proteínas pro- y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2. Ambas vías convergen en la activación de las caspasas-3, -6 y -7, siendo la principal la caspasa-3.

También por la acción de caspasa-8 iniciadora de la vía extrínseca, que proteoliza la proteína pro-apoptótica Bid activándola, de este modo Bid activa actúa en la mitocondria induciendo apoptosis.

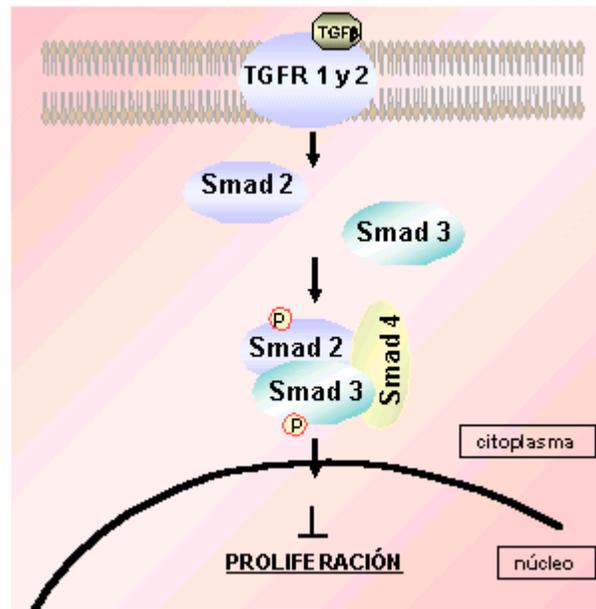
En endometrio humano normal, la apoptosis ha sido observada fundamentalmente en la fase secretora media y tardía, tanto para el epitelio como para el estroma celular (Tabibzadeh S, 1996; Castro A, 2001), y localmente en el sitio de implantación (Von Rango U, 1998). Por lo tanto, dado que: i) la proliferación celular está asociada con carcinogénesis endometrial (Kurman RJ, 1985; Sherman ME, 2000); ii) la ciclina D1 es importante en la carcinogénesis endometrial, y iii) los endometrios de pacientes con SOP podrían asociarse con carcinogénesis endometrial, resulta importante conocer en estos endometrios el grado de proliferación celular, los factores que regulan el ciclo celular, como por ejemplo, las ciclinas D y E, el inhibidor de ciclo celular p27 y conocer, además, el grado de fragmentación del DNA .

I.6. VÍA DE SEÑALIZACIÓN TGF- β

Las proteínas Smads, Smad 2, 3 y 4, pertenecen a una familia de proteínas estructural y funcionalmente relacionadas, que se han dividido según sus propiedades en tres clases: i) Smads fosforiladas por el receptor activado por los ligandos TGF- β (R-Smads), ii) Smads mediadoras que forman complejos con las R-Smads (Co-Smad) y iii) Smads antagonistas de la vía de señalización (Anti-Smads). Las proteínas Smad 2 y 3 son representantes de la familia de proteínas R-Smads, y son fosforiladas por el complejo TGF- β -receptor, en respuesta a la unión de los ligando TGF- β 1, β 2, β 3. Por otra parte, la proteína Smad4 es la única Co-Smad identificada hasta el momento en vertebrados y es necesaria para las vías de señalización activadas por los diferentes complejos ligando-receptor de la superfamilia de receptores TGF- β (Figura 5) (Massague J, 2000). Además, las proteínas Smad 6 y 7 son las Anti-Smads conocidas que actúan uniéndose al complejo receptor activo y, además, reclutando a las E3 ubiquitina ligasas, conocidas como factor regulatorio de ubiquitinación de las Smads (Smurf) 1 y Smurf2 al complejo receptor para degradarlo (Levy L & Hill CS, 2006).

Figura 5. Vía clásica de señalización para TGF β . Una vez que el ligando TGF β se une a su receptor (dímero TGFRI, TGFRII). La subunidad TGFR1 fosforila a la subunidad TGFR2 y con ello la activa. De este modo, TGFRII fosforila a las R-Smads: Smad2 y Smad3, las cuales pueden

formar complejo con la Co-Smad denominada Smad4. Estos complejos ingresan al núcleo celular donde activan la transcripción de genes relacionados al control de la homeostasis celular.



La activación de promotores blancos por las proteínas Smads depende de la translocación nuclear de estos complejos R-Smad/Co-Smad. Las R-Smads entran al núcleo después de ser fosforilados por el receptor de TGF-β, mientras que Smad4 requiere asociación con R-Smad para su translocación al núcleo. Cuando el receptor es activado, este receptor fosforila a las proteínas Smad 2 y 3. De este modo, las proteínas Smad 2 y 3 forman canónicamente un complejo con la proteína Smad4 y este complejo experimenta un transporte citoplasma-núcleo / núcleo-citoplasma continuo por interacción directa con el complejo de poro nuclear (Chen HB, 2005; Wu L, 2003). En el núcleo, este complejo se asocia a factores de unión al DNA, así como a otros factores transcripcionales para la activación de la transcripción de sus genes blancos.

La vía TGF-β/Smad 2, 3/Smad4 está involucrada en la regulación de la homeostasis tisular. Así, esta vía es responsable de la activación transcripcional de los genes p15INK4b y p21CIP1 que codifican para los inhibidores del ciclo celular p15 y p21, respectivamente, así como, de la represión transcripcional de c-myc (Massague J & Gomis RR, 2006). Además, el inhibidor de ciclo celular p27 fue el primer mediador identificado de la respuesta inhibitoria de TGF-β sobre CDK, esto fue demostrado en la línea celular epitelial de pulmón Mv1Lu y en queratocitos (Massague J & Gomis RR, 2006). En este sentido, las concentraciones de p27 prácticamente no varían en respuesta a TGF-β. Sin embargo, después de la inducción de p15INK4b por TGF-β,

p15 desplaza a p27 de su unión con CDK4/6 y p27 se une e inhibe a CDK2 (Massague J & Gomis RR, 2006).

Es importante destacar que un evento clave en la promoción y progresión tumoral pudiese ser la inactivación o desregulación de la expresión génica de moléculas pertenecientes a la vía TGF- β (Derynck R, 2001; Piestrzeniewicz-Ulanska D, 2003). Así, la alteración de la señalización por esta vía puede darse por inactivación mutacional o carencia de receptores TGF- β así como, de las proteínas Smads. Además, ha sido demostrado que mutaciones en los genes Smads pueden también conectarse con progresión tumoral, de este modo esta señalización puede considerarse una vía supresora de tumores (Piestrzeniewicz-Ulanska D, 2003; Zhou Y, 1999; Massague J, 2000). En este contexto, mutaciones en el gen para Smad2 han sido identificadas en los carcinomas colorectal, de pulmón, cabeza, cuello y hepatocelular (Piestrzeniewicz-Ulanska D, 2003). Por otra parte, ratones transgénicos carentes del gen para Smad3 pueden desarrollar cáncer de colon por un aumento en la proliferación celular (Zhu Y, 1998). No han sido descritas mutaciones puntuales para Smad3 en cánceres humanos; si se conoce que esta proteína es un importante supresor de tumores en cáncer gástrico y en leucemia linfoblástica aguda pediátrica de células T donde está ausente la proteína Smad3 (Liu F, 2006).

Por otra parte, Smad4 es inactivado frecuentemente en cánceres pancreáticos y de colon y, en menor extensión, en otros tipos de cánceres (Derynck R, 2001; Massague J, 2000). Además, mutaciones en Smad4 encontradas en la línea germinal han sido identificadas en algunos individuos con el Síndrome Familiar de Poliposis Juvenil, el cual predispone a cáncer gastrointestinal (Howe JR, 1998).

Por otro lado, se ha sugerido que la vía TGF- β a través de las proteínas Smads, puede controlar la sobrevida celular como se ha mencionado, además, por inducción de la apoptosis en los diferentes tejidos, como por ejemplo, en células epiteliales de la próstata y pulmón, células pancreáticas y hepáticas (Derynck R, 2001).

Así mismo, alteraciones de la presencia de TGF- β han sido asociadas a diferentes patologías endometriales como la endometriosis, sangramiento uterino anormal y cáncer endometrial (Luo X, 2003; Gold LI, 1994). Existen antecedentes que señalan que la transformación neoplásica del endometrio pudiese asociarse a cambios en la expresión, así como, en la distribución intracelular de las Smads. En efecto, el análisis intracelular de las Smads ha revelado que la progresión

tumoral se acompañaría fundamentalmente por la presencia proteica de Smad 2, 3 y 4 en las fracciones citoplasmática y nuclear, mientras que un número menor de tumores presentaría solamente localización nuclear de dichas proteínas (Piestrzeniewicz-Ulanska D, 2003).

Además, es importante destacar que las proteínas Smads interactúan con el RA, el RE α y la proteína β -catenina, proteína reguladora de la proliferación celular, co-activadora del RA (Moustakas A, 2001). Estas interacciones para las Smads han sido demostradas en ensayos de co-immunoprecipitación en líneas celulares. No existen antecedentes acerca de la expresión de proteínas Smads en endometrio humano de mujeres con SOP. Sin embargo, se ha observado una disminución de la presencia de la forma fosforilada (activa) de Smad2 en hiperplasia endometrial y una disminución mayor en cáncer endometrial, no encontrándose afectados los niveles proteicos de Smad2 no fosforilada y Smad7 en estas patologías (Parekh TV, 2002).

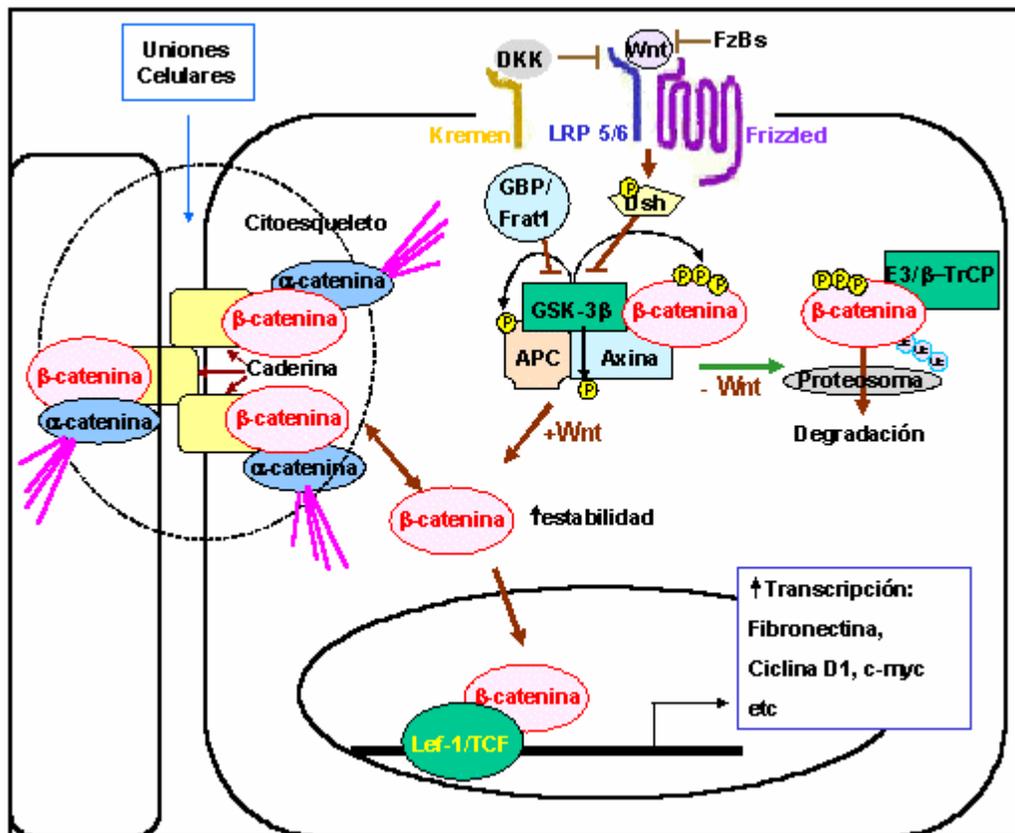
I.7. VÍA DE SEÑALIZACIÓN Wnt/ β -CATENINA

Los ligandos Wnt son una gran familia de glicoproteínas de secreción con al menos 19 miembros conocidos en humano. Estas glicoproteínas son importantes para el proceso de desarrollo, controlando una variedad de eventos, tales como, la forma, migración y polaridad celular (Miller JR, 2002). Además, se sabe que esta vía puede actuar regulando los niveles de β -catenina, una proteína que en el núcleo constituye un factor para la transcripción génica. De este modo, en ausencia de señal Wnt, las células no estimuladas regulan sus niveles de β -catenina a través de su fosforilación en un complejo multiproteico. Dicha fosforilación la identifica para una posterior ubiquitinación y degradación (Orford K, 1997). El complejo para la degradación de β -catenina consiste de las proteínas: Proteína supresora de tumores APC, axina y glicógeno sintasa quinasa (GSK-3 β) (Figura 6). Después de la unión de un ligando Wnt a su receptor frizzled (Fz), se desencadena una cascada de eventos que desestabiliza el complejo de degradación; de esta forma no puede fosforilarse β -catenina y la molécula desfosforilada se acumula y transloca al núcleo. En el núcleo funciona como un co-factor para la transcripción de genes dependientes de los factores de transcripción: Factores potenciadores linfoides (LEF)/factor de células T (TCF) (Giles RH, 2003).

El inicio de la señalización Wnt ocurre con la unión del ligando Wnt a un miembro de la familia de receptores Fz (Giles RH, 2003), junto al coreceptor LRP-5 o LRP-6, los cuales son miembros

de la familia de lipoproteínas de baja densidad relacionadas a receptores (Wehrli M, 2001). La vía Wnt clásica sólo se activa cuando tanto Fz como LRP forman un complejo con el ligando Wnt (Figura 6) (Tamai K, 2000).

Figura 6. Participación de β -catenina en la adhesión celular y la activación transcripcional. Adhesión Celular: La β -catenina se une a caderina y vía α -catenina se asocia con el citoesqueleto de actina para formar uniones celulares. Activación Transcripcional: Cuando la vía de señalización Wnt es inactiva, la β -catenina citoplasmática es degradada por un complejo que incluye glicógeno sintasa quinasa (GSK-3 β), APC y axina. En este complejo GSK-3 β se encuentra activa y fosforila β -catenina. La proteína fosforilada es reconocida por el componente de ubiquitina ligasa β -TrCP, ocurriendo entonces la degradación proteosomal de β -catenina. La unión de Wnt al receptor frizzled activa la señalización Wnt, que activa a su vez a la proteína dishevelled (Dsh), la cual es responsable de la inhibición de la fosforilación de β -catenina mediada por GSK-3 β . Esto resulta en la acumulación de β -catenina y su migración al núcleo, donde se une a los factores de transcripción: Factor potenciador linfocitario (LEF)/factor de células T (TCF) seguido por la activación de genes blancos.



Seguido de la estimulación de Wnt, la proteína dishevelled (Dsh) es reclutada a la membrana y fosforilada, lo cual se postula que induce un cambio conformacional que permite la disociación, mediada por la proteína de unión a GSK-3 β (GBP/Frat1), de GSK-3 β de su unión con axina, impidiéndose de esta forma la fosforilación de β -catenina ya que axina y APC son las proteínas que forman un andamio estructural que permite a GSK-3 β fosforilar a β -catenina (Figura 6) (Giles RH, 2003).

La proteína β -catenina fue inicialmente identificada como un componente de las uniones de adhesión, donde une E-caderina a β -catenina y, consecuentemente, la red de microfilamentos de actina del citoesqueleto (Nagafuchi A & Takeichi M, 1989). Se ha descrito que la activación de la vía de señalización Wnt puede estar involucrada en el desarrollo de tumores benignos y malignos, incluyendo cáncer de colon, melanoma, cáncer de próstata, ovárico y endometrial (Fukuchi T, 1998; Saito T, 2006). Mutaciones en los genes para β -catenina, APC o axina resultan en la estabilización de β -catenina y en una acumulación significativa de esta proteína en el citoplasma, aunque también la acumulación nuclear de β -catenina ha sido observada en diferentes tipos de tumores (Saito T, 2006; Koch A, 1999). Por otro lado, está bien documentado que la proteína puede interactuar físicamente con el RA, es decir, β -catenina interactúa con dicho receptor potenciando su actividad transcripcional en células LNCap. Esta interacción es potenciada por la adición de andrógenos (Yang F, 2002; Verras M, 2006).

De manera interesante, la vía de señalización Wnt, así como la vía TGF- β funcionan de manera cooperativa durante numerosos estados de la determinación del destino celular (Cadigan KM & Nusse R, 1997; Whitman M, 1998). Adicionalmente, Labbe y col, (2000) plantearon que Smad3 (vía TGF- β) interactúa físicamente con LEF-1 (vía Wnt) y que las vías de señalización TGF- β y β -catenina pueden regular la transcripción de los genes dependientes de los factores LEF/TCF, tanto en forma independiente como ambas vías simultánea y cooperativamente (Labbe E, 2000).

De lo anterior podemos resumir que: i) la descoordinación entre proliferación y apoptosis puede constituir un factor que favorezca una mayor supervivencia celular a nivel endometrial y ii) las vías de señalización TGF- β y Wnt/ β -catenina pueden constituir un mecanismo importante de control de la homeostasis tisular endometrial. Por lo tanto, es importante conocer la expresión y activación de proteínas pertenecientes a estas vías de señalización, que participan en el control

del ciclo celular en endometrios de pacientes SOP y de pacientes SOP con hiperplasia endometrial.

En síntesis, el conocimiento del metabolismo esteroidal *in-situ*, así como de la expresión y activación de moléculas involucradas en el control de la viabilidad celular podría ayudar en la identificación de marcadores tempranos de hiperplasia y/o cáncer endometrial en las pacientes SOP, así como, en la localización de blancos terapéuticos.

II. HIPÓTESIS

En el endometrio de pacientes con síndrome de ovario poliquístico se alteran el metabolismo esteroidal intracelular y la expresión y activación de proteínas que regulan positivamente la proliferación celular, lo cual conduce a una desregulación de la homeostasis tisular.

III. OBJETIVOS GENERALES

Determinar si en endometrios SOP se modifica el metabolismo, disponibilidad y acción de hormonas esteroidales, al compararlo con los endometrios controles.

Evaluar si los niveles de proteínas reguladoras del ciclo celular en endometrios SOP son similares a los de endometrios controles.

Analizar si en endometrios SOP los procesos de proliferación y apoptosis celular, es decir, la homeostasis celular es diferente a la de los endometrios controles.

Investigar *in-vitro* si las condiciones hiperestrogénica (E₂), hiperandrogénica (T o androstenediona-A₄-) y/o hiperinsulínica, contribuyen a modificar el metabolismo esteroide, así como, la expresión y activación de moléculas que participan significativamente en vías de señalización relacionadas con proliferación y apoptosis.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar en el endometrio *ex-vivo* de pacientes con SOP la actividad y expresión de enzimas del metabolismo esteroideal: EST, sulfatasa, 17 β -HSD tipo 1 y 2, P450-aromatasa, 5 α -reductasa. Comparar estos resultados con los obtenidos en endometrios de mujeres controles.

Evaluar si los niveles de la proteína reguladora de la biodisponibilidad de esteroides SHBG en el endometrio *ex-vivo* de pacientes con SOP son similares a los de endometrios de mujeres controles.

Analizar en el endometrio *ex-vivo* de pacientes con SOP los niveles de esteroides intracelulares (E₂, A₄, T y P₄), y si estos difieren de los encontrados en endometrios controles.

Investigar, *ex-vivo*, si en el endometrio de pacientes SOP se modifican la expresión y fosforilación del RE α en Ser 118 (pRE α -Ser118); y de los co-reguladores de receptores esteroideales: ARA70 y NCoR.

Establecer, *ex-vivo*, si en el endometrio de pacientes SOP, se alteran reguladores del ciclo celular: ciclina D1, ciclina E, p27, al compararlos con los endometrios controles.

Evaluar, *ex-vivo*, si en el endometrio de pacientes SOP, los niveles de proteínas de la vía de señalización TGF- β relacionadas al control de la homeostasis tisular: Smad2, Smad3, psmad2, pSmad3 y Smad4, difieren de los niveles presentes en endometrios controles.

Determinar, *ex-vivo*, si la expresión de la proteína reguladora del control de la homeostasis tisular β -catenina en el endometrio de pacientes SOP es diferente a la de endometrios controles.

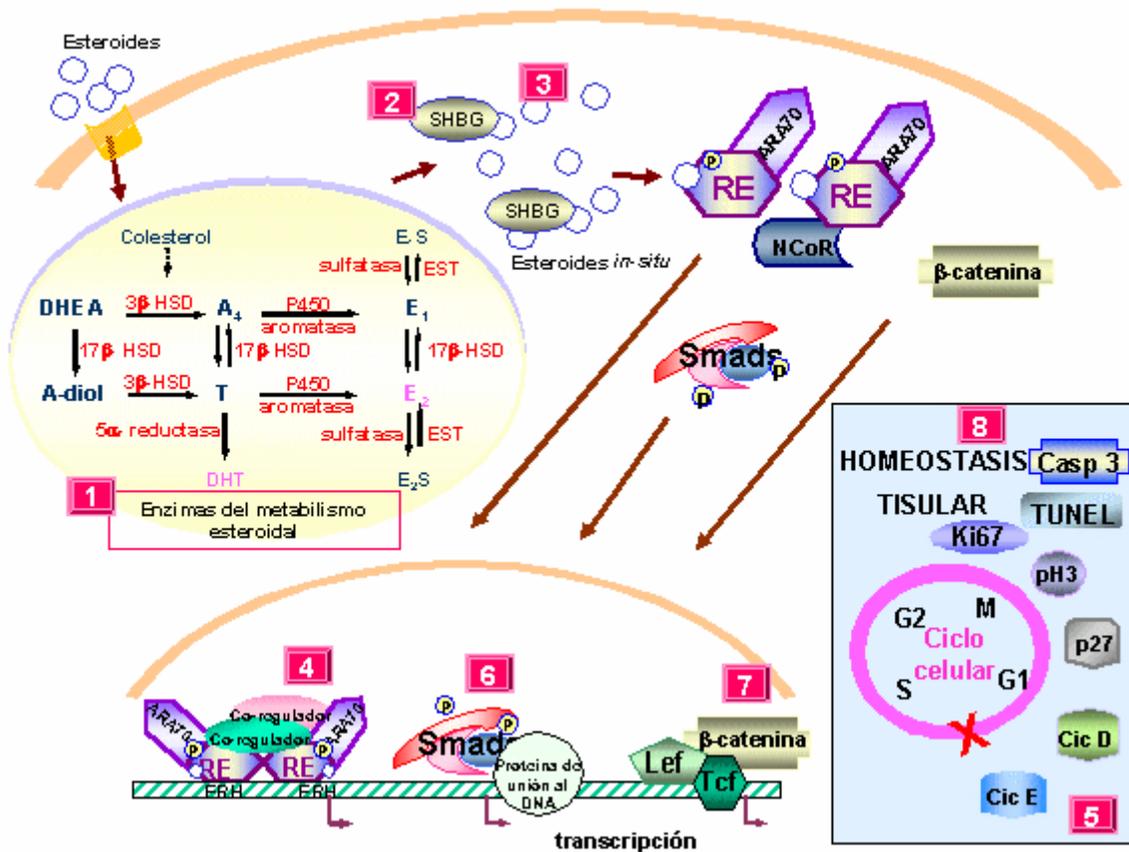
Establecer si en el endometrio *ex-vivo* de pacientes con SOP los procesos de proliferación y apoptosis celular, son diferentes a los de endometrios controles.

Evaluar *in-vitro* si las condiciones hiperestrogénica (E₂), hiperandrogénica (T o A₄) y/o hiperinsulínica, contribuyen a modificar el metabolismo esteroideal intracelular (producción de DHT y E₂ por células estromales y epiteliales y por explantes de tejido endometrial normal).

Evaluar *in-vitro* si las condiciones hiperestrogénica (E₂), hiperandrogénica (T o A₄) y/o hiperinsulínica, contribuyen a modificar la expresión y activación de las proteínas Smads (pSmad2 y Smad4), inhibidoras de la proliferación celular.

Los objetivos específicos de los experimentos ex-vivo se describen en la Figura 7.

Figura 7. Objetivos específicos ex-vivo: (1) Enzimas del metabolismo esteroidal, (2) Niveles de SHBG, (3) Concentraciones de esteroides, (4) Fosforilación y niveles de RE α y co-reguladores ARA70 y NCoR, (5) Reguladores del ciclo celular: ciclina D1, E y p27, (6) Smads. Fosforilación y niveles proteicos, (7) Niveles de β -catenina, (8) Homeostasis tisular: Proliferación y apoptosis



V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Los endometrios fueron obtenidos de cuatro grupos de mujeres, previo consentimiento escrito e informado (Anexo 1). Este proyecto fue aprobado por los Comités de Ética de: 1) Hospital Clínico San Borja Arriarán, Área Central de Salud y 2) Hospital Clínico Universidad de Chile.

V.1.1. Controles (ENp)

Se utilizaron como controles, voluntarias cíclicas normales en fase proliferativa del ciclo menstrual (n=23), con fertilidad probada, sin terapia con anticonceptivos hormonales por lo menos tres meses antes de la obtención de la muestra. Las voluntarias fueron sometidas, por indicación médica, a salpingoligadura o histerectomía por causas no neoplásicas en el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Clínico San Borja-Arriarán, Campus Centro, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Estos endometrios se utilizaron como controles, ya que los endometrios obtenidos de pacientes SOP, son comparables morfológicamente a endometrios normales de fase proliferativa.

V.1.2. Pacientes con SOP (ESOP)

Se incluyeron en total 18 pacientes entre 20-35 años con diagnóstico de SOP, quienes no tenían tratamiento hormonal ni farmacológico a la fecha del estudio y que asistieron al Consultorio de Infertilidad y Gineco-Endocrinología del Hospital Clínico San Borja-Arriarán. A estas pacientes se les realizaron biopsias endometriales usando Pipelle. Los criterios de inclusión fueron los que se mencionan a continuación, teniendo en cuenta que se requieren al menos dos de estas tres características para establecer el diagnóstico del síndrome: oligo y/o anovulación, signos clínicos (acné, hirsutismo, seborrea, sin virilización) o bioquímicos (T total >0,6 ng/ml, índice andrógenos libres >4,5) de hiperandrogenismo y ovarios poliquísticos a la ultrasonografía (Rotterdam, 2004).

Algunas de las pacientes presentaron signos clínicos de hiperinsulinemia (obesidad androide: índice masa corporal >27, índice cintura/cadera >88 cm, con o sin acantosis nigricans) e

insulinemias indicativas de insulino-resistencia (insulinemia 2 h post sobrecarga de glucosa >60 UI/ml y glicemia/insulinemia en ayunas < 4,5). En este sentido, 61% de estas mujeres SOP presentaron insulino-resistencia.

Se excluyeron pacientes con prolactina >35 ng/ml, testosterona total >2 ng/ml, dehidroepiandrosterediona sulfato (DHEAS) >4000 µg/ml, 17-OH progesterona >2,5 ng/ml, TSH >5 mUI/l o con diabetes franca. Las mediciones hormonales fueron determinadas por radioinmunoensayo (RIA) o IRMA convencionales.

V.1.3. Pacientes SOP con hiperplasia endometrial (ESOPH)

Las muestras (n=10) fueron obtenidas mediante biopsia endometrial de pacientes SOP. El diagnóstico de hiperplasia endometrial fue confirmado por estudios histológicos realizados por un anatómo-patólogo experimentado.

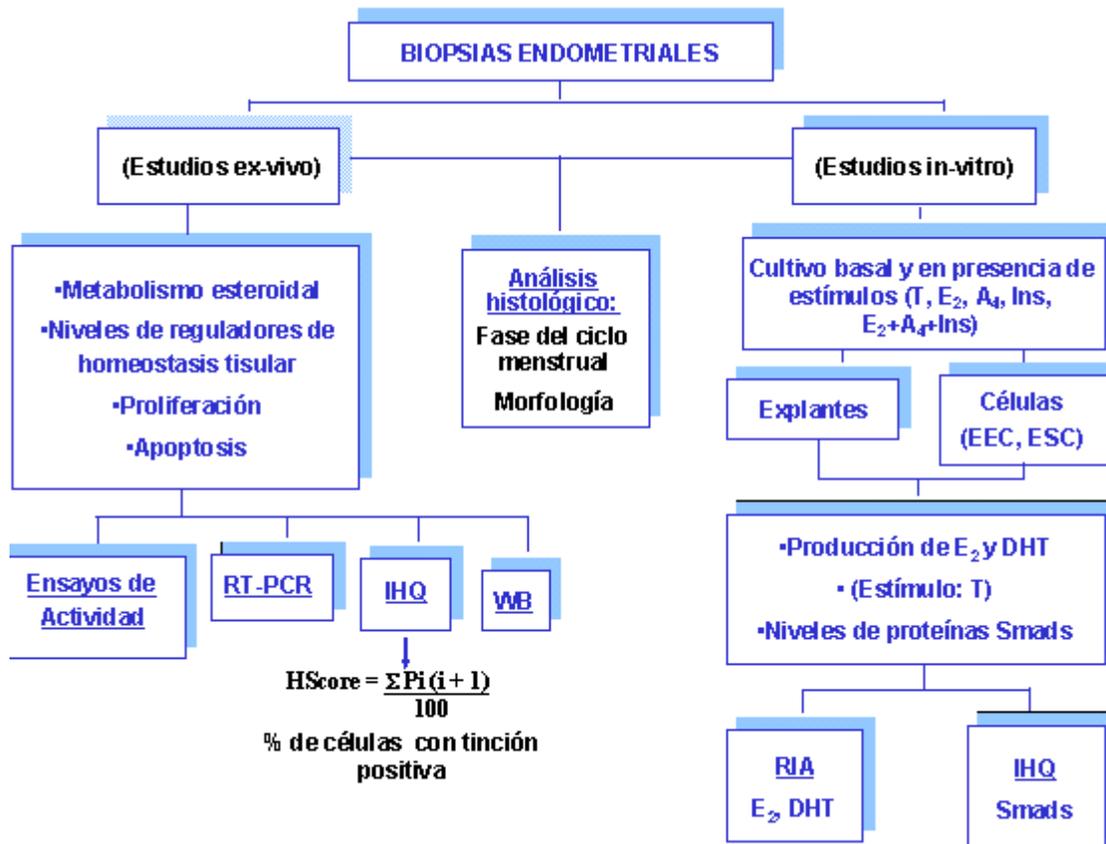
V.1.4. Pacientes no SOP con hiperplasia endometrial (HE)

Las muestras de tejido endometrial (n=7) fueron obtenidas luego del procedimiento quirúrgico (legrado endometrial y/o pieza de histerectomía), según el criterio médico.

Todas las muestras de tejido endometrial fueron clasificadas según la fecha de la última regla, concentraciones plasmáticas de E₂ y P₄ de cada paciente y mediante estudio histológico de acuerdo a los criterios de Noyes (Noyes RW, 1975). El estudio histológico fue realizado por un anatómo-patólogo con experiencia en este tipo de tejido. El diagnóstico de hiperplasia endometrial en pacientes con y sin SOP fue establecido acorde al criterio de Kurman y col (Kurman RJ, 1985).

Posteriormente, se procedió al desarrollo de los estudios *ex-vivo* e *in-vitro*, como se detalla a continuación:

V.2. DISEÑO EXPERIMENTAL



.3. ESTUDIOS *EX-VIVO*

Una vez obtenidos los tejidos endometriales de los cuatro grupos de pacientes, una fracción (t = 0) fue congelada en N₂ líquido y guardada a -80°C (estudios de semicuantificación proteica y/o génica). Otra fracción fue incluida en parafina para el análisis morfológico, y para los estudios de IHQ y de apoptosis (TUNEL).

V.4. ESTUDIOS *IN-VITRO*

En el caso del grupo ENp, el resto del tejido fue procesado inmediatamente para cultivos de explantes de endometrio y de células epiteliales y estromales. Cada situación experimental se realizó en duplicado o triplicado.

V.4.1. Cultivos de explantes de tejidos

Se realizaron cultivos de explantes de endometrios de fase proliferativa y secretora de 20-30 mg (peso húmedo), los cuales fueron cultivados durante 18 h a 37°C y 5% CO₂/aire, en medio DMEM-F12 suplementado con albúmina bovina, transferrina y selenio, antibióticos, glutamax, ácido ascórbico, sin rojo fenol y sin insulina. Los explantes fueron no tratados (condición basal) o tratados con: T: 10⁻⁶ mol/l (estudio de actividad 5α-reductasa), A₄: 10⁻⁶ mol/l, E₂: (10⁻⁶ mol/l), Insulina (10⁻⁶ mol/l) y combinaciones hormonales de A₄ (10⁻⁶ mol/l) + E₂ (10⁻⁶ mol/l) + Insulina (10⁻⁶ mol/l).

