



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACEUTICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

EFFECTO DE TNF- α SOBRE EL SISTEMA DE LAS
METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ EN ENDOMETRIO
EUTÓPICO DE ENDOMETRIOSIS

MEMORIA PARA OPTAR AL TITULO DE BIOQUÍMICO

CAROLINA PÍA GALLEGUILLOS DÍAZ

Profesor Patrocinante: Prof. Dr. Hernán Lara P.
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
Departamento de Bioquímica y Biología Celular.

Directora de Tesis: Prof. Dra. Maria Cecilia Johnson Pena.
Universidad de Chile. Facultad de Medicina. Campus Centro.
Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI).

2007

DEDICATORIA

A mis abuelos que conocí y por circunstancias de la vida los que no pude conocer

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo a Cecilia por acogerme durante tanto tiempo en su laboratorio, donde aprendí mucho tanto a nivel profesional como personal. Gracias por su apoyo, sencillez, honestidad y en especial por su preocupación en cada uno de nosotros, tus tesis. Creo que es una de las pocas personas que he conocido que tiene la virtud de perdonar y volver a creer.

Angélica a pesar de las miles de preocupaciones o trabajo que tenía que realizar, le agradezco su incondicional ayuda y alegría que mostraba cada día.

Marisa, más que todo lo que me enseñaste en el laboratorio, prefiero agradecerte por haber compartido parte de tu vida conmigo y a pesar de nuestras diferencias climáticas en ti encontré una amistad sincera y divertida.

Maricela, gracias por tu compañía y por haber encontrado una persona muy especial, donde la amistad es tu fortaleza y la espontaneidad tu virtud.

Gracias Simón por haber compartido tanto de música como amistad y sobretodo su ayuda ilimitada y voluntaria que siempre me entregó.

También agradecer a Jazmín por su amistad, a Pía con sus locuras, a todos los chicos de la USACH, por su compañerismo y entrega de conocimientos.

Por último quiero agradecer a mi familia que ha estado siempre acompañándome en este camino. A mis hermanos porque haber creído en mí. A mi padre querido que a pesar de todas las dificultades que hemos tenido, tu apoyo y compañía siempre han estado conmigo. A mi madre preciosa e incondicional, que con tu fuerza y perseverancia he podido llegar hasta acá.

Y como olvidarme de ti, mi Carlitos que siempre estuviste en mis buenas y malas, recogéndome si me caía, dándome alegría en todo momento. Gracias por tu paciencia, compañía, amor y cariño infinito que has tenido en todo este largo periodo.

AGRADECIMIENTOS	3
INDICE	4
INDICE DE FIGURAS Y ESQUEMAS	5
INDICE DE TABLAS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	8
I. INTRODUCCIÓN	9
II. HIPÓTESIS	19
III. OBJETIVOS GENERALES	19
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
V. MATERIALES Y MÉTODOS	20
VI. RESULTADOS	28
<i>VI.1 MMPs y TIMPs en endometrio eutópico de mujeres con y sin endometriosis durante el ciclo menstrual</i>	28
<i>VI.2. MMPs y TIMPs en cultivos celulares endometriales provenientes de endometrios eutópicos de mujeres con y sin endometriosis</i>	42
VII. DISCUSIÓN	56
VIII. CONCLUSIONES	66
IX. PROYECCIONES	67
X. BIBLIOGRAFÍA	69
XI. ANEXOS	76

INDICE DE FIGURAS Y ESQUEMAS

Esquema 1. Expresión del sistema de las MMPs en el ciclo menstrual endometrial.....	13
Figura 1. Posibles vías de regulación de TNF- α sobre la expresión de MMPs.....	18
Esquema 2. Diagrama experimental.....	21
Figura 2. Gel electroforético representativo de amplificadores de MMP-2, MMP-9, MMP-7, MMP-26 y TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4 y rRNA 18S.....	29
Figura 3. Niveles de mRNA de MMP-7 y MMP-26 en endometrios obtenidos de mujeres controles y con endometriosis durante el ciclo menstrual.....	30
Figura 4. Niveles de mRNA de los TIMPs en endometrios obtenidos de mujeres controles y con endometriosis durante el ciclo menstrual.....	31
Figura 5. Gel de zimografía para MMP-2 y MMP-9 y Western Blot del contenido proteico de MMP-7, MMP-26, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4 y β -actina en endometrios controles y de endometriosis durante el ciclo menstrual.....	34
Figura 6. Contenido de proteína de pro-MMP-7 y pro-MMP-26 en endometrios obtenidos de mujeres controles y con endometriosis durante el ciclo menstrual.....	35
Figura 7. Razones del mRNA entre MMPs y TIMPs en endometrios controles y de endometriosis según fases del ciclo menstrual.....	38
Figura 8. Razones proteicas entre MMPs y TIMPs en endometrios controles y de endometriosis según fases del ciclo menstrual.....	40
Figura 9. Expresión del mRNA de MMPs y TIMPs en cultivos celulares endometriales provenientes de endometrios de mujeres con y sin endometriosis.....	45
Figura 10. Efecto de TNF- α sobre la expresión del mRNA de MMP-9 y MMP-7 en cultivos de células endometriales estromales y epiteliales provenientes de endometrios de mujeres con y sin endometriosis.....	47
Figura 11. Efecto de TNF- α sobre la expresión del mRNA de TIMP-4 en cultivos de células endometriales estromales y epiteliales provenientes de endometrios de mujeres con y sin endometriosis.....	48
Figura 12. Expresión de la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 en cultivos de células endometriales y estromales provenientes de endometrios de mujeres con y sin endometriosis.....	50
Figura 13. Expresión proteica de MMP-7, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 en cultivos de células endometriales y estromales provenientes de endometrios de mujeres con y sin endometriosis.....	50
Figura 14. Efecto de TNF- α sobre la actividad gelatinasa de pro-MMP-2 en el medio de cultivo de células endometriales estromales y epiteliales provenientes de endometrios de mujeres con y sin endometriosis.....	52
Figura 15. Efecto de TNF- α sobre la actividad gelatinasa de pro-MMP-9 y MMP-9 en medio de cultivo de células endometriales estromales y epiteliales provenientes de endometrios de mujeres con y sin endometriosis.....	53
Figura 16. Efecto de TNF- α sobre la expresión proteica de TIMP-4 glicosilada y no glicosilada en cultivos de células estromales y epiteliales provenientes de endometrios de mujeres con y sin endometriosis.....	55
Esquema 3. Expresión del sistema de las MMPs en endometrio de endometriosis.....	66
Esquema 4. Efecto de TNF- α sobre el sistema de las MMPs en endometrio eutópico de mujeres con endometriosis.....	67

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo para células endometriales estromales y epiteliales y DMEM definido.....	22
Tabla 2. Partidores específicos usados en la amplificación génica por RT-PCR.....	24
Tabla 3. Condiciones de la amplificación para los genes estudiados por RT-PCR.....	24
Tabla 4. Condiciones utilizadas en la realización de la técnica de Western blot para homogenizados de tejido y de células endometriales.....	26
Tabla 5. Niveles de mRNA de MMP-2 y MMP-9 en endometrios obtenidos de mujeres controles y con endometriosis durante el ciclo menstrual.....	30
Tabla 6. Actividad proteolítica de MMP-2 y MMP-9 en endometrios controles y de endometriosis durante el ciclo menstrual.....	35
Tabla 7. Contenido proteico de TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 en endometrios controles y de endometriosis durante el ciclo menstrual.....	36
Tabla 8. Razones del mRNA entre MMPs y TIMPs en endometrios controles y de endometriosis según fases del ciclo menstrual.....	39
Tabla 9. Razones proteicas entre MMPs y TIMPs en endometrios controles y de endometriosis según fases del ciclo menstrual.....	40
Tabla 10. Relación entre los niveles de mRNA y proteicos de MMPs y TIMPs en endometrios de mujeres con endometriosis y su procedencia.....	41
Tabla 11. Expresión basal de 2-3 y 24 horas del mRNA de MMPs y TIMPs en cultivos de células estromales y epiteliales provenientes de endometrios de mujeres con y sin endometriosis.....	46
Tabla 12. Efecto de TNF- α sobre la expresión proteica de pro-MMP-7, TIMP-2 y TIMP-3 en cultivos de células estromales y epiteliales provenientes de endometrios de mujeres con y sin endometriosis.....	54

RESUMEN

La endometriosis es una patología caracterizada por la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina que afecta alrededor del 10% de la población femenina en edad reproductiva, pero su etiología y patogénesis aún son poco claras. La presencia aumentada de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en el fluido peritoneal puede potenciar la capacidad invasiva de este tejido endometrial ectópico mediante la alteración del sistema de las metaloproteinasas (MMPs). Tanto el endometrio ectópico como el endometrio eutópico de estas pacientes son diferentes al de mujeres sin endometriosis. Sin embargo, poco se sabe del comportamiento de las MMPs y menos de su regulación en el endometrio eutópico de estas pacientes. Proponemos que en el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis ya existe una expresión alterada del sistema de las MMPs que afecta su funcionalidad y favorece la capacidad invasiva del tejido endometrial, donde TNF- α es una de las citoquinas involucrada en su regulación. Los objetivos del presente trabajo fueron estudiar la expresión de MMP-2, MMP-9, MMP-7, MMP-26, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 y el efecto de TNF- α en tejido endometrial eutópico de mujeres con endometriosis y compararlo con endometrio normal (control) en modelos *ex vivo* a través del ciclo menstrual y en cultivos celulares endometriales. Los resultados en el endometrio de pacientes con endometriosis, respecto al endometrio control, muestran un aumento de MMP-7 en fase proliferativa (mRNA: 56% y proteína: 57%) y una disminución de MMP-9 en fase secretora media (proteína: 58%), de MMP-26 en fase secretora inicial (mRNA: 60%), de TIMP-2 en fases proliferativa (mRNA: 45% y proteína: 50%) y secretora inicial (mRNA: 64%) y de TIMP-4 en fase secretora tardía (mRNA: 98%); MMP-2 y TIMP-3 fueron similares al control. En cultivos celulares de ambos grupos de endometrios: TNF- α (10 ng/mL, 24 horas) aumentó la secreción de MMP-2 (parcialmente inhibido por Bay 11-7085, inhibidor de la vía de NF κ B), el mRNA y la secreción de MMP-9 (independiente de NF κ B) y el mRNA de MMP-7 (independiente de NF κ B) y disminuyó el mRNA y proteína de TIMP-4 (efectos inhibidos por Bay). En endometrio eutópico de pacientes con endometriosis, la expresión o secreción de las MMPs está aumentada y la de los TIMPs reducida, efectos incrementados por TNF- α , lo que puede estar afectando su funcionalidad y promoviendo su actividad proteolítica permitiendo una capacidad mayor para invadir sitios ectópicos.

SUMMARY

Effect of TNF- α on Matrix Metalloproteinases system in eutopic endometrium from endometriosis

Endometriosis is a pathology characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity that affects about 10 % of the female population of reproductive age, but its etiology and pathogenesis are still unclear. The increased presence of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in the peritoneal fluid can enhance the invasive capacity of this ectopic endometrial tissue by altering the system of metalloproteinases (MMPs). Both the ectopic as the eutopic endometrium of these patients are different to that of women without endometriosis. However, little is known about the behavior of MMPs and its regulation in the eutopic endometrium of these patients. We propose that in eutopic endometrium of patients with endometriosis there is an altered expression of MMPs system that affects their functionality and enhances the invasive capacity of endometrial tissue, and TNF- α is one of the cytokines involved in its regulation. The objectives of this work were to study the expression of MMP-2, MMP-9, MMP-7, MMP-26, TIMP-2, TIMP-3, and TIMP-4 and the effect of TNF- α in eutopic endometrial tissue of women with endometriosis and compare it with normal endometrium (control) in ex vivo models through the menstrual cycle and in endometrial cell cultures. The results in the endometrium of patients with endometriosis respect the control endometrium, show an increase of MMP-7 in proliferative phase (mRNA: 56%; protein: 57%) and a decrease of proMMP-9 in mid secretory phase (protein: 57%), MMP-26 in early secretory phase (mRNA: 60%), TIMP-2 in proliferative (mRNA: 45% protein and 50%) and early secretory phase (mRNA: 64%) and TIMP-4 in late secretory phase (mRNA: 98%); MMP-2 and TIMP-3 were similar to the control. In cell cultures of both groups of endometria: TNF- α (10 ng / ml, 24 hours) increased MMP-2 secretion (partially inhibited by Bay11-7085, NF κ B pathway inhibitor), the mRNA and secretion of MMP-9 (NF κ B independent) and the mRNA for MMP-7 (NF κ B independent), and decreased mRNA and protein of TIMP-4 (effects inhibited by Bay). In eutopic endometrium from endometriosis women, the expression or secretion of MMPs are augmented and of TIMPs reduced, effects increased by TNF- α , may affect its functionality and promote its proteolytic activity that allow a higher invasive capacity in ectopic sites.

I. INTRODUCCIÓN

En la mujer, la morfología y función endometrial experimenta cambios característicos a través del ciclo menstrual. El endometrio manifiesta ciclos bien caracterizados de proliferación, diferenciación, y apoptosis en respuesta a la exposición predominante de un ambiente de esteroides sexuales ováricos (Jabbour y cols, 2006). Se compone de dos capas, la funcional donde ocurre la recepción del embrión y en ausencia de embarazo, se descama y la basal encargada de regenerar la capa funcional (Curry y Osteen, 2003; Jabbour y cols, 2006).

El ciclo menstrual promedio dura entre 28 a 30 días y se divide en tres fases: la fase preovulatoria, donde los estrógenos son responsables de los cambios proliferativos en el endometrio; la fase secretora postovulatoria, dominada por la progesterona que favorece la diferenciación endometrial y es caracterizada por la secreción glandular, y por último, la fase menstrual, provocada por el término del soporte hormonal esteroideal (la concentración sérica de progesterona y estrógeno declina) en respuesta a la ausencia de la implantación embrionaria. La fase secretora se subdivide en fase temprana, regulada por progesterona y estrógeno; en fase media, dependiente solamente de progesterona y en fase tardía, asociada con la disminución de los niveles circulantes de progesterona (Jabbour y cols, 2006).

Junto a las hormonas esteroidales, factores de crecimiento y citoquinas han sido involucrados en el remodelamiento del tejido conectivo, el cual está separado del epitelio por una membrana basal (MB), y está compuesto de elementos estromales como vasos sanguíneos y linfáticos, matriz extracelular (MEC) y componentes celulares que incluyen fibroblastos y macrófagos. La MB y la MEC están compuestas por diversas proteínas estructurales como proteínas fibrilares (colágeno y elastina), proteoglicanos y glicoproteínas (fibronectina y laminina) (Chakraborti y cols, 2003).

La modulación de la interacción entre células y MEC ocurre, en parte, a través de la acción de un sistema proteolítico responsable de la hidrólisis de una variedad de componentes de la MEC, regulando su integridad y composición de la MEC, y además intervenir en el comportamiento y fenotipo celular a través del control de señales que producen las moléculas de la matriz, participando en la regulación de la proliferación, la diferenciación y la muerte celular (Sternlicht y Werb, 2001). La renovación y remodelamiento de la MEC son altamente regulados, ya que un exceso de proteólisis contribuiría a un estado anormal

generando muchas condiciones patológicas caracterizadas por la excesiva degradación de componentes de la MEC, como ocurren en la artritis y cáncer (Curry y Osteen, 2003). Entre las proteínas que permiten esta regulación se encuentran las metaloproteinasas de la matriz (MMP) y sus inhibidores endógenos, que permiten la renovación de la MEC en procesos biológicos como el desarrollo embrionario, la angiogénesis, el crecimiento óseo, la menstruación, entre otros (Curry y Osteen, 2003; Dong y cols, 2002).

Metaloproteinasas de la Matriz

La familia de metaloproteinasas comprende más de 200 enzimas, agrupadas en base a su conformación tridimensional y a su estructura evolutiva, constituyendo 40 subfamilias diferentes, entre la que se encuentra la subfamilia de las metaloproteinasas de la matriz (Curry y Osteen, 2003).

En humanos están presentes 23 de las 24 MMPs identificadas (Visse y Nagase, 2003). Estas enzimas son estructuralmente muy similares, poseen dominios funcionales y mecanismos de activación comunes (Goldman y Shalev, 2003). Todas las MMPs contienen tres dominios básicos: el péptido señal, el propéptido (que le otorga a las MMPs su forma latente como zimógeno) y el catalítico (el cual contiene toda la maquinaria catalítica incluyendo un sitio de unión a zinc y una metionina conservada) (Curry y Osteen, 2003; Goldman y Shalev, 2003; Nagase y Woessner, 1999). Excepto por las matrilisinas que están compuestas sólo por estos dominios básicos, todas las MMPs humanas expresan un dominio en la región C-terminal para hemopexina (Goldman y Shalev, 2003), involucrado en la especificidad del sustrato de las MMPs y en la interacción con los inhibidores tisulares de metaloproteinasas de la matriz (TIMPs) (Dong y cols, 2002). Las MMPs funcionan a pH neutro y son secretadas hacia el espacio extracelular en forma de zimógeno, con excepción de las MMPs de membrana (MT-MMP) que permanecen ancladas a la membrana celular (Chakraborti y cols, 2003; Goldman y Shalev, 2003).

A pesar de las semejanzas señaladas anteriormente, las MMPs tienen diferencias estructurales que les otorgan distintos grados de reconocimiento y especificidad de los componentes de la MEC lo que permite agruparlas en 6 grupos: colagenasas, gelatinasas, estromelinas, matrilisinas, MMPs de membrana y MMPs de categoría diferente a las anteriores.

Las MMPs no sólo degradan a la MEC y sus proteínas, además son capaces de reconocer como sustratos a numerosas proteínas no pertenecientes a la MEC (McCawley y Matrisian, 2001), participando de esta manera, en la regulación de muchas actividades biológicas; por ello, su importancia en los procesos fisiológicos normales y patológicos.

Son secretadas como enzimas latentes y para su activación se ha sugerido un modelo llamado “Switch de Cisteína”, basado en la interacción entre una cisteína altamente conservada en el dominio propéptido y el átomo de zinc del sitio activo impidiendo la actividad proteolítica, y la disociación de esta unión que permite la activación (Das y cols, 2003).

Entre los activadores fisiológicos importantes está el sistema de la plasmina, constituido por proteasas serinas que pueden activar directamente a las proMMPs como también puede prevenir la inhibición de los TIMPs (Curry y Osteen, 2003; Kucharewicz y cols, 2003; Visse y Nagase, 2003). Las MMPs también pueden ser activadas por otras proteinasas, agentes químicos, especies reactivas del oxígeno, pH ácido y calor (Chakraborti y cols, 2003; Visse y Nagase, 2003).

Las MMPs que se resisten a estas proteasas son activadas por otros mecanismos. Es así que en la activación de MMP-2 se involucran otras metaloproteinasas, principalmente MT1-MMP y el inhibidor TIMP-2 (Curry y Osteen, 2003). Esta activación consiste en la formación de un complejo no inhibitorio entre la región C-terminal de TIMP-2 y pro-MMP-2, el cual es reconocido por el dominio extracelular de MT1-MMP, o bien, TIMP-2 puede unirse a MT1-MMP y formar un receptor para el zimógeno de MMP-2, permitiendo el clivaje y activación de MMP-2 por MT1-MMP. Este proceso puede ser regulado por la concentración de TIMP-2: a niveles bajos se favorece la formación del complejo no inhibitorio o el receptor con MT1-MMP, permitiendo la activación de MMP-2, y a niveles altos, TIMP-2 se une tanto a la pro-MMP-2 como MT1-MMP, impidiendo la unión de ambas proteasas (Curry y Osteen 2003, Nagase y Woessner, 1999).

Inhibidores de las MMPs

Existen dos importantes grupos, los inhibidores séricos y los inhibidores tisulares. Los inhibidores séricos tienen la habilidad de inhibir una amplia gama de proteinasas, incluyendo las MMPs en el suero y fluidos corporales. Los inhibidores tisulares de

metaloproteinasas (TIMPs) son producidos localmente e inhiben específicamente a las MMPs (Curry y Osteen 2003).

En el humano se han caracterizado cuatro inhibidores tisulares: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4, que son expresados por una variedad de tipos celulares y están presentes en la mayoría de los tejidos y fluidos del cuerpo (Lambert y cols, 2004). Los TIMPs son proteínas entre 21 a 34 kDa con varios sitios de N-glicosilación y poseen 12 residuos de cisteínas altamente conservados que forman seis enlaces disulfuro, permitiendo el pliegue de la proteína en la región N-terminal, que contiene el dominio inhibitorio para MMPs y se le atribuye la mayoría de sus funciones biológicas, y la región C-terminal que formaría complejos con los zimógenos o proMMP (Baker y cols, 2002; Lambert y cols, 2004). Los TIMPs son secretados y/o asociados a proteínas unidas a membrana que incluyen a las MT-MMP en la superficie celular. Solamente TIMP-3 permanece en la superficie celular a través de la unión con proteoglicanos (Baker y cols, 2002).