El tiempo de incubación de 18 h fue establecido en estudios anteriores de nuestro laboratorio, en los cuales se determinó que a las 18 horas de cultivo se mantiene la arquitectura tisular. Las concentraciones de hormonas utilizadas se encuentran dentro de rangos fisiológicos y fueron establecidas en protocolos anteriores realizados por nuestro grupo (Maliqueo MA, 2004) y están basadas, además, en datos obtenidos por otros autores (Tuckerman EM, 2000; Apparao KB, 2002; Greisen S, 2002).

Una vez finalizada la incubación, los trozos de tejidos fueron congelados en N₂ líquido para la determinación de las concentraciones de esteroides (DHT y E₂) por RIA y/o incluidos en parafina para los estudios de expresión proteica.

La realización del estudio *in vitro* es fundamental para establecer una relación causal entre las hormonas involucradas en SOP (andrógenos, estrógenos e insulina) y la modificación de los marcadores a estudiar.

V.4.2. Cultivo de células endometriales, epiteliales y estromales

El tejido endometrial fue digerido enzimáticamente por una incubación de 2 horas en colagenasa tipo I. Las células estromales y epiteliales se separaron por sedimentación repetida y adhesión a placas de poliestireno (Simon C, 1993; Tao XJ, 1997). Ambas fracciones celulares fueron centrifugadas a 800g por 10 minutos y resuspendidas en medio de cultivo DMEM-F12 enriquecido a 37°C y en atmósfera de CO₂ al 5%. Así, las células epiteliales y estromales fueron cultivadas separadamente hasta confluencia. Luego de la privación del suero fetal bovino, las células fueron estimuladas por 48 horas en presencia o ausencia de T 10⁻⁶ mol/l. Una vez finalizada la incubación, los medios de cultivo y las células fueron congelados en N₂ líquido y

guardados a -70°C para su posterior utilización. La viabilidad se evaluó por exclusión de azul tripán, y la pureza por la inmunodetección de citoqueratina (células epiteliales) o vimentina (células estromales).

V.5. ANÁLISIS MORFOLÓGICO

Para las muestras de tejido de las pacientes estudiadas (tanto para los estudios *ex-vivo* como *in-vitro*) se realizó la tinción de rutina hematoxilina-eosina para evaluar la integridad y morfología del tejido.

V.6. EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS ESTEROIDES INTRACELULARES Y EN LOS MEDIOS DE CULTIVO:

Las concentraciones intracelulares de los esteroides E₂, T, A₄ y P₄, se determinaron en las muestras de endometrios controles y SOP por RIA, según instrucciones del fabricante (*Diagnostic Systems Laboratories, INC*). En síntesis, se homogeneizaron 40 mg de tejido a 4°C usando un tampón de lisis conteniendo: Hepes 20 mmol/l, EDTA 2 mmol/l EGTA 2 mmol/l, Triton 1%, PMSF 5 mmol/l, Na₃VO₄ 50 µmol/l (Sigma), además de un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche, IN). Luego de la centrifugación a 10,000 g por 20 min a 4°C, se determinó la concentración de proteínas usando BCA protein assay kit (Pierce, IL). Se utilizaron 100 µl del homogeneizado celular para la extracción del esteroide con solvente orgánico. Se utilizó curva estándar de la hormona para la cuantificación de los resultados.

Del mismo modo, fueron determinadas las concentraciones de DHT y E₂ en los estudios *in-vitro*.

V.7. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

V.7.1. Reacción de polimerización en cadena de DNA complementario (RT-PCR)

El RNA total se obtuvo utilizando TRIZOL (Invitrogen), según instrucciones recomendadas por el fabricante. Los trozos de tejido (entre 20-50 mg de peso), fueron homogenizados con 1 ml de

TRIZOL, las fases fueron separadas mediante centrifugación (16.000 x g por 15 min. a 4°C), previa adición de cloroformo. Para precipitar el RNA, al sobrenadante se le agregó isopropanol y nuevamente fue centrifugado (16.000 x g por 10 min. a 4°C), éste fue posteriormente lavado con 1 ml de etanol al 75%. El RNA fue resuspendido en agua DEPC (dietilpirocarbonato). La integridad del RNA se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en condiciones denaturantes.

El DNA complementario (cDNA) se sintetizó a partir de 2 µg RNA total tratado con DNAasa I, utilizando la enzima SuperScript II Transcriptasa Reversa (Invitrogen). Los cDNA fueron amplificados según protocolos estandarizados previamente en nuestro laboratorio y utilizando partidores específicos para cada gen a estudiar. Dos µl de cDNA fueron ajustados a un volumen final de 25 µl de una mezcla que contenía buffer de PCR, MgCl₂, desoxinucleótidos (dNTPs), *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) y la mezcla de los partidores a las concentraciones que se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones de los reactivos utilizados para PCR.

	P450 _{arom}	STS	EST	17β-HSD1	17β-HSD2	ARA70	NCoR	GAPDH
Buffer PCR 10X	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x
MgCl ₂ (mmol/l)	1.5	1.5	1.5	3	3	0.8	1.5	3
dNTPs (mmol/l)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Taq polimerasa mU/µl	25	25	25	25	25	25	25	25
Mezcla de partidores	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.4	0.8	0.8

$\mu\text{mol/l}$								
-------------------	--	--	--	--	--	--	--	--

La reacción se realizó en Termocycler PTC-100 (MJ Research Inc, Watertown, MA) utilizando las condiciones expuestas en la Tabla 2, que fueron estandarizadas en nuestro laboratorio.

Con los productos ya amplificados, se procedió a separar el cDNA por electroforesis en gel de agarosa 1% en presencia de bromuro de etidio, y en todas las muestras se amplificó un control interno: Gliceraldehido Fosfato Deshidrogenasa (GAPDH). La intensidad y el área de las bandas fueron analizadas con el programa KODAK 1D Image Análisis Software (Rochester, NY). Los resultados se expresaron como la razón entre el mRNA del gen estudiado mRNA del gen GAPDH. Para comparar con los otros grupos de endometrios, a los endometrios controles (ENp) se les asignó el valor arbitrario de 1.

Tabla 2. Condiciones de PCR y secuencias de partidores de los diferentes genes.

Gen	Partidores	Secuencia	Denaturación	Apareamiento	Extensión	Nº de ciclos
P450 _{arom}	Sentido	5'- TGG CTA CCC AGT GAA AAA GG -3'	94°C / 1 min	50°C / 1 min	72°C / 1 min 30seg	35
	Antisentido	5'- TCA AAG CAC ATT TGG TGG AA -3'				
STS	Sentido	5'- AAC TCA CTC AGC ACC TGG CA -3'	94°C / 1 min	52°C / 1 min	72°C / 1 min 30seg	28
	Antisentido	5'- GGG AGG AAG ACC AGC CTC TT -3'				
EST	Sentido	5'- CAA ATC CTG GAT CCT TTC CA -3'	94°C / 45 seg	50°C / 1 min	72°C / 1 min 30seg	28
	Antisentido	5'- TCC TGT CCA CAA GCT CCT CT -3'				
17β-HSD 1	Sentido	5'- AGG CTT ATG CGA GAG TCT GG -3'	94°C / 1 min	52°C / 1 min	72°C / 1 min 30seg	35
	Antisentido	5'- CAT GGC GGT GAC GTA GTT GG -3'				
17β-HSD 2	Sentido	5'- CTG AGG AAT TGC GAA GAA CC -3'	94°C / 1 min	55°C / 1 min	72°C / 1 min 30seg	30
	Antisentido	5'- GAA GTC CTT GCT GGC TAA CG -3				
ARA70	Sentido	5'- TGA GCC TGA GAA GCA TAA AGA TTC -3'	94°C / 3 min	50°C / 1 min	72°C / 2 min	36
	Antisentido	5'- ACA TCT GTA GAG GGT TCG ATA TAAC -3'				

NCoR	Sentido	5'- GGA AGA CTA CCA TTA CTG CAG CTA ACT -3'	94°C / 4 min	58°C / 15 seg	72°C / 2 min	42
	Antisentido	5'- CAT CCT TGT CCG AGG CAA TT -3'				
GAPDH	Sentido	5'- CCA CCA TGG AGA AGG CTG GG - 3'	94°C / 45 seg	55°C / 1 min	72°C / 1 min 30seg	22
	Antisentido	5'- ATC ACG CCA CAG TTT CCC GG - 3'				

V.8. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Trozos de tejido endometrial de todos los grupos analizados, de 20-60 mg fueron homogenizados en tampón fosfato [100 mmol/l KCl, 100 mmol/l KH₂PO₄, 100 mmol/l Na₂HPO₄, y 1 mmol/l EDTA (pH 7.5)], y centrifugados por 15 min a 1000 g. El sobrenadante fue utilizado para determinar la concentración proteica mediante el BCA Protein Assay Kit (PIERCE).

V.8.1. Sulfatasa

El ensayo fue realizado como había sido previamente descrito con pequeñas modificaciones (Utsunomiya H, 2004). Aproximadamente, 0.25 mg de homogeneizado tisular fueron mezclados con E₁S que contenía [6,7-³H]- E₁S (1.6 x 10⁵ dpm, 0.5 pmol/l) a 20 μmol/l. El tampón de reacción utilizado fue Tris-HCl: 50 mmol/l-7mmol/l MgCl₂ pH 7,4 y la reacción se realizó en 230 μl de volumen total. La mezcla de reacción fue incubada a 37°C por 60 min en un baño de agua con agitación. La reacción enzimática fue terminada con la adición de 500 μl de NaOH 0,1 N. Posteriormente, se adicionó 1 ml de tolueno y se mezcló con vortex por un min. La mezcla de reacción fue centrifugada a 600 g por 5 min para separar E₁ (fase orgánica) de E₁S (fase acuosa).

La fracción de tolueno fue recuperada y la radioactividad del [³H] fue medida en un contador de centelleo líquido (Packard 1600 TR, Liquid Scintillation Counter, A Canberra Company).

V.8.2. Sulfotransferasa (EST)

Aproximadamente 0,25 mg de homogeneizado fueron agregados en cada ensayo, y se adicionó [³H]-E₁ a una concentración de 20 nmoles/l. Las reacciones fueron comenzadas con la adición de 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato a una concentración final de 20 μmol/l en un volumen final de 230 μl. El tampón de reacción utilizado fue Tris-HCl: 50 mmol/l -7mmol/l MgCl₂ pH 7,4. Las mezclas de reacción fueron incubadas a 37°C por 45 min y luego fueron terminadas con la adición de 0,5 ml de Tris-HCl (0,25 mol/l, pH 8.7) para alcalinizar la solución, seguido por la adición de 4,0 ml de cloroformo. Las mezclas de reacción fueron centrifugadas a 1000 g por 10 min para separar la E₁S (fase acuosa) de la E₁ (fase orgánica). La formación de E₁S tritiada fue determinada en el contador de centelleo líquido (Miki Y, 2002).

V.8.3. 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD) tipo 2

El ensayo fue realizado según fue descrito previamente con breves modificaciones (Yang S, 2001). Homogeneizados con 0,25 mg de proteína fueron mezclados con [³H]-E₂ (0,5 μCi/μl), E₂ no marcado con radioactividad (5 μmoles/l y NAD⁺ (1,5 mmoles/l) en un volumen final de 230 μl. Se utilizó como tampón de reacción Tris-HCl: 50 mmol/l – MgCl₂: 7mmol/l, pH 7,4. El ensayo se inició con la adición del cofactor y se realizó a 37°C por 40 minutos. La reacción fue terminada con la adición de 100 μL de NaOH (0,1 N). Se realizaron dos extracciones con una mezcla de dietiléter-etilacetato (9:1). La fase orgánica fue recuperada, evaporada y resuspendida en 200 μL de etanol. El sustrato y el producto (E₂ y E₁) fueron separados mediante cromatografía en capa fina (TLC) con una fase líquida que consistía en cloroformo-etilacetato (4:1). Exceso de E₂ y E₁ fueron agregados a los 200 μL de etanol para ayudar en la visualización de los productos mediante vapores de yodo en la placa de TLC (cromatografía en capa delgada). La actividad de todas las enzimas se expresó como pmol de producto/mg proteína x h.

V.9. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN PROTEICA

V.9.1. SDS-PAGE y análisis de western blot (WB)

Trozos de tejido congelados de los grupos de las pacientes estudiadas fueron homogenizados y lisados a 4°C usando un tampón de lisis conteniendo: Hepes 20 mmol/l, EDTA 2 mmol/l EGTA 2 mmol/l, Triton 1%, PMSF 5 mmol/l, Na₃VO₄ 0,4 mmol/l (Sigma), además de una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche, IN).

Luego de la centrifugación a 10,000 g por 20 min a 4°C, se determinó la concentración de proteínas usando BCA protein assay kit (Pierce, IL). Los extractos proteicos (50 μg) fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida-bisacrilamida (37,5:1) al 7,5%. Una vez finalizada la corrida, los geles fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa. Luego de la transferencia, las membranas fueron bloqueadas y a continuación incubadas con el primer anticuerpo preparado en T-TBS (Tween 20: 0,1%, Tris base: 20mmol/l, NaCl: 137 mmol/l), o tal como se indica en la Tabla 3. Luego, las membranas fueron lavadas en T-TBS, o para pREα-Ser118 con H₂O bidestilada y con TBS-Tween 20: 0,05% por 3 min en el último lavado (después del anticuerpo secundario). Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el segundo anticuerpo correspondiente, durante 1h a temperatura ambiente o según se indica en la Tabla 3.

Luego, las membranas fueron lavadas nuevamente, y los anticuerpos secundarios unidos a la membrana fueron detectados por quimioluminiscencia. Los niveles proteicos fueron analizados por estudios densitométricos usando el programa KODAK 1D Image Análisis Software (Rochester, NY). Los resultados de WB se expresan como la razón entre la intensidad de la banda de la proteína en estudio y la de β -actina, como control interno.

Tabla 3. Características de protocolos de Western blot y de anticuerpos utilizados.

Western Blot	Bloqueo	Anticuerpo Primario (Marca comercial y número de catálogo)	Dilución	Tiempo	Temperatura	Anticuerpo Secundario (Marca y número de catálogo)	Dilución
5 α -Reductasa tipo 1	Leche/TTBS (10%) 2h TA	Policlonal, Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA (sc-20658)	1/100	18 horas	4°C	Policlonal (Amersham) (NA934V)	1/2000
RE α	Leche/TTBS (10%) 2h TA	Monoclonal, Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA (sc-8005)	1/300	18 horas	4°C	Monoclonal (Amersham) (NA9310V)	1/5000
pRE α -Ser118	Leche/TTBS (10%) 2h TA	Policlonal, Upstate, USA (07-487)	1/500 en leche 3%-TBS	2 horas	TA	Policlonal (Amersham) (NA934V) en leche 3%-TBS 30 min, TA	1/5000
Ciclina D1	Leche/TTBS (5%) 2h TA	Policlonal, Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA, (sc-717)	1/200	18 horas	4°C	Policlonal (Amersham)	1/5000

						(NA934V)	
Ciclina E	Leche/TTBS (5%) 1h TA	Monoclonal, BD Pharmigen, CA, USA (sc-247)	1 µg/ml	18 horas	4°C	Monoclonal (Amersham) (NA9310V)	1/5000
p27	Leche/TTBS (5%) 1h TA	Monoclonal, BD Pharmigen, CA, USA (610241)	1/2500	18 horas	4°C	Monoclonal (Amersham) (NA9310V)	1/5000
Smad2,3	Leche/TTBS (5%) 1h TA	Monoclonal, BD Biosciences Pharmigen, USA, (610842)	1/350	18 horas	4°C	Monoclonal (Amersham) (NA9310V)	1/2000
β-catenina	Leche/TTBS (5%) 1h TA	Monoclonal, Upstate, USA, (05-665)	1/100	18 horas	4°C	Monoclonal (Amersham) (NA9310V)	1/2000
Pro-caspasa-3 y Caspasa-3	Leche/TTBS (10%) 2h TA	Monoclonal, BD Pharmigen, CA, USA (559565)	1/500	2h	TA	Policlonal (Amersham) (NA934V)	1/2000
β-actina	Según corresponda	Monoclonal, Sigma, USA, (A5441)	1/15000	1 hora	TA	Monoclonal (Amersham, NA 9310V), 30 min, TA	1/5000

V.9.2. Estudios de IHQ

Se realizaron en cortes de 5 μm incluidos en parafina de especímenes de endometrios de los cuatro grupos de pacientes estudiados, y en los explantes utilizados para los ensayos *in vitro*. Se detectó la presencia de las proteínas: P450-aromatasa, 5 α -reductasa, ARA70, NCoR, ciclina D1, ciclina E, p27, pSmad2, pSmad3, Smad4, β -catenina total y β -catenina no fosforilada por GSK-3 β . En el caso de los estudios *in-vitro*, se realizó inmunodetección para pSmad2, pSmad3 y Smad4.

Para ello, los tejidos fueron desparafinados y rehidratados. Para la recuperación de antígenos, los cortes se incubaron 20 min en baño de agua entre 95-100° C en una solución de citrato de sodio 10 mmol/l, pH 6,0 excepto para ciclina D1 en que se utilizó el tampón Tris: 20mmol/l - EDTA: 65mmol/l -Tween 20: 0,0005%; pH 9. En el caso de P450-aromatasa no se necesitó realizar el procedimiento de recuperación antigénica. Para evitar la actividad peroxidasa endógena, se realizó un tratamiento durante 30 min con peróxido de hidrógeno al 0,2% en metanol para ARA70, NCoR; al 0,5% en metanol para ciclina D1, β -catenina no fosforilada por GSK-3 β y β -catenina total; al 3% en metanol para P450-aromatasa; al 0,5% en agua para p27 y al 3% en agua para SHBG, ciclina E, pSmad2, pSmad3, Smad4 y 5 α -reductasa. Posteriormente, los cortes se incubaron en PBS-BSA al 4% durante 1 h para evitar uniones inespecíficas, y luego, con los respectivos anticuerpos, de acuerdo a los protocolos que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Características de los anticuerpos utilizados en la realización de técnicas de inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Empresa y Número de Catálogo	Dilución	Tiempo	Temperatura
pH3	Upstate, CA, USA (06-570)	0,0005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	18 horas	4°C
SHBG	USBiological. USA (S1012-53)	1/200	1 hora	37°C
P450- aromatasa	Serotec, Oxford, UK (MCA 2077)	1/75	18 horas	4°C
5 α -reductasa	Sta. Cruz Biotechnology, CA,	1/2000	18 horas	4°C

	USA (sc-20658)			
ARA70	Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA (sc-15984)	1/100	18 horas	4°C
NCoR	Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA (sc-1611)	1/200	18 horas	4°C
ciclina D1	Novocastra Laboratories Ltda, UK (sc-717)	1/20	18 horas	4°C
ciclina E	Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA (sc-247)	1/300	18 horas	4°C
p27	BD Transduction Lab, CA, USA (610241)	1/400	18 horas	4°C
pSmad2	Calbiochem, USA, (566415)	1/1000	18 horas	4°C
pSmad3	Cell Signaling, (9514)	1/150	18-20 horas	4°C
Smad4	Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA (sc-7966)	1/1600	18-20 horas	4°C
β -catenina	Novocastra Laboratories Ltda, UK (NCL-B-CAT)	1/150	18 horas	4°C
β -catenina no fosforilada por GSK-3 β	Upstate, CA, USA (05-665)	1/2000	18 horas	4°C

Luego de la incubación con el primer anticuerpo preparado en PBS-BSA al 2%, se continuó con la técnica utilizando el kit LSAB (DAKO, USA), y siguiendo las instrucciones del fabricante, se agregó el segundo anticuerpo biotinilado por 30 min a temperatura ambiente.

Posteriormente, se incubó con estreptavidina marcada con peroxidasa por 30 min a temperatura ambiente; como sustrato se utilizó peróxido de hidrógeno y como cromógeno diaminobencidina (DAB), por lo que la tinción positiva se evidenció de color café. Las muestras fueron contrateñidas con hematoxilina. Cada muestra contó con su correspondiente control negativo, al cual no se le agregó el primer anticuerpo.

Cada muestra fue evaluada por tres observadores independientes mediante porcentaje de células teñidas obtenidas del conteo de 1000 células por compartimiento celular, tanto para núcleo como para los citoplasmas celulares, o con el uso de la fórmula de HScore para los marcadores que mostraron diferentes grados de tinción. El HScore se calcula como la sumatoria del % de células positivas con intensidad (i) multiplicado por (i+1) y dividido entre 100, donde a (i) se le asigna valores de 1, 2 o 3 según sea evaluada la intensidad de la tinción como leve (i=1), moderada (i=2), o intensa (i=3). La evaluación por HScore ha sido realizada previamente por nuestro laboratorio (Villavicencio A, 2006; Maliqueo MA, 2004).

V.10. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN

V.10.1. Expresión de la proteína Ki67

La proteína Ki67 está presente en el nucleolo durante las fases G1 tardía, S, G2 y M; por tanto, su expresión se encuentra restringida a células que están en ciclo celular.

Las muestras fueron tratadas con tampón Tris 100 mmol/l pH 9,5 por 20 min a 100° C, peróxido de hidrógeno al 0,2% en metanol por 30 min y PBS-BSA al 4% por 60 min. Posteriormente, fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-Ki67 0,05 µg/ml (Oncogene, CA, USA; número de catálogo NA59) durante toda la noche a 4° C, y luego reveladas con el kit LSAB (DAKO, USA), de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Se evaluaron varios campos a 400x por tres observadores en forma independiente, contándose 1000 células por placa para cada compartimiento celular, y los resultados se expresaron como porcentaje de células positivas respecto al control.

V.10.2. Expresión de histona H3 fosforilada en Ser 10 (pH3)

Para la recuperación del antígeno pH3, los cortes se incubaron 20 min en baño de agua entre 95-100° C en una solución de citrato de sodio 10mmol/l, pH 6,0. Para evitar la actividad peroxidasa endógena se utilizó peróxido de hidrógeno al 3% en metanol por 30 min, además, las placas se bloquearon con PBS-BSA al 4% por 60 min. Posteriormente, fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-pH3 0,0005 µg/µl (Upstate, CA, USA) durante toda la noche a 4° C, y luego reveladas con el kit LSAB (DAKO, USA), de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Las muestras se evaluaron a 400x por tres observadores en forma independiente, contándose 1000 células por lámina para cada compartimiento celular y los resultados se expresaron como porcentaje de células con tinción positiva.

V.11. ESTUDIOS DE APOPTOSIS

V.11.1. Método fluorescente de detección de fragmentación del DNA (TUNEL)

La fragmentación del DNA fue evaluada mediante el sistema DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, WI, USA). Este consiste en la incorporación de 12-dUTP marcado con FITC al extremo 3' OH de la molécula de DNA mediante la enzima deoxinucleotidil transferasa (TdT). Los cortes histológicos luego de ser desparafinados y rehidratados, fueron tratados con proteinasa K (20 µg/ml) por 10 min, lavados en PBS por 10 min e incubados a temperatura ambiente por 1 h en cámara húmeda, con la mezcla de la enzima Terminal Deoxinucleótidil Transferasa (TdT), los deoxinucleótidos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y el tampón de equilibrio en las proporciones indicadas por los fabricantes. Al control negativo no se le adicionó la enzima TdT. Los cortes fueron contrateñidos con yoduro de propidio y analizados en un microscopio de fluorescencia. El porcentaje de células con tinción positiva contándose entre 800 a 1000 células fue evaluado por tres observadores independientes.

V.12. ANALISIS ESTADÍSTICO

El número de sujetos empleado en este estudio fue calculado asumiendo un α de 0,05 y un β de 0,20, estando interesados en detectar como estadísticamente significativa una diferencia entre las medias de 25%.

Los resultados se expresan como promedio \pm error estándar de la media o como veces respecto al grupo control en todos los análisis realizados.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa computacional Graph Pad Prism 4.0. Se realizó un test de normalidad (Kolmogorov-Smirnov), para evaluar la distribución de los datos. Para las comparaciones entre los distintos grupos se utilizó el test de Student en distribuciones paramétricas y el test de Mann Whitney en distribuciones no paramétricas. En todos los casos se consideró un $p < 0,05$ como criterio de significación.

VI. RESULTADOS

VI.1. OBJETIVO ESPECÍFICO 1:

Determinar en el endometrio *ex-vivo* de pacientes con SOP la actividad y expresión de enzimas del metabolismo esteroidal: EST, sulfatasa, 17 β -HSD tipo 1 y 2, P450-aromatasa, 5 α -reductasa. Comparar estos resultados con los obtenidos en endometrios de mujeres controles.

VI.1.1. Características clínicas y metabólicas de las pacientes en estudio

Se obtuvieron biopsias endometriales de 23 mujeres controles en fase proliferativa, de 18 pacientes diagnosticadas como pacientes con SOP cuyos endometrios eran morfológicamente compatibles con fase proliferativa, 10 pacientes diagnosticadas como SOP con HE y 7 pacientes con hiperplasia endometrial (HE). Las mujeres SOP y SOP con HE se diferenciaron significativamente en cuanto a edad e índice de masa corporal (IMC) de las mujeres controles, lo cual es inherente al síndrome y al diseño experimental usado. Además, se diferenciaron significativamente de las pacientes con HE en la edad (Tabla 5).

Las pacientes SOP y SOP con HE mostraron diferencias significativas en los valores plasmáticos para A₄, T, SHBG e índice de andrógenos libres (IAL), respecto a las mujeres controles (Tabla 6). Todas las pacientes SOP y SOP con HE fueron hiperandrogénicas, mostrando una concentración plasmática mayor de T total y una marcada disminución en la concentración de SHBG, lo que trajo como consecuencia un aumento significativo del IAL respecto a mujeres controles. No se observaron diferencias en las concentraciones plasmáticas de E₂ y P₄. Utilizando el criterio diagnóstico de la medición de insulinemia 120 minutos post carga de glucosa, se obtuvo un 61% de pacientes SOP insulino resistentes y un 39% de pacientes SOP no insulino-resistentes.

Tabla 5. Características clínicas de las pacientes

	ENp	ESOP	ESOPH	HE
n	23	18	10	7
Edad	37.1 ± 1.5	26.6 ± 1.0 ^{bd}	29.4 ± 1.4 ^{a,c}	41.5 ± 4.1
IMC (kg/m²)	25.6 ± 1.0	31.4 ± 1.6 ^a	31.9 ± 2.0 ^a	28.0 ± 2.0

Endometrio control proliferativo (ENp), endometrio de pacientes con síndrome de ovario poliquístico sin hiperplasia endometrial (ESOP) y con hiperplasia endometrial (ESOPH), endometrios de pacientes sin síndrome de ovario poliquístico y con hiperplasia endometrial (HE), número de mujeres incluidas en el estudio (n), Índice de Masa Corporal (IMC). Los valores son expresados como media ± error estándar de la media. a: p<0.05 vs ENp; b: p<0.01 vs ENp; c: p<0.05 vs HE; d: p<0.01 vs HE.

Tabla 6. Características hormonales de las pacientes

	ENp 23	ESOP 18	ESOPH 10
n	23	18	10
P4 (ng/ml)	0.9 ± 0.5	1.0 ± 0.3	1.55 ± 1.09
E2 (pg/ml)	42.4 ± 17.1	63.1 ± 4.7	85.8 ± 9.6
A4 (ng/ml)	1.7 ± 0.3	4.5 ± 1.6 ^a	3.2 ± 0.7
T (ng/ml)	0.4 ± 0.1	0.9 ± 0.1 ^b	0.8 ± 0.0 ^a
SHBG (nmol/l)	60.4 ± 16.1	23.8 ± 3.1 ^b	25.7 ± 5.5 ^a
IAL	2.7 ± 0.7	15.0 ± 2.5 ^a	11.9 ± 2.3 ^a

Progesterona (P4), estradiol (E2), androstenediona (A4), testosterona (T), globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG), índice de andrógenos libres (IAL), endometrio control proliferativo (ENp), endometrio de pacientes con síndrome de ovario poliquístico sin hiperplasia endometrial (ESOP) y con hiperplasia endometrial (ESOPH). Los valores son expresados como media ± error estándar de la media; a: p<0.05 vs ENp; b: p<0.01 vs ENp.
Valores de referencia: E2: 20 – 300 pg/ml (F.F), T: <0.6 ng/ml (F.F), SHBG: 30 – 120 nmol/L, A4: 0.4 – 2.7 ng/ml, P4: < 4.0 ng/ml (F.F), IAL < 5.

VI.1.2. Presencia de mRNA, proteína y/o actividad *ex-vivo* de enzimas del metabolismo esteroidal en endometrio humano.

VI.1.2.1. Niveles de mRNA y proteína de P450-aromatasa

En los cuatro grupos de endometrios analizados no se detectó la presencia de mRNA para la enzima P450-aromatasa. En efecto, la Figura 8 muestra la banda para P450-Aromatasa en el control positivo (trozo de cuerpo lúteo humano de fase lútea intermedia), no encontrándose esta banda en los endometrios analizados. Al aumentar la concentración de cDNA y/o partidores en el PCR, no se encontró la presencia de producto amplificado para las muestras de endometrios analizadas. Por otra parte, los estudios de IHQ tampoco detectaron la presencia de la enzima en endometrio humano, siendo positiva la técnica realizada para cuerpo lúteo humano de fase lútea intermedia. En este sentido, y de acuerdo con datos de la literatura, es controversial la presencia de la enzima en endometrio humano normal. (Figura 8).

Figura 8. Niveles de mRNA para P450 aromatasa en endometrios. Se realizó RT-PCR clásico para endometrio humano: control (ENp, n=7), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico sin hiperplasia endometrial (ESOP, n=7) y con hiperplasia endometrial (ESOPH, n=3) y de mujeres con hiperplasia endometrial (HE, n=4). El control positivo correspondió a cuerpo lúteo humano de fase intermedia. Se utilizó GAPDH como gen normalizador.



IV.1.2.2. Presencia de mRNA y actividad enzimática para las enzimas sulfatasa y EST.

La enzima sulfatasa cataliza la remoción de un grupo sulfato de los estrógenos E₁S y estradiol sulfato (E₂S), transformándolos en las formas libres E₁ y E₂, respectivamente. Por otra parte, la enzima EST cataliza la transferencia de un grupo sulfato a los estrógenos formando sus formas inactivas: E₁S y E₂S. Los niveles de mRNA para la enzima sulfatasa se encontraron disminuidos

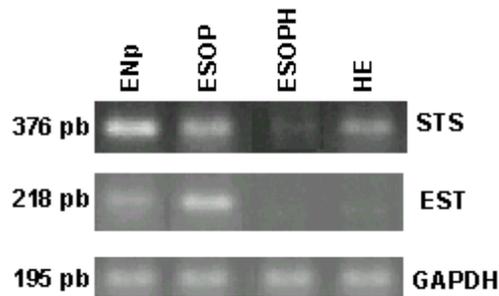
en los ESOP ($p < 0.05$) y ESOPH ($p < 0.01$) vs ENp (Figura 9 a, b). En relación a la actividad enzimática de sulfatasa, ésta resultó ser significativamente menor en ESOP respecto a ENp ($p < 0.05$) (Tabla 7).

Por otro lado, al realizar los ensayos de niveles de mRNA y de actividad para la enzima EST en las mismas muestras analizadas para sulfatasa, se encontró que los niveles de mRNA fueron menores en ESOPH ($p < 0.05$) y HE ($p < 0.05$), respecto a ENp. Además, los niveles de mRNA fueron mayores en ESOP ($p < 0.05$) vs ENp (Figura 9 a, c). Sin embargo, las actividades enzimáticas fueron similares para todos los grupos analizados (Tabla 7).

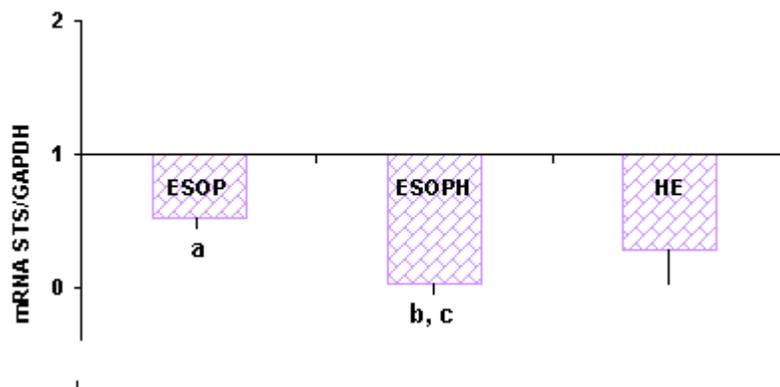
Al determinar la relación entre las actividades de sulfatasa y EST para comprender mejor el significado biológico de estos resultados (Figura 10), se encontró una relación disminuida en ESOP ($p < 0.05$) y ESOPH ($p < 0.05$) vs ENp. Lo anterior indicaría una menor tendencia de estos endometrios a formar esteroide libre a partir de las formas sulfatadas.