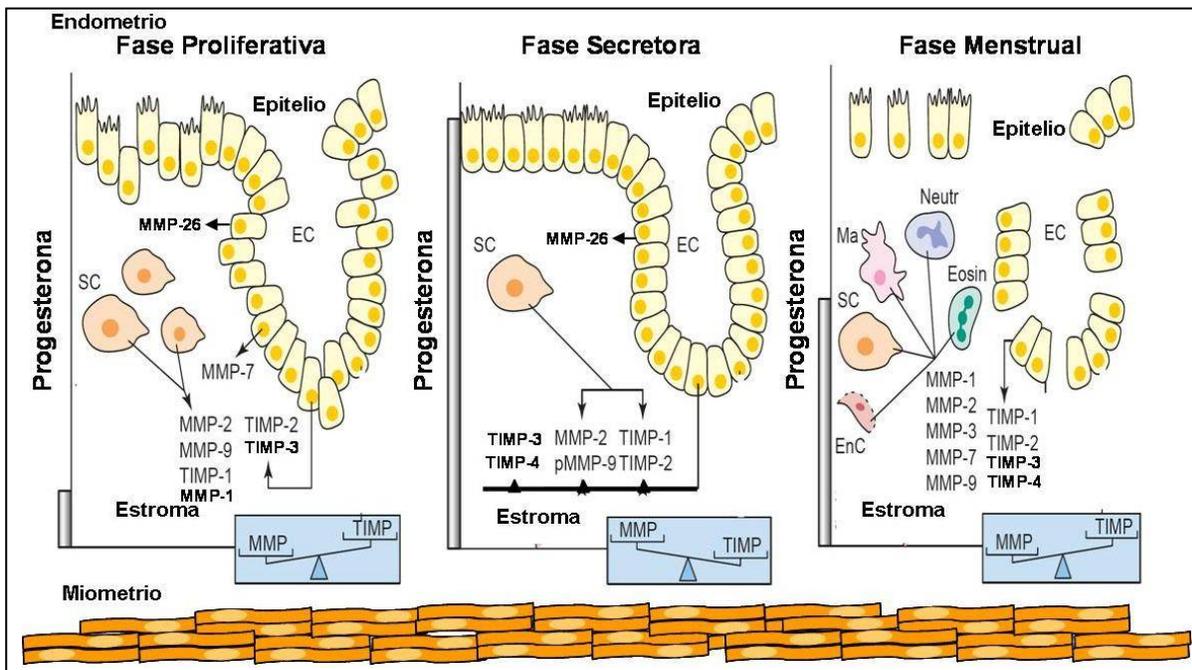
Los TIMPs inhiben la actividad proteolítica de las MMPs formando un complejo no covalente estequiométrico 1:1. La interacción TIMPs-MMPs involucra múltiples sitios que incluyen los puentes de disulfuro de cisteínas y el dominio N-terminal de TIMP con el sitio catalítico de la MMP, siendo la unión resistente a denaturación por calor o a la degradación proteolítica (Curry y Osteen, 2003; Lambert y cols, 2004). Además de inhibir a las MMPs, los TIMPs se han considerado como proteínas multifuncionales que, al igual que las MMPs, participan en la regulación de varias actividades biológicas abarcando la esteroidogénesis, la embriogénesis, la angiogénesis y el crecimiento y programación de la muerte celular (Lambert y cols, 2004).

MMPs en el endometrio

La expresión de las MMPs y sus inhibidores endógenos en el endometrio humano ha sido estudiada a través del ciclo menstrual, donde se han encontrado diferentes patrones de expresión y actividad enzimática (Esquema 1) (Curry y Osteen 2003). El ambiente endocrino, paracrino y autocrino en el endometrio humano enfatiza la versatilidad y complejidad de la regulación de esta familia de proteinasas. En el endometrio de fase proliferativa, las MMPs estarían involucradas con la restauración y producción de la MEC, que permite la re-epitelialización de la superficie luminal después de la fase menstrual. En fase secretora la acción de la progesterona es predominantemente negativa sobre la expresión

y actividad de la mayoría de las MMPs y su disminución a finales del ciclo produce un desbalance de la razón MMP/TIMP, que favorece la actividad proteolítica y la degradación de la capa funcional del endometrio.

Esquema 1. Expresión del sistema de las MMPs en el ciclo menstrual endometrial.



Hacia finales de la menstruación, comienza la etapa de re-estructuración y crecimiento del tejido endometrial. La secreción de las MMPs, en parte, permiten la reparación tisular y re-epitelización de la superficie endometrial. Aunque la fase secretora, MMPs y TIMPs son secretados, su actividad proteolítica está disminuida principalmente por la concentración elevada de progesterona. Cuando los niveles hormonales disminuyen en la fase menstrual, tanto células de la línea blanca como células estromales (SC), endoteliales (EnC) y epiteliales (EC) producen importantes cantidades de MMPs, mientras que la producción de TIMPs permanece constante o disminuida, produciendo un incremento de la actividad proteolítica en el endometrio, que conduce a la degradación de componentes de la MEC. Eosin: eosinófilos; Ma: macrófagos; Neutr: neutrófilos. (Modificado desde Dong y cols, 2002).

El rol del estrógeno en relación con la expresión de las MMPs aún es poco claro. (Curry y Osteen, 2003; Dong y cols 2002; Hulboy y cols, 1997). Se ha sugerido que el estrógeno media el incremento de la expresión de Fos y Jun, factores de transcripción que reconocen al elemento de respuesta AP-1 (elemento activador de la proteína-1), el cual se encuentra en la mayoría de los promotores de las MMPs y que en respuesta a agentes químicos o citoquinas proinflamatorias, permite la transcripción de estas proteinasas (Curry y Osteen, 2003).

La progesterona regularía la expresión de las MMPs por vías no clásicas, debido a que la región promotora de las MMPs carece o sólo se han identificado elemento respuesta putativos a hormonas esteroidales (Hulboy y cols, 1997). Una vía posible utilizada por la progesterona es por medio de la síntesis de ácido retinoico (forma activa de la vitamina A), el cual puede secuestrar los factores de transcripción Fos y Jun impidiendo así la expresión de las MMPs (Curry y Osteen, 2003). Otras vías posibles son a través de la inhibición de la liberación de IL-1 α , citoquina que estimula la expresión de MMPs o por la inducción del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el que puede suprimir su expresión en especial de MMP-7 (Dong y cols, 2002). Sin embargo, la progesterona también puede incrementar la expresión de algunas MMPs, como se ha observado con la MMP-9 (Goldman y Shalev, 2003).

Por otro lado, los promotores de TIMPs también poseen múltiples elementos respuesta, siendo su regulación génica diferente entre ellos. TIMP-1 y TIMP-4 son inducible a nivel transcripcional en respuestas a citoquinas proinflamatorias, a hormonas, o a compuesto químicos, en tanto, TIMP-3 además de ser un gen inducible, se ha asociado su regulación al ciclo celular, y por el contrario, a TIMP-2 se le ha identificado como un gen más constitutivo (Baker y cols, 2002; Greene y cols, 1996, Lambert y cols, 2004).

Además el ambiente esteroideal en el endometrio regula la expresión de varios factores como IL-1, EGF, TNF- α , TGF- β y otras proteasas, los cuales median directa o indirectamente la expresión génica de las proMMPs (Jabbour y cols, 2006).

Endometriosis

La endometriosis es un desorden ginecológico crónico benigno dependiente de estrógenos que afecta a la mujer en edad reproductiva. Está caracterizada por la presencia de tejido endometrial uterino fuera de su localización normal. Los implantes endometriósicos ectópicos son encontrados principalmente en la superficie peritoneal, ovarios y/o invadiendo el septo rectovaginal, y en casos menos frecuentes, en el pericardio, pleura e incluso en tejido cerebral (Child y Lin Tan, 2001). La teoría más aceptada para la endometriosis es la menstruación retrógrada (Sampson, 1927), donde células endometriales viajan en un flujo retrógrado desde la cavidad uterina a la peritoneal. Sin embargo, la menstruación retrógrada es un fenómeno común en las mujeres en edad reproductiva y los mecanismos moleculares para explicar esta patología aún se desconocen.

Aunque algunas mujeres son asintomáticas, frecuentemente este síndrome se ha asociado a la dismenorrea que puede ser acompañada de dispareunia, disuria o disquesia. Otro suceso que se involucra fuertemente con esta patología es la infertilidad de estas pacientes (Taylor, 2004). De la población total femenina en edad reproductiva se estima que un 10% tiene endometriosis y existe alrededor de un 5% en el cual son mujeres fértiles y asintomáticas. Mujeres con infertilidad entre el 5 y el 50% cursan la enfermedad, mujeres que presentan dolor pélvico oscila entre 5 y el 21% y mujeres con dolor pélvico e infertilidad es de 35 a 50 % (Child y Lin Tan, 2001, Giudice y Kao, 2004; Missmer y Cramer, 2003; Taylor, 2004). La endometriosis constituye un problema de salud mayor para la mujer cuya calidad de vida puede verse severamente afectada, sumado a la infertilidad asociada a esta patología. Muy poca información se encuentra en nuestro país al respecto.

Las lesiones endometriósicas están influenciadas por múltiples factores que permiten un ambiente propicio para su mantención en las zonas ectópicas: factores endocrinos, con una producción estrogénica local independiente (Kitawaki y cols, 2003; Noble y cols, 1996); factores genéticos (Barlow y Kennedy, 2005; Simpson y cols 2003); factores ambientales, frente a la exposición a toxinas que suprimen la regulación de la progesterona principalmente (Lebel y cols, 1998); y factores inmunológicos asociados a cambios en los componentes celulares y humorales (Lebovic y cols, 2001)

Se ha demostrado la expresión de citoquinas peritoneales y endometriales en pacientes con endometriosis, que además de participar fuertemente en el incremento de inflamación peritoneal, pueden contribuir al microambiente proinflamatorio que favorece la adhesión de tejido endometrial hacia la superficie peritoneal y al desarrollo de la endometriosis (Wu y Ho, 2003). Varias de estas citoquinas están asociadas con la adhesión celular de las lesiones endometriósicas hacia el peritoneo. Una de estas citoquinas asociadas a estos procesos inflamatorios es el factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Esta molécula es una citoquina pleiotrópica que dependiendo de la cantidad producida, su localización, actividad local de las proteínas de unión a TNF, del medio hormonal y de otras citoquinas, puede tener efectos benéficos o dañinos. TNF- α es producido por neutrófilos, linfocitos activados, macrófagos, células NK y varias células no hematopoyéticas entre las que se incluyen las células endometriales (Tabibzadeh y cols, 1999). Su función principal es iniciar las cascadas de citoquinas y factores asociados con la respuesta inflamatoria. TNF- α ha sido

implicado en la fisiología normal del endometrio humano (Bedaiwy y Falcone, 2004) y permite la expresión de varias proteínas en las células epiteliales durante la fase secretora, y en células estromales ha sido detectado predominantemente en la fase proliferativa del ciclo menstrual. Estos datos sugirieron una localización y regulación hormonal distinta de esta citoquina entre compartimentos celulares endometriales (Hunt y cols, 1992). En estudios in vitro, la secreción epitelial de TNF- α es modulada por IL-1, progesterona y PP14 (Laird y cols, 1996). Se ha mostrado que TNF- α en cultivos de células epiteliales endometriales incrementa la cantidad de prostaglandina, promoviendo señales inflamatorias y de adhesión (Lebovic y cols, 2001), y en células estromales permite la adherencia hacia células mesoteliales peritoneales (Zhang y cols, 1993). Estos datos han sugerido que la presencia de TNF- α en el fluido peritoneal puede estar participando en la adherencia del tejido endometrial ectópico hacia el peritoneo, permitiendo de esta forma la implantación. Varias investigaciones han mostrado que las concentraciones de TNF- α son elevadas en el fluido peritoneal (FP) de pacientes con endometriosis, y que estas altas concentraciones correlacionan con el estado de la enfermedad (Bullimore, 2003; Lebovic y cols, 2001). Aún más, macrófagos y monocitos de sangre periférica de estas pacientes son capaces de generar una alta secreción de esta citoquina, que podría estar contribuyendo con las elevadas concentraciones de TNF- α en el FP (Lebovic y cols, 2001). Debido a su importancia en procesos proinflamatorios, a esta citoquina se le ha considerado como un factor esencial en la patogénesis de la endometriosis.

MMPs y Endometriosis

Numerosas publicaciones indican que las MMPs están involucradas en la patogénesis de la endometriosis. En las lesiones endometriósicas se ha identificado la expresión anormal de algunas MMPs, como también de sus inhibidores tisulares (Cox y cols, 2001; Chung y cols 2002; Kokorine y cols, 1997; Koks y cols, 2000; Laudanski y cols, 2005; Liu y cols, 2002; Spuijbroek y cols, 1992; Wolber y cols 2003; Uzan y cols, 2004), mientras que en el endometrio normal son altamente reguladas durante el ciclo menstrual (Cox y cols, 2001; Rodgers y cols, 1994, Spuijbroek y cols, 1992,). Esta expresión aumentada de MMPs hace que este tejido sea mucho más invasivo, favorecido además, por la disminución de la expresión de los TIMPs como es el caso de TIMP-1, que no se detecta en el líquido

peritoneal de mujeres con endometriosis (Collette y cols, 2004; Sharpe-Timms y cols, 1998).

En endometriosis, un suceso importante es la supresión de la acción protectora de la progesterona sobre estas proteasas (Osteen y cols, 2005). La regulación negativa de TGF- β sobre MMP-7 observada en el endometrio normal no ocurre en el endometrio ectópico donde se expresa de forma constitutiva, independiente a los niveles elevados de esta citoquina en el FP de mujeres con endometriosis (Bruner y cols, 1997). Además, los niveles de IL-1 α son elevados, lo que facilita la expresión de MMPs, a pesar de la presencia de progesterona (Hudelist y cols, 2005; Keller y cols 2000).

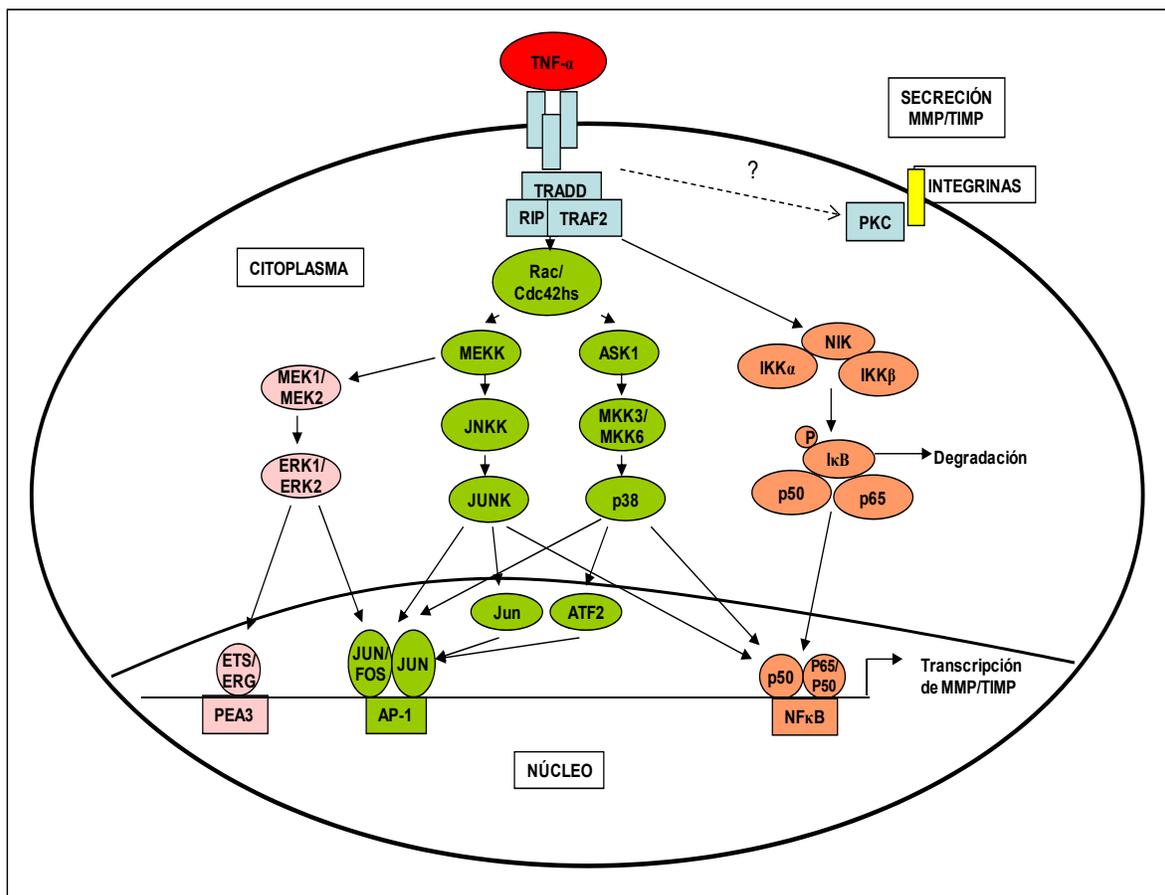
Aunque el endometrio eutópico de mujeres con y sin endometriosis es histológicamente similar, no ocurre lo mismo bioquímicamente (Johnson y cols, 2005a; Kao y cols, 2003; Osteen y cols, 2005; Ulukus y cols, 2006). Además de la acción reducida de la progesterona como un factor de riesgo para el desarrollo de la endometriosis (Osteen y cols, 2005), también es importante destacar la contribución del microambiente estrogénico alterado descrito en el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis (Johnson y cols, 2004, Noble y cols, 1997). Este ambiente hormonal permite que otras moléculas estén alteradas y posiblemente participen en la desregulación del sistema de las MMPs.

Por estudios in vitro se ha demostrado que TNF- α estimula la producción y secreción de MMPs en endometrio normal (Rawdanowicz y cols, 1994; Sillem y cols, 2001) y contribuye a la disminución de la expresión de TIMPs en lesiones endometriósicas, permitiendo el incremento de la actividad de las MMPs (Bullimore, 2003). Se ha observado en endometrio eutópico que los niveles de mRNA de esta citoquina son elevados en fase menstrual de pacientes con endometriosis (Kyama y cols, 2006). Además se ha visto que la expresión alterada de sus receptores en endometrio eutópico, facilitaría la desregulación de procesos pro-inflamatorios y antiapoptóticos regidos por esta citoquina. (Johnson y cols, 2005b; Kharfi y cols, 2003).

Con estos antecedentes en el presente trabajo, evaluamos la alteración del sistema de las MMPs en el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis, específicamente de dos grupos de MMPs: las gelatinasas, las cuales se han asociado a la angiogénesis que ocurre en el endometrio y que en endometriosis están asociadas a los procesos invasivos del tejido ectópico y, las matrilisinas las cuales están mayormente expresadas en el epitelio

endometrial y son asociadas a la re-epitelización del endometrio, existiendo pocos antecedentes de su comportamiento en endometriosis. Además estudiamos la expresión de los inhibidores TIMPs como complemento del sistema, y por último, si el efecto de TNF- α en cultivos endometriales de estas pacientes sobre la expresión y secreción de estas proteasas y TIMPs, tal como se ha observado en lesiones endometriósicas.

Figura 1. Posibles vías de regulación de TNF- α sobre la expresión de MMPs.



Extraído y modificado desde Van den Steen y cols, 2002 y Chakrabarti y cols, 2006.

II. HIPÓTESIS

“En la endometriosis, el remodelamiento endometrial eutópico es afectado por una inadecuada expresión del sistema de las MMPs, donde TNF- α es una de las citoquinas que participa en este proceso”

III. OBJETIVOS GENERALES

1. Estudiar la expresión de MMPs y TIMPs en explantes endometriales de mujeres con y sin endometriosis durante el ciclo menstrual.
2. Estudiar el efecto de TNF- α en la expresión de MMPs y de los inhibidores tisulares TIMPs en cultivos de células endometriales de mujeres con y sin endometriosis.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer la expresión y/o actividad de las gelatinasas MMP-2 y MMP-9, matrilisinas MMP-7 y MMP-26 y de los inhibidores tisulares TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 en explantes endometriales de mujeres con y sin endometriosis durante el ciclo menstrual mediante RT-PCR y/o inmunoblot (IB) y/o zimografía.
2. Determinar el efecto de TNF- α en la expresión y/o actividad de MMP-2 y MMP-9, MMP-7 y MMP-26 y de los inhibidores tisulares TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 mediante RT-PCR y/o IB y/o zimografía en cultivos celulares endometriales.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos: Mujeres normales con fertilidad probada y pacientes con endometriosis con previo consentimiento escrito e informado (documento anexo), procedentes del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Clínico San Borja-Arriarán e IDIMI Facultad de Medicina Universidad de Chile (estudio aprobado por los Comités de Ética de la Facultad de Medicina Universidad de Chile y del Hospital Clínico San Borja Arriarán).

	Control o Normal	Pacientes o Endometriosis
n Total	61	51
Edad	36,2 ± 0,7 (25-44) años	33,4 ± 0,7 (25-44) años
IMC	27,4 ± 0,9 Kg/m ²	24,9 ± 0,7 Kg/m ²
Hijos	1 a 6	0-2
		#Peritoneales: 62,8 % #Mínima-Leve(1-15): 41%
		#Ováricas: 37,2 % #Moderada-Severa(16 o más):59%

Según los criterios de Acosta (1973) y la Sociedad Americana de Fertilidad.