Figura 9. Niveles de mRNA para las enzimas sulfatasa (STS) y sulfotransferasa (EST). RT-PCR convencional para endometrio humano: control (ENp), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico sin hiperplasia endometrial (ESOP) y con hiperplasia endometrial (ESOPH) y de mujeres con hiperplasia endometrial (HE). (a) Gel representativo para el RT-PCR. (b) Presencia de mRNA para la enzima STS en ENp, n=7; ESOP, n=6; ESOPH, n=3 y HE, n=3. Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media y respecto al control (ENp: 0.9 ± 0.3 U.A.) al cual se le asignó un valor arbitrario de 1. (c) Presencia de mRNA para la enzima EST en ENp, n=7; ESOP, n=6; ESOPH, n=3 y HE, n=5. Los resultados se expresaron como en b). El valor del control fue ENp: 0.3 ± 0.1 U.A., al cual se le asignó un valor arbitrario de 1. Se utilizó GAPDH como normalizador. a: $p < 0.05$ vs ENp, b: $p < 0.01$ vs ENp, c: $p < 0.01$ vs ESOP.

a)



b)



c)

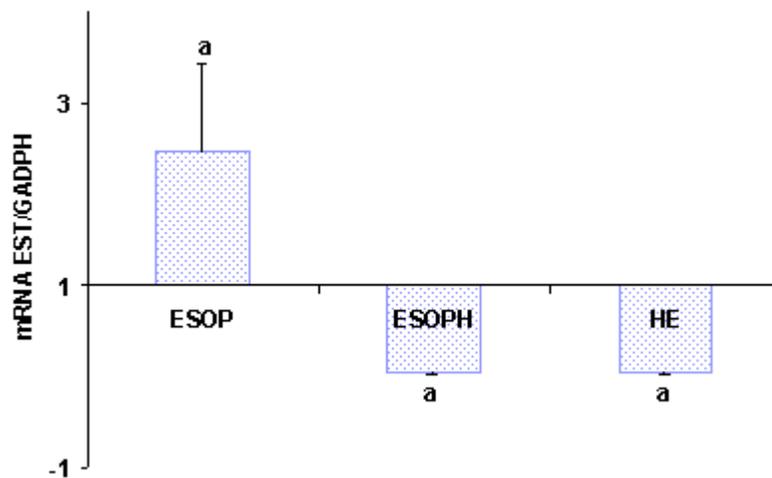
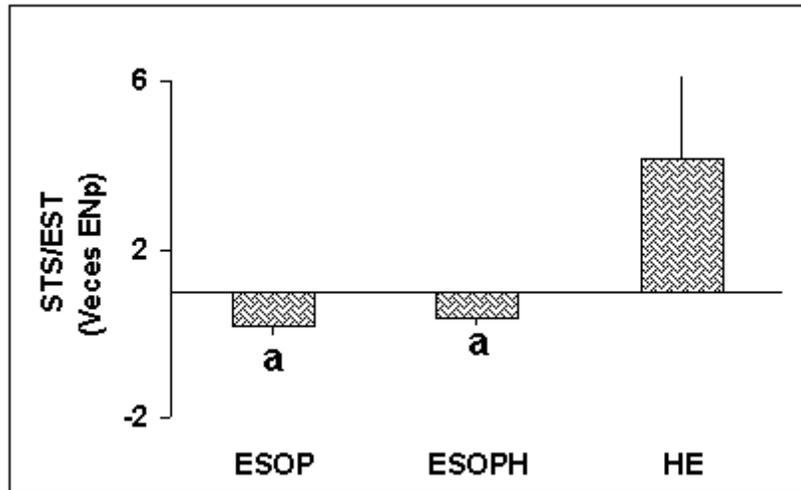


Tabla 7. Actividad enzimática de sulfatasa (STS) y sulfotransferasa (EST)

	ENp	ESOP	ESOPH	HE
n	10	5	6	3
STS (pmol/mg proteína x h)	129.0 ± 13.0	67.2 ± 13.7 ^{a,b}	90.1 ± 10.6	174.2 ± 51.8
EST (pmol/mg proteína x h)	2.1 ± 0.4	2.8 ± 0.3	1.7 ± 0.3	2.5 ± 2.3

Endometrio control proliferativo (ENp), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico (ESOP), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico e hiperplasia endometrial (ESOPH) y de mujeres con hiperplasia endometrial (HE). Los valores son expresados en media ± error estándar. a: p < 0.05 vs ENp; b: p < 0.05 vs HE

Figura 10. Razón de la actividad enzimática de sulfatasa (STS) y sulfotransferasa (EST). Ambas actividades enzimáticas se determinaron en endometrios procedentes de las mismas mujeres. Se utilizaron endometrios: control proliferativo (ENp, n=10), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico sin hiperplasia endometrial (ESOP, n=5), y con hiperplasia endometrial (ESOPH, n=6) y en pacientes con hiperplasia endometrial (HE, n=3). Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media y respecto al control (ENp: 140.1 ± 17.9 pmol/mg prot*h), al cual se le asignó un valor arbitrario de 1. a: $p < 0.05$ para ESOP, ESOPH vs ENp, respectivamente.



VI.1.2.3. Nivel de mRNA y actividad enzimática para 17 β -HSD tipos 1 y 2

Se determinó por RT-PCR convencional la presencia de mRNA para las enzimas 17 β -HSD tipos 1 y 2. Para la enzima responsable de la transformación de E₁ en E₂ (17 β -HSD tipo 1) encontramos menor nivel de mRNA en ESOP y ESOPH respecto a ENp, ($p < 0.05$) (Figura 11 a, b). La enzima 17 β -HSD tipo 2, que cataliza la transformación de E₂ en E₁, mostró un nivel de mRNA disminuido en ESOP ($p < 0.05$) vs ENp (Figura 11 a, c). De manera interesante, la relación de los niveles de mRNA 17 β -HSD1/17 β -HSD2 fue mayor para los ESOP vs ENp ($p < 0.01$) (Figura 12). Como se muestra en la Figura 13, estos resultados están de acuerdo con los obtenidos para la actividad enzimática de la 17 β -HSD tipo 2, existiendo una menor tendencia a la inactivación de E₂ en ESOP vs ENp ($p < 0.05$).

Figura 11. Semicuantificación de los niveles de mRNA para las enzimas 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) tipo 1 y 2. Se realizó RT-PCR clásico para endometrio humano: normal (ENp, n=4), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico sin hiperplasia endometrial (ESOP, n=5) y con hiperplasia (ESOPH, n=3) y de mujeres con hiperplasia endometrial (HE, n=3). (a) Gel representativo que muestra las isoformas en los tejidos (electroforesis en gel de agarosa al 2% en presencia de bromuro de etidio). (b) mRNA para la enzima 17 β -HSD tipo 1. (c) mRNA para la enzima 17 β -HSD tipo 2. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media. Se utilizó el mRNA para GAPDH como normalizador. a: p<0.01 vs ENp.

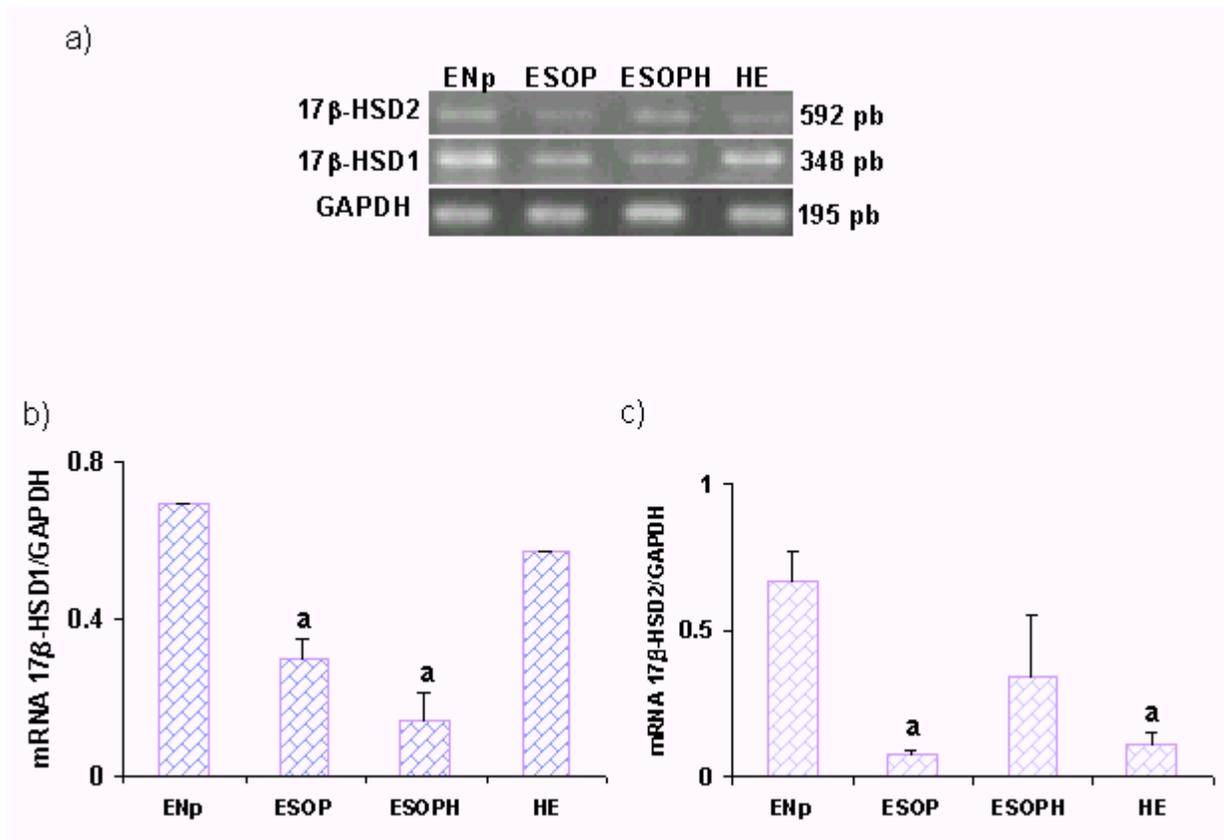


Figura 12. Relación de los niveles de mRNA para las enzimas 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) tipos 1 y 2. Se realizó RT-PCR convencional para endometrio humano: normal (ENp, n=4), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico sin hiperplasia endometrial (ESOP, n=5) y con hiperplasia (ESOPH, n=3) y de mujeres con hiperplasia endometrial (HE, n=3). Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media y respecto al control (ENp: 0.9 \pm 0.3), al cual se le asignó valor arbitrario de 1. Se utilizó el mRNA para GAPDH como normalizador. a: p<0.05 vs ENp, b: p<0.05 vs ESOPH.

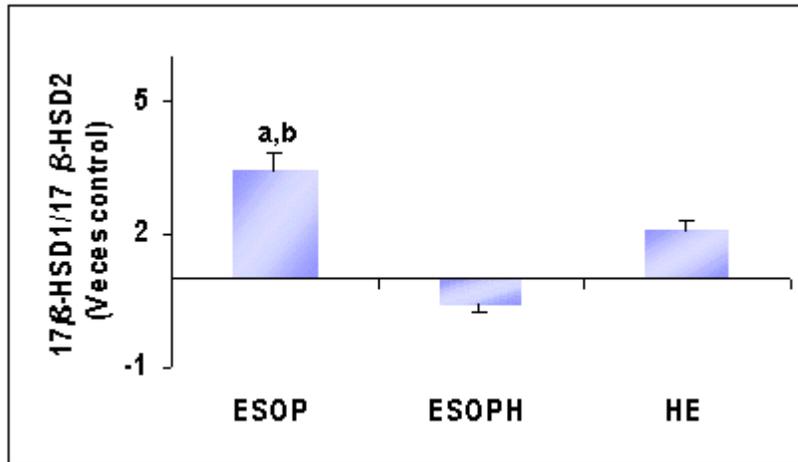
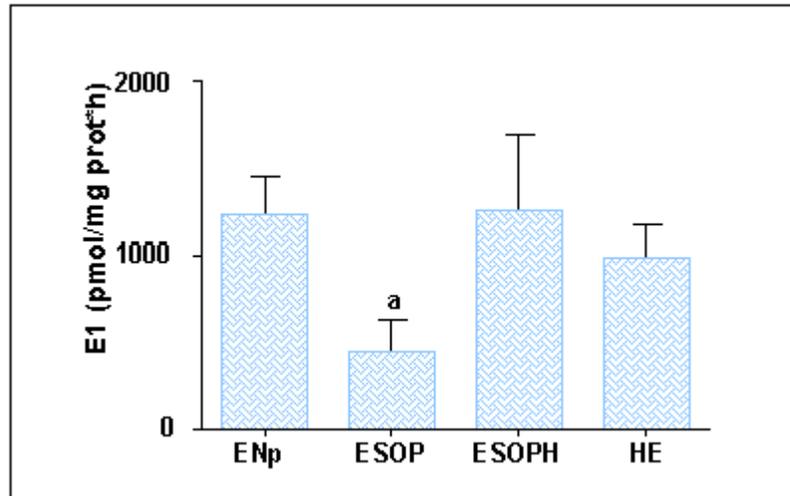


Figura 13. Actividad de 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) tipo 2 en endometrio humano. Este ensayo se realizó en endometrio: control (ENp), de mujeres SOP sin hiperplasia (ESOP) y con hiperplasia endometrial (ESOPH) y en mujeres con hiperplasia endometrial sin SOP (HE). Se utilizaron 7 ENp, 5 ESOP, 4 ESOPH y 2 HE. Los resultados se expresaron como la media de formación de estrona (E₁) \pm error estándar de la media. a: p<0.05 ESOP vs ENp.



VI.1.2.4. 5 α -reductasa

Esta enzima cataliza la transformación de T en DHT, la forma androgénica de mayor actividad. Se determinó la presencia proteica de la enzima 5 α -reductasa en todos los grupos analizados utilizando las técnicas de WB e IHQ. De este modo, se detectaron niveles proteicos elevados de la enzima para ESOP (p<0.05) y ESOPH vs ENp (p<0.01) por WB normalizado vs β -actina (Figura 14 a, b). Además, se detectó por inmunotinción que la enzima está localizada fundamentalmente en el citoplasma del epitelio glandular, con un patrón de tinción homogéneo para todos los grupos de endometrios estudiados (Figura 15). Como se muestra en la Figura 16, el análisis por IHQ corroboró los resultados obtenidos por WB. En efecto, se detectó una presencia mayor de la enzima en epitelio glandular (5 veces) y menor en el compartimiento estromal de ESOP (p<0.05) vs ENp. Además, se encontró niveles significativamente mayores de 5 α -reductasa en glándulas de ESOPH vs ENp (p<0.01) y también vs ESOP (p<0.01).

Figura 14. Semicuantificación proteica de la enzima 5α -reductasa por western blot. Se muestra: (a) Gel representativo de los resultados obtenidos, en cada carril se aplicaron 50ug del homogeneizado de proteínas totales para endometrios controles (ENp), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico sin hiperplasia endometrial (ESOP), y con hiperplasia endometrial (ESOPH) y de pacientes con hiperplasia endometrial (HE); (b) Análisis densitométrico de los resultados obtenidos. El número de pacientes utilizado fue n=5 para cada uno de los grupos analizados. Los valores se normalizaron vs β -actina y se expresaron como media \pm error estándar de la media; a: $p < 0.05$ vs ENp, b: $p < 0.01$ vs ENp.

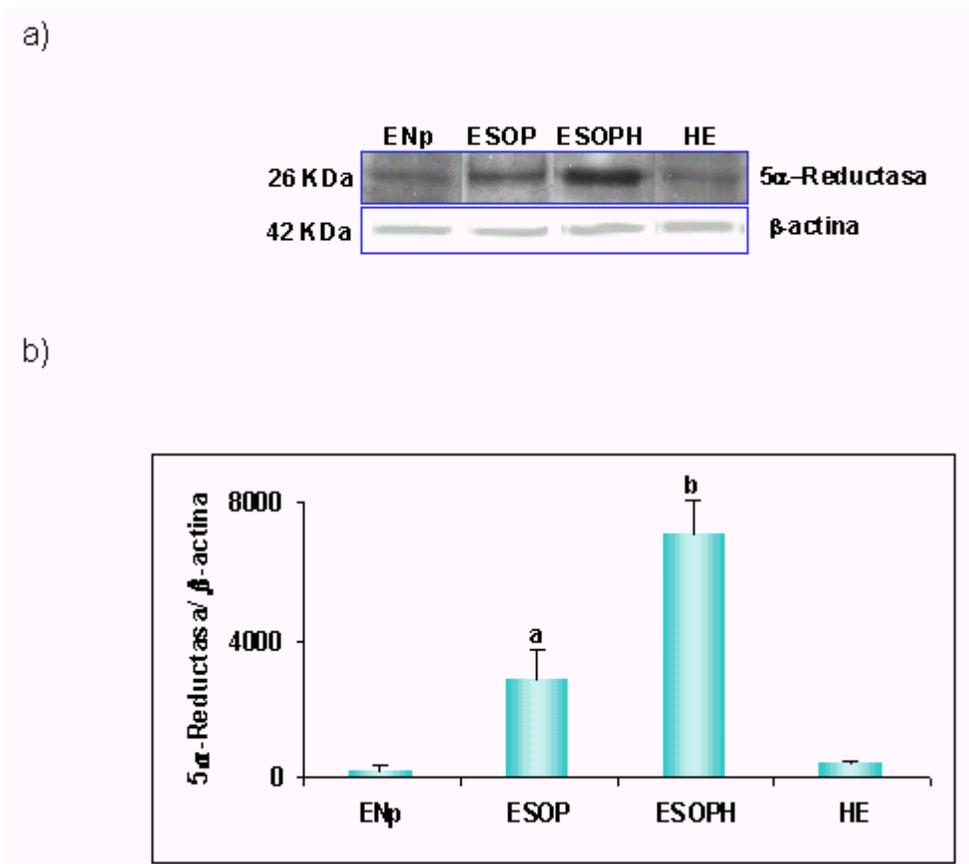


Figura 15. Inmunodetección de la enzima 5α -reductasa en endometrios. Se realizó inmunohistoquímica en los endometrios: control (ENp), de mujeres SOP sin hiperplasia endometrial (ESOP) y con hiperplasia (ESOPH) y en mujeres con hiperplasia endometrial sin SOP (HE). En todas las microfotografías el aumento corresponde a 400x, la barra representa 30 μm y las flechas indican tinción positiva. El control negativo, C(-), se muestra en el inserto.

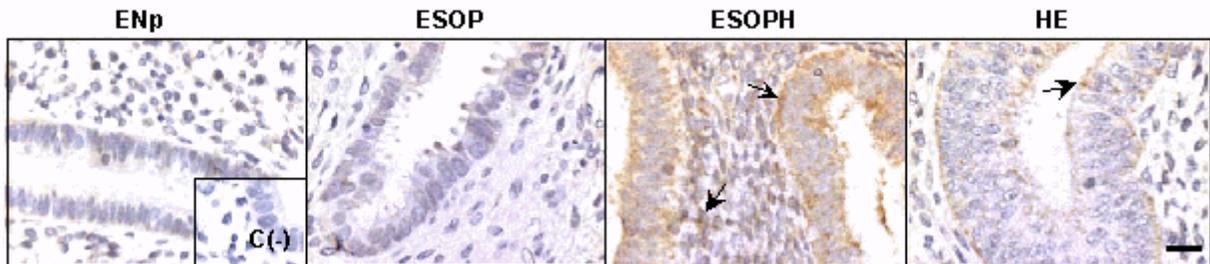
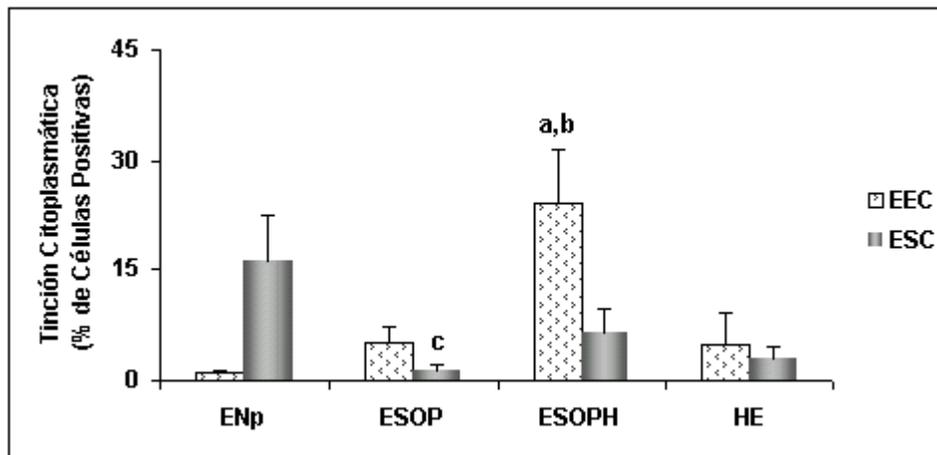


Figura 16. Expresión proteica de 5α -reductasa por inmunohistoquímica. Semicuantificación de la proteína en células epiteliales (EEC) y estromales (ESC) de endometrios: normal (ENp), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico (ESOP), de ESOP e hiperplasia endometrial (ESOPH) y de mujeres con hiperplasia endometrial (HE). El número de pacientes analizadas fue de siete para todos los grupos estudiados. Los resultados se expresaron como media del porcentaje de citoplasmas celulares positivos \pm error estándar de la media, a: $p < 0.01$ vs ENp; b: $p < 0.01$ vs ESOP; c: $p < 0.05$ vs ENp.



VI.2. OBJETIVO ESPECÍFICO 2:

Evaluar si los niveles de la proteína reguladora de la biodisponibilidad de esteroides SHBG en el endometrio *ex-vivo* de pacientes con SOP son similares a los de endometrios de mujeres controles.

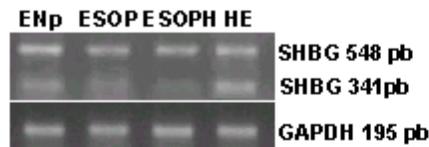
VI.2.1. Niveles de mRNA y proteína para SHBG

La SHBG es una glicoproteína reguladora de la biodisponibilidad esteroideal. Se analizó los niveles de las formas 548 pb y 341 pb para SHBG. La Figura 17 muestra que el nivel de la forma 548pb resultó ser significativamente mayor que el de la forma 341pb en ENp, ESOP y ESOPH. No obstante, los endometrios de pacientes con HE mostraron mayores niveles de la forma 341pb (Figura 17 a, b). Además, la relación entre la expresión de las formas 548 vs 341pb fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en todos los grupos analizados, al compararlos con los de HE (Figura 18).

Por otra parte, se observó inmunotinción positiva y homogénea para SHBG en el citoplasma de los dos compartimentos celulares, y para todos los endometrios estudiados (Figura 19). La semicuantificación por HScore indicó que la tinción positiva para SHBG fue mayor en epitelio que en estroma en todos los grupos analizados, siendo en ESOP significativamente menor en el estroma vs ENp ($p < 0.05$) (Figura 20).

Figura 17. Semicuantificación de la presencia de mRNA para la proteína SHBG. Se realizó RT-PCR convencional para endometrio humano: control (ENp), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico sin hiperplasia (ESOP) y con hiperplasia endometrial (ESOPH) y de mujeres con hiperplasia endometrial (HE). El número de endometrios utilizados fue n=5 para todos los grupos analizados. (a) Gel representativo de la presencia de las formas en los tejidos (electroforesis en gel de agarosa al 2% en presencia de bromuro de etidio). (b) Semicuantificación de la presencia de mRNA. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media. Se utilizó el mRNA para GAPDH como normalizador. a: $p < 0.05$ para la comparación de SHBG548/GAPDH vs SHBG341/GAPDH. b: $p < 0.05$ vs HE.

a)



b)

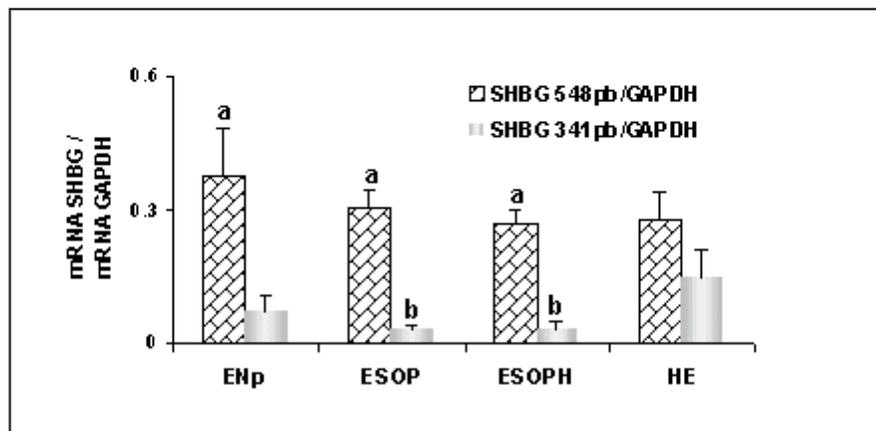


Figura 18. Relación de los niveles de mRNA SHBG 548pb/ SHBG 341pb. Se realizó RT-PCR convencional para endometrio humano: control (ENp), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico sin hiperplasia endometrial (ESOP) y con hiperplasia (ESOPH) y de mujeres con hiperplasia endometrial (HE). El número de endometrios utilizados fue n=5 para todos los grupos analizados. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media. Se utilizó GAPDH como normalizador. a: $p < 0.05$ vs HE.

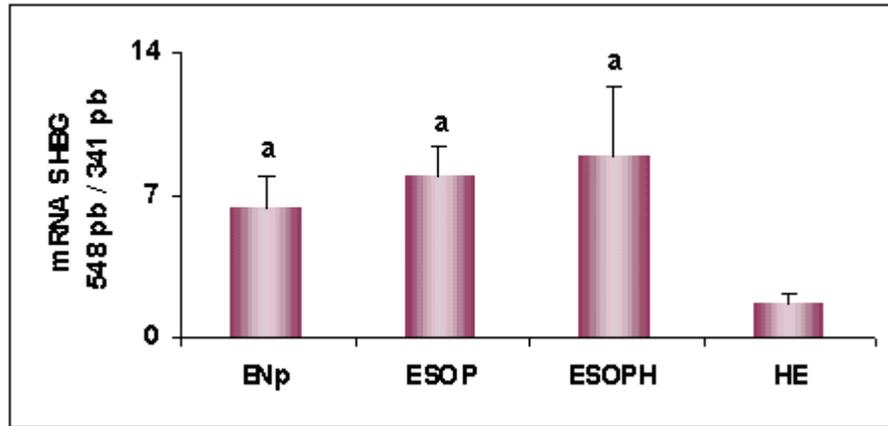


Figura 19. Inmunodetección de la proteína SHBG. Se realizó inmunohistoquímica en los endometrios: control (ENp), de mujeres SOP sin hiperplasia endometrial (ESOP) y con hiperplasia (ESOPH) y en mujeres con hiperplasia endometrial sin SOP (HE). En todas las microfotografías el aumento corresponde a 200x, la barra representa 30 μ m y las flechas indican tinción positiva. El control negativo, C(-), se muestra en el inserto.

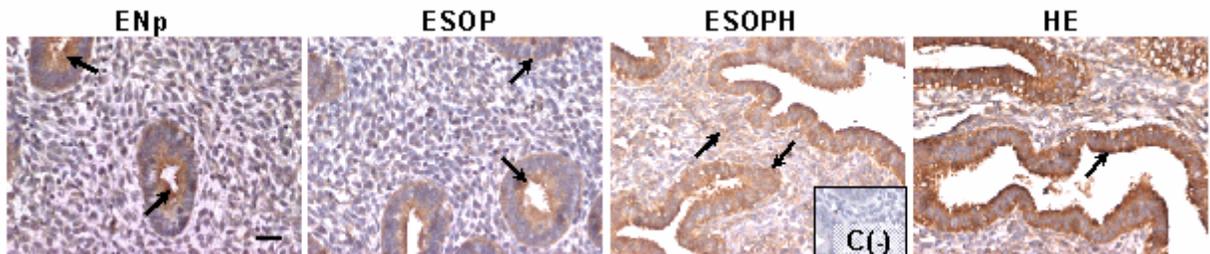
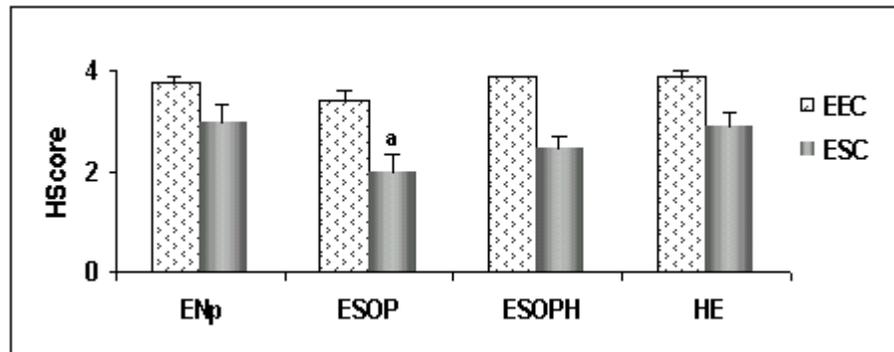


Figura 20. Semicuantificación por inmunohistoquímica de la glicoproteína SHBG. El ensayo se realizó en células epiteliales (EEC) y estromales (ESC) de endometrio: control (ENp), con síndrome de ovario poliquístico sin hiperplasia endometrial (ESOP) y con hiperplasia (ESOPH) e hiperplasia endometrial (HE). El número de pacientes analizadas fue de cinco para todos los grupos estudiados. Los resultados se expresaron como media del HScore \pm error estándar de la media. a: $p < 0.05$ vs ENp.



VI.3. OBJETIVO ESPECÍFICO 3:

Analizar en el endometrio *ex-vivo* de pacientes con SOP los niveles de esteroides intracelulares (E_2 , A_4 , T y P_4), y si estos difieren de los encontrados en endometrios controles.

VI.3.1. Concentración de esteroides en tejido endometrial

Las concentraciones de P_4 , E_2 , A_4 y T fueron medidas por RIA en trozos de endometrio humano para mujeres controles y mujeres con SOP. Los resultados de la Tabla 8 muestran que las concentraciones para todas las hormonas señaladas fueron similares en los dos tipos de endometrios estudiados. La T es, de los esteroides expuestos, el que presenta mayor concentración en endometrios humanos controles y SOP.

Tabla 8. Concentración de esteroides en trozos de endometrio humano

Hormonas	n	ENp 7	ESOP 7
P ₄ (pg/mg de tejido)		12,3 ± 2,6	9,5 ± 0,9
E ₂ (pg/mg de tejido)		20,9 ± 2,7	23,9 ± 1,9
A ₄ (pg/mg de tejido)		24,8 ± 3,6	30,0 ± 4,1
T (pg/mg de tejido)		138,1 ± 15,6	136,7 ± 12,8

Progesterona (P4), estradiol (E2), androstenediona (A4), testosterona (T), endometrio control proliferativo (ENp), endometrio de pacientes con síndrome de ovario poliquístico sin hiperplasia endometrial (ESOP). Los valores son expresados en media ± error estándar de la media.

VI.4. OBJETIVO ESPECÍFICO 4:

Investigar, *ex-vivo*, si en el endometrio de pacientes SOP se modifican la expresión y fosforilación del pRE α -Ser118; y de los co-reguladores de receptores esteroidales: ARA70 y NCoR.

VI.4.1. Expresión de mRNA y proteína de co-reguladores esteroidales

VI.4.1.1. Expresión del co-activador ARA70

Los endometrios de pacientes SOP son los que exhibieron la mayor expresión génica para ARA70 (RT-PCR normalizado con GAPDH) (Figura 21 a, b). Además, la localización subcelular de la proteína ARA70 fue alta y principalmente citoplasmática, tanto en el compartimiento epitelial como en el estromal, en todos los grupos de endometrios en estudio, mostrando un patrón de expresión similar entre ellos (Figuras 22 y 23).

Figura 21. Semicuantificación de la presencia de mRNA del co-activador de receptores esteroidales ARA70. Se realizó RT-PCR convencional en endometrio normal proliferativo (ENp), endometrios de pacientes con síndrome de ovario poliquístico (ESOP), ESOP con hiperplasia endometrial (ESOPH) y pacientes con hiperplasia endometrial (HE) no asociada a ESOP. El número de endometrios diferentes pertenecientes a pacientes analizadas en cada grupo fue de cinco. (a) El gel muestra una imagen representativa de los resultados obtenidos para cada grupo de estudio. (b) Semicuantificación de los niveles de mRNA en los grupos estudiados. Los valores son expresados como media \pm error estándar. Los resultados fueron normalizados con GAPDH. a: $p < 0,05$ vs ESOPH e HE.

a)



b)

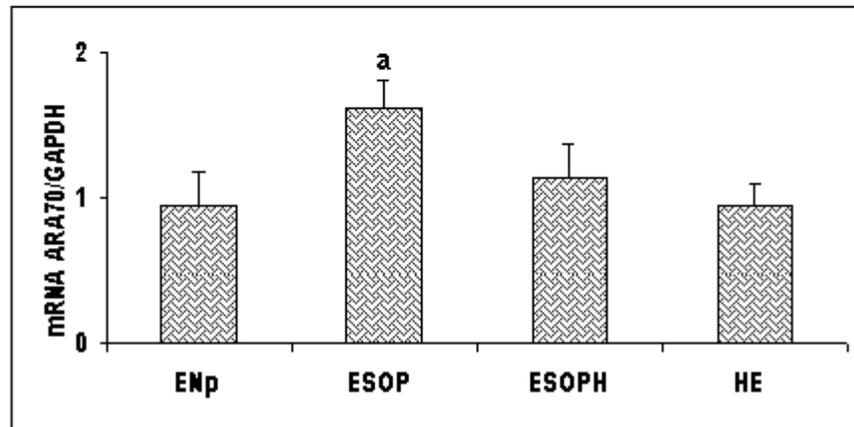


Figura 22. Inmunodetección del co-activador ARA70. Se realizó inmunohistoquímica en los endometrios: control (ENp), de mujeres SOP (ESOP), ESOP con hiperplasia endometrial (ESOPH) y en mujeres con hiperplasia endometrial no asociada a ESOP (HE). En todas las microfotografías el aumento corresponde a 400x, la barra representa 30 μm y las flechas indican tinción positiva. El control negativo, C(-), se muestra en el inserto.