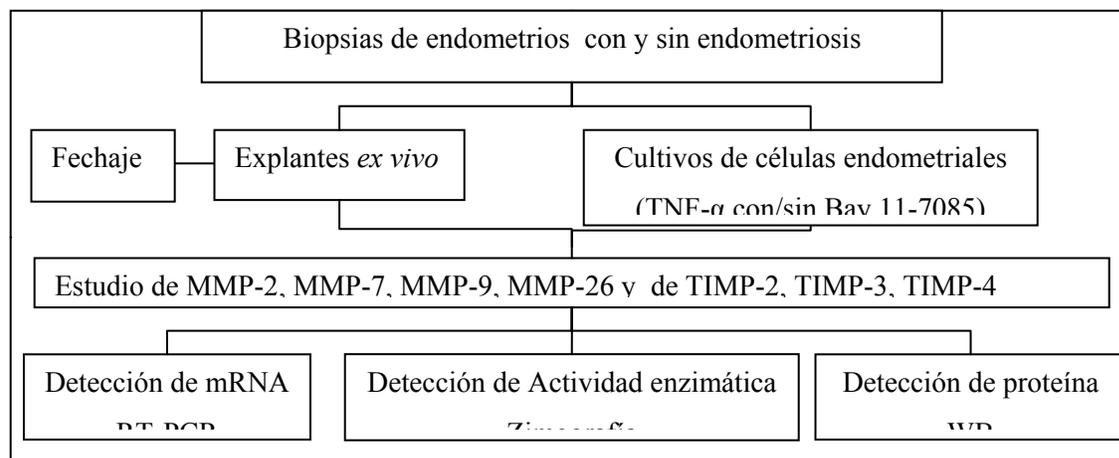
Criterios de inclusión: Mujeres en edad reproductiva entre 20 y 45 años sometidas a esterilización tubaria vía laparoscópica o a histerectomía por indicación ginecológica benigna no endometrial (normales), o con endometriosis diagnosticada en los últimos 6 meses mediante cirugía abierta o laparoscópica (pacientes).

Criterios de exclusión: existencia de enfermedades neoplásicas, endocrinas o infecciones actuales; tratamiento médico de endometriosis durante los últimos 12 meses sin confirmación quirúrgica de recidiva; tratamientos hormonales o uso de anticoncepción hormonal dentro de 6 meses previos al ingreso al estudio.

Obtención de endometrios: Las biopsias endometriales de pacientes y controles fueron obtenidas durante la cirugía con cánula Pippelle de Cornier, en condiciones estériles y transportadas en tampón fosfato salino (PBS) estéril inmediatamente al laboratorio. Tres trozos (ex vivo) fueron congelados en N₂ líquido y guardados a -80°C para estudios de expresión y actividad [Western blot (WB), RT-PCR, y zimografía]; una fracción de la muestra fue fijada en formalina tamponada e incluida en parafina (fechaje). Cuando la cantidad de tejido lo permitió, una fracción se procesó inmediatamente para obtener células endometriales aisladas. Según el criterio de Noyes (1950), todos los endometrios fueron clasificados histológicamente en fase proliferativa (días 1-14; 20 controles y 14 pacientes) y fase secretora (días 15-28; 41 controles y 37 pacientes) del ciclo menstrual. La fase secretora fue subdividida en inicial (días 15-18; 13 controles y 14 pacientes), media (días 19-23; 17 controles y 16 pacientes) y tardía (días 24-28; 11 controles y 7 pacientes). Los

estudios in Vitro fueron realizados en un total de: 6 cultivos celulares estromales normales y 5 de endometriosis; 9 cultivos celulares epiteliales normales y 6 de endometriosis.

Esquema 2. Diagrama experimental



Aislamiento y cultivo de células endometriales: Para la obtención de células aisladas de tipo estromal (ESC) y epitelial (EEC) se utilizó la técnica descrita en Johnson y cols (2004), los tejidos endometriales se lavaron con PBS estéril, se cortaron finamente y se digirió con Colagenasa tipo I (10mg/mL; Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ, USA) y DNasa I (25mg/mL; Sigma Co., St Louis, MO, USA) durante 1 hora a 37°C en agitación constante. Se dejó decantar por 10 minutos para obtener un sedimento con glándulas y células estromales en el sobrenadante, el cual se filtró a través de una malla de nylon 100 µm (Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, USA) y luego se centrifugó a 800 x g durante 10 minutos obteniendo un pellet de células estromales, el cual se resuspendió en 1mL de medio de cultivo para células estromales (MC-ESC, Tabla 1).

Las glándulas endometriales sedimentadas se resuspendieron con medio de cultivo para células epiteliales (MC-EEC, Tabla 1), y se trasladaron a un frasco de cultivo incubándolo por 30 min a 37°C por cada una de las caras basal y superior para adherir al frasco las células estromales remanentes quedando las glándulas en suspensión. Ambos tipos celulares aislados fueron sembrados en frascos de cultivo de 75cm² en el medio respectivo y mantenidos en un incubador con 5% CO₂/aire a 37°C (cultivos primarios), con cambio de medio de cultivo cada 72 hrs. Alcanzada la confluencia, se lavó con PBS y las células se suspendieron con tripsina-EDTA (5 mg/mL-3,7 mg/mL, respectivamente; Gibco-BRL Life Technologies, Bethesda, MD, USA), para luego sembrarlas en frascos (cultivos

secundarios), y posteriormente en placas de cultivo. Se determinó una vitalidad celular mayor al 90% (técnica de exclusión vital con azul trypan), y al menos 95% de pureza de cada tipo celular aislado, confirmación realizada por inmunocitoquímica, utilizando vimentina para la detección de células estromales y citoqueratina para células epiteliales.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo para células endometriales estromales y epiteliales y DMEM definido

Medio de cultivo	MC-ESC DMEM*/MCDB-105# (3:1, v/v)	MC-EEC DMEM*/MCDB-105 (3:1, v/v)	DMEM definido DMEM*
Suero Fetal Bovino (%) [*]	2	10	-
Insulina (mg/L) [*]	10	5	-
Transferrina (µg/L) [*]	5,5	10	-
Selenio (µg/L) [*]	5,7	-	-
Glutamax (moles/L) [*]	2	2	2
Penicilina (UI/mL) [*]	100	100	100
Estreptomicina (mg/mL) [*]	0,1	0,1	0,1
Fungizona (µg/mL) [*]	0,25	0,25	-
Ácido Ascórbico (µg/mL) [#]	0,25	0,25	-
Hepes (moles/L) [#]	-	-	0,025
BSA (g/L) [#]	-	-	1

* Invitrogen Life Technologies

Sigma

Condiciones experimentales para el estudio del contenido de mRNA, proteínas y actividad enzimática en cultivo de células endometriales.

Para el estudio del contenido de mRNA: En los cultivos celulares endometriales provenientes de mujeres con y sin endometriosis, se estudiaron los niveles de mRNA de MMPs y TIMPs por RT-PCR. Ambos tipos celulares se sembraron en placas de 6 pocillos (2 X 10⁵ células por pocillo, Costar/Corning), en el medio correspondiente. Alcanzada la confluencia sobre el 90% (48-72 horas), el medio de cultivo se reemplazó por DMEM definido (Tabla 1) por 24 horas previo al tratamiento. El efecto de TNF- α sobre MMPs y TIMPs, se estudio en tiempos cortos de 2 a 3 horas con 0, 1, 10 y 50 ng/mL de TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) y en tiempos largos de 24 horas con una concentración fija de 10 ng/mL. Para confirmar si el sistema NF κ B participa en la regulación de MMPs y TIMPs, al cultivo celular se le adicionó el inhibidor del sistema NF κ B, Bay 11-7085 (2 µM Sigma, aplicado 30 minutos previos a la adición de TNF- α).

Para el estudio del contenido de proteínas: La expresión proteica de MMP-7, MMP-26, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 fue analizada en cultivos celulares endometriales provenientes de mujeres con y sin endometriosis mediante western blot. Ambos tipos celulares se sembraron en placas petri (5×10^5 células por placa de 10 cm de diámetro, Orange Scientific) en el medio de cultivo correspondiente hasta alcanzar una confluencia sobre el 80%. Tras 24 horas de privación en DMEM definido, éste se reemplazó por DMEM definido fresco y se trató con TNF- α 10 ng/mL por 24 horas con o sin Bay 11-7085 (aplicado 30 minutos previos a la adición de TNF- α).

Para el estudio del contenido de actividad enzimática: Por zimografía se estudió la actividad proteolítica de MMP-2 y MMP-9 en el medio de cultivo de 24 horas de ambos tipos celulares endometriales provenientes de mujeres con y sin endometriosis.

Determinación de los niveles de mRNA, de proteínas y de la actividad enzimática en explantes ex vivo y en cultivos celulares.

Preparación de RNA, síntesis y amplificación de DNA complementario (cDNA) por PCR: El RNA total de trozos *ex vivo* y células cultivadas *in vitro* se obtuvo con TRIzol (Invitrogen) más glicógeno (Chemicon Internacional, Inc., Temecula, CA) siguiendo las indicaciones del proveedor. El precipitado de RNA purificado obtenido se hidrató con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). Se determinó la concentración de RNA total y contaminación con proteínas por espectrofotometría a 260 y 280 nm, respectivamente, muestras con razón $260/280 > 1,65$ fueron utilizadas. Se confirmó integridad de RNA por electroforesis en agarosa-formaldehído.

El DNA complementario (cDNA) se sintetizó desde 2 μ g de RNA total tratado con DNasa I (Fermentas AB, Vilnius, Lithuania) utilizando partidores al azar (Invitrogen) y la enzima transcriptasa reversa revertAid H Minus M-Mul V (Fermentas) siguiendo las indicaciones del proveedor. Luego, la amplificación génica se realizó en 2 μ L de cDNA utilizando partidores específicos para cada gen a estudiar (Tabla 2) en las condiciones señaladas en la Tabla 3. Los productos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa al 1,0% (p/v) con bromuro de etidio. El análisis de la densidad óptica de las bandas se realizó con el programa computacional KODAK 1D Image Analysis (Rochester, NY, USA). Cada gen amplificado se normalizó con la amplificación del gen constitutivo de rRNA 18S, el cual se determinó rutinariamente en todas las síntesis de cDNA.

Tabla 2. Partidores específicos usados en la amplificación génica por RT-PCR

MMP-2 (494 bp) (Zhang y cols, 1998)	Sense	5'-TGG GAG CAT GGC GAT GGA TA-3'
	Antisense	5'-ACA GTG GAC ATG GCG GTC TCA-3'
MMP-7 (329 bp)*	Sense	5'-GAG TGC CAG ATG TTG CAG AA-3'
	Antisense	5'-GCG TTC ATC CTC ATC GAA GT -3'
MMP-9 (391 bp)*	Sense	5'-TCT TCC CTG GAG ACC TGA GA-3'
	Antisense	5'-TAC ACG CGA GTG AAG GTG AG-3'
MMP-26 (400 bp)*	Sense	5'-GCAGAA TGG AGA TGC AGA CA-3'
	Antisense	5'-CCC TGA AAG GAC AGG TTG AA-3'
TIMP-2 (526 bp) (Zhang y cols, 1998)	Sense	5'-GAA ACG ACA TTT ATG GCA ACC-3'
	Antisense	5'-GCT GGA CCA GTC GAA ACC-3'
TIMP-3 (485 bp) (Zhang y cols, 1998)	Sense	5'-GCA GCA GCG GCA ATG ACC-3'
	Antisense	5'- CCG GAT GCA GGC GTA GTG TTT-3'
TIMP-4 (308 bp)*	Sense	5'-GAC AGT CTG GCC ACT GTC AA-3'
	Antisense	5'- TGC CAG TCA GCC TGT TTA TG-3'
rRNA 18S (192 bp) (Schmittigen y cols, 2000)	Sense	5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3'
	Antisense	5'- CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG-3'

* Los partidores se diseñaron con el programa on line Primer3.

Tabla 3. Condiciones de la amplificación para los genes estudiados por RT-PCR

Gen	Denaturación (Temperatura:°C/ Tiempo:Seg)	Alineamiento	Extensión	Número de ciclos	MgCl ₂ (mmoles/L)	Primer (μmol/L)	TaqPol (U)
MMP-2	94/60	60/60	72/90	30	3.0	0.4	0.625
MMP-7	94/60	55/60	72/90	30	3.0	0.4	0.625
MMP-9	94/60	55/60	72/90	38	1.0	0.4	0.625
MMP-26	94/60	55/60	72/90	30	3.0	0.4	0.625
TIMP-2	94/60	55/60	72/90	30	3.0	0.4	0.625
TIMP-3	94/60	55/105	72/120	30	3.0	0.4	0.625
TIMP-4	94/60	48/60	72/90	32	3.0	0.4	1.250
rRNA 18S	94/60	55/60	72/90	18	3.0	0.4	0.625

Western blot (WB)

Obtención de proteínas: Las proteínas de trozos ex vivo y de cultivos celulares endometriales se obtuvieron como indica Schreiber y cols (1989), donde se obtienen dos extractos proteicos, uno citosólico y otro nuclear. Para efectos de esta tesis sólo se describe la extracción citosólica.

Trozos de endometrio ex vivo: éstos fueron homogenizados 1:5 (p/v) en tampón de lisis A [Hepes 10 mmoles/L pH 7.9, EDTA 1 mmol/L, ditiotreitól (DTT) 1 mmol/L, NaF 5 mmol/L, Na₃VO₄ 1 mmol/L, Na₃MoO₄ 10 mmol/L, PMSF 0,5 mmol/L, cocktail de antiproteasas (Roche Molecular biochemical, Mannheim, Alemania), inhibidor de tripsina

44,5 µg/mL (Sigma), y KCl 10 mmol/L] con homogenizador de plástico en hielo. El homogenizado se dejó reposar por 15 minutos en hielo y se le agregó NP-40 0,05% (v/v) seguido de una agitación de 15 segundos en vortex, se centrifugó a 17300 x g por 2 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante (extracto citosólico).

Cultivos celulares: después de extraer el sobrenadante a cada placa petri, las células adheridas se lavaron con PBS, se les agregó 100 µL de tampón de lisis A y se removieron con raspador (scraper). Se continuó con el proceso descrito arriba recuperando el sobrenadante. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (BioRad, Hércules, CA).

Electroforesis: Cincuenta µg de proteína de homogenizados provenientes de trozos de endometrios ex vivo y 15 µg de cultivos celulares fueron resueltos en electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 12% con tampón de corrida [Tris 25 mmoles/L, glicina 192 mmoles/L y SDS 0,1% (p/v)] a 80 V por 150 minutos. Las proteínas resueltas en el gel fueron electro-transferidas a 80 V por 120 minutos en frío (4°C aprox.) en tampón de transferencia [Tris 25 mmoles/L, glicina 192 mmoles/L, metanol 20% (v/v)] a una membrana de nylon polivinilideno difluoruro PVDF (BioRad) previamente activada con metanol 100% (incubación: 3 minutos, luego enjuagada y equilibrada con tampón de transferencia). La membrana fue bloqueada con BSA 5% en tampón TTBS [Tris-HCl 20 mmoles/L, pH 7,6, NaCl 137 mmoles/L, Tween20 0,1% (v/v)] por 60 minutos, luego se lavó 5 veces por 5 minutos con TTBS y después se incubó con los anticuerpos primarios en la concentración, tiempo y temperatura indicados en la Tabla 4. Al término de la incubación, la membrana se lavó nuevamente con TTBS, se incubó con el 2° anticuerpo (anti conejo, Calbiochem; anti ratón, Amersham Biosciences, Tabla 4) conjugado con peroxidasa por 1 hora a temperatura ambiente. Posterior a nuevos lavados con TTBS, la membrana se incubó por 1 minuto en solución de quimioluminiscencia [Tris-HCl 0,1 moles/mL pH 8,5, Luminol 1,25 mmoles/L (Sigma), ácido p-Coumarico 0,2 mmoles/L (Sigma), peróxido de hidrógeno 9% (v/v)] y fue expuesta a un film de rayos X. Se calculó la densidad óptica de las bandas con el programa KODAK 1D y se normalizó con la proteína constitutiva β-actina. Controles positivos: MMP-7, homogenizados endometriales de fase menstrual (Goffin y cols, 2003), MMP-26: hiperplasia endometrial (Pilka y cols, 2004b) y TIMPs: placenta (Riley y cols, 1999).

Tabla 4. Condiciones utilizadas en la realización de la técnica de Western blot para homogenizados de tejido y de celulares endometriales

Anticuerpo Primario	Homogenizado Tejido		Tiempo (horas) 4°C	Homogenizado Células	
	1°/2° anticuerpo			1°/2° anticuerpo	
MMP-7 Conejo policlonal (USBiological)	1: 2500	1: 4000	18	1:1000	1:4000
MMP-26 Conejo policlonal (USBiological)	1: 2000	1: 4000	18	1:2000	1:4000
TIMP-2 Conejo policlonal (Chemicon)	1: 1500	1: 5000	18	1:1000	1:500
TIMP-3 Conejo policlonal (Chemicon)	1: 2500	1: 5000	18	1:1000	1:500
TIMP-4 Conejo policlonal (Chemicon)	1: 2500	1: 5000	18	1:2500	1:500
β-actina Ratón monoclonal (Sigma)	1: 15000	1: 3000	18	1:15000	1:3000

Zimografía

Obtención de proteínas: Este estudio se realizó en trozos de endometrio ex vivo y en medio de cultivos celulares endometriales de 24 horas.

Trozos de endometrio ex vivo: se extrajo los componentes de la matriz extracelular basado en el método descrito por Talhouk et al (1992) modificado: las muestras fueron homogenizadas 1:5 (p/v) en tampón de extracción (Tris-HCl 500 mmoles/L; TritónX-100 1% (v/v), CaCl₂ 10 mmoles/L; NaCl 200 mmoles/L. pH 7,5) con homogenizador de plástico en hielo. El homogenizado se sometió a ciclos de congelamiento/descongelamiento en N₂ líquido 3 veces, 5 minutos cada vez. Se efectuó una centrifugación a 13000 x g a 4°C por 30 minutos, se recuperó el sobrenadante (extracto de componentes de la matriz extracelular) y se guardó en hielo. Se determinó la concentración de proteínas (Bradford).

Células en cultivo: De los cultivos de células tratadas con TNF-α por 24 h (0 y 10 ng/mL) utilizadas en el WB, se guardó 1 ml de medio de cultivo y se congeló a -20°C.

Electroforesis: Treinta µg de proteína del extracto proteico y 10 µL de medio de cultivo fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 8% copolimerizada con gelatina (1 mg/mL, Sigma), en tampón de corrida descrito anteriormente, a 80 V por 150 minutos. Cada electroforesis realizada incluyó 0.01 µg/µL de proteínas purificadas de MMP-2 y MMP-9 (Chemicon Internacional) como estándar interno y de peso molecular de las formas latente y activa de ambas enzimas. Posteriormente, se procedió a la remoción del SDS incubando 2 veces el gel con Tritón X-100, 2.5% (v/v) por 20 minutos con agitación

constante y a temperatura ambiente. Luego, el gel se incubó por 24 horas a 37°C en tampón de ensayo de MMPs (Tris-HCl 50 mmoles/L pH 7,4, NaCl 150 mmoles/L, CaCl₂ 20 mmoles/L, NaN₃ 0.02%). Finalmente, el gel fue fijado y teñido con Azul de Coumassie R-250 (Sigma) y desteñido con solución de metanol 30% y ácido acético 10%. La actividad gelatinasa se visualizó como bandas definidas claras contra un fondo azul. Se calculó la densidad óptica de las bandas con el programa KODAK 1D. La zimografía de endometrio ex vivo se normalizó con el estándar de MMPs. En el medio de cultivo: la MMP-2 se normalizó con la actividad proteolítica basal de la enzima y para MMP-9 los datos están expresados como unidades arbitrarias (UA=intensidad por área de banda). Dado que las MMPs dependen de Ca²⁺ para su actividad enzimática, algunos geles se incubaron en tampón de ensayo de MMPs en presencia de EDTA (4 mmoles/L) con el fin de inhibir la actividad enzimática y confirmar la presencia de las enzimas.

Análisis Estadístico

Se calculó el número muestral empleando un alfa de 0.05, poder estadístico de 80% (beta=0.20), y desviación estándar de 0.08 dada en Goffin y cols (2003), para tener una diferencia entre las medias de los grupos de al menos 11%. El n muestral calculado fue de 6 sujetos por grupo, ya que son dos grupos y cada uno consta de 4 categorías, el n final fue de 48 sujetos. El software estadístico utilizado fue Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Los resultados fueron evaluados por: test *t* Student, Mann-Whitney U, Kruskal-Wallis H, o ANOVA de acuerdo al tipo de distribución y variable (previamente determinada según el test de Kolmogorov-Smirnoff). Se acompañó del post test de Tukey o de Dunnett. El valor de p inferior al 5% ($p < 0.05$) fue considerado como significativo.

Financiamiento

Esta tesis se realizó en su totalidad en el Instituto de Investigaciones Materno-Infantil (IDIMI), Facultad de Medicina, Campus Centro, Universidad de Chile, localizado en el Hospital Clínico San Borja Arriarán, Santiago.

Esta investigación se desarrolló en el marco del proyecto FONDECYT #1040412

VI. RESULTADOS

VI.1 MMPs y TIMPs en endometrio eutópico de mujeres con y sin endometriosis durante el ciclo menstrual.

Contenidos de mRNA de las MMPs y de los TIMPs en endometrio eutópico de mujeres con endometriosis y controles durante el ciclo menstrual.

Los amplificadores por RT-PCR de MMP-2, MMP-9, MMP-7, MMP-26, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4 y de rRNA 18S de endometrios con y sin endometriosis durante el ciclo menstrual se muestran la Figura 2.