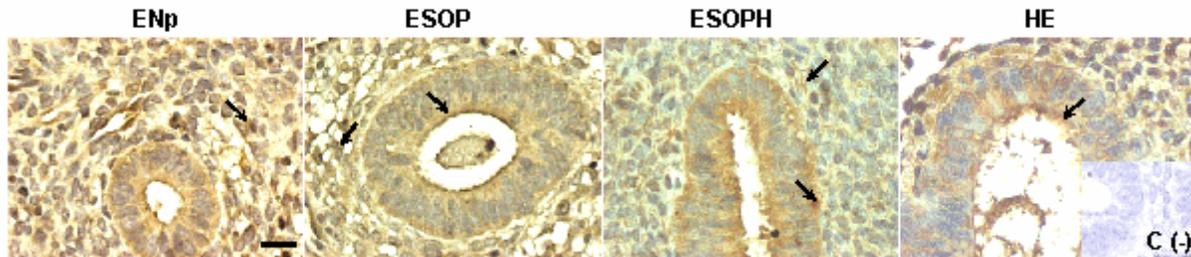
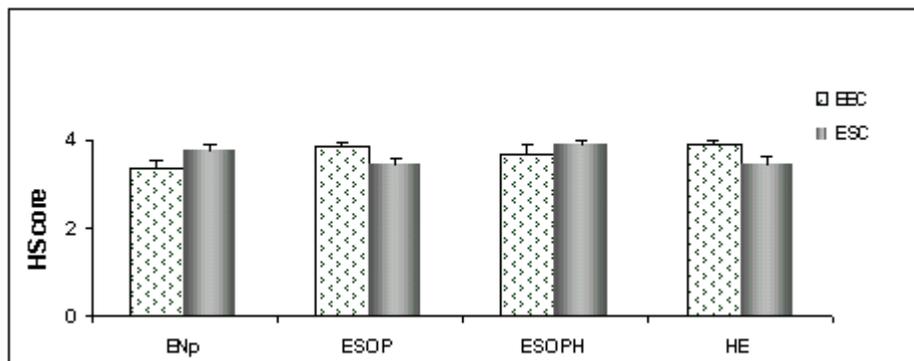


Figura 23. Semicuantificación por inmunohistoquímica del co-activador ARA70. La semicuantificación se realizó en células epiteliales (EEC) y estromales (ESC) de endometrio: control (ENp, n=5), con síndrome de ovario poliquístico sin hiperplasia (ESOP, n=7), ESOP con hiperplasia endometrial (ESOPH, n=4) e hiperplasia endometrial (HE, n=3). Los resultados se expresaron como media de HScore \pm error estándar de la media.



VI.4.1.2. Co-represor NCoR

La evaluación de los niveles génicos del co-represor NCoR, normalizados con GAPDH (Figura 24), muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de endometrios en estudio. Por otro lado, la inmunodetección de NCoR (Figura 25) señala que esta proteína posee una localización fundamentalmente citoplasmática, en ambos compartimientos celulares y en todos los grupos de endometrios estudiados. La semicuantificación de NCoR mediante HScore muestra un aumento significativo de la expresión en los tejidos de ESOP,

ESOPH; ($p < 0.01$) e HE ($p < 0.05$), respecto al control, fundamentalmente por la mayor expresión citoplasmática de esta proteína (Figura 26 a, b). Es importante destacar que la localización citoplasmática de NCoR sugiere que su acción represora estaría restringida en estos tejidos.

Figura 24. Semicuantificación de los niveles de mRNA para el co-represor NCoR. El análisis se realizó por RT-PCR convencional para endometrios controles (ENp, $n=5$), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico (ESOP, $n=7$), ESOP e hiperplasia endometrial (ESOPH, $n=4$) y para pacientes con hiperplasia endometrial (HE, $n=5$). (a) Gel de agarosa representativo de los resultados obtenidos para NCoR. (b) Semicuantificación de los resultados obtenidos. Los valores fueron normalizados con GAPDH y son expresados como media \pm error estándar.

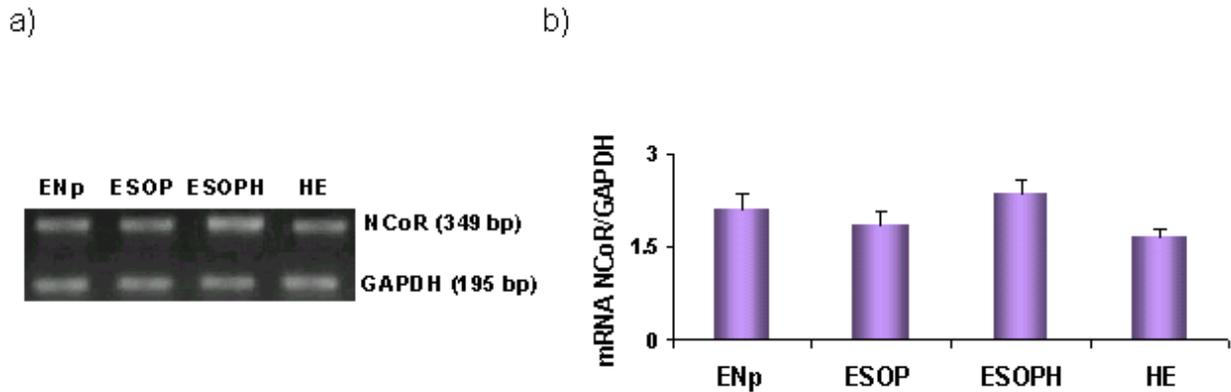


Figura 25. Inmunodetección del co-represor NCoR. Se realizó inmunohistoquímica en los endometrios: control (ENp), de mujeres SOP (ESOP), ESOP con hiperplasia endometrial (ESOPH) y en endometrios de mujeres con hiperplasia endometrial no asociada a ESOP (HE). En todas las microfotografías el aumento corresponde a 400x, la barra representa 30 μ m y las flechas indican tinción positiva. El control negativo, C(-), se muestra en el inserto.

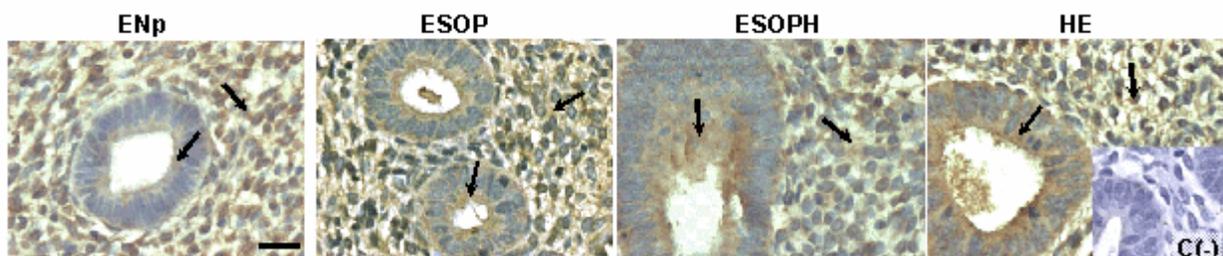
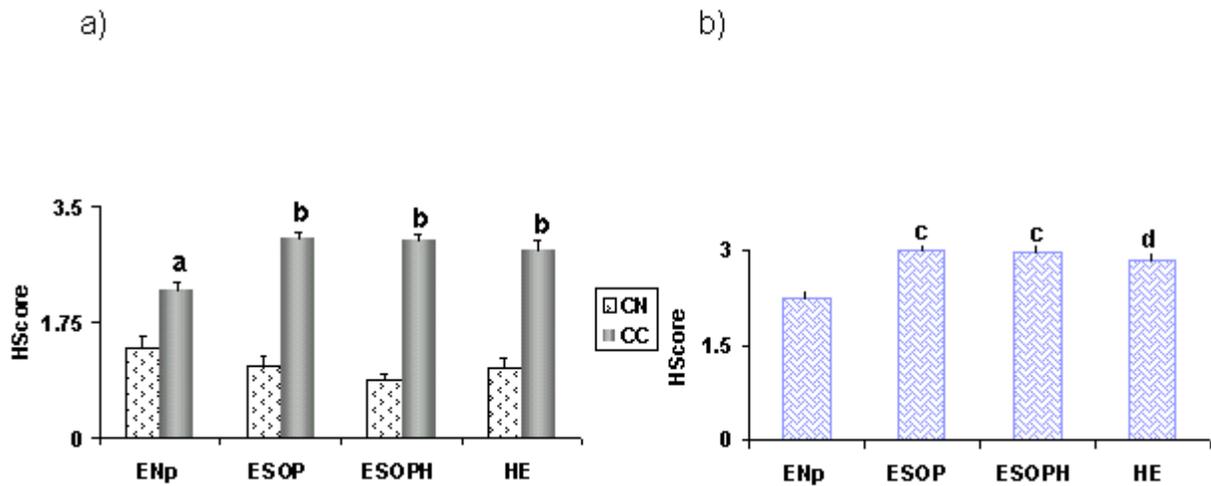


Figura 26. Semicuantificación por inmunohistoquímica del co-represor NCoR. La determinación se realizó en endometrio: control (ENp), con síndrome de ovario poliquístico (ESOP), ESOP con hiperplasia endometrial (ESOPH) e hiperplasia endometrial (HE). (a) Comparación en los niveles de expresión para los compartimientos nuclear (CN) y citoplasmático (CC). (b) Presencia del co-represor en los citoplasmas del tejido endometrial. El número de muestras fue n=4 para todos los grupos analizados. Los resultados se expresaron como media HScore \pm error estándar de la media. a: $p < 0.01$ vs CN. b: $p < 0.001$ vs CN, c: $p < 0.01$ vs ENp, d: $p < 0.05$ vs ENp.



VI.4.2. Fosforilación en Ser 118 del RE α .

La fosforilación en Ser 118 del RE α se ha establecido como un importante modulador de su actividad transcripcional. Los resultados del WB mostrados en la Tabla 9, indican que la relación pRE α -Ser118/RE α fue mayor en ESOP, ESOPH e HE; ($p < 0.05$) vs ENp, sugiriendo una actividad aumentada del RE α en dichos endometrios.

Tabla 9. Fosforilación en Ser 118 del receptor de estrógeno alfa (pRE α -Ser118)

Endometrios	n	Veces Control
ENp	8	1.00
ESOP	7	1.72
ESOPH	5	2.67 ^a
HE	3	5.67 ^a

La fosforilación se detectó por western blot, en extractos proteicos totales de endometrios: controles (ENp), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico (ESOP), de pacientes con SOP e hiperplasia (ESOPH) y endometrios con hiperplasia endometrial no asociada a ESOP (HE, n = 7). Se realizó análisis densitométrico de las bandas obtenidas, se normalizó vs β -actina y se comparó respecto al receptor de estrógeno alfa (RE α) en los endometrios estudiados. n: número de endometrios distintos utilizados, a: p<0.05 vs ENp.

VI.5. OBJETIVO ESPECÍFICO 5:

Establecer, *ex-vivo*, si en el endometrio de pacientes SOP, se alteran reguladores del ciclo celular: ciclina D1, ciclina E, p27, al compararlos con los endometrios controles.

VI.5.1. Presencia del regulador de ciclo celular ciclina D1

La ciclina D1 fue inmunodetectada en todos los grupos de endometrios analizados, con una presencia homogénea y fundamentalmente citoplasmática, tanto para glándulas como para el estroma endometrial. Además, la proteína tuvo una localización significativamente mayor en los núcleos y citoplasmas de los endometrios con HE vs ENp (Figura 27). Por otra parte, los núcleos de las células mostraron para ESOP un aumento en la presencia de ciclina D1 de 400% y 138 % para las células epiteliales y estromales, respectivamente, respecto al endometrio control. Para los citoplasmas, las células epiteliales glandulares de ESOP mostraron un aumento significativo en la presencia de esta proteína al compararlas con los endometrios controles (p<0.05) (Tablas 10, 11). Así mismo, los resultados del WB fueron similares a los de la IHQ, existiendo una tendencia a mayor expresión de ciclina D1 en ESOP (28%) respecto a ENp (Figura 28).

Figura 27. Inmunotinción para ciclina D1. La inmunotinción se realizó en endometrios: controles (ENp), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico (ESOP), de ESOP con hiperplasia (ESOPH) y endometrios con hiperplasia endometrial no asociada a SOP (HE). En todas las microfotografías el aumento corresponde a 400x, la barra representa 30 μ m y las flechas indican tinción positiva. El control negativo, C(-), se muestra en el inserto.

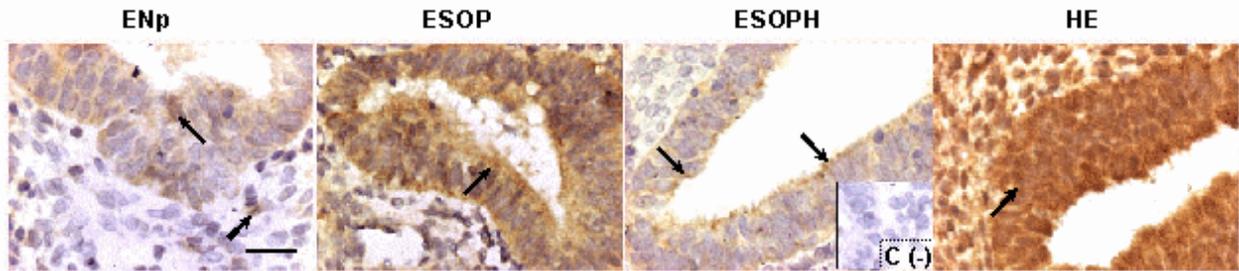


Tabla 10. Semicuantificación por inmunohistoquímica del regulador de ciclo celular ciclina D1 en núcleos celulares

	n	EEC	ESC
ENp	5	4.2 ± 2.6	4.2 ± 3.9
ESOP	7	20.1 ± 7.7	10.0 ± 4.6
ESOPH	4	3.2 ± 2.6	5.8 ± 4.8
HE	4	68.2 ± 24.5 ^a	64.9 ± 25.1 ^a

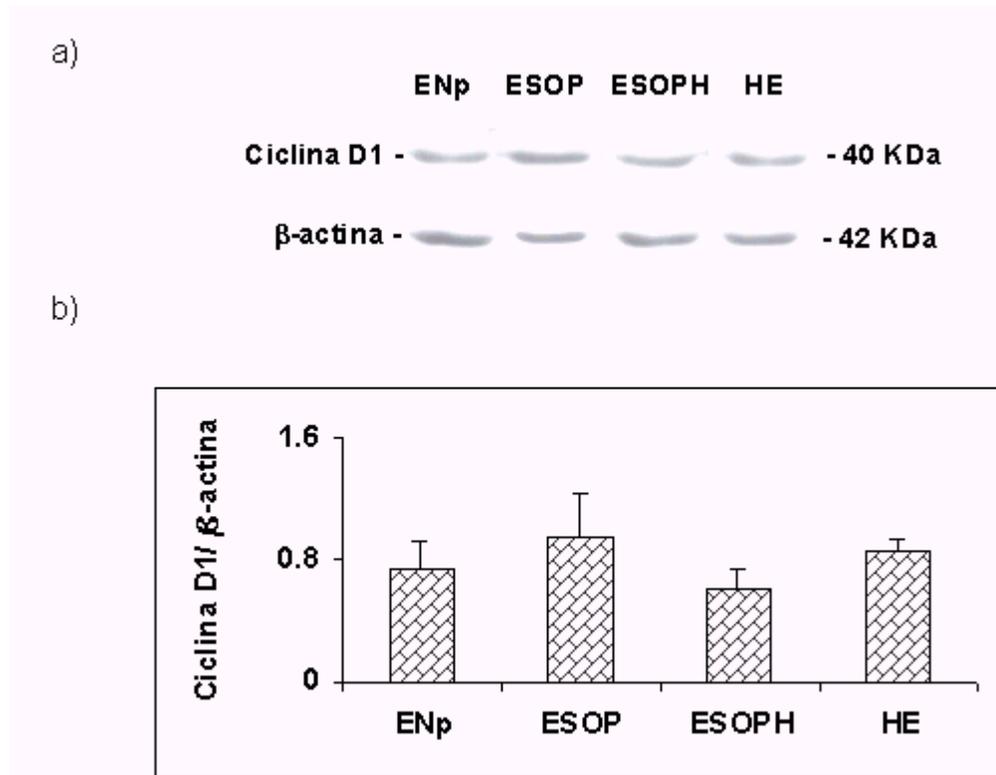
La semicuantificación se realizó para las células epiteliales (EEC) y estromales (ESC) de endometrios: controles (ENp), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico sin hiperplasia endometrial (ESOP) y con hiperplasia endometrial (ESOPH) y de mujeres con hiperplasia endometrial (HE). Los resultados se expresaron como la media del porcentaje de células positivas ± error estándar de la media. a: p<0.05 vs ENp.

Tabla 11. Semicuantificación por inmunohistoquímica del regulador de ciclo celular ciclina D1 en citoplasmas celulares

	n	EEC	ESC
ENp	5	70.6 ± 6.3	21.7 ± 13.4
ESOP	7	86.5 ± 2.5 ^a	19.1 ± 2.9
ESOPH	4	59.2 ± 5.4	12.4 ± 7.5
HE	4	95.0 ± 5.0 ^a	86.2 ± 7.8 ^b

La semicuantificación se realizó en las células epiteliales (EEC) y estromales (ESC) de endometrios: controles (ENp), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico sin hiperplasia (ESOP) y con hiperplasia endometrial (ESOPH) y de mujeres con hiperplasia endometrial no asociada a ESOP (HE). Los resultados se expresaron como la media del porcentaje de células positivas ± error estándar de la media. a: p<0.05 vs ENp, b: p<0.01 vs ENp.

Figura 28. Semicuantificación de la proteína ciclina D1. Se realizó en extractos proteicos totales por técnicas de western blot para endometrios: normal proliferativo (ENp, n=5), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico (ESOP, n=5), ESOP con hiperplasia endometrial (ESOPH, n=4) e hiperplasia endometrial (HE, n=4). (a) Gel representativo del análisis por Western blot, (b) Análisis densitométrico de los resultados obtenidos por western blot, los valores se normalizaron vs β -actina y se expresaron como media \pm error estándar.



VI.5.2. Niveles de ciclina E

La semicuantificación de la proteína ciclina E reveló que la expresión de dicha proteína es similar entre los distintos grupos de endometrios estudiados, al analizarlos por WB (Figura 29 a, b). Sin embargo, al inmunodetectar la ciclina E en los diferentes compartimentos subcelulares, se encontró que esta proteína estaba presente principalmente en las células epiteliales de los 4 grupos de endometrios en estudio. Además, observamos una expresión significativamente menor de esta proteína en núcleos de células epiteliales de ENp, ESOP y ESOPH respecto a HE ($p < 0.05$) (Figura 30, 31).

Figura 29. Semicuantificación de la proteína ciclina E por western blot. Se realizó en extractos proteicos totales para endometrios: normal proliferativo (ENp, n=5), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico (ESOP, n=5), ESOP con hiperplasia endometrial (ESOPH, n=4) e hiperplasia endometrial (HE, n=4). (a) Gel representativo del análisis por western blot; control positivo, C (+): carcinoma endometrial. (b) Análisis densitométrico de los resultados obtenidos por western blot, los valores se normalizaron vs β -actina y se expresaron como porcentaje del basal \pm error estándar.

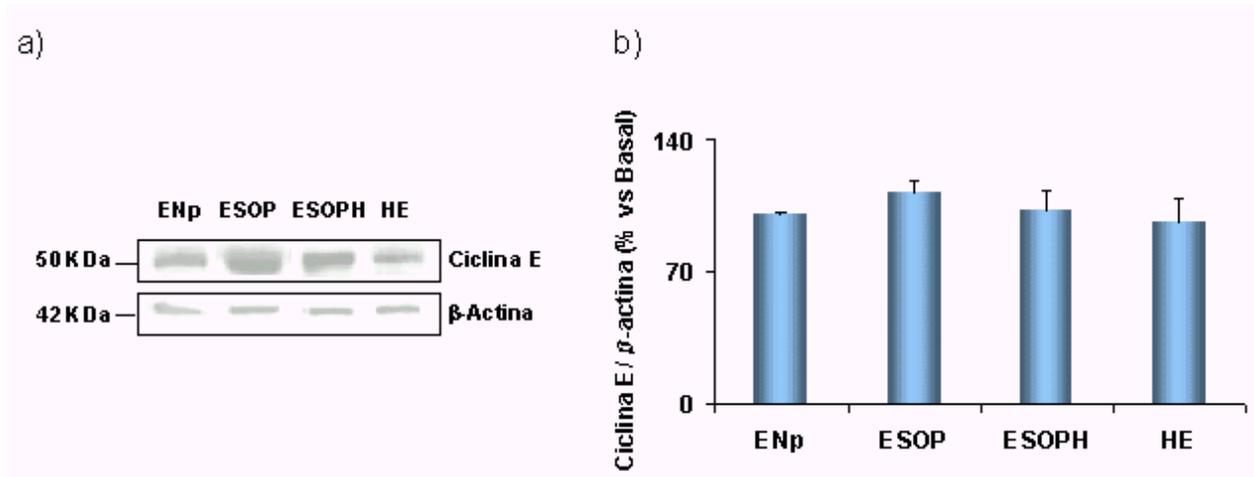


Figura 30. Inmunodetección de ciclina E. Se realizó inmunohistoquímica en los endometrios: control (ENp), de mujeres SOP sin hiperplasia endometrial (ESOP) y con hiperplasia endometrial (ESOPH) y en mujeres con hiperplasia endometrial no asociada a SOP (HE). En todas las microfotografías el aumento corresponde a 400x, la barra representa 30 μ m y las flechas indican tinción positiva. El control negativo, C(-), se muestra en el inserto.

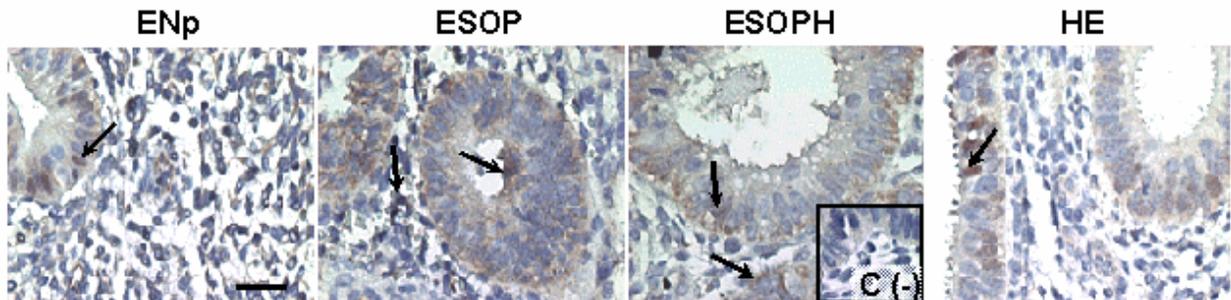
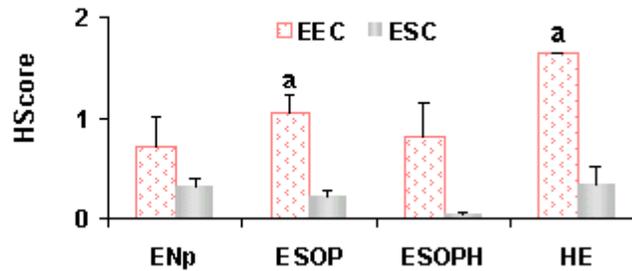
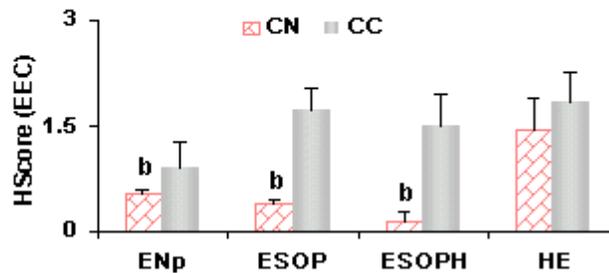


Figura 31. Semicuantificación de la proteína ciclina E por IHQ. Se realizó para endometrios: normal proliferativo (ENp, n=5), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico (ESOP, n=5), ESOP con hiperplasia endometrial (ESOPH, n=4) e hiperplasia endometrial (HE, n=4). (a) Semicuantificación de la proteína por inmunohistoquímica en células epiteliales (EEC) y estromales (ESC) y (b) En los compartimentos: nuclear (CN) y citoplasmático (CC) de EEC. Los valores son expresados como media del HScore \pm error estándar. a: $p < 0,01$ vs ESC, b: $p < 0,05$ vs HE.

a)



b)



VI.5.3. Inhibidor del ciclo celular p27

El análisis por IHQ de la proteína p27 mostró una expresión tanto nuclear como citoplasmática en las células endometriales (Figura 32). Se encontró una reducción significativa de la expresión nuclear de p27 en las células estromales de ESOP y ESOPH ($p < 0.05$), así como, un aumento de la expresión citoplasmática para ESOP (Figura 33 a y b). Al realizar la semicuantificación de la proteína p27 por WB (Figura 34), no se encontró diferencias en la expresión de la proteína en los endometrios *ex-vivo* de los grupos analizados.

Figura 32. Inmunotinción para la proteína p27. Se realizó inmunohistoquímica en los endometrios: control (ENp), de mujeres SOP sin hiperplasia endometrial (ESOP) y con hiperplasia endometrial (ESOPH) y en mujeres con hiperplasia endometrial no asociada a ESOP (HE). En todas las microfotografías el aumento corresponde a 400x, la barra representa 30 μ m y las flechas indican tinción positiva. El control negativo, C(-), se muestra en el inserto.

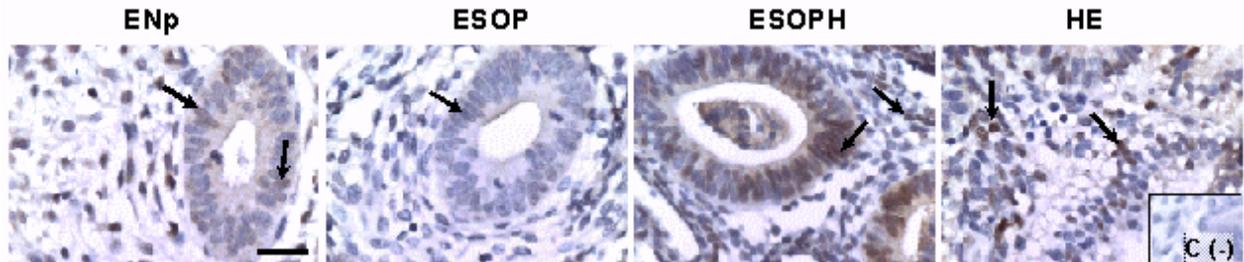


Figura 33. Semicuantificación por inmunohistoquímica del inhibidor de ciclo celular p27. El ensayo se realizó en células epiteliales (EEC) y estromales (ESC) de endometrios: controles (ENp), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico sin hiperplasia (ESOP) y con hiperplasia endometrial (ESOPH) y de mujeres con hiperplasia endometrial (HE). (a) Inmunotinción nuclear para EEC y ESC, (b) Inmunotinción para los citoplasmas celulares del tejido. El número de muestras analizadas fue n=6 para todos los grupos estudiados, a: $p < 0.05$ vs ENp.

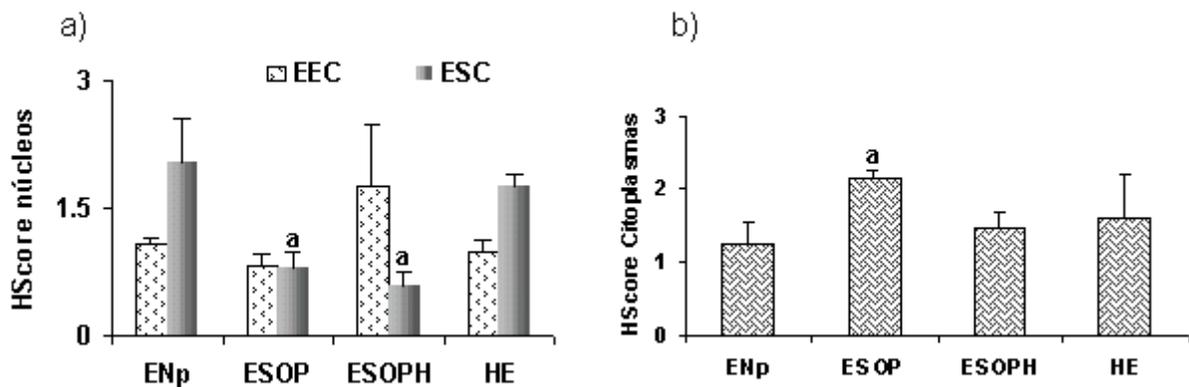
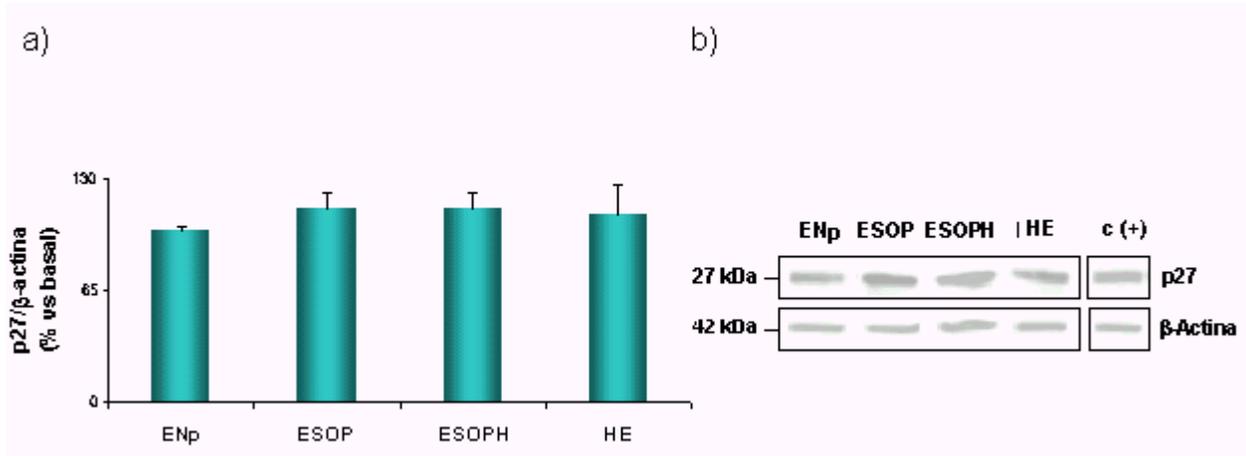


Figura 34. Expresión del inhibidor de ciclo celular p27 por western blot. El análisis se realizó en extractos proteicos totales. (a) Análisis densitométrico para los endometrios: normal proliferativo (ENp, n=10), con síndrome de ovario poliquístico (ESOP, n=10), ESOP con hiperplasia (ESOPH, n=9) e hiperplasia endometrial no asociada a ESOP (HE, n=7). (b) Gel representativo de los resultados obtenidos. Como control positivo, c (+), se utilizaron endometrios de pacientes con carcinoma endometrial. Los valores son expresados como media \pm error estándar. Los resultados se normalizaron respecto β - actina.



VI.6. OBJETIVO ESPECÍFICO 6:

Evaluar, *ex-vivo*, si en el endometrio de pacientes SOP, los niveles de proteínas de la vía de señalización TGF- β relacionadas al control de la homeostasis tisular: Smad2, Smad3, pSmad2, pSmad3 y Smad4, difieren de la expresión en endometrios controles.

VI.6.1. Smad 2,3 y sus formas fosforiladas

Las proteínas Smad2 y Smad3 son activadas por fosforilación como resultado de la unión de TGF- β a su receptor, modulando la homeostasis tisular. En la Figura 35 a y b, se muestran los resultados de WB para la proteína Smad2, observándose una reducción en la expresión de las proteínas en ESOP (34%), ESOPH (65%) e HE (73%, $p < 0.05$) comparados a los ENp. Por otra parte, se determinaron los niveles de Smad3 por WB observándose una disminución en la presencia de la proteína en ESOPH de un 93% respecto a ENp (Figura 35 a y c). Además, se determinó la presencia de las formas fosforiladas (activas) de estas proteínas en los grupos de endometrios analizados. Los resultados mostraron inmunotinción nuclear para pSmad2, tanto para glándulas como para el estroma, y una disminución de la activación de esta proteína en los

ESOPH ($p < 0.05$) (Figura 36 a y 37 a). La inmunodetección para pSmad3 fue menor que para pSmad2 en todos los endometrios estudiados, con una localización fundamentalmente nuclear y glandular. Se evidenció una disminución de pSmad3 en ESOPH ($p < 0.05$) y también en las células estromales de ESOP ($p < 0.05$) respecto a ENp (Figura 36 b y Figura 37 b y c).

VI.6.2. Inmunotinción para Smad4

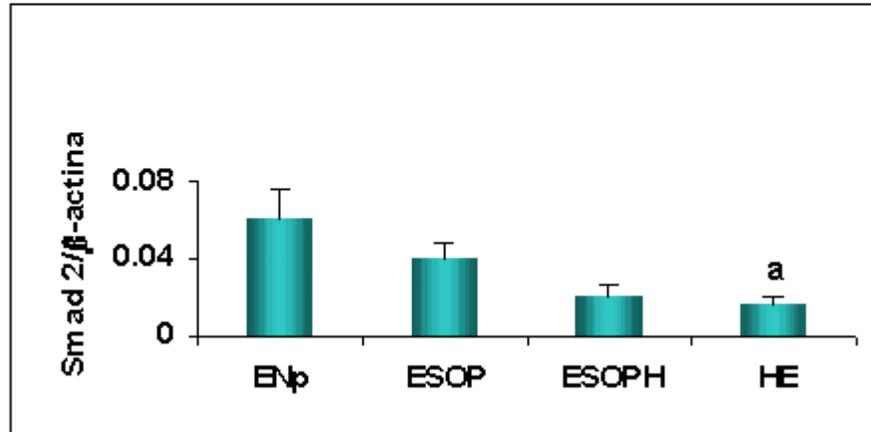
Por su parte, la proteína Smad4 que forma heterodímeros y heterotrímeros con pSmad2 y pSmad3, los cuales translocan al núcleo para activar la transcripción génica, se encontró presente en los núcleos y citoplasmas celulares en el estroma y fundamentalmente en el epitelio celular. Los resultados mostraron que esta proteína se encuentra disminuida en los núcleos de ESOP, específicamente para las células estromales ($p < 0.05$) (Figura 36 c y Figura 38 a). No se observaron diferencias en los niveles citoplasmáticos de la proteína en los endometrios analizados (Figura 38 b). Dada la regulación negativa que ejercen estas proteínas en la proliferación celular de epitelios celulares y la interacción funcional que existe entre estroma y epitelio glandular, estos resultados sugieren que la proliferación celular está favorecida en estos endometrios.

Figura 35. Expresión de proteínas Smads por WB. La determinación se realizó en extractos proteicos totales de endometrios: controles (ENp, n = 6), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico (ESOP, n = 9), de ESOP con hiperplasia (ESOPH, n = 4) y endometrios con hiperplasia endometrial no asociada a ESOP (HE, n = 7), por análisis densitométrico de las bandas obtenidas. (a) Gel representativo de los resultados obtenidos; (b) Smad2 normalizado vs β -actina; (c) Smad3 normalizado vs β -actina. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media. a: $p < 0.05$ vs ENp.

a)



b)



c)

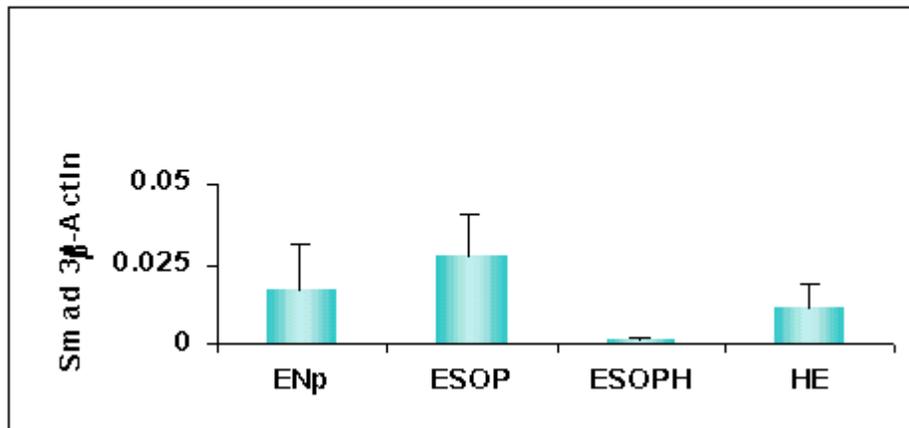


Figura 36. Inmunotinción para las proteínas Smads: a) pSmad2, b) pSmad3 y c) Smad4. Se realizó inmunohistoquímica para endometrios: controles (ENp), de pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico (ESOP) de ESOP con hiperplasia (ESOPH) y endometrios con hiperplasia endometrial no asociada a ESOP (HE). En las microfotografías el aumento corresponde a 400x (para pSmad2 y Smad4) y 200x (pSmad3), la barra representa 30 μm y las flechas indican tinción positiva. El control negativo, C(-), se muestra en el inserto.

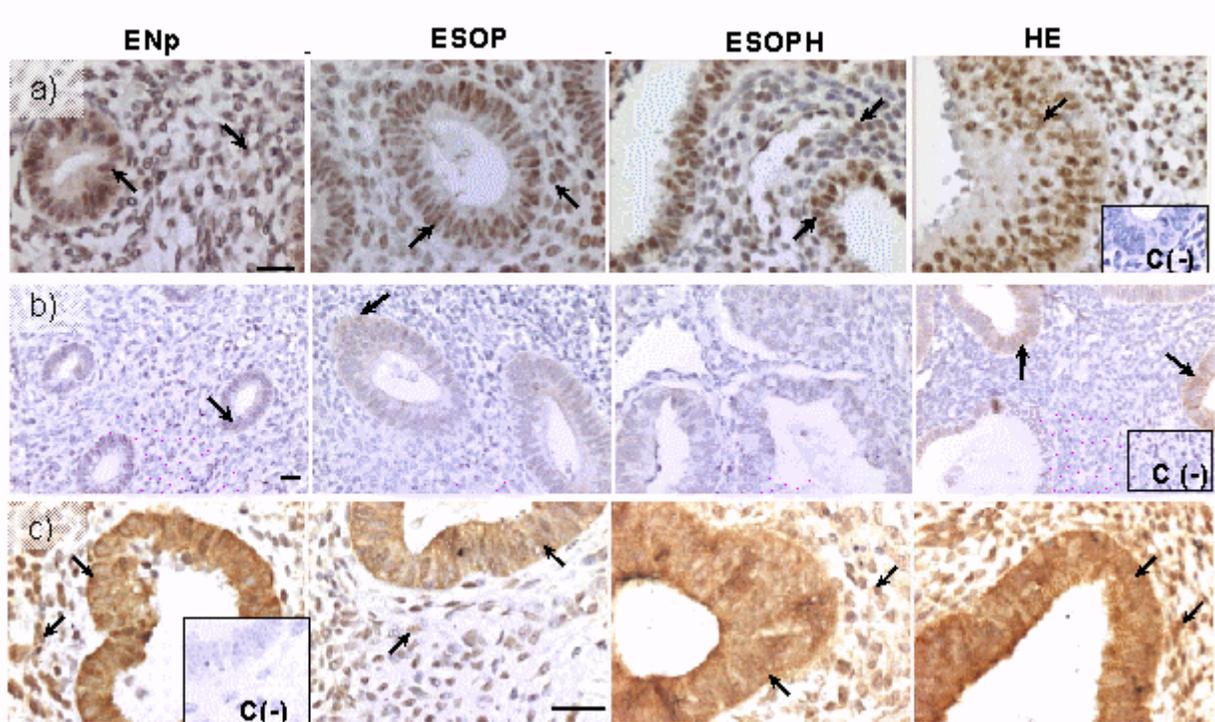
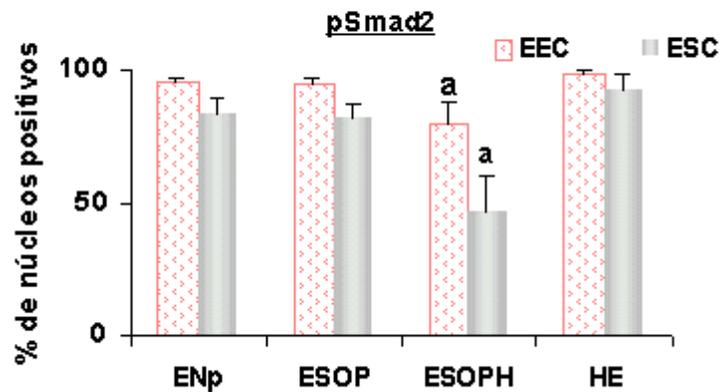
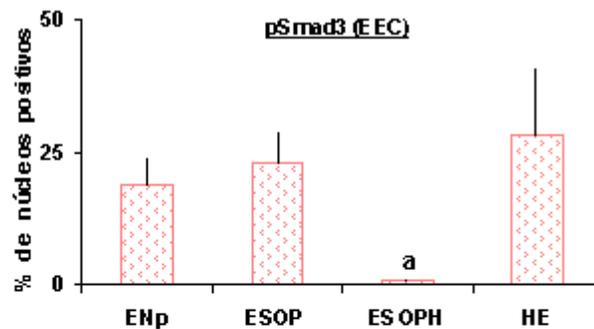


Figura 37. Semicuantificación de la inmunotinción nuclear de las fosfoproteínas pSmad2 y pSmad3. (a) Presencia de pSmad2 en células epiteliales (EEC) y estromales (ESC) de endometrios: controles (ENp, n=10), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico sin hiperplasia endometrial (ESOP, n=12) y con hiperplasia endometrial (ESOPH, n=4) y de mujeres con hiperplasia endometrial (HE, n=4). (b, c) Niveles de pSmad3 en EEC y ESC de ENp, n=10; ESOP, n=12; ESOPH, n=4 y HE, n=4. Los resultados se expresaron como la media del porcentaje de núcleos positivos \pm error estándar de la media. a: $p < 0.05$ vs ENp.

a)



b)



c)

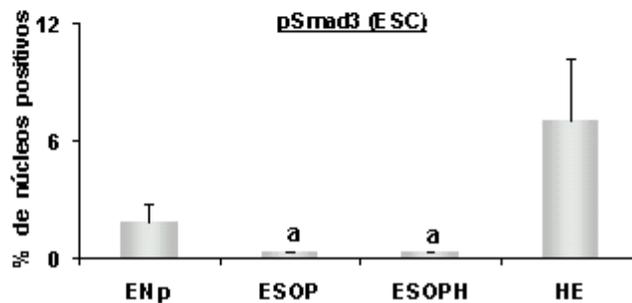
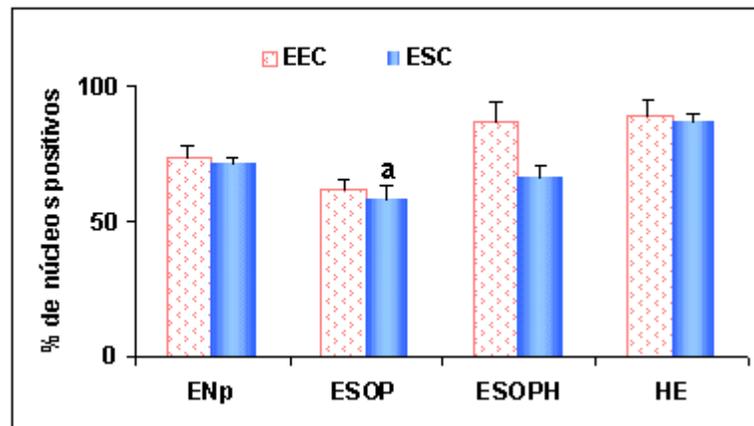
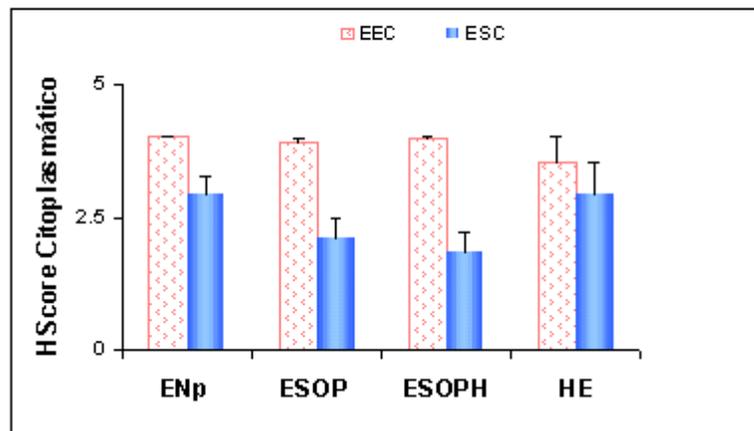


Figura 38. Semicuantificación por inmunohistoquímica de la proteína Smad4. El ensayo se realizó para células epiteliales (EEC) y estromales (ESC) de endometrios: controles (ENp, n=9), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico sin hiperplasia endometrial (ESOP, n=7) y con hiperplasia endometrial (ESOPH, n=5) y de mujeres con hiperplasia endometrial (HE, n=4). (a) Presencia de la proteína Smad4 en los núcleos de EEC y ESC. (b) Semicuantificación de la presencia de Smad4 en el citoplasma. Los resultados se expresaron como la media del porcentaje de núcleos positivos \pm error estándar de la media o como HScore para los citoplasmas celulares; a: $p < 0.05$ vs ENp.

a)



b)



VI.7. OBJETIVO ESPECÍFICO 7:

Determinar, *ex-vivo*, si la expresión de la proteína reguladora del control de la homeostasis tisular β -catenina en el endometrio de pacientes SOP es diferente a la de endometrios controles.

VI.7.1. Proteína β -catenina

La proteína β -catenina total (formas fosforiladas y no fosforiladas por GSK 3- β) se encontró presente tanto en células epiteliales como en células estromales en los grupos de endometrios incluidos en este trabajo. La detección positiva fue fundamentalmente en los citoplasmas y la tinción fue de carácter heterogéneo, encontrándose mayormente en los límites celulares para todos los grupos de endometrios. Al analizar los núcleos celulares (Tabla 12), se encontró un aumento significativo de la presencia de la proteína total en los núcleos del estroma para HE respecto a ESOP y ESOPH. Para los citoplasmas celulares no se evidenció diferencias en la presencia de la proteína total entre los grupos de estudios (Tabla 13). Cuando determinamos por WB la presencia proteica de la forma no marcada para degradación por la acción de la GSK 3- β , ésta se encontró aumentada significativamente en ESOP ($p < 0.05$) vs ENp (Figura 39 a, b). El patrón de tinción por inmunohistoquímica para la β -catenina no fosforilada por GSK-3 β fue similar al patrón observado para la forma total, tinción fundamentalmente epitelial y heterogénea, encontrándose mayor presencia de la proteína en los límites celulares (Figura 40). Por otra parte, se observó un aumento significativo de la presencia de la proteína nuclear en el estroma de ESOP, ESOPH y HE vs ENp; ($p < 0.05$) (Figura 41).

Tabla 12. Nivel total de β -catenina total (forma fosforilada y no fosforilada por GSK-3 β) en los núcleos celulares

	n	EEC	ESC
ENp	9	26.1 \pm 7.2	14.4 \pm 5.3
ESOP	7	10.1 \pm 2.9	9.5 \pm 3.6 ^a
ESOPH	5	25.2 \pm 13.0	6.8 \pm 1.8 ^b
HE	4	30.2 \pm 20.1	30.3 \pm 2.8

Endometrio normal proliferativo, control (ENp), de mujeres con síndrome de ovario poliquístico (ESOP), ESOP con hiperplasia endometrial (ESOPH), endometrios de mujeres con hiperplasia endometrial no asociada a ESOP (HE), células epiteliales (EEC), células estromales (ESC), número de sujetos utilizados (n). Los resultados se expresan como la media del % de núcleos positivos \pm error estándar.

Tabla 13. Nivel total de β -catenina total (forma fosforilada y no fosforilada por GSK-3 β) en citoplasmas celulares

	n	EEC	ESC
ENp	9	3.6 \pm 0.1	2.7 \pm 0.1
ESOP	7	3.9 \pm 0.1	2.8 \pm 0.1
ESOPH	5	3.6 \pm 0.2	2.2 \pm 0.2
HE	4	3.5 \pm 0.3	2.3 \pm 0.3

Endometrio normal proliferativo, control (ENp), de mujeres con síndrome de ovario poliquístico (ESOP), ESOP con hiperplasia endometrial (ESOPH), endometrios de mujeres con hiperplasia endometrial no asociada a ESOP (HE), células epiteliales (EEC), células estromales (ESC), número de sujetos utilizados (n). Los resultados se expresan como la media del HScore \pm error estándar.

Figura 39. Semicuantificación de β -catenina no fosforilada por GSK-3 β por western blot (WB). El WB se realizó en homogeneizados de proteínas totales. (a) Gel representativo de electroforesis (SDS-PAGE) para endometrios de mujeres controles (ENp, n=4), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico (ESOP, n=8), ESOP con hiperplasia endometrial (ESOPH, n=9) y con hiperplasia endometrial no asociada a ESOP (HE, n=4). (b) Análisis densitométrico de los resultados obtenidos, normalizados vs β -actina. a: $p < 0.05$ vs ENp.



b)

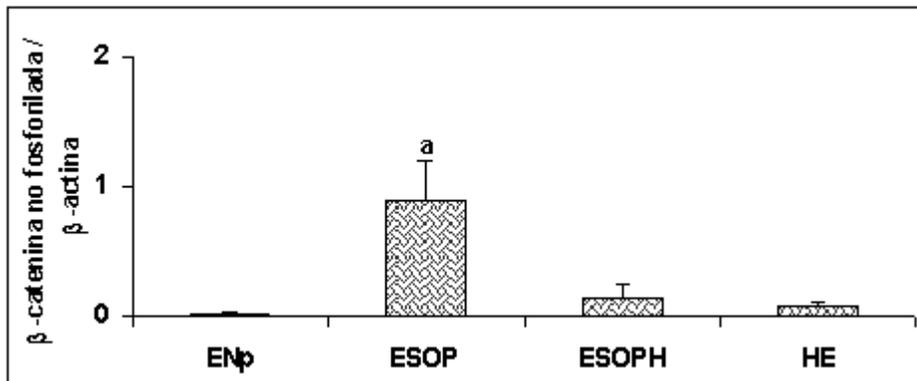


Figura 40. Inmunotinción para la proteína β -catenina no fosforilada por GSK-3 β . La inmunohistoquímica se realizó para endometrios de mujeres controles (ENp), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico (ESOP), ESOP con hiperplasia endometrial (ESOPH) y con hiperplasia endometrial no asociada a ESOP (HE, n=4). En todas las microfotografías el aumento corresponde a 400x, la barra representa 30 μ m y las flechas indican tinción positiva. El control negativo, C(-), se muestra en el inserto.

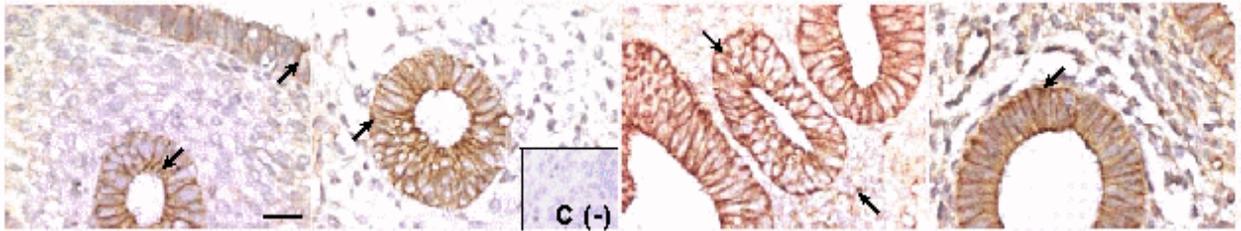
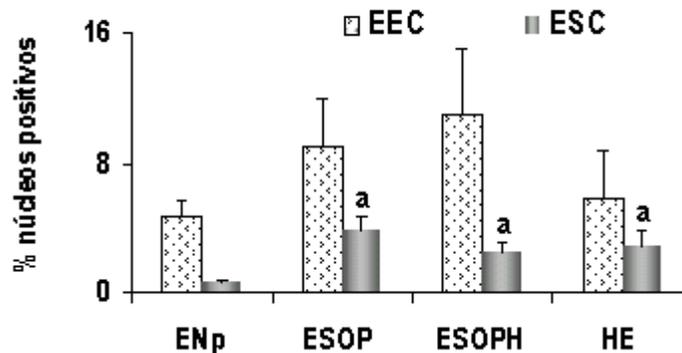


Figura 41. Semicuantificación nuclear por inmunohistoquímica de la proteína β -catenina no fosforilada por GSK-3 β . La semicuantificación se realizó en células epiteliales (EEC) y estromales (ESC) de endometrios: controles (ENp), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico (ESOP), ESOP con hiperplasia endometrial (ESOPH) y de mujeres con hiperplasia endometrial (HE). El número de mujeres analizadas fue n=5 para todos los grupos. Los resultados se expresaron como la media del porcentaje de núcleos positivos \pm error estándar de la media. a: $p < 0.05$ vs ENp.



VI.8. OBJETIVO ESPECÍFICO 8:

Establecer si en el endometrio *ex-vivo* de pacientes con SOP los procesos de proliferación y apoptosis celular, son diferentes a los de endometrios controles.

VI.8.1. Proliferación celular

VI.8.1.1. Presencia de la proteína Ki67 mediante IHQ

Con el fin de evaluar si los diferentes tipos de endometrios en estudio se comportan de manera diferente en los procesos de proliferación celular comparado con los endometrios normales, se determinó la expresión de la proteína nucleolar Ki67. En los cuatro grupos de endometrios analizados se observó tinción positiva homogénea y de localización nuclear, en ambos compartimientos celulares (Figura 42), siendo mayor la presencia de Ki67 en ESOP, específicamente en el compartimento epitelial ($p < 0.05$) (Figura 43 a y b). Por lo tanto, en ESOP existen más células en las fases G1, S y/o G2 del ciclo celular.

VI.8.1.2. Presencia proteica de pH3 en endometrios de mujeres controles y pacientes

Se determinó mediante IHQ la expresión de la proteína pH3 que detecta células en mitosis. Los resultados muestran que la expresión de esta proteína es nuclear, en ambos compartimientos celulares y para todos los endometrios estudiados (Figura 44). Además, se observó que en ENp como en las condiciones ESOP, ESOPH e HE las células con figuras mitóticas, estudiadas a través de pH3, fueron escasas. No obstante, la expresión de pH3 en las células epiteliales fue 27% mayor en ESOP y ESOPH respecto a ENp (Tabla 14).

Figura 42. Inmunotinción para el antígeno nucleolar Ki67. Se realizó inmunohistoquímica para endometrios controles (ENp), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico (ESOP), ESOP con hiperplasia endometrial (ESOPH) y de pacientes sin síndrome de ovario poliquístico y con hiperplasia endometrial (HE). En todas las microfotografías el aumento corresponde a 400x, la barra representa 30 μ m y las flechas indican tinción positiva. El control negativo, C(-), se muestra en el inserto.

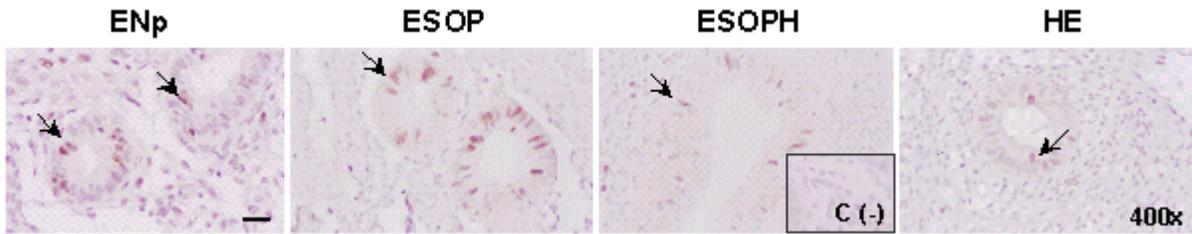
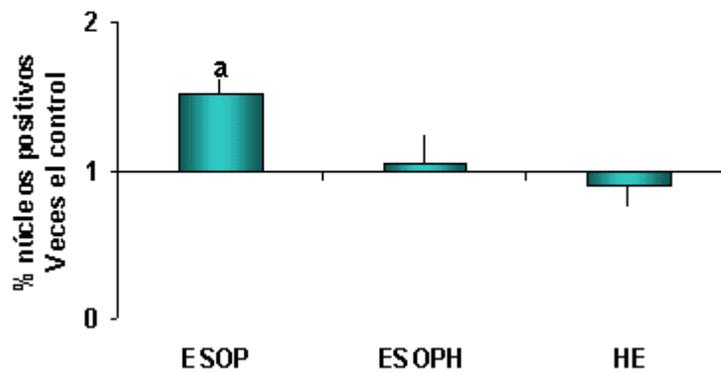


Figura 43. Proliferación celular. Inmunodetección de Ki67 en secciones incluidas en parafina de endometrios: control (ENp, n=5), con síndrome de ovario poliquístico sin hiperplasia (ESOP, n=6), con hiperplasia endometrial (ESOPH, n=5) e hiperplasia endometrial (HE, n=5). a) Ki67 en tejido total. b) Tinción positiva para Ki67 en células epiteliales (EEC) y en células estromales (ESC). Los valores son expresados como porcentaje de células positivas en el endometrio analizado vs ENp. Porcentaje de núcleos positivos para ENp: EEC=20.0 \pm 2.3 U.A; ESC=13.0 \pm 1.7 U.A. a: p<0.05 vs ENp.

a)



b)

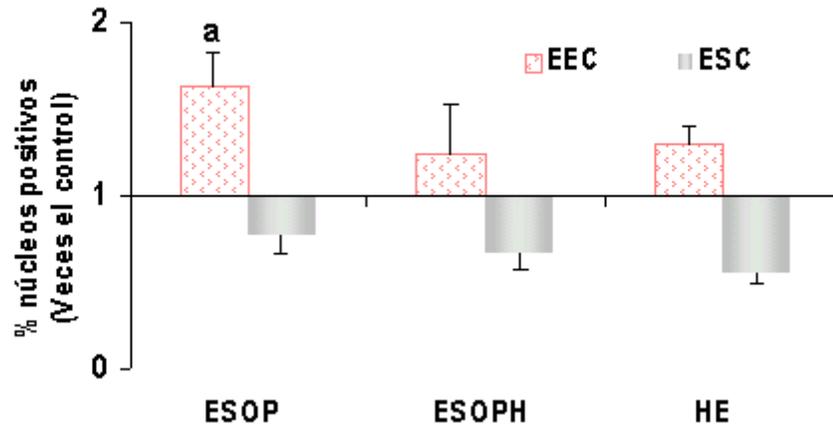


Figura 44. Inmunotinción para la histona H3 fosforilada en ser10. La inmunodetección se realizó en endometrios: control (ENp), de pacientes con síndrome de ovario poliquístico (ESOP), ESOP con hiperplasia endometrial (ESOPH) e hiperplasia endometrial (HE). En todas las microfotografías el aumento corresponde a 400x, la barra representa 30 μm y las flechas indican tinción positiva.

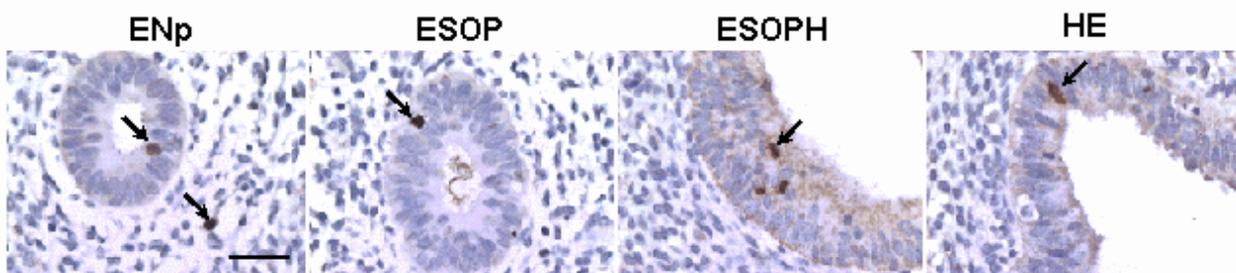


Tabla 14. Estudios de proliferación celular mediante la expresión proteica de histona H3 fosforilada en Ser10 en células del compartimento epitelial (EEC) y estromal (ESC).

% células (+) n	ENp 8	ESOP 12	ESOPH 5	HE 6
EEC	1.4 ± 0.5	1.9 ± 0.2	1.9 ± 0.1	1.4 ± 0.6
ESC	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.1	1.0 ± 0.5	1.1 ± 0.5

Endometrio normal proliferativo, control (ENp), de mujeres con síndrome de ovario poliquístico (ESOP), ESOP con hiperplasia endometrial (ESOPH), endometrios de mujeres con hiperplasia endometrial no asociada a ESOP (HE), células epiteliales (EEC), células estromales (ESC), número de sujetos utilizados (n). Los resultados se expresan como la media del % de núcleos positivos ± error estándar.

VI.8.2 Estudios de apoptosis

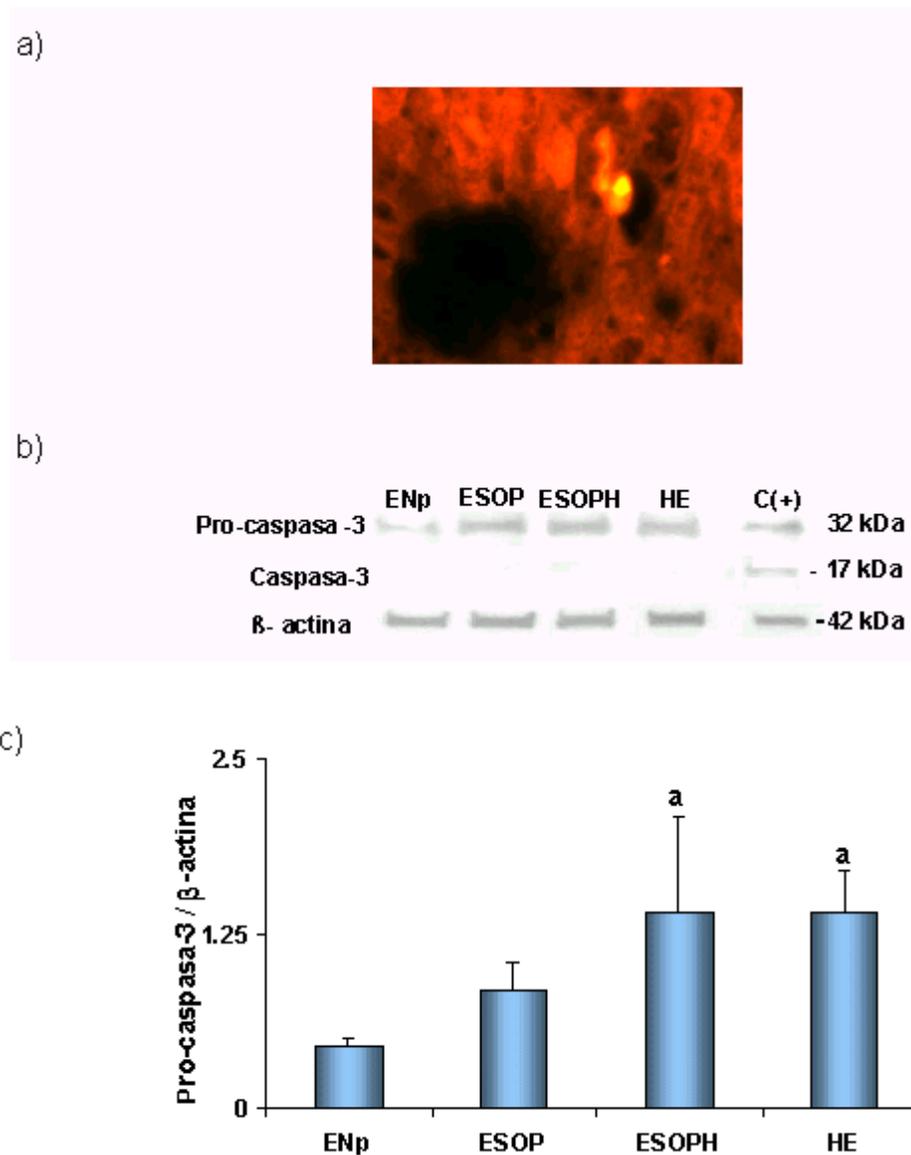
VI.8.2.1. Fragmentación del DNA por técnica de TUNEL

Se observaron escasas figuras con signos positivos de fragmentación del DNA en los endometrios analizados de los distintos grupos, independientemente de la presencia o no de hiperplasia (Figura 45 a).