Gelatinasas durante el ciclo menstrual: El patrón de mRNA de MMP-2 en endometrios controles presentó un aumento en las fases secretoras media-tardía ($p < 0,05$). El endometrio eutópico de mujeres con endometriosis, el patrón fue diferente, donde no mostró variaciones durante el ciclo. Al comparar cada fase del ciclo entre endometrios con y sin endometriosis no se detectaron diferencias significativas (Tabla 5A).

El mRNA de MMP-9 fue constante en el endometrio de mujeres normales, en cambio, en endometriosis se observó un patrón irregular entre las fases del ciclo. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos estudiados (Tabla 5B).

Matrilisinas durante el ciclo menstrual: Los niveles de mRNA de MMP-7 en los endometrios controles no presentaron variaciones. El endometrio de endometriosis de fase proliferativa fue 56% mayor al de fase secretora tardía ($p = 0.003$). Al comparar ambos grupos, el mRNA de fase proliferativa de endometriosis fue mayor que el normal (30%, $p = 0.045$) (Figura 3A).

En endometrio control y de endometriosis, el mRNA de MMP-26 disminuyó en las fases secretoras media y tardía ($p < 0.0001$). Distinto fue el mRNA de fase secretora inicial de endometriosis el cual fue 56% menor al grupo control. ($p = 0.027$) (Figura 3B).

TIMPs durante el ciclo menstrual: El mRNA de TIMP-2 en los endometrios de mujeres con y sin endometriosis presentó una disminución hacia la fase secretora inicial, recuperándose en la fase secretora tardía siendo significativamente diferente ($p = 0,048$ y $p = 0,006$, respectivamente). En endometriosis, la fase proliferativa y secretora inicial fueron 45% y 64% menores al control ($p = 0.022$ y $p = 0.028$, respectivamente) (Figura 4A).

El mRNA de TIMP-3 en endometrios de mujeres con y sin endometriosis aumentaron 5 y 6,6 veces en la fase secretora tardía respecto a la fase proliferativa ($p=0.004$ y $p<0.0001$, respectivamente). No se encontró diferencias entre los grupos (Figura 4B).

El mRNA de TIMP-4 en los endometrios controles obtuvo su máximo nivel en la fase secretora inicial decayendo en la fase tardía. En endometriosis, sin embargo, el mRNA de TIMP-4 fue constante hasta la fase secretora media, disminuyendo fuertemente en la fase secretora tardía con niveles casi indetectables ($p= 0.0019$). La fase tardía de endometriosis fue 98% menor que el control ($p=0.028$) (Figura 4C).

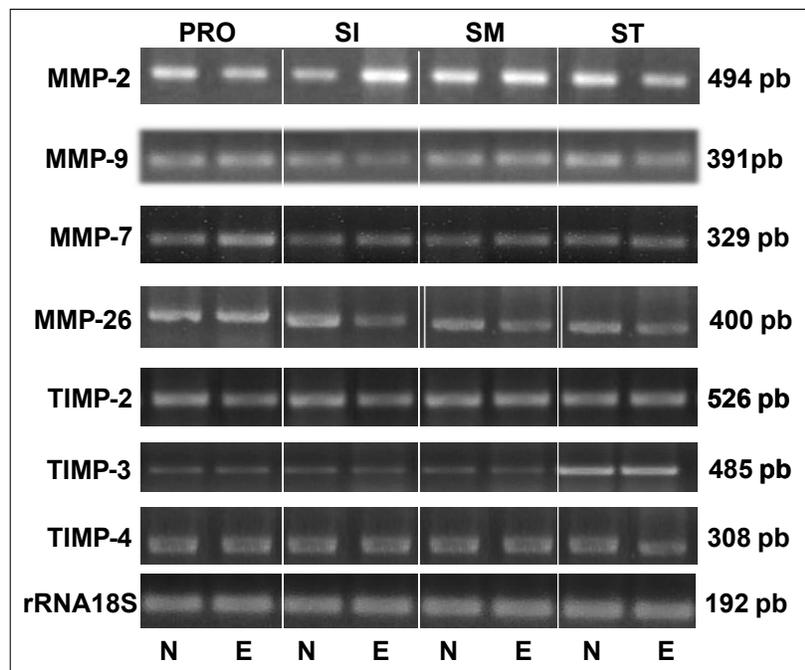


Figura 2. Gel electroforético representativo de amplificados de MMP-2, MMP-9, MMP-7, MMP-26, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4 y rRNA 18S. DNA complementario obtenido de RNA de endometrio de mujeres controles (N) y con endometriosis (E) fue amplificado con partidores específicos por RT-PCR. PRO: proliferativo; SI: secretor inicial; SM: secretor medio; ST: secretor tardío.

Tabla 5. Niveles de mRNA de MMP-2 (A) y MMP-9 (B) en endometrios obtenidos de mujeres con y sin endometriosis durante el ciclo menstrual

A

Fase del ciclo menstrual	Control <i>n</i> = 18	Endometriosis <i>n</i> = 21	p
Proliferativo	0,38 ± 0.08 ^a	0.48 ± 0.05	ns
Secretor Inicial	0.34 ± 0.06 ^{b,c}	0.53 ± 0.10	ns
Secretor Medio	0.56 ± 0.10 ^c	0.57 ± 0.05	ns
Secretor Tardío	0.63 ± 0.07 ^{a,b}	0.48 ± 0.13	ns

B

Fase del ciclo menstrual	Control <i>n</i> = 17	Endometriosis <i>n</i> = 22	p
Proliferativo	0.44 ± 0.18	0.53 ± 0.11 ^{a,b}	ns
Secretor Inicial	0.40 ± 0.13	0.17 ± 0.05 ^{a,c}	ns
Secretor Medio	0.47 ± 0.09	0.56 ± 0.09 ^{c,d}	ns
Secretor Tardío	0.32 ± 0.13	0.26 ± 0.02 ^{b,d}	ns

DNA complementario fue amplificado con partidores específicos para los genes estudiados en las condiciones señaladas en Materiales y Métodos. Los resultados, normalizados con la subunidad ribosomal 18S, son el promedio ± EE. El *n* indicado es el número total de muestras. Diferencia significativa de *p*<0.05: letras iguales dentro del mismo grupo; *p* entre grupos; ns no significativo.

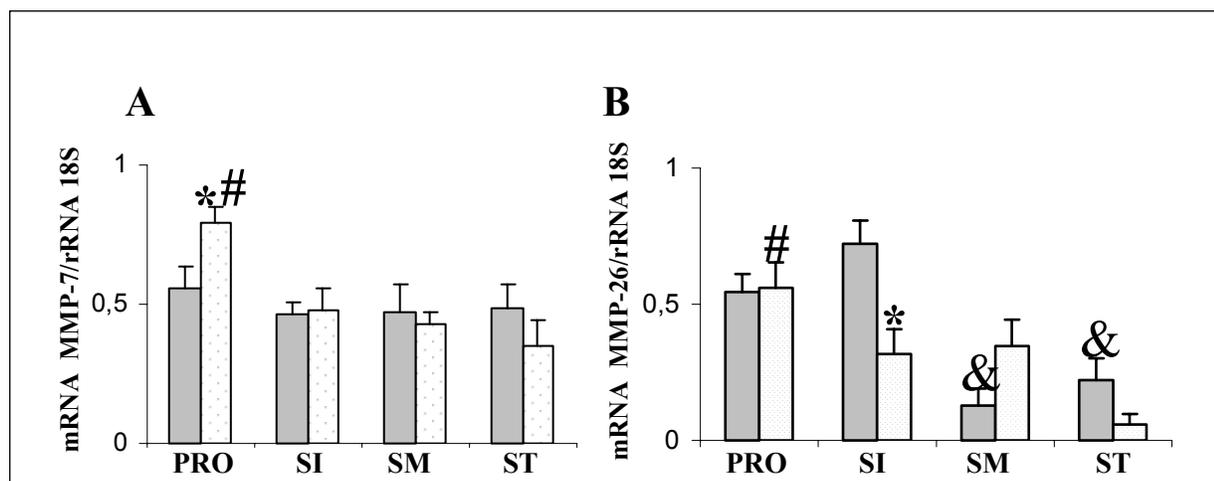


Figura 3. Niveles de mRNA de MMP-7 y MMP-26 en endometrios obtenidos de mujeres con y sin endometriosis durante el ciclo menstrual. A, mRNA de MMP-7 detectado en 19 endometrios del grupo control y 19 del grupo endometriosis. B, mRNA de MMP-26 detectado en 25 endometrios del grupo control y 26 del grupo endometriosis. Los resultados muestran el promedio ± EE normalizados con la subunidad ribosomal 18S. PRO: proliferativo (*n* controles: 5;6, *n* endometriosis: 4;7); SI: secretor inicial (*n* controles: 5;6, *n* endometriosis: 5;6); SM: secretor medio (*n* controles: 4;7, *n* endometriosis: 5;7); ST: secretor tardío (*n* controles: 5;6, *n* endometriosis: 5;6). **p*<0.05 vs normal; # *p*<0.05 vs ST, & *p*<0.05 vs PRO y SI. Barras grises: Normal, barras claras: Endometriosis.