VI.8.2.2. Expresión proteica de procaspasa-3 y caspasa-3 (WB)

Se obtuvo expresión positiva para pro-caspasa-3 en todos los grupos de endometrios analizados. Se evidenció una mayor expresión de pro-caspasa-3 en los ESOP, ESOPH e HE ($p < 0.05$) vs ENp. La caspasa-3, que corresponde a la forma activa de la enzima, no se detectó en ninguno de los endometrios examinados (Figura 45 b, c). Lo que sugiere que, en los endometrios analizados la apoptosis resultó ser mínima.

Figura 45. Apoptosis en células endometriales. (a) TUNEL (n = 3) para cada uno de los grupos estudiados. (b, c) Western blot para procaspasa-3 y caspasa-3 activa en extractos proteicos totales de endometrio control proliferativo (ENp, n=5), endometrio de pacientes con síndrome de ovario poliquístico (ESOP, n=5), ESOP que presentó además hiperplasia endometrial (ESOPH, n=5), y endometrios con hiperplasia endometrial (HE, n=5). Se realizó análisis densitométrico de las bandas obtenidas para pro-caspasa-3 en los cuatro grupos estudiados. Control positivo, C(+): lisado de células Jurkat tratadas con Camptothecin. Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar de la media y normalizados con β -actina. a: $p < 0.05$ vs ENp



VI.9. OBJETIVO ESPECÍFICO 9:

Evaluar *in-vitro* si las condiciones hiperestrogénica (E₂), hiperandrogénica (T o A₄) y/o hiperinsulínica, contribuyen a modificar el metabolismo esteroidal intracelular (producción de DHT y E₂ por células estromales y epiteliales y por explantes de tejido endometrial normal).

VI.9.1. Producción de E₂ *in-vitro*

Los datos obtenidos al cultivar separadamente las células epiteliales y las estromales muestran que la producción basal de E₂ fue similar en células epiteliales y estromales. Ambos tipos celulares aumentaron significativamente su producción de E₂ cuando se cultivaron en presencia de andrógenos (Figura 46). Por otro lado, estudios con explantes endometriales mostraron que la producción basal de E₂ es similar en endometrio normal de fase proliferativa y secretora; la adición de andrógenos al cultivo de estos explantes mostró una tendencia a la elevación de los niveles de E₂ (Tabla 15).

VI.9.2. Producción de DHT *in-vitro*

En ausencia de la adición de andrógenos (condición basal) a los cultivos celulares se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en la producción de DHT en las células estromales, al compararla con la producción en las células epiteliales. Del mismo modo, la adición de andrógenos a los cultivos celulares produjo un aumento en la concentración de DHT en el medio de cultivo, tanto para las células epiteliales como para las estromales ($p < 0.05$ vs basal respectivo) (Figura 47). Por otra parte, la producción de DHT basal como estimulada con andrógeno, fue similar en explantes de endometrio normal de fase proliferativa y secretora y el cultivo de estos explantes con andrógeno mostró una tendencia a la elevación de los niveles de DHT (Tabla 16).

Al determinar la razón entre la producción de DHT y de E₂, se encontró que ésta es significativamente mayor en células y explantes cultivados en presencia de andrógeno vs la condición basal (Figura 48).

Figura 46. Concentración de estradiol [E₂] en cultivos de células epiteliales (EEC) y de células estromales (ESC) de endometrio. Las células se cultivaron con testosterona (T) 10⁻⁶ mol/L y la [E₂] fue determinada por radioinmunoensayo. Se utilizaron 5 endometrios controles para la obtención de EEC y ESC. Los valores son expresados como media ± error estándar de la media y respecto al basal, al cual se le asignó valor arbitrario de 1. Los valores para los basales respectivos fueron: EEC: 1.1±0.7 U.A.; ESC: .1.5±0.3 U.A. a: p<0,01 vs el basal, b: p<0,05 vs el basal.

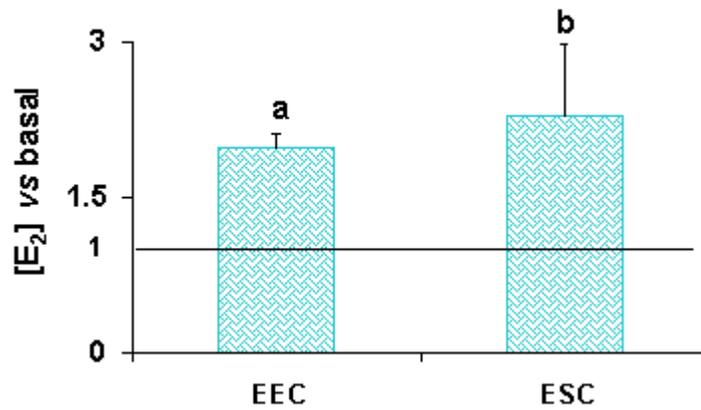


Tabla 15. Concentración de E₂ en cultivos de explantes endometriales

Tratamientos	[E ₂] (pg/mg de tejido)	
	Explantes Proliferativos	Explantes Secretores
n	1	5
Basal	0.2	0.1 ± 0.1
Estímulo (T: 10 ⁻⁶ mol/l)	0.4	0.2 ± 0.1

Los explantes fueron cultivados con testosterona (T) 10⁻⁶ mol/l y la concentración de E₂ fue determinada por radioinmunoensayo. Los valores son expresados como media ± error estándar de la media.

Figura 47. Concentración de dihidrotestosterona [DHT] en cultivos de células epiteliales (EEC) y estromales (ESC) de endometrio. En este ensayo las células fueron cultivadas con testosterona (T) 10^{-6} mol/L y las [DHT] fueron determinadas por radioinmunoensayo. Se utilizaron 5 endometrios controles para la obtención de EEC y ESC. Los valores son expresados en media \pm error estándar de la media y respecto al basal, al cual se le asignó valor arbitrario de 1. Los valores para los basales respectivos fueron: EEC: 5.6 ± 1.5 U.A.; ESC: $.8.40 \pm 2.0$ U.A. a: $p < 0,05$ vs basal.

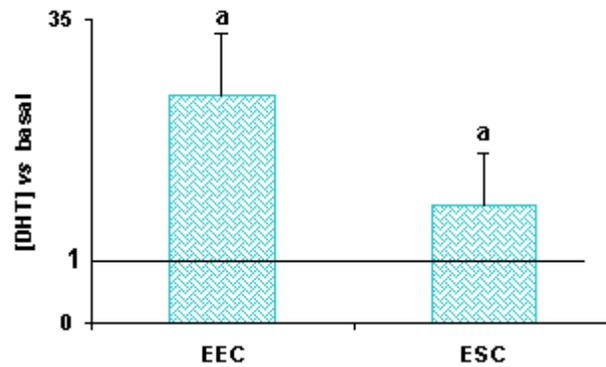
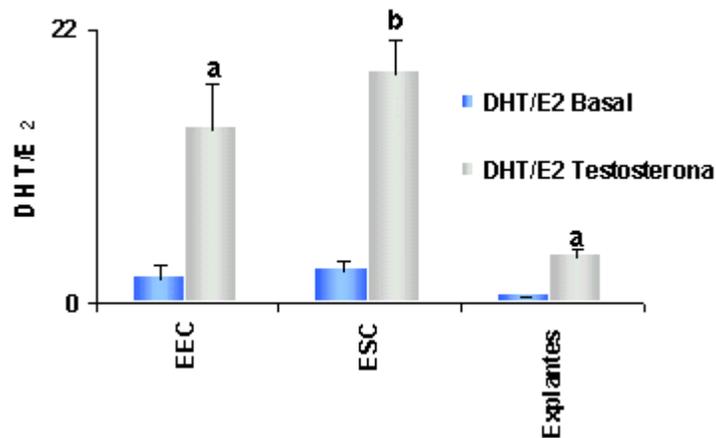


Tabla 16. Concentración de DHT en cultivos de explantes endometriales

Tratamientos	[DHT] (pg/mg de tejido)	
	Explantes Proliferativos	Explantes Secretores
n	2	5
Basal	2.7 ± 1.2	0.7 ± 0.2
Estímulo (T: 10^{-6} mol/l)	31.8 ± 18.8	16.8 ± 10.3

Los explantes fueron cultivados con testosterona (T) 10^{-6} mol/l y la concentración de DHT fue determinada por radioinmunoensayo. Los valores son expresados como media \pm error estándar de la media.

Figura 48. Relación entre la producción de dihidrotestosterona (DHT) y estradiol (E₂) en células y explantes cultivados en condición basal e incubados con andrógenos. Las células epiteliales (EEC) y estromales (ESC) fueron obtenidas de 5 endometrios controles. Se utilizaron 2 y 4 explantes de endometrio de fase proliferativa y secretora, respectivamente. Los valores son expresados como media ± error estándar. a: p<0,05 vs el basal, b: p<0,01 vs el basal.



VI.10. OBJETIVO ESPECÍFICO 10:

Evaluar *in-vitro* si las condiciones hiperestrogénica (E₂), hiperandrogénica (T o A₄) y/o hiperinsulínica, contribuyen a modificar la expresión y activación de las proteínas Smads (pSmad2 y Smad4), inhibidoras de la proliferación celular.

VI.10.1. Semicuantificación de los niveles proteicos de pSmad2 y Smad4 en explantes endometriales cultivados con estímulos hormonales

El cultivo de explantes endometriales con insulina, E₂, A₄ o una mezcla de estas hormonas mostró que a las 18 horas de cultivo se mantiene la arquitectura celular para todas las condiciones ensayadas (Figura 49, 50). Además, al analizar los patrones de distribución celular de las proteínas pSmad2 y Smad4 por IHQ se encontró que éstos no variaron para ninguna de las condiciones analizadas, cuando se compararon con los resultados obtenidos en los estudios *in-vivo* (Figura 36). En este sentido, pSmad2 se encontró solamente en los núcleos celulares tanto

para las células epiteliales, como para las células estromales. Aún más, Smad4 se expresó también en los citoplasmas celulares (Figura 49, 50). Al semicuantificar la tinción positiva de pSmad2 en los explantes cultivados con E₂ y A₄, se obtuvo un aumento significativo de la presencia de pSmad2 en los núcleos epiteliales respecto al basal ($p < 0.05$). No obstante, los estímulos utilizados en este estudio no alteraron el porcentaje de células positivas para la proteína en las células estromales (Figura 51 a, b). Por otro lado, el cultivo de los explantes con E₂ indujo una disminución significativa ($p < 0.05$) en la presencia de la proteína Smad4 en los núcleos epiteliales (Figura 52 a). La detección de la proteína en los citoplasmas epiteliales y en el estroma celular no fue alterada por los estímulos ensayados (Figura 52 b, Tabla 17).

Figura 49. Inmunotinción para la proteína pSmad2 en explantes endometriales cultivados con estímulos hormonales. Los explantes endometriales fueron estimulados con: Insulina (Ins), estradiol (E_2), androstenediona (A_4) y una mezcla de estas hormonas. En todas las microfotografías el aumento corresponde a 400x, la barra representa 30 μm y las flechas indican tinción positiva. El control negativo, C(-), se muestra en el inserto.

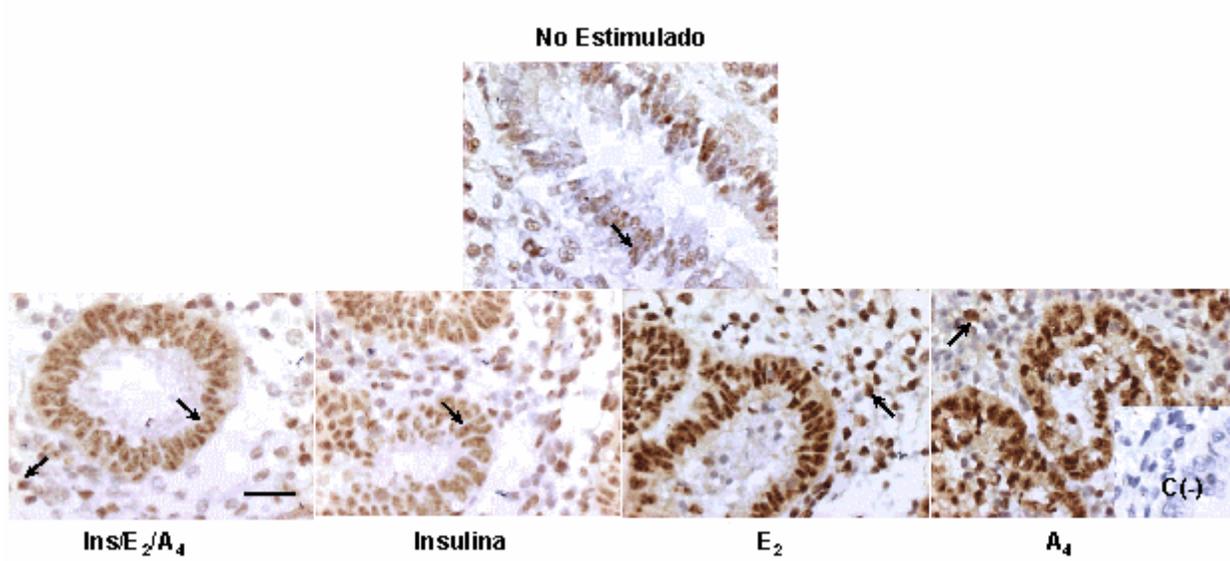


Figura 50. Inmunotinción para la proteína Smad4 en explantes endometriales cultivados con estímulos hormonales. Los explantes fueron cultivados con: Insulina (Ins), estradiol (E_2), androstenediona (A_4) y una mezcla de estas hormonas. En todas las microfotografías el aumento corresponde a 400x, la barra representa 30 μm y las flechas indican tinción positiva. El control negativo, C(-), se muestra en el inserto.

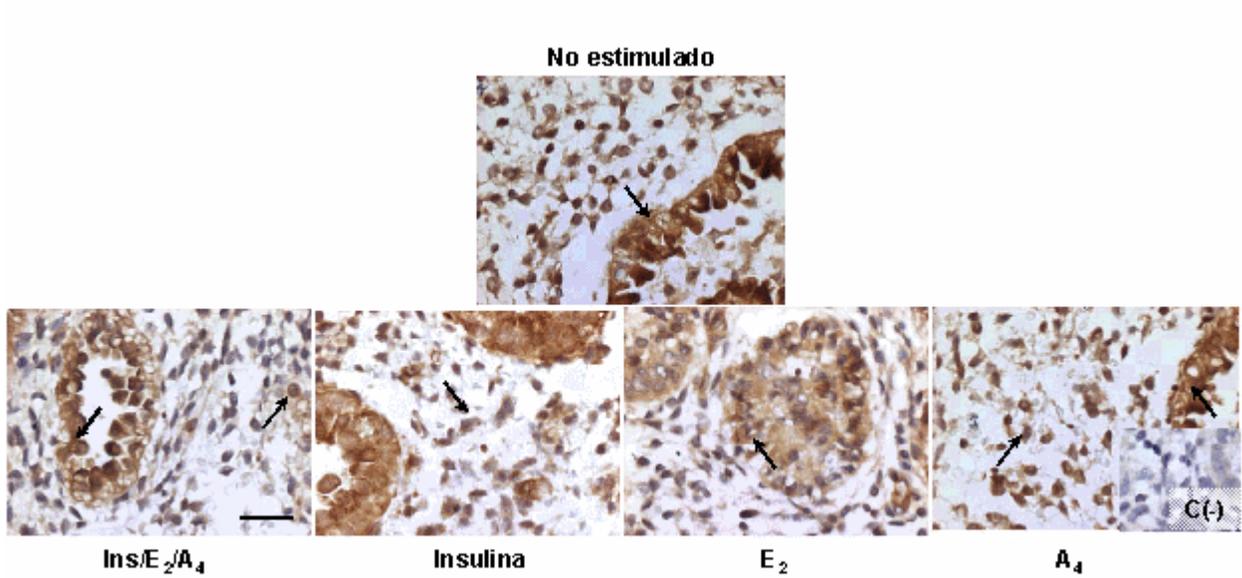
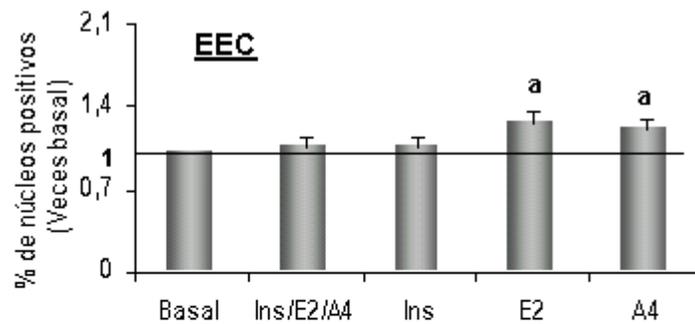


Figura 51. Semicuantificación por inmunohistoquímica de los niveles de pSmad2 en explantes endometriales cultivados con estímulos hormonales. Los estímulos utilizados fueron insulina (Ins), estradiol (E₂), androstenediona (A₄) y una mezcla de estas hormonas. (a) Resultados obtenidos para las células epiteliales (EEC), el porcentaje de núcleos positivos para el basal de EEC fue 79.9±5.6.U.A. (b) Semicuantificación para el estroma celular (ESC), el porcentaje de núcleos positivos para el basal de las ESC fue 37.1±6.5 U.A. El número de explantes estimulados fue n=4 para cada condición experimental. Los resultados se expresan como la media del porcentaje de núcleos positivos ± error estándar de la media. a: p<0.05 vs basal.

a)



b)

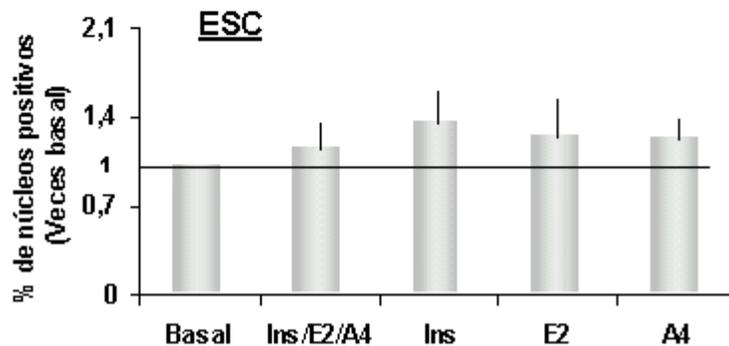
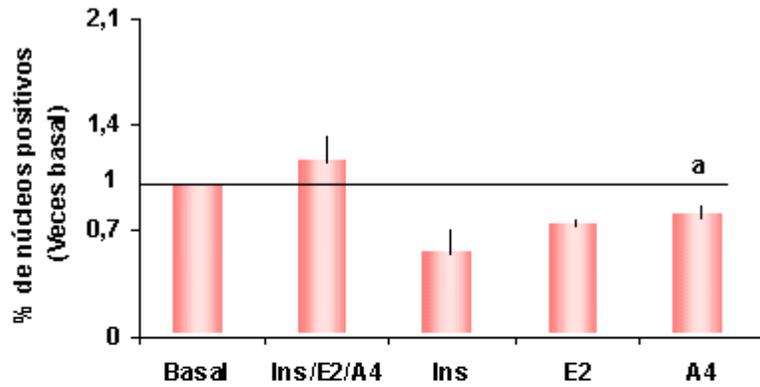


Figura 52. Semicuantificación por inmunohistoquímica, para el compartimento epitelial (EEC), de los niveles de Smad4 en explantes endometriales cultivados con estímulos hormonales. Los estímulos utilizados fueron: Insulina (Ins), estradiol (E₂), androstenediona (A₄) y una mezcla de estas hormonas y el número de explantes empleados fue n=4 para cada condición experimental. Resultados obtenidos para los núcleos (a) y citoplasmas (b) de EEC. El porcentaje de núcleos y citoplasmas positivos para los basales fueron 76.9±6.0 y 95.4±4.0 U.A., respectivamente. Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media. a: p<0.05 vs basal.

a)



b)

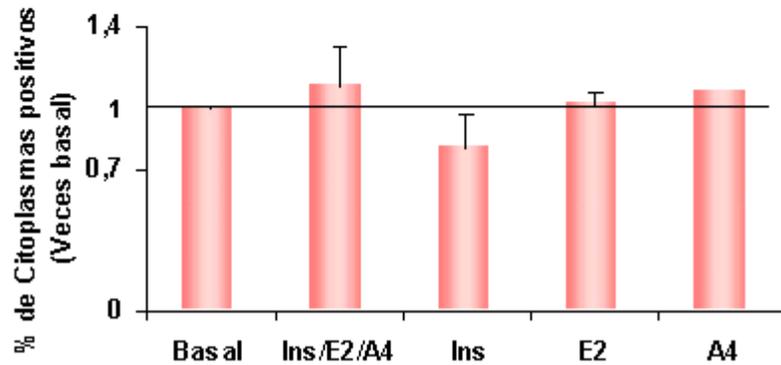


Tabla 17. Semicuantificación por inmunohistoquímica de los niveles de Smad4 en explantes endometriales (células estromales-ESC-) cultivados con estímulos hormonales

ESC	Basal	Ins/E ₂ /A ₄	Ins	E ₂	A ₄
Núcleos	1.00	2.0 ± 0.6	1.0 ± 0.5	1.6 ± 0.5	1.7 ± 0.4
Citoplasmas	1.00	8.5 ± 5.8	0.7 ± 0.3	0.8 ± 0.5	4.9 ± 3.5
<p>Insulina (Ins), estradiol (E2), androstenediona (A4). El número de explantes empleado fue n=4. Los resultados se expresan como la media del porcentaje de células positivas ± error estándar. Porcentaje de núcleos positivos para el basal 52.6 ± 13.7. Porcentaje de citoplasmas positivos para el basal: 42.8 ± 21.1.</p>					

VII. DISCUSIÓN.

El endometrio humano normal regula su función respondiendo a las variaciones cíclicas de los esteroides producidos por el ovario. Es relevante, por lo tanto, la sugerencia de que las concentraciones *in-situ* de hormonas esteroidales podrían ser diferentes a las concentraciones plasmáticas. Una de las explicaciones para estas diferencias radicaría en la expresión y actividad en el endometrio de distintas enzimas responsables del metabolismo esteroideal.

Se sabe que la desulfatación de los sulfatos de estrógeno y la aromatización de andrógenos en las células blanco contribuyen sustancialmente a la formación de estrógeno activo en estas células y, por lo tanto, potencian la estimulación hormonal del receptor de estrógeno clásico. En contraste, el metabolismo de los estrógenos por enzimas conjugativas, como la EST, en la célula blanco puede disminuir la actividad hormonal de los estrógenos, al disminuir sus concentraciones intracelulares (Sasano H, 2006).

Por otro lado, la aromatización de andrógenos a estrógenos es controversial en el endometrio humano, dado que autores como Dheenadayalu K. y col. (2002), y Johnson C. y col. (2004), han planteado la expresión de P450-aromatasa en endometrios normales (Dheenadayalu K, 2002; Johnson MC, 2004), en tanto, otros autores no han detectado actividad de esta enzima en endometrios (Noble LS, 1996; Kitawaki J, 1997).

Los resultados obtenidos *in-vitro* en el presente trabajo muestran que existe un aumento de E₂ al adicionar andrógenos al sistema de cultivo de células endometriales, lo cual sugiere que la enzima P450-aromatasa estaría presente y activa en este sistema de cultivo. No obstante, la ausencia de mRNA y proteína de la enzima en los tejidos *ex-vivo* permite plantear que la aromatización de andrógenos a estrógenos no sería un mecanismo importante para la producción *in-situ* de estrógenos en los endometrios controles y de pacientes SOP analizados en este estudio. En este sentido, Watanabe K y col. (1995), publicaron la ausencia de actividad aromatasa en hiperplasia endometrial; además, Ma X y col. (2006), no encontraron diferencias en la inmunotinción de la enzima entre endometrio normal y con hiperplasia (Watanabe K, 1995; Ma XX, 2006). Estos antecedentes sustentarían la carencia de significancia funcional de aromatasa para la progresión endometrial a hiperplasia, lo que estaría de acuerdo con lo encontrado en el

presente estudio. La diferencia entre los resultados obtenidos *in-vitro* y *ex-vivo* podría deberse a la pérdida de las interacciones regulatorias entre células epiteliales y estromales que se sabe que ocurren en el cultivo celular.

Por otra parte, existen evidencias experimentales sólidas que describen a la vía sulfatasa como relevante en la producción de estrógenos en diversos tejidos, incluyendo el endometrio (Van Landeghem AA, 1985), lo cual concuerda con los datos de la presente investigación. En efecto, en los endometrios humanos de todos los grupos analizados se encontró la presencia de mRNA y de las actividades de sulfatasa, y en menor grado, EST. Estos resultados concuerdan con datos publicados para cáncer de mama, donde se han señalado otras vías importantes adicionales a la vía aromatasa, para la obtención de compuestos con actividad estrogénica (Nakata T, 2003). En este sentido, se conoce que la actividad sulfatasa en cáncer de mama es al menos 100 veces mayor que la actividad aromatasa (Nakata T, 2003) y se ha planteado que E₁S debiera ser un reservorio para la formación de estrógenos activos al presentarse en el tejido en concentraciones mayores y poseer un tiempo de vida media mayor que las formas estrogénicas libres (Ruder HJ, 1972). Sin embargo, en endometrios de pacientes SOP no existían antecedentes de la actividad de estas enzimas.

De manera interesante, la presencia de niveles disminuidos de mRNA para la enzima sulfatasa en ESOP y ESOPH, así como, el aumento del mRNA para la enzima EST en ESOP, son resultados concordantes con la menor relación entre las actividades sulfatasa y EST obtenida en dichos endometrios, respecto al control. Lo anteriormente expuesto podría relacionarse con una menor tendencia en los endometrios SOP a la formación de las formas libres de estos esteroides respecto a las formas sulfatadas. Sin embargo, lo anterior contrasta con la menor actividad de 17 β -HSD tipo 2 encontrada en los ESOP, indicando que dichos endometrios tendrían una menor tendencia a la formación de E₁ utilizando E₂ como sustrato. Por lo tanto, los datos nos permiten sugerir que a pesar de existir menor actividad de sulfatasa en los ESOP, la menor actividad de 17 β -HSD tipo 2 permite potencialmente una mayor concentración de E₂ libre. Esto está de acuerdo con la mayor acción estrogénica representada, en parte, por la mayor proliferación observada en estos endometrios, tal como se discutirá más adelante. Concordantemente, los resultados obtenidos para la relación entre los mRNA para las isoformas 1 y 2 de 17 β -HSD, fueron también indicativos de una menor tendencia a la inactivación de E₂ en endometrios de pacientes SOP. En este sentido, se ha planteado que la enzima 17 β -HSD tipo 2 podría tener un rol protector en los

tejidos normales, controlando el efecto estrogénico a través de la inactivación *in-situ* de E₂ y que la desregulación de su actividad, como lo observado en este trabajo para los ESOP, se relacionaría a malignización del tejido (Ito K, 2006). De este modo, se conoce que en cáncer endometrial se produce una disminución de la actividad de la isoforma 2 respecto a hiperplasia endometrial y a endometrio normal de fase secretora. Además, se ha demostrado que en cáncer endometrial, los niveles de mRNA para 17β-HSD tipo 2 se correlacionan inversamente con las concentraciones de E₂ (Ito K, 2006). Lo interesante es que en el presente estudio, además de evaluar el nivel de mRNA de 17β-HSD tipo 2, determinamos la actividad de esta enzima, lo que contrasta con lo encontrado por Ito y col. (Ito K, 2006). Estos autores no encontraron presencia de la enzima por IHQ en endometrio humano (Ito K, 2006) Estas diferencias pueden deberse a que la actividad enzimática es una metodología más sensible que la inmunotinción.

Además, es importante destacar que en tejido endometrial podrían existir otros compuestos con actividad estrogénica, que no han sido abordados en esta tesis, los cuales serían responsables en parte, de la actividad del REα, como ha sido publicado para el compuesto andro-5-ene-3,17-diol (Adiol) en cáncer de mama, que es también un esteroide activo y que es derivado de dehidroepiandrosterona sulfato en una vía que involucra la actividad sulfatasa, pero no la actividad aromatasa (Nakata T, 2003).

Otra de las enzimas analizadas en esta tesis fue 5α-reductasa. Los estudios *ex-vivo* corroboraron la presencia de la isoforma tipo 1 de la enzima en ENp, como había sido previamente publicado por Ito K. y col (2002) (Ito K, 2002). Adicionalmente, el aumento progresivo, encontrado en esta investigación, para los niveles de esta enzima en el epitelio glandular desde endometrios controles hasta endometrios SOP con hiperplasia, nos inducen fuertemente a plantear que la formación de DHT a partir de T en el epitelio endometrial podría desempeñar un papel importante en el desarrollo de hiperplasia endometrial que se da en algunas pacientes con SOP. Está bien documentado que DHT ejerce efectos biológicos diferentes a los ejercidos por T en varios tejidos distintos de endometrio, en los cuales se ha propuesto que T afectaría predominantemente la diferenciación celular, mientras que DHT, la proliferación celular. Sin embargo, no existen antecedentes al respecto, en relación a endometrio, por lo cual se requiere de investigaciones adicionales que permitan clarificar el rol de los andrógenos en el endometrio humano, tanto en condiciones normales como en condiciones patológicas (Ito K, 2002).

Adicionalmente, los estudios realizados *in-vitro*, corroboraron que el endometrio humano posee una alta capacidad de transformación de T en DHT.

En síntesis, los resultados de ese trabajo permiten plantear que los ESOP poseen actividades diferentes de las enzimas del metabolismo esteroide intracelular, respecto a endometrios controles. En consecuencia estos endometrios presentan desregulación del metabolismo esteroide *in-situ*.

Contrariamente a lo que esperábamos, se encontró concentraciones tisulares similares de los esteroides P₄, E₂, A₄ y T en ESOP y ENp. Por lo tanto, sería necesario determinar en un futuro cercano las concentraciones tisulares de otras formas esteroidales en el tejido, como por ejemplo, de DHT y las formas sulfatadas de los estrógenos E₁ y E₂, y aportar así al conocimiento del metabolismo esteroide en el endometrio. Estas determinaciones no fueron realizadas en esta tesis dada la escasa disponibilidad de muestras de pacientes SOP.

Otro factor importante en la biodisponibilidad de esteroides en el organismo es la SHBG. Para que un esteroide pueda unirse a su receptor intracelular, debe estar presente en la célula en una forma bioquímicamente activa y, además, no unido a moléculas como SHBG, que se une a los esteroides plasmáticos y regula su acción biológica.

En este sentido, y concordantemente a los resultados obtenidos por otros investigadores (Misao R, 1994; Misao R, 1997), en este trabajo encontramos que los productos génicos 341pb (mRNA_T) y principalmente el 548pb (mRNA_L), se transcriben en endometrio humano. Evidenciamos la presencia de los dos productos génicos para SHBG en ENp, ESOP, ESOPH y HE, encontrándose una menor razón mRNA 548pb/341pb en los endometrios de pacientes con HE. Por lo anterior, pensamos que la regulación del empalme (splicing) de mRNA para SHBG podría ser una transformación importante en el desarrollo de HE no SOP. Por otra parte, la presencia de mRNA y la inmunotinción positiva para SHBG indicaron que la proteína está presente en todos los endometrios estudiados, por lo tanto, SHBG podría jugar un papel adicional en la regulación *in-situ* de la biodisponibilidad esteroide en estos endometrios. Dicha biodisponibilidad sería mayor en los ESOP, dada la disminución intracelular en el nivel de esta molécula en estos endometrios.

Además, se ha planteado que SHBG puede regular la proliferación celular a través de la unión a su receptor de membrana activando la enzima adenilato ciclasa, con la consiguiente elevación de los niveles intracelulares de AMPc y activación de la proteína quinasa A (Rosner W, 1999). La

quinasa activa actúa fosforilando proteínas involucradas en la homeostasis tisular. Se ha señalado además, que la acción de SHBG mediada por su receptor sería modulada por los esteroides que pueden unirse al complejo y regular su actividad en una manera esteroide y tejido específica (Rosner W, 1999). En consecuencia, la SHBG participaría en dos mecanismos complementarios en la regulación de la homeostasis tisular, considerando los antecedentes de la literatura (Rosner W, 1999). Así, y de acuerdo a los resultados del presente estudio, en los ESOP pudiese existir una mayor concentración intracelular de esteroides disponibles para actuar a través de sus receptores, aumentando la actividad de éstos. Además, se podría inferir una actividad diferencial de la adenilato ciclasa al compararlos con endometrios normales. Todo lo anteriormente señalado podría alterar el balance entre proliferación y apoptosis para estos endometrios.

Por lo tanto, además de las alteraciones en las actividades enzimáticas encontradas en ESOP, la biodisponibilidad de E₂, o sea la concentración de la forma libre que puede ejercer su efecto biológico por la unión a su receptor, se vería aumentada por la disminución en la concentración de SHBG en estos endometrios. Se sabe que E₂ es un estrógeno mitogénico en endometrio humano. Lo anterior sugiere que SHBG podría jugar un papel en la alteración de la homeostasis tisular, lo que ha sido previamente descrito por nuestro grupo (Villavicencio A, 2007) (Figura 53).

Es conocido que la acción de los esteroides es, además, regulada por co-reguladores de receptores esteroidales. Nuestro grupo de trabajo estableció recientemente y por primera vez, la presencia del co-activador de receptores esteroidales ARA70 en endometrio humano (Quezada S, 2006). Cabe destacar que en el presente trabajo, los ESOP mostraron una mayor presencia de mRNA para ARA70; sin embargo, no se observaron diferencias entre los grupos analizados en los niveles proteicos, probablemente por una regulación diferencial en la traducción de estos mRNA. De esta forma, encontramos que existe una alta expresión del co-activador ARA70 en el citoplasma en los cuatro grupos de endometrios estudiados, en presencia de una expresión nuclear baja del co-represor NCoR. Es importante destacar que la localización citoplasmática de ARA70 sugiere que este co-activador actúa de una forma diferente a los co-activadores clásicos, los cuales se unen a los receptores esteroidales activados por el ligando y a los factores generales de la maquinaria de transcripción génica. En contraste, ARA70 podría representar una nueva clase de potenciadores de receptores esteroidales que se uniría al receptor esteroide en el citoplasma, previo a su interacción con el esteroide, para mantener una alta afinidad del receptor

por su ligando (Kollara A, 2001). Por otra parte, la localización subcelular aberrante de NCoR encontrada en este estudio (fundamentalmente citoplasmática), sugiere que este co-represor no está cumpliendo con su rol represor de la acción transcripcional de los receptores esteroidales en los endometrios en estudio, tal como fue establecido previamente en neuronas (Boutell JM, 1999).

Por lo tanto, la alta expresión citoplasmática de ARA70 en todos los grupos incluidos en este trabajo, unido a una expresión baja del co-represor NCoR en los núcleos de ESOP, indicaría alta sensibilidad a la acción esteroideal en los endometrios patológicos estudiados (Figura 53). Estos resultados, junto a la alta expresión de los co-activadores de receptores esteroidales, Src3 y Src2 y de los receptores RE α y RA para ESOP, que hemos previamente establecido (Villavicencio A, 2006, Gregory CW, 2002), reflejarían una mayor sensibilidad a la acción esteroideal para los ESOP respecto de los endometrios controles.

No obstante, es posible considerar que otros co-reguladores pudiesen sumarse a la acción de ARA70 y NCoR en la actividad de los receptores esteroidales en los grupos de endometrios estudiados.

Otro factor que puede estar asociado a una mayor sensibilidad a la acción esteroideal en los ESOP, es el estado de fosforilación de los receptores esteroidales. Se sabe que los receptores esteroidales pueden experimentar modificaciones post-traduccionales, tales como acetilaciones y fosforilaciones y que estas modificaciones influyen en su actividad, asociándose a la regulación de la homeostasis tisular. El RE α puede fosforilarse en respuesta a la unión de E₂ y también por activación de vías de señalización celular, como por ejemplo, la vía de las MAPK (Lannigan DA, 2003; Maofu F, 2003).

Los resultados de este trabajo mostraron que la fracción de RE α fosforilada en Ser 118 respecto a RE α total, fue mayor en ESOP, ESOPH y HE respecto a ENp. Lo anterior, en conjunto con los antecedentes que indican que la fosforilación de este sitio se asocia a una mayor actividad del receptor (Lannigan DA, 2003; Shupnik MA, 2004), nos permite sugerir que el aumento en pRE α S118 en los endometrios patológicos estudiados se asociaría a una regulación positiva adicional a los factores anteriormente discutidos, aumentando la actividad transcripcional del receptor en dichos endometrios. Lo anterior conduciría a desregular la transcripción de genes

involucrados en el control del ciclo celular, entre otros, y estas alteraciones podrían potencialmente inducir al desarrollo de hiperplasia endometrial en mujeres SOP.

Para el interés de esta tesis, es importante recordar que los ESOP están expuestos a E₂ por períodos de tiempo más prolongados que los endometrios normales, en ausencia de la acción contrapuesta de P₄. Además, E₂ unido a su receptor, puede unirse a Src y a PI3K, activando estas vías de señalización celular (efecto no genómico) (Cheskis BJ, 2004; Ali S, 1993). Por lo anteriormente expuesto y de acuerdo a los resultados de este trabajo, podemos inferir que, adicionalmente a la fosforilación que experimenta el RE α por unión de su ligando, el complejo RE α -E₂ en el citoplasma pudiera estar influenciando la fosforilación del RE α en el núcleo a través de la activación de quinasas citoplasmáticas, como un nivel superior en la estimulación del RE α .

Como consecuencia de la condición endocrinológica del SOP que afecta al organismo en general y al endometrio en particular y de la acción prolongada en el tiempo de los estrógenos en los endometrios de estas pacientes, como hemos descrito anteriormente, es altamente probable una desregulación del ciclo celular de las células endometriales. Es conocido que el ciclo celular está regulado por la interacción entre ciclinas, CDKs y productos de genes supresores de tumores. Los complejos ciclina/CDKs y los inhibidores de quinasas de ciclina son regulados, a su vez, por hormonas, entre otros componentes, siendo esta regulación específica para cada señal hormonal (Pestell RG, 1999).

En el presente estudio, los resultados de la evaluación de ciclina D1 mostraron una localización subcelular de preferencia citoplasmática en todos los endometrios analizados; además, los ESOP exhibieron niveles más altos de la proteína, tanto en el compartimento nuclear como en los citoplasmas celulares, respecto de los endometrios controles.

Existen evidencias experimentales de que altos niveles nucleares de ciclina D1 se relacionan con un aumento anormal en la proliferación celular y, por lo tanto, con diferentes tipos de cánceres, entre ellos el cáncer endometrial (Fu M, 2004; Ruhul Quddus M, 2002). Consecuentemente, los mayores niveles de ciclina D1 observados en los núcleos celulares de ESOP respecto a ENp encontrados en este trabajo, contribuirían al mayor número de células en ciclo proliferativo observada en estos endometrios.

No se conoce si ciclina D1 ejerce alguna función en el citoplasma, o si su localización citoplasmática puede significar la degradación de la proteína. No obstante, existen antecedentes que señalan que ciclina D1 es secuestrada en el citoplasma de cardiomiocitos prenatales (Tamamori-Adachi M, 2003). Además, estudios en neuronas postmitóticas indican que la actividad de ciclina D1 puede ser regulada a través de su secuestro citoplasmático. En estas células la localización citoplasmática induce apoptosis (Sumrejkanchanakij P, 2003), sugiriendo que la localización subcelular de ciclina D1 puede regular, la supervivencia celular (Alao JP, 2006). Adicionalmente, Alao y col. (2006), plantearon que la regulación de la actividad de ciclina D1 por secuestro citoplasmático resultante de la inhibición de su importe nuclear, parece ser una característica común de líneas celulares transformadas y células de cáncer de mamíferos (Alao JP, 2006). En este sentido, no podemos descartar la existencia de más de un pool de ciclina D1, cada uno con ubicación y funciones propias. Estos antecedentes son importantes debido a la mayor tendencia a la expresión de ciclina D1 por tumores endometriales en mujeres que presentan SOP, lo cual cambia la asunción de que mujeres con SOP y carcinoma endometrial tendrían un mejor pronóstico para el cáncer endometrial (Pillay OC, 2006). Lo anteriormente expuesto nos hace suponer que los niveles mayores observados en esta tesis para ciclina D1 en los citoplasmas celulares de los ESOP podrían ser importantes en la progresión de la enfermedad hacia hiperplasia y cáncer endometrial, ésto adicionalmente a los mayores niveles nucleares de la proteína.

Otro de los reguladores del ciclo celular analizados en este estudio fue la ciclina E, la cual funciona en el punto de chequeo entre las fases G1 y S del ciclo celular. Esta fue detectada principalmente en las células epiteliales de los grupos de endometrios en estudio, lo cual es coincidente con lo descrito para carcinoma endometrial (Milde-Langosch K, 2001). Aún más, la expresión de ciclina E fue similar entre los endometrios estudiados con excepción de los endometrios con HE, en los cuales se detectaron altos niveles de esta proteína. Así, en HE la acción de ciclina E pudiese jugar un papel fundamental en la génesis de esta patología. Por lo tanto, los datos obtenidos sugieren que en los ESOP podría no existir aún una desregulación en la expresión de esta proteína. Sin embargo, es importante considerar que las mujeres normales también expresan ciclina E en sus endometrios en fase proliferativa del ciclo menstrual y que la expresión de esta proteína disminuye en endometrios de fase secretora de mujeres normales (Shiozawa T, 1998). Dado que los ESOP tienen una fase proliferativa prolongada debido a que la

mayoría de estas mujeres son oligomenorreicas o amenorreicas, es probable que la ciclina E se exprese por períodos de tiempo mayores en estos endometrios.

Por otro lado, se sabe que los complejos ciclina/CDK pueden ser inactivados, lo cual resulta en arresto del ciclo celular y en una disminución de la proliferación celular. Dentro de estos inhibidores se encuentra p27, y de acuerdo a los datos de la literatura (Shiozawa T, 1998), tendría una expresión débil en endometrios de fase proliferativa, aumentando en endometrios de fase secretora del ciclo menstrual. En este mismo estudio (Shiozawa T, 1998) se encontró una expresión mínima de p27 en HE y una elevación de los niveles de este inhibidor cuando las pacientes fueron tratadas con P₄. De estos resultados se sugiere que p27 estaría involucrada en la supresión del crecimiento endometrial inducido por P₄ (Shiozawa T, 1998). También se ha señalado que la expresión de este inhibidor se encuentra disminuida en carcinoma endometrial (Oshita T, 2002).

Recientemente se han publicado acciones diferentes para p27 según el compartimiento subcelular donde se encuentra (Besson A, 2004). Así, actúa como un inhibidor de la proliferación celular en el núcleo, inactivando principalmente al complejo ciclina E/CDK2 (Polyak K, 1994) y también, como una molécula potencialmente oncogénica en el citoplasma, donde regula la estructura del citoesqueleto, afectando en parte, la migración celular (Besson A, 2004). En este sentido, la importante reducción de la expresión nuclear de p27 en las células estromales de pacientes SOP con y sin hiperplasia observada en el presente trabajo, indicaría una menor restricción a la proliferación celular en estos endometrios. Además, dado que se ha planteado que uno de los mecanismos de regulación de las acciones de p27 es su relocalización desde el núcleo hacia el citoplasma en presencia de factores mitogénicos (Besson A, 2006; Susaki E, 2007), la mayor expresión a nivel citoplasmático para los ESOP encontrada en esta tesis, pudiese significar la relocalización de esta proteína.

En síntesis, los niveles mayores de ciclina D1, así como, la falta de regulación apropiada del ciclo celular por p27 en los ESOP, jugarían un papel importante en el mayor número mayor de células en ciclo celular detectada en estos endometrios (Figura 53).

Con el propósito de conocer mejor los mecanismos reguladores de la sobrevivencia de las células endometriales, evaluamos la participación de la vía de las Smads en tejidos normales y patológicos. Las Smad constituyen moléculas reguladoras de proliferación y apoptosis celular.

Los resultados de este trabajo indican que estas proteínas y sus formas activas se encuentran disminuidas en los ESOP. Estos resultados son de especial interés, pues se ha indicado que la vía de señalización TGF- β es una vía supresora de tumores cuya actividad puede perderse en muchos tipos de cáncer, incluido el cáncer endometrial (Piestrzeniewicz-Ulanska D, 2003; Zhou Y, 1999). Aún más, existen antecedentes que señalan que la activación de esta vía es responsable de la translocación de p27 desde el complejo ciclina D1/CDK4, 6 hacia el complejo ciclina E/CDK2 y, consecuentemente, de la inhibición de la progresión del ciclo celular. Si consideramos los antecedentes de la literatura acerca de la acción de las proteínas Smads sobre el ciclo celular, los resultados del presente estudio indicarían que en ESOP existe disminución de la actividad supresora del paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular a través de las proteínas Smads, induciendo la progresión del ciclo celular (Figura 53).

Es importante destacar que en nuestros estudios no observamos una relación proporcional entre las diferentes proteínas Smads en los núcleos de ESOP y ESOPH, como se esperaría de un análisis estequiométrico simple de la formación de estos heterocomplejos y su migración al núcleo. Esto se explicaría por el hecho de que Smad4 puede participar en la formación de diversos heterodímeros y heterotrímeros con pSmad 2 y 3 (Massague J & Gomis RR, 2006; Moustakas A, 2001).

Un antecedente importante para el interés del presente trabajo es que en la literatura se ha planteado que la vía TGF- β es regulada por esteroides. Para comprender mejor cómo el microambiente esteroideal alterado en que funcionan las células endometriales de las pacientes SOP, modifica los niveles de las proteínas Smads, explantes endometriales fueron cultivados en presencia de diferentes estímulos hormonales. Los resultados de los estudios *in-vitro* para Smad4 mostraron que E₂ y fundamentalmente A₄, disminuyen los niveles de Smad4 en los núcleos celulares de las células cultivadas. Estos resultados concuerdan en que la exposición prolongada a E₂ y los altos niveles de andrógenos en mujeres SOP, pudiesen explicar la disminución de la proteína Smad4 observada en los estudios *in-vivo* para los endometrios de estas pacientes.

Otra de las proteínas relacionadas al control de la homeostasis celular investigada en esta tesis, fue β -catenina. La presencia de la forma total para β -catenina, que corresponde a la forma no fosforilada más la fosforilada para degradación por la quinasa GSK-3 β , fue similar entre los distintos grupos de endometrios analizados. Sin embargo, se encontró niveles mayores de la forma de β -catenina no marcada para degradación, en los ESOP, ESOPH e HE, lo cual

constituye un paso importante en el conocimiento de cambios tempranos que pueden ocurrir en un tejido y que podrían conducir finalmente a su malignización (Figura 53). En este sentido, se conoce que β -catenina funciona en los núcleos celulares como factor de transcripción, activando la transcripción de genes como c-myc y ciclina D1, responsables de la regulación de la proliferación celular (Shi W, 2004). Por lo tanto, los mayores niveles de β -catenina explicarían la mayor presencia de ciclina D1 que hemos encontrado en los mismos grupos de endometrios.

Es importante considerar que las proteínas Smads y β -catenina podrían modular coordinadamente la transcripción de los mismos genes (Labbe E, 2000; Zhang Y & Derynck R, 1999). En este contexto, son necesarios estudios adicionales para investigar si ésto ocurre en endometrio humano y si los niveles de ciclina D1 son afectados por la actividad transactivadora de las proteínas Smads.

Existen antecedentes experimentales en útero de ratón que indican que E_2 puede, aumentar los niveles de los ligandos Wnt4 y Wnt5a, con el consecuente aumento de la presencia de β -catenina nuclear en el epitelio uterino (Hou X, 2004). Así mismo, se ha señalado que el complejo de factores de transcripción TCF/LEF/ β -catenina puede interactuar con el complejo $RE\alpha$ - E_2 en los mismos promotores para estimular el crecimiento de útero de ratón. En consecuencia, es posible suponer que el microambiente estrogénico no compensado por P_4 en que se desarrollan los ESOP y ESOPH y los niveles elevados de E_2 que acompañan a la HE, podrían ser los responsables del hallazgo de la presencia de β -catenina nuclear aumentada en estos endometrios (Hou X, 2004).

De manera interesante, de los resultados del presente trabajo se desprende que ESOP, ESOPH e HE presentan diferencias importantes en la presencia y activación de proteínas pertenecientes a la vía TGF- β , lo cual unido a otras diferencias detectadas entre estos tres grupos, por ejemplo, en la relación Sulfatasa/ EST y la actividad 17 β -HSD tipo 2, nos permiten plantear que, a pesar de la similitud morfológica de ESOPH y HE y del ambiente hormonal similar en que se desarrollan ESOP y ESOPH, estos tres tipos de endometrios son molecularmente diferentes. El hecho anteriormente expuesto de que la hiperplasia endometrial que se desarrolla en las mujeres SOP podría estar gobernada por mecanismos moleculares diferentes a la hiperplasia endometrial que se genera en pacientes que no presentan SOP, es importante para las decisiones terapéuticas que deben ser tomadas en ambos grupos de pacientes.

Además, sugerimos que los endometrios patológicos, a los cuales subyacen alteraciones moleculares importantes, aún poseen mecanismos regulatorios de la homeostasis tisular que contrarrestan la tendencia a una mayor proliferación. Esto resulta en un número de células en mitosis que no parece ser significativamente diferente para ESOP, ESOPH e HE, respecto a endometrio control. Por lo tanto, estudios adicionales son necesarios para comprender de qué forma estos endometrios frenan su malignización.

Por otra parte, las diferencias encontradas en los niveles de las proteínas Smads en los grupos estudiados podrían alterar la activación de receptores esteroidales y, por lo tanto, la homeostasis tisular. De hecho, se ha planteado la función coordinada de la vía de señalización de las Smads y de los receptores nucleares, pudiendo regular las proteínas Smads la transactivación de los receptores esteroidales y, a su vez, el receptor esteroideal regular la actividad de las proteínas Smads. En este sentido, se ha publicado en cáncer de próstata, que Smad3 se une físicamente al RA, modulando la actividad transactivadora del RA (Van der Poel HG, 2005).

Con el propósito de conocer el balance entre proliferación celular y apoptosis, en este estudio medimos, además, marcadores de proliferación celular como Ki67 y pH3 y marcadores de apoptosis como la fragmentación del DNA por técnica de TUNEL y la expresión de caspasa-3 activa. El estudio de la proteína Ki67 reveló un aumento del número de células en ciclo celular en endometrios de pacientes SOP, junto a la ausencia de apoptosis. Esta última fue evidenciada a través de caspasa-3-activa negativa y de la carencia de figuras compatibles con fragmentación del DNA por TUNEL.

La proteína Ki67 es un marcador que se expresa durante las fases G1, S, G2 y M del ciclo celular. Generalmente el conteo de células positivas para Ki67 correlaciona bien con el índice mitótico; sin embargo, esta correlación no se da siempre. Por ejemplo, se ha visto que en el endometrio de macacos estrogenizados que fueron tratados con antiprogestina por dos semanas, la antiprogestina causó una dramática disminución del índice mitótico, pero no supresión de la expresión de Ki67 (Slayden OD, 2001; Brenner RM, 2003). En este sentido, se conoce que las células pueden ser bloqueadas en las diferentes etapas del ciclo celular donde se expresa Ki67, sin necesariamente entrar en mitosis (Scholzen T & Gerdes J, 2000). Consecuentemente, aunque el antígeno Ki67 es un marcador muy útil para detectar poblaciones proliferantes, el conteo de pH3 permitiría saber el número de células que realmente completan el ciclo celular, complementando la información obtenida con el marcador Ki67.

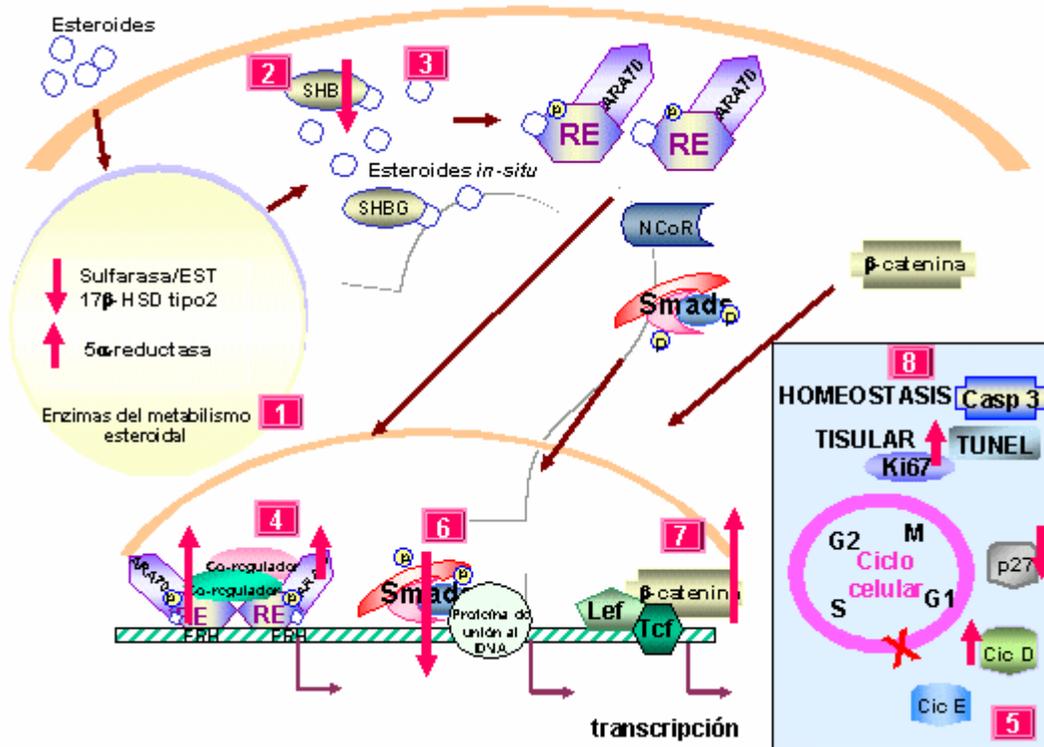
El anticuerpo anti-pH3 reconoce histona H3 cuando está fosforilada en Ser 10, o sea, sólo durante la mitosis (Strahl BD & Allis CD, 2000). En la presente investigación, el resultado de la inmunotinción para pH3 fue similar en ESOP respecto a los endometrios controles, lo cual contrasta con la presencia de niveles de Ki67 significativamente mayores en los ESOP. A pesar de que se ha planteado una mejor correlación entre el índice mitótico y pH3 que entre el índice mitótico y Ki67 (Brenner RM, 2003), la baja expresión encontrada para pH3 en los endometrios analizados en nuestro laboratorio, nos hace pensar que este marcador podría tener una baja sensibilidad para detectar las diferencias en el grado de mitosis entre estos grupos de endometrios. En este sentido, los resultados señalan que Ki67 reporta un resultado de mayor confiabilidad.

Por lo tanto, los datos de esta investigación sugieren que las pacientes SOP presentan una desregulación de su homeostasis endometrial con un mayor número de células en ciclo celular, las que potencialmente podrían atravesar el punto de control del ciclo celular G2/M.

Es importante recordar que las células epiteliales de estas pacientes funcionan en un microambiente hormonal alterado. Por lo tanto, la acción descamatoria cíclica de P₄ (pacientes con oligomenorrea y amenorrea), trae como consecuencia que las células endometriales presentan un ciclo celular más prolongado que las células en la condición normal. Lo anterior, unido a la ausencia de apoptosis, aumenta la probabilidad para estas células endometriales de acumular mutaciones que pueden resultar finalmente en hiperplasia y carcinoma endometrial.

En resumen, es importante destacar que el presente trabajo constituye el primero en describir alteraciones en las enzimas del metabolismo esteroide en endometrios de mujeres con SOP. Además, los resultados obtenidos en esta tesis nos permiten señalar que los ESOP poseen una biodisponibilidad mayor de estrógenos activos, lo que estaría alterando la expresión y actividad de reguladores de la homeostasis tisular. Lo anterior se traduciría en un mayor potencial proliferativo de estos endometrios, con el riesgo mayor asociado de hiperplasia y carcinoma endometrial. Además, proponemos que los ESOP pueden constituir un modelo para el estudio y la mejor comprensión de cuáles son los primeros pasos en la desregulación de la homeostasis celular endometrial.

Figura 53. Desregulación de la homeostasis tisular en endometrios de pacientes con síndrome de ovario poliquístico. Resultados obtenidos para los objetivos específicos planteados: (1) Enzimas del metabolismo esteroidal, (2) Niveles de SHBG, (3) Concentraciones de esteroides, (4) Fosforilación y niveles de RE α y co-reguladores ARA70 y NCoR, (5) Reguladores del ciclo celular: ciclina D1, E y p27, (6) Smads. Fosforilación y niveles proteicos, (7) Niveles de β -catenina, (8) Homeostasis tisular: Proliferación y apoptosis. Las flechas rojas indican la modificación en los niveles o actividad de la proteína.



VIII. CONCLUSIONES

Los ESOP poseen una proliferación celular aumentada en presencia de escasas figuras apoptóticas y, por lo tanto, un desbalance en la homeostasis celular. Esta conclusión se basa fundamentalmente en el aumento significativo del antígeno nucleolar Ki67 encontrado en los ESOP, respecto a los controles y a la presencia en estos endometrios de pH3 similar a los endometrios controles, que son endometrios con un alto índice mitótico.

Los ESOP poseen un metabolismo esteroidal *in-situ* diferente del existente en endometrios controles. Lo anterior se apoya en los resultados que indican que los ESOP presentan alteración en la relación de actividades de las enzimas del metabolismo esteroidal sulfatasa y EST y de la actividad de la 17 β -HSD tipo 2, así como, de los niveles de la enzima 5 α -reductasa y de la proteína SHBG.

La presencia de un metabolismo *in-situ* modificado para los esteroides en ESOP sugiere una mayor disponibilidad de E₂ y DHT en estos endometrios, lo que podría relacionarse a la alteración en la homeostasis celular encontrada para estos endometrios.

Los ESOP presentan una mayor sensibilidad a la acción esteroidal basada en los altos niveles del co-activador ARA70, la localización aberrante del co-represor NCoR, así como, la mayor presencia de pRE α -Ser118. Esto puede conducir a que en los ESOP existan cambios en la expresión de genes involucrados en los procesos de proliferación y apoptosis.

La mayor localización de ciclina D1, ciclina E y β -catenina en las células epiteliales respecto a las estromales, indica que estos reguladores del ciclo celular serían importantes para la proliferación de este tipo celular.

La DHT tendría un papel fisiológico importante en el estroma celular de endometrios controles dado los altos niveles de 5 α -reductasa encontrados en el estroma celular de endometrios controles y los bajos niveles de esta enzima encontrados en este compartimento celular para endometrios patológicos.

La hiperplasia endometrial que padecen algunas pacientes SOP es molecularmente diferente de la HE en pacientes no SOP. Esto se basa en las diferencias encontradas en la relación de actividades sulfatasa/EST, en la presencia de 5α -reductasa, ciclina D1, ciclina E, p27 y Smad3 en endometrios con HE respecto a ESOPH.

La baja capacidad para la inactivación de E_2 por 17β -HSD tipo 2 en ESOP, no así en ESOPH, así como, el aumento en la presencia de 5α -reductasa y la disminución de Smad2, Smad3 y pSmad3 desde ENp hasta ESOPH, indican que estos endometrios son molecularmente distintos y estas variaciones progresivas podrían relacionarse a la transformación de ESOP a ESOPH.

IX. PROYECCIONES

La presente investigación es el primer trabajo que aborda el estudio de la homeostasis tisular relacionado al metabolismo *in-situ* de esteroides en endometrios de mujeres SOP sin y con hiperplasia endometrial. En este sentido, hemos encontrado que el endometrio de estas pacientes posee un metabolismo *in-situ* de esteroides que es diferente al de los endometrios de pacientes controles. Además, y asociado a esta desregulación, hemos encontrado que los ESOP poseen una mayor proliferación celular y alteración de la expresión y/o actividades de moléculas reguladoras de la homeostasis tisular. De manera interesante, este trabajo sugiere fuertemente que los ESOP, ESOPH e HE, son patologías molecularmente distintas, a pesar de sus similitudes morfológicas y/o endocrinas. Esperamos que este trabajo constituya un estímulo a la profundización en el conocimiento de cómo funcionan las vías de transducción de señales que regulan la homeostasis tisular en un endometrio normal y qué moléculas son las determinantes de la potencial progresión de los endometrios SOP hacia hiperplasia y cáncer endometrial. Parece importante, además, la realización de estudios adicionales que permitan establecer marcadores moleculares para el diagnóstico temprano de la progresión del ESOP a ESOPH y cáncer endometrial.

Por todo lo anteriormente expuesto, pensamos que este trabajo es importante para el diagnóstico y las decisiones terapéuticas de las pacientes SOP con y sin hiperplasia. Los resultados de este estudio sugieren que es importante solicitar biopsia endometrial a mujeres SOP en oligomenorrea o amenorrea y que las aproximaciones terapéuticas que son aplicadas a las pacientes no SOP con hiperplasia endometrial no debiesen ser extrapoladas a pacientes SOP con hiperplasia.

X. ANEXO1: CONSENTIMIENTO INFORMADO

PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO ENDOMETRIAL

Título del Proyecto: Regulación de la homeostasis tisular en endometrios de mujeres con síndrome de ovario poliquístico.

Nombre del investigador principal: Ketty Bacallao Fernández.

Institución: Programa de postgrado en Bioquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile y Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI), HCSBA, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Teléfonos: 56-2-4248280/ 4248283

Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación “Influencia intracrina del microambiente hormonal sobre la homeostasis tisular en endometrio de mujeres con síndrome de ovario poliquístico. Esta investigación tiene por objetivo estudiar si un ambiente hormonal alterado, presente en patologías tales como el síndrome de ovario poliquístico, modifica el metabolismo esteroideal endometrial y los mecanismos de regulación de la homeostasis tisular en endometrio humano, ya que la descoordinación entre proliferación y apoptosis puede favorecer el desarrollo de hiperplasia endometrial en estas pacientes.

Este estudio incluirá a un número total de 60 pacientes, de los Consultorios de Infertilidad y de Gineco-Endocrinología del Hospital Clínico San Borja Arriarán, Campus Centro, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Si UD. acepta participar en este proyecto, se le pedirá una muestra de tejido endometrial obtenida por indicación médica de biopsia endometrial, histerectomía por patología endometrial y/o

esterilización tubaria, parte de la cual será utilizada en este estudio. Dicho procedimiento no tendrá más riesgo para UD. que el procedimiento mismo.

La participación en este estudio no le significará a UD. ningún beneficio inmediato. Su contribución será importante para la identificación de marcadores tempranos de hiperplasia endometrial en las mujeres que padecen síndrome de ovario poliquístico.

UD. es libre de participar o no, en este estudio, de manera que si UD. decide no participar, no habrá consecuencias negativas para UD. y recibirá la misma atención previamente acordada con su médico tratante.

Toda la información será conservada con estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o de agencias supervisoras de la investigación. Además, la publicación de los resultados no incluirá su nombre e identidad.

Si UD. necesita cualquier otra información sobre este proyecto o acerca de su participación, puede llamar al Dr. Ariel Fuentes (Fono: 4248280) o dirigirse a la Dra. Margarita Vega (Fono: 4248283).

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto “Regulación de la homeostasis tisular en endometrios de mujeres con síndrome de ovario poliquístico”.

Nombre de la paciente

Firma

Fecha

Nombre del médico

Firma

Fecha

Nombre del investigador

Firma

Fecha

XI. BIBLIOGRAFÍA

ACOG practice bulletin. Polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol* 100: 1389-402, 2002.

Alao JP, Gamble SC, Stavropoulou AV, Pomeranz KM, Lam EW, Coombes RC, Vigushin DM. The cyclin D1 proto-oncogene is sequestered in the cytoplasm of mammalian cancer cell lines. *Mol Cancer*. 2006, Feb 17; 5: 7.

Albanese C, D'Amico M, Reutens AT, Fu M, Watanabe G, Lee RJ, Kitsis RN, Henglein B, Avantiaggiati M, Somasundaram K, Thimmapaya B, PestellRG. Activation of the cyclin D1 gene by the E1A-associated protein p300 through AP-1 inhibits cellular apoptosis. *J Biol Chem*. 1999, 274:34186–34195

Ali S, Metzger D, Bornert JM, Chambon P. Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region. *EMBO J*. 1993, 12(3):1153-60.

Alkarain A, Slingerland J. Deregulation of p27 by oncogenic signaling and its prognostic significance in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2004;6(1):13-21. Review.

Allen RT, Cluck MW and Agrawal DK. Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol Life Sci*. 1998, 54(5): 427-45.

Anderson DC. Sex-hormone-binding globulin. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 1974, 3(1): 69–96.

Apparao KB, Lovely LP, Gui Y, Lininger RA, and Lessey BA. Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome. *Biology of Reproduction*. 2002, 66(2): 297-304.

Benitez R, Sir-Petermann T, Palomino A, Angel B, Maliqueo M, Perez F, Calvillan M. Prevalence of metabolic disorders among family members of patients with polycystic ovary syndrome. *Rev Med Chil*. 2001, 129(7):707-12.

Bérubé D, Seralini GE, Gagné R, and Hammond GL. Localization of the human sex hormone-binding globulin gene (SHBG) to the short arm of chromosome 17 (17p12-p13). *Cytogenet. Cell Genet*. 1990, 54(1-2):65–7.

Besson A, Assoian RK, Roberts JM. Regulation of the cytoskeleton: an oncogenic function for CDK inhibitors? *Nat Rev Cancer*. 2004, 4(12):948-55. Review.

Besson A, Gurian-West M, Chen X, Kelly-Spratt KS, Kemp CJ, Roberts JM. A pathway in quiescent cells that controls p27Kip1 stability, subcellular localization, and tumor suppression. *Genes Dev*. 2006, 20 (1): 47-64.

Boutell JM, Thomas P, Neal JW, Weston VJ, Duce J, Harper PS, Jones AL. Aberrant interactions of transcriptional repressor proteins with the Huntington's disease gene product, huntingtin. *Hum Mol Genet.* 1999, 8(9):1647-55.

Brenner RM, Slayden OD, Rodgers WH, Critchley HO, Carroll R, Nie XJ, Mah K. Immunocytochemical assessment of mitotic activity with an antibody to phosphorylated histone H3 in the macaque and human endometrium. *Hum Reprod.* 2003, 18(6):1185-93.

Brooks SC, Christensen C, Meyers S, Corombos J, Pack BA. Endocrine implications endometrial estrogen sulfurylation, in : VM Jasonni, et al. (Eds.), *Steroids and Endometrial Cancer, Raven Press, New York*, pp. 145–155, 1983.

Buckley CH, Fox H. Biopsy pathology of the endometrium. *Raven Press, New York*, pp 149–165, 1989.

Bulun SE, Economos K, Miller D, Simpson ER. CYP19 (Aromatase cytochrome P450) gene expression in human malignant endometrial tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994, 79(6): 1831-4.

Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 1997, 11(24): 3286-305. Review.

Casey ML, MacDonald PC, Andersson S. 17 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2: chromosomal assignment and progestin regulation of gene expression in human endometrium. *J Clin Invest.* 1994, 94(5):2135-41.

Castro A, Johnson MC, Anido M, Cortinez A, Gabler F, Vega M. Role of nitric oxide and bcl-2 family genes in the regulation of human endometrial apoptosis. *Fertil Steril.* 2002, 78(3):587-95.

Cormack DH. Endometrio. En *Histología de HAM*. Harper and Row Eds. 9º edición. Harla. México. 1990, p 777-79.

Chen HB, Rud JG, Lin K, Xu L. Nuclear targeting of transforming growth factor-beta-activated Smad complexes. *J Biol Chem.* 2005, 280(22): 21329-36.

Cheskis BJ. Regulation of cell signalling cascades by steroid hormones. *J Cell Biochem.* 2004, 93 (1): 20-7. Review. Erratum in: *J Cell Biochem.* 2004, 93(1): 214.

Cheung AP. Ultrasound and menstrual history in predicting endometrial hyperplasia in polycystic ovary syndrome. *Obstetrics and Gynecology.* 2001, 98(2): 325–31.

Chung DC. Cyclin D1 in human neuroendocrine: tumorigenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2004, 1014: 209-17. Review.

Dai D, Litman ES, Schonteich E and Leslie KK. Progesterone regulation of activating protein-1 transcriptional activity: a possible mechanism of progesterone inhibition of endometrial cancer cell growth. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003, 87,123–131.

Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet.* 2001, (2):117-29. Review. Erratum in: *Nat Genet* 2001, 29(3):351.

Dheenadayalu K, Mak I, Gordts S, Campo R, Higham J, Puttemans P, White J, Christian M, Fusi L, Brosens J. Aromatase P450 messenger RNA expression in eutopic endometrium is not a specific marker for pelvic endometriosis. *Fertil Steril.* 2002, 78(4):825-9.

Dibbelt L, Kuss E. Human placental steryl-sulfatase. Interaction of the isolated enzyme with substrates, products, transition-state analogues, amino-acid modifiers and anion transport inhibitors. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1991 Mar;372(3):173-85.

Diehl JA. Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biol Ther.* 2002, 1(3):226–231.

Dooley TP, Haldeman-Cahill R, Joiner J, Wilborn TW. Expression profiling of human sulfotransferase and sulfatase gene superfamilies in epithelial tissues and cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000, 277(1), 236-245.

Dubowy RL, Feinberg RF, Keefe DL, Doncel GF, Williams SC, McSweet JC, Kliman HJ. Improved endometrial assessment using cyclin E and p27. *Fertil Steril.* 2003, 80(1):146-56.

Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 2005 Mar 24;352(12):1223-36. Review.

Elliott JL, Hosford SL, Demopoulos RI, Perloe M, Sills ES. Endometrial adenocarcinoma and polycystic ovary syndrome: risk factors, management, and prognosis. *South Med J.* 2001, 94(5):529-31.

Ezaki K, Motoyama H, Sasaki H. Immunohistologic localization of estrone sulfatase in uterine endometrium and adenomyosis. *Obstet Gynecol.* 2001, 98(5 Pt 1):815-9.

Falany JL & Falany CN. Regulation of estrogen sulfotransferase in human endometrial adenocarcinoma cells by progesterone. *Endocrinology* 1996, 137(4): 1395–1401.

Falany JL, Ricardo A, Charles NF. Identification and characterization of cytosolic sulfotransferases in normal human endometrium. *Chemico-Biological Interactions.* 1998, 109(1-3): 329-339.

Fassnacht M, Schlenz N, Schneider SB, Wudy SA, Allolio B, Arlt W. Beyond Adrenal and Ovarian Androgen Generation: Increased Peripheral 5 α -Reductase Activity in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2003, 88(6):2760–6.

Ferenczy A, Bertrand G, and Gelfand MM. Proliferation kinetics of human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol.* 1979, 133(8): 859-67.

Fisher RP. Cdks and cyclins in transition(s). *Curr. Opin. Gene Dev.* 1997. 7(1): 32–38.

Foster PA, Newman SP, Chander SK, Stengel C, Jhalli R, Woo LL, Potter BV, Reed MJ, Purohit A. In vivo efficacy of STX213, a second-generation steroid sulfatase inhibitor, for hormone-dependent breast cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2006 Sep 15;12(18):5543-9.

Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology.* 2004, 145(12):5439-47. Epub 2004 Aug 26. Review

Fujimoto J, Nishigaki M, Hori M, Ichigo S, Itoh T, and Tamaya T. The effect of estrogen and androgen on androgen receptors and mRNA levels in uterine leiomyoma, myometrium and endometrium of human subjects. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1994, 50(3-4): 137-43.

Fujimoto J, Sakaguchi H, Aoki I, Toyoki H, and Tamaya T. Clinical implications of the expression of estrogen receptor α and β in primary and metastatic lesions of uterine endometrial cancers. *Oncology.* 2002, 62(3): 269-77.

Fukuchi T, Sakamoto M, Tsuda H, Maruyama K, Nozawa S, Hirohashi S. Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer Res.* 1998, 58(16): 3526-8.

Futterweit W. Polycystic ovary syndrome: clinical perspectives and management. *Obstet Gynecol Surv.* 1999, 54(6): 403-13. Review.

Gao X, Loggie B W, Nawaz Z. The roles of sex steroid receptor coregulators in cancer. *Molecular Cancer.* 2002, 1(1): 7.

Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2003, 1653(1):1-24. Review.

Giudice LC. Elucidating endometrial function in the post-genomic era. *Human Reproduction Update* 2003, 9(3): 223–235.

Giudice LC. Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2006 Jun; 20(2):235-44. Review.

Gold LI, Saxena B, Mittal KR, Marmor M, Goswami S, Nactigal L, Korc M, Demopoulos RI. Increased expression of transforming growth factor beta isoforms and basic fibroblast growth factor in complex hyperplasia and adenocarcinoma of the endometrium: evidence for paracrine and autocrine action. *Cancer Res.* 1994, 54(9): 2347-58.

Gregory CW, Wilson EM, Apparao KB, Lininger RA, Meyer WR, Kowalik A, Fritz MA, Lessey BA. Steroid receptor coactivator expression throughout the menstrual cycle in normal and abnormal endometrium. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002, 87(6):2960-6.

Greisen S, Flyvbjerg A, Ledet T, Ovesen P. Regulation of insulin-like growth factor binding protein secretion by human granulosa luteal cells in a polycystic ovary-like environment. *Fertil Steril.* 2002, 78(1):162-8.

Gurpide E, Gusberg SB & Tseng L. Estradiol binding and metabolism in human endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *The Journal of Steroid Biochemistry* 1976, 7(11-12): 891–896.

Gurpide E. Endometrial cancer: biochemical and clinical correlates Review *J Nat Cancer Inst.* 1991, 83(6): 405-416.

Gustafsson JA. An update on estrogen receptors. *Semin Perinatol.* 2000, 24(1): 66–9.

Hahnel R, Twaddle E, Ratajczak T. The specificity of the estrogen receptor of human uterus. *J. Steroid Biochem.* 1973, 4(1): 21–31.

Hammond GL. Molecular properties of corticosteroid binding globulin and the sex-steroid binding proteins. *Endocr. Rev.* 1990, 11(1):65–79.

Hardiman P, Pillay OC, Atiomo W. Polycystic ovary syndrome and endometrial carcinoma. *Lancet.* 2003,361(9371):1810-2. Review. Erratum in: *Lancet.* 2003, 362(9389):1082.

Holnthoner W, Pillinger M, Groger M, Wolff K, Ashton AW, Albanese C, Neumeister P, Pestell RG, Petzelbauer P. Fibroblast growth factor-2 induces Lef/Tcf-dependent transcription in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 2002, 277:45847–45853.

Homburg R. Polycystic ovary syndrome- from gynaecological curiosity to multisystem endocrinopathy. *Hum Reprod.* 1996, 11(1): 29-39.

Hosokawa Y, Arnold A. Mechanism of cyclin D1 (CCND1, PRAD1) overexpression in human cancer cells: analysis of allele-specific expression. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998, 22(1): 66-71. Review.

Hou X, Tan Y, Li M, Dey SK, Das SK. Canonical Wnt signaling is critical to estrogen-mediated uterine growth. *Mol Endocrinol.* 2004, 18(12):3035-49.

Howe JR, Roth S, Ringold JC, Summers RW, Jarvinen HJ, Sistonen P, Tomlinson IP, Houlston RS, Bevan S, Mitros FA, Stone EM, Aaltonen LA. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science.* 1998, 80(5366):1086-8.

Hsueh AJ, Peck EJ Jr, Clark JH. Control of uterine estrogen receptor levels by progesterone. *Endocrinology.* 1976, 98(2): 438-44.

Hwang HC, Clurman BE. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene.* 2005, 24(17):2776-86. Review.

Inoue K, Sherr CJ. Gene expression and cell cycle arrest mediated by transcription factor DMP1 is antagonized by D-type cyclins through a cyclindependent-kinase-independent mechanism. *Mol Cell Biol.* 1998, 18(3):1590–1600.

Ito K, Suzuki T, Akahira J, Moriya T, Kaneko C, Utsunomiya H, Yaegashi N, Okamura K, Sasano H. Expression of androgen receptor and 5alpha-reductases in the human normal endometrium and its disorders. *Int J Cancer.* 2002, 99(5):652-7.

Ito K, Utsunomiya H, Suzuki T, Saitou S, Akahira J, Okamura K, Yaegashi N, Sasano H. 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human endometrium and its disorders. *Mol Cell Endocrinol.* 2006, 248(1-2):136-40. Review.

Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Magoffin DA. 5alpha-reductase activity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999, 84(7): 2414-8.

Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39: 295-312. Review.

Johnson MC, Pinto C, Alves A, Palomino A, Fuentes A, Boric MA, Vega M. [P450Arom and estrogenic microenvironment of eutopic endometria in endometriosis] *Rev Med Chil.* 2004, 132(12):1475-82. Spanish.

Kato N, Watanabe J, Jobo T, Nishimura Y, Fujisawa T, Kamata Y, Kuramoto H. Immunohistochemical expression of cyclin E in endometrial adenocarcinoma (endometrioid type) and its clinicopathological significance. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003, 129(4): 222-6.

Katzenellenbogen BS, Montano MM, Ediger TR, Sun J, Ekena K, Lazennec G, Martini PG, McInerney EM, Delage-Mourroux R, Weis K, Katzenellenbogen JA. Estrogen receptors: selective ligands, partners, and distinctive pharmacology. *Recent Prog Horm Res.* 2000, 55:163-93; discussion 194-5. Review.

Kershah SM, Desouki MM, Koterba KL, Rowan BG. Expression of estrogen receptor coregulators in normal and malignant human endometrium. *Gynecol Oncol.* 2004, 92(1): 304-13.

Kidson W. Polycystic Ovary Syndrome: a new direction in treatment. *Med J Aust.* 1998, 169(10): 537-40.

King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol.* 1998, 60: 601-17. Review.

Kitawaki J, Koshiba H, Ishihara H, Kusuki I, Tsukamoto K, Honjo H. Progesterone induction of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 during thesecretory phase occurs in the endometrium of estrogen-dependent benign diseases but not in normal endometrium. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000, 85(9):3292-6.

Kitawaki J, Noguchi T, Amatsu T, Maeda K, Tsukamoto K, Yamamoto T, Fushiki S, Osawa Y, Honjo H. Expression of aromatase cytochrome P450 protein and messenger ribonucleic acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium. *Biol Reprod.* 1997, 57(3):514-9.

Knudsen KE, Cavenee WK, Arden KC. D-type cyclins complex with the androgen receptor and inhibit its transcriptional transactivation ability. *Cancer Res.* 1999, 59(10): 2297–2301.

Koch A, Denkhaus D, Albrecht S, Leuschner I, von Schweinitz D, Pietsch T. Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res.* 1999, 59(2): 269-73..

Kollara A, Kahn HJ, Marks A, Brown TJ. Loss of androgen receptor associated protein 70 (ARA70) expression in a subset of HER2-positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat.* 2001, 67(3):245-53.

Kurman RJ, Kaminski PF, Norris HJ. The behavior of endometrial hyperplasia. A long-term study of "untreated" hyperplasia in 170 patients. *Cancer.* 1985, 15;56(2): 403-12.

Labbe E, Letamendia A, Attisano L. Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor-beta and wnt pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, 97(15): 8358-63.

Labrie F, Luu-The V, Lin SX, Labrie C, Simard J, Breton R, Belanger A. The key role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids.* 1997, 62(1):148-58.

Lamb J, Ladha MH, McMahon C, Sutherland RL, Ewen ME. Regulation of the functional interaction between cyclin D1 and the estrogen receptor. *Mol Cell Biol.* 2000, 20(23):8667–8675.

Lannigan DA. Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids,* 2003, 68(1): 1-9.

Leo C, Chen JD. The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene.* 2000, 245(1): 1-11. Review.

Levy L, Hill CS. Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006, 17(1-2): 41-58. Review.

Liu F. Smad3 phosphorylation by cyclin-dependent kinases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006, 17(1-2): 9-17.

Luo X, Xu J, Chegini N. The expression of Smads in human endometrium and regulation and induction in endometrial epithelial and stromal cells by transforming growth factor-beta. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003, 88(10): 4967-76.

Luu-The V. Analysis and characteristics of multiple types of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001, 76(1-5),143-51.

Ma XX, Zhang SL, Gao S, Lu JM, Dong F. [Expressions of aromatase protein and sex hormone receptor in endometrial lesions] *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2006, 41(6):395-8.

Maliqueo M, Clementi M, Gabler F, Johnson MC, Palomino A, Sir Petermann T, Vega M. Expression of Steroid receptors and proteins related to apoptosis in endometria of women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2003, 80 suppl 2: 812-9.

Maliqueo M. Cambios en el patrón de expresión de los receptores de estrógenos y progesterona en endometrio humano normal, efecto de los andrógenos y de inductores de apoptosis. Tesis de Postgrado Magíster en Ciencias Biológicas, mención Biol de la Reprod 2001.

Maliqueo MA, Quezada S, Clementi M, Bacallao K, Anido M, Johnson C, Vega M. Potential action of androstenedione on the proliferation and apoptosis of stromal endometrial cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004, 10; 2: 81.

Maofu F, Wang C, Zhang X, Pestell R. Nuclear receptor modification and endocrine cell proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003, 85(2-5): 133-8.

Massague J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell.* 2000, 103(2): 295-309. Review.

Massague J, Gomis RR. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett.* 2006; 580 (12): 2811-20. Review.

Massague J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000, 1(3):169-78. Review.

McMahon C, Suthiphongchai T, DiRenzo J, Ewen ME. P/CAF associates with cyclin D1 and potentiates its activation of the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999, 96(10): 5382–5387.

Meikrantz W, Schlegel R. Apoptosis and the cell cycle. *J. Cell. Biochem.* 1995, 58 (2):160–74.

Miettinen MM, Mustonen MV, Poutanen MH, Isomaa VV, Vihko RK. Human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 isoenzymes have opposite activities in cultured cells and characteristic cell- and tissue-specific expression. *Biochem J.* 1996, 314 (Pt 3):839-45.

Miki Y, Nakata T, Suzuki T, Darnel AD, Moriya T, Kaneko C, Hidaka K, Shiotsu Y, Kusaka H, Sasano H. Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002, 87(12):5760-8.

Milde-Langosch K, Bamberger AM, Goemann C, Rossing E, Rieck G, Kelp B, Loning T. Expression of cell-cycle regulatory proteins in endometrial carcinomas: correlations with hormone receptor status and clinicopathologic parameters. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2001, 127(9): 537-44.

Miller JR. The Wnts. *Genome Biol.* 2002;3(1): Review.

Mindnich R, Moller G, Adamski J. The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol.* 2004, 218(1-2):7-20. Review.

Misao R, Itoh N, Mori H, Fujimoto J, Tamaya T. Sex hormone-binding globulin mRNA levels in human uterine endometrium. *Eur J Endocrinol.* 1994, 131(6):623-9.

Misao R, Nakanishi Y, Fujimoto J, Tamaya T. Expression of sex hormone-binding globulin exon VII splicing variant messenger RNA in human uterine endometrial cancers. *Cancer Res.* 1997, 15;57(24):5579-83.

Morgan DO. Principles of Cdk regulation. *Nature* 1995. 374(6518): 131–34.

Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF- β signal transduction. *J Cell Sci.* 2001,114:4359-4369.

Murray A, Hunt T. 1993. *The Cell Cycle.* New York: Oxford Univ. Press. 251 pp.

Murray A. Cell cycle checkpoints. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1994, 6(6): 872–76.

Nagafuchi A, Takeichi M. Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: a 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of E-cadherin. *Cell Regul.* 1989, 1(1): 37-44.

Nakata T, Takashima S, Shiotsu Y, Murakata C, Ishida H, Akinaga S, Li PK, Sasano H, Suzuki T, Saeki T. Role of steroid sulfatase in local formation of estrogen in post-menopausal breast cancer patients. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003, 86 (3-5): 455-60.

Noble LS, Simpson ER, Johns A, Bulun SE. Aromatase expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996, 81(1):174-9.

Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol.* 1975, 122(2):262-3.

Ohtsubo M, Roberts JM. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science.* 1993 Mar 26;259(5103):1908-12.

Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW. Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem.* 1997, 272(40): 24735-8.

Oshita T, Shigemasa K, Nagai N, Ohama K. p27, cyclin E, and CDK2 expression in normal and cancerous endometrium. *Int J Oncol.* 2002 Oct;21(4):737-43.

Oyama T, Kashiwabara K, Yoshimoto K, Arnold A, Koerner F. Frequent overexpression of the cyclin D1 oncogene in invasive lobular carcinoma of the breast. *Cancer Res.* 1998, 58(13): 2876-80.

Parekh TV, Gama P, Wen X, Demopoulos R, Munger JS, Carcangiu ML, Reiss M, Gold LI. Transforming growth factor β signaling is disabled early in human endometrial carcinogenesis concomitant with loss of growth inhibition. *Cancer Res.* 2002, 62: 2778–2790.

Pasqualini JR, Chetrite G, Blacker C, Feinstein MC, Delalonde L, Talbi M, Maloche C. Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and postmenopausal breast cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996, 81(4):1460-4.

Pestell RG, Albanese C, Reutens AT, Segall JE, Lee RJ, and Arnold A. The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation *Endocrine Reviews* 20 (4): 501-534, 1999.

Piesterzeniewicz-Ulanska D, Brys M, Semczuk A, Jakowicki JA, Krajewska WM. Expression and intracellular localization of Smad proteins in human endometrial cancer. *Oncol Rep.* 2003, 10(5):1539-44.

Pillay OC, Te Fong LF, Crow JC, Benjamin E, Mould T, Atiomo W, Menon PA, Leonard AJ, Hardiman P. The association between polycystic ovaries and endometrial cancer. *Hum Reprod.* 2006, 21(4): 924-9.

Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell.* 1994, 78(1):59-66.

Purohit A, Woo LW, Chander SK, Newman SP, Ireson C, Ho Y, Grasso A, LeeseMP, Potter BV, Reed MJ. Steroid sulphatase inhibitors for breast cancer therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003 Sep;86(3-5):423-32. Review.

Quezada S, Avellaira C, Johnson MC, Gabler F, Fuentes A, Vega M. Evaluation of steroid receptors, coregulators, and molecules associated with uterine receptivity in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2006 Apr;85(4):1017-26.

Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed SI. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol.* 1994 Mar;14(3):1669-79.

Reutens AT, Fu M, Wang C, Albanese C, McPhaul MJ, Sun Z, Balk SP, Janne OA,Palvimo JJ, Pestell RG. Cyclin D1 binds the androgen receptor and regulates hormone-dependent signalling in a p300/CBP-associated factor (P/CAF)-dependent manner. *Mol Endocrinol.* 2001 May;15(5):797-811. Erratum in: *Mol Endocrinol* 2001

Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Nakhla AM, Romas NA. Androgen and estrogen signaling at the cell membrane via G-proteins and cyclic adenosine monophosphate. *Steroids*. 1999 Jan-Feb;64(1-2):100-6. Review.

Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2004, 81(1):19-25.

Ruder HJ, Loriaux L, Lipsett MB. Estrone sulfate: production rate and metabolism in man. *J Clin Invest*. 1972, 51(4):1020-33.

Ruhul Quddus M, Latkovich P, Castellani WJ, James Sung C, Steinhoff MM, Briggs RC, Miranda RN. Expression of cyclin D1 in normal, metaplastic, hyperplastic endometrium and endometrioid carcinoma suggests a role in endometrial carcinogenesis. *Arch Pathol Lab Med*. 2002 Apr;126(4):459-63.

Saito T, Oda Y, Yamamoto H, Kawaguchi K, Tanaka K, Matsuda S, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Nuclear beta-catenin correlates with cyclin D1 expression in spindle and pleomorphic sarcomas but not in synovial sarcoma. *Hum Pathol*. 2006 Jun;37(6):689-97.

Salamonsen LA and Nancarrow CD. 1994, *Cell Biology of the Oviduct and Endometrium*. En: *Molecular biology of the female reproductive system*. Findlay JK ed. Academic Press.

Sasano H, Suzuki T, Nakata T, Moriya T. New development in intracrinology of breast carcinoma. *Breast Cancer*. 2006;13(2):129-36. Review.

Sasano H., Harada N. Intratumoral aromatase in human breast, endometrial, and ovarian malignancies. *Endocr Rev*. 1998, 19(5): 593-607.

Satyaswaroop PG, Wartell DJ, Mortel R. Distribution of progesterone receptor, estradiol dehydrogenase, and 20 alpha-dihydroprogesterone dehydrogenase activities in human endometrial glands and stroma: progestin induction of steroid dehydrogenase activities in vitro is restricted to the glandular epithelium. *Endocrinology*. 1982, 111(3):743-9.

Schmidt WN, Katzenellenbogen BS. Androgen-uterine interactions: an assessment of androgen interaction with the testosterone- and estrogen-receptor systems and stimulation of uterine growth and progesterone-receptor synthesis. *Mol Cell Endocrinol*. 1979, 15(2):91-108.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000, 182(3):311-22. Review.

Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev*. 1993, 14(2):133-51. Review.

- Segreti EM.** Endometrial hyperplasia and carcinoma in women with androgen excess disorders. Capítulo 64: 667-672, 1997.
- Sherman ME.** Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach. *Mod Pathol.* 2000, 13(3): 295-308.
- Sherr CJ, McCormick F.** The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell.* 2002, 2(2):103-12. Review.
- Sherr CJ, Roberts JM.** CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 1999, 13(12):1501-12. Review.
- Shi W, Sun C, He B, Xiong W, Shi X, Yao D, Cao X.** GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *J Cell Biol.* 2004, 164(2): 291-300.
- Shiozawa T, Nikaido T, Nakayama K, Lu X, Fujii S.** Involvement of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in growth inhibition of endometrium in the secretory phase and of hyperplastic endometrium treated with progesterone. *Mol Hum Reprod.* 1998, 4(9):899-905.
- Shoker BS, Jarvis C, Davies MP, Iqbal M, Sibson DR, Sloane JP.** Immunodetectable cyclin D(1) is associated with oestrogen receptor but not Ki67 in normal, cancerous and precancerous breast lesions. *Br J Cancer.* 2001, 84(8):1064-9.
- Shupnik MA.** Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation. *Oncogene.* 2004, 23(48):7979-89. Review.
- Simon C, Piquette GN, Frances A, Polan ML.** Localization of interleukin-1 type I receptor and interleukin-1 beta in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993, 77(2): 549-55.
- Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, et al.** Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev.* 1994, 15(3):342-55. Review.
- Slayden OD, Chwalisz K, Brenner RM.** Reversible suppression of menstruation with progesterone antagonists in rhesus macaques. *Hum Reprod.* 2001, 16(8):1562-74.
- Slingerland J, Pagano M.** Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol.* 2000 Apr;183(1):10-7. Review.
- Speroff L, Glass R, and Kase N.** 1994 Hormone biosynthesis, metabolism, and mechanism of action. In: C. Mitchell (ed.) *Clinical gynecologic endocrinology and infertility.* 5 ed. Pp. 31-92. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Speroff L, Vande Wiele RL.** Regulation of the human menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol.* 1971, 109(2): 234-47.

Stein C, Hille A, Seidel J, Rijnbout S, Waheed A, Schmidt B, Geuze H, von Figura K. Cloning and expression of human steroid-sulfatase. Membrane topology, glycosylation, and subcellular distribution in BHK-21 cells. *J Biol Chem.* 1989, 264(23):13865-72.

Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000, 6;403(6765):41-5.

Sumrejkanchanakij P, Tamamori-Adachi M, Matsunaga Y, Eto K, Ikeda MA. Role of cyclin D1 cytoplasmic sequestration in the survival of postmitotic neurons. *Oncogene.* 2003 Nov 27;22 (54): 8723-30.

Susaki E, Nakayama K, Nakayama KI. Cyclin D2 translocates p27 out of the nucleus and promotes its degradation at the G0-G1 transition. *Mol Cell Biol.* 2007 Apr 23; [Epub ahead of print].

Tabibzadeh S. The signals and molecular pathways involved in human menstruation, a unique process of tissue destruction and remodeling. *Mol Hum Reprod.* 1996, 2(2): 77-92.

Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, Le Shay N, Nezhat CN, Kempson R, Lessey BA, Nayak NR, Giudice LC. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology.* 2006, 147(3):1097-121.

Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature.* 2000, 407(6803): 530-5.

Tamamori-Adachi M, Ito H, Sumrejkanchanakij P, Adachi S, Hiroe M, Shimizu M, Kawauchi J, Sunamori M, Marumo F, Kitajima S, Ikeda MA. Critical role of cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferation. *Circ Res.* 2003, 10;92(1):e12-9.

Tao XJ, Tilly KI, Maravei DV, Shifren JL, Krajewski S, Reed JC, Tilly JL, Isaacson KB. Differential expression of members of the bcl-2 gene family in proliferative and secretory human endometrium: glandular epithelial cell apoptosis is associated with increased expression of bax. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Aug;82(8):2738-46.

Taylor AH, Guzail M, Wahab M, Thompson JR, Al-Azzawi F. Quantitative histomorphometric analysis of gonadal steroid receptor distribution in the normal human endometrium through the menstrual cycle. *Histochem Cell Biol.* 2005, 123(4-5): 463-74.

Tuckerman EM, Okon MA, Li T, Laird SM. Do androgens have a direct effect on endometrial function? An in vitro study. *Fertil Steril.* 2000, 74(4): 771-9.

Uchikawa J, Shiozawa T, Shih HC, Miyamoto T, Feng YZ, Kashima H, Oka K, Konishi I. Expression of steroid receptor coactivators and corepressors in human endometrial hyperplasia

and carcinoma with relevance to steroid receptors and Ki-67 expression. *Cancer*. 2003, 98(10): 2207-13.

Utsunomiya H, Ito K, Suzuki T, Kitamura T, Kaneko C, Nakata T, Niikura H, Okamura K, Yaegashi N, Sasano H. Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004 Sep 1;10(17):5850-6.

van der Poel HG. Androgen receptor and TGFbeta1/Smad signaling are mutually inhibitory in prostate cancer. *Eur Urol*. 2005, 48 (6): 1051-8.

Van Landeghem AA, Poortman J, Nabuurs M, Thijssen JH. Endogenous concentration and subcellular distribution of estrogens in normal and malignant human breast tissue. *Cancer Res*. 1985, 45(6): 2900-6.

Verras M, Sun Z. Roles and regulation of Wnt signaling and beta-catenin in prostate cancer. *Cancer Lett*. 2006, 237(1): 22-32. Review.

Villavicencio A, Bacallao K, Avellaira C, Gabler F, Fuentes A, Vega M. Androgen and estrogen receptors and co-regulators levels in endometria from patients with polycystic ovarian syndrome with and without endometrial hyperplasia. *Gynecol Oncol*. 2006 Oct;103(1):307-14.

Villavicencio A, Bacallao K, Gabler F, Fuentes A, Albornoz J, Casals A, Vega M. Deregulation of tissue homeostasis in endometria from patients with polycystic ovarian syndrome with and without endometrial hyperplasia. *Gynecol Oncol*. 2007, 104 (2): 290-5.

Von Rango U, Classen-Linke I, Krusche CA, Beier HM. The receptive endometrium is characterized by apoptosis in the glands. *Hum Reprod*. 1998, 13(11): 3177-89.

Wang C, Li Z, Fu M, Bouras T, Pestell RG. Signal transduction mediated by cyclin D1: from mitogens to cell proliferation: a molecular target with therapeutic potential. *Cancer Treat Res*. 2004, 119: 217-37. Review.

Watanabe K, Sasano H, Harada N, Ozaki M, Niikura H, Sato S, Yajima A. Aromatase in human endometrial carcinoma and hyperplasia. Immunohistochemical, in situ hybridization, and biochemical studies. *Am J Pathol*. 1995,146(2):491-500.

Watson H, Franks S and Bonney RC. Regulation of epidermal growth factor receptor by androgens in human endometrial cells in culture. *Hum Reprod*. 1997, 13: 2585-91.

Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L, Schwartz S, Vaizel-Ohayon D, Schejter E, Tomlinson A, DiNardo S. Arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature*. 2000, 407(6803): 527-30. Erratum in: *Nature* 2001, 410(6830): 847.

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995, 81(3):323-30. Review.

- Whitman M.** Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily. *Genes Dev.* 1998 Aug 15;12(16):2445-62. Review.
- Wild S, Pierpoint T, Jacobs H, McKeigue P.** Long-term consequences of polycystic ovary syndrome: results of a 31 year follow-up study. *Hum Fertil.* 2000, 3(2): 101-05.
- Witek A, Mazurek U, Paul M, Bierzynska-Macyszyn G, and Wilczok T.** Quantitative analysis of estrogen receptor alpha and beta and exon 5 splicing variant mRNA in endometrial hyperplasia in perimenopausal women. *Folia Histochem Cytobiol.* 2001, 39 Suppl 2: 119-21.
- Xita N, Georgiou I, Tsatsoulis A.** The genetic basis of polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2002;147(6):717-25.
- Xu L, Alarcon C, Col S, Massague J.** Distinct domain utilization by Smad3 and Smad4 for nucleoporin interaction and nuclear import. *J Biol Chem.* 2003, 278(43): 42569-77.
- Yang F, Li X, Sharma M, Sasaki CY, Longo DL, Lim B, Sun Z.** Linking beta-catenin to androgen-signaling pathway. *J Biol Chem.* 2002, 277(13): 11336-44.
- Yang S, Fang Z, Gurates B, Tamura M, Miller J, Ferrer K, Bulun SE.** Stromal PRs mediate induction of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in human endometrial epithelium: a paracrine mechanism for inactivation of E2. *Mol Endocrinol.* 2001,15(12):2093-105.
- Zhang H, Varlamova O, Vargas FM, Falany CN, Leyh TS.** Sulfuryl transfer: the catalytic mechanism of human estrogen sulfotransferase. *J Biol Chem.* 1998 May 1; 273(18): 10888-92. Erratum in: *J Biol Chem* 1998, 273(27):17296. Varmalova O.
- Zhang Y, Derynck R.** Regulation of Smad signalling by protein associations and signalling crosstalk. *Trends Cell Biol.* 1999 Jul;9(7):274-9. Review.
- Zhou Y, Kato H, Shan D, Minami R, Kitazawa S, Matsuda T, Arima T, Barrett JC, Wake N.** Involvement of mutations in the DPC4 promoter in endometrial carcinoma development. *Mol Carcinog.* 1999, 25(1): 64-72.
- Zhu Y, Richardson JA, Parada LF, Graff JM.** Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell.* 1998, 94(6): 703-14.