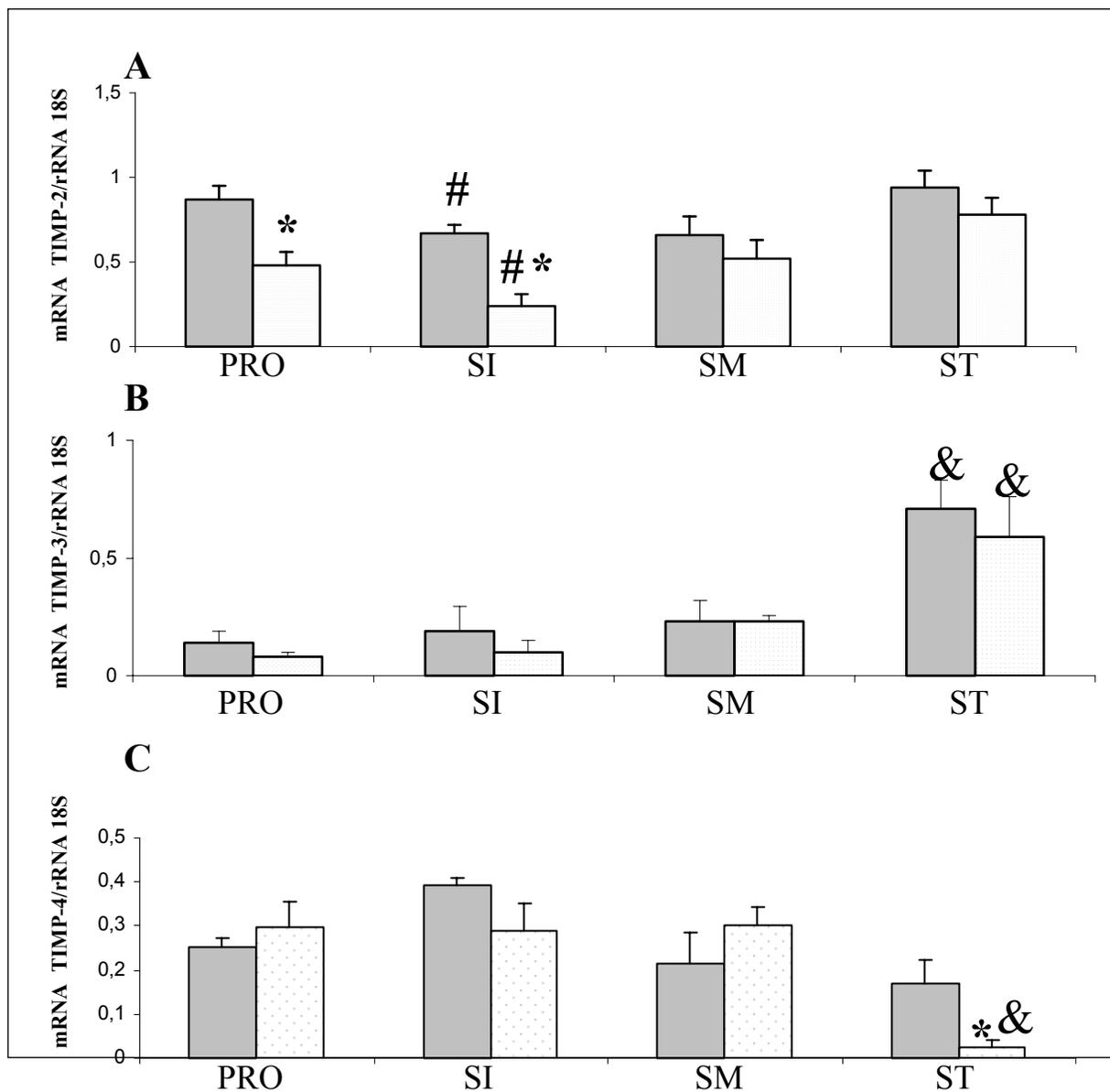


Figura 4. Niveles de mRNA de los TIMPs en endometrios obtenidos de mujeres con y sin endometriosis durante el ciclo menstrual. A, mRNA de TIMP-2 detectado en 13 endometrios del grupo control y 19 del grupo endometriosis. **B,** mRNA de TIMP-3 detectado en 16 endometrios del grupo control y 22 del grupo endometriosis. **C,** mRNA de TIMP-4 detectado en 25 endometrios del grupo control y 25 del grupo endometriosis. Los resultados muestran el promedio \pm EE normalizados con la subunidad ribosomal 18S. PRO: proliferativo (*n* controles: 3;4;7, *n* endometriosis: 7;7;6); SI: fase secretora inicial (*n* controles :4;4;4, *n* endometriosis: 4;6;6) ; SM: fase secretora media (*n* controles: 3;4;7, *n* endometriosis:5;5;7); ST: fase secretora tardía (*n* controles : 3;4;7, *n* endometriosis: 3;4;6); * $p < 0.05$ vs normal; # $p < 0.05$ vs ST, & $p < 0.05$ vs PRO, SI y SM. Barras grises: Normal, barras claras: Endometriosis.

Contenido proteico o actividad enzimática de MMPs y TIMPs en endometrio eutópico de mujeres con y sin endometriosis durante el ciclo menstrual.

Se estudió la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 por zimografía, el contenido proteico de las matrilisinas MMP-7 y MMP-26 y de TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 por western blot en endometrios con y sin endometriosis durante el ciclo menstrual. Figura 5.

Gelatinasas durante el ciclo menstrual: se detectó dos bandas para MMP-2 correspondientes a la proenzima y a la enzima activa (72 y 62 kDa, respectivamente). En el grupo control se observó una disminución de la proenzima en la fase secretora inicial y media, en tanto la proteína activa de MMP-2 se mantuvo constante. En endometriosis, la proenzima de MMP-2 fue constante y la forma activa presentó una disminución hacia la fase secretora tardía. La actividad proteolítica de MMP-2 entre el grupo control y de endometriosis fueron similares (Figura 5A y Tabla 6A).

Se detectaron dos bandas para MMP-9 correspondientes al dímero putativo del zimógeno y el zimógeno (92 y 170 kDa, respectivamente); la MMP-9 activa no fue detectada en ningún grupo. El zimógeno de MMP-9 en el endometrio normal, no presentó variaciones significativas. En endometriosis de fase secretora media, mostró una reducción del 58% de la proenzima con respecto al endometrio normal ($p=0.017$). Considerando la fase secretora en su conjunto, la actividad proteolítica del zimógeno en endometriosis fue 44% menor al grupo control ($p=0.011$). El dímero putativo del zimógeno de MMP-9 del grupo control mostró una disminución de la actividad proteolítica en la fase secretora tardía, siendo significativa con respecto a la fase proliferativa (76%, $p=0.038$). En endometriosis, en cambio, fue constante (Figura 5A y Tabla 6B).

Matrilisinas durante el ciclo menstrual: El anticuerpo para MMP-7 detecta su forma activa (18kDa) y de zimógeno (28kDa). En los homogenizados tisulares de endometrios controles y de endometriosis sólo se observó el zimógeno. De manera similar al mRNA, en el endometrio normal se detectó niveles proteicos constantes y en fase proliferativa de endometriosis, MMP-7 tiende a ser más alto respecto a las otras fases del ciclo, y al compararla con la fase proliferativa del grupo control fue 57% mayor ($p=0.041$) (Figuras 5 y 6A). El anticuerpo para MMP-26 detecta la forma latente de la proteína (30kDa). Por western blot mostró un patrón similar al mRNA, aunque no significativo, de las fases

secretoras media y tardía en ambos grupos. La disminución detectada del mRNA de la fase secretora inicial en endometriosis, no se observó en la proteína (Figuras 5 y 6B).

TIMPs durante el ciclo menstrual: la proteína de TIMP-2 detectada por western blot (21kDa), en el endometrio control fue constante, contrario a lo detectado en el mRNA. En endometriosis, TIMP-2 fue menor en las fases secretora inicial (66%) y media (48%), incluso la fase secretora en conjunto (50%) respecto a la fase proliferativa ($p < 0,05$). En endometriosis la fase secretora en su conjunto fue 50% menor que el endometrio normal secretor ($p = 0.009$). Por a la gran dispersión de los resultados de fase proliferativa en endometrio normal, no se observó diferencias significativas con endometriosis (Figura 5 Tabla 7A). A pesar de que el anticuerpo para TIMP-3 detecta dos formas, la glicosilada (30kDa) y no glicosilada (24kDa), sólo se detectó la forma glicosilada. En ambos grupos estudiados los niveles de TIMP-3 glicosilado fueron constantes, contrario a lo observado en el mRNA. No se observó diferencias al comparar entre ambos grupos (Figura 5 y Tabla 7B). Ambas formas de TIMP-4, la glicosilada (29kDa) y la no glicosilada (23kDa), se detectaron en los endometrios de mujeres con y sin endometriosis mostrando un patrón constante y sin diferencias significativas en ambos grupos de endometrios (Figura 5 y Tabla 7C).

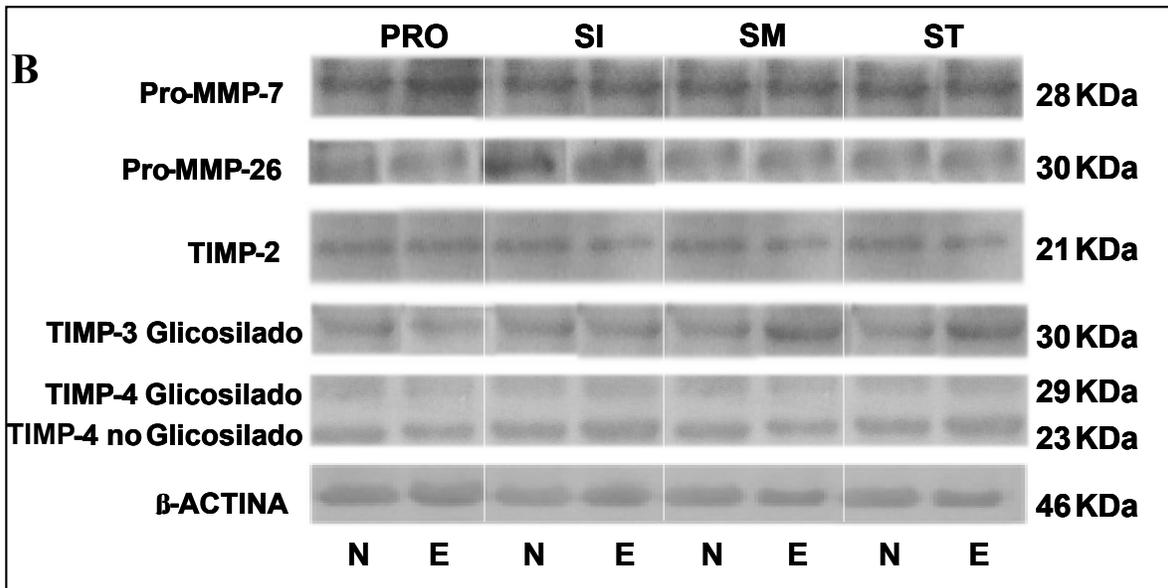
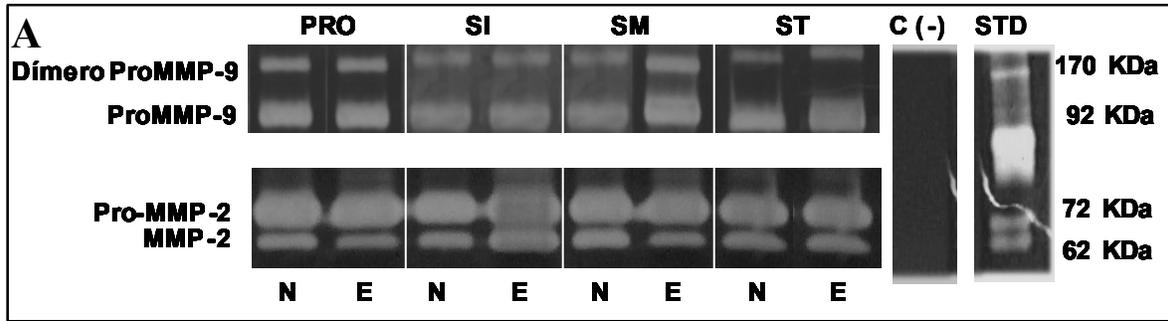


Figura 5. Gel de zimografía para MMP-2 y MMP-9 (A) y Western Blot (B) del contenido proteico de MMP-7, MMP-26, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4 y β -actina en endometrios controles y de endometriosis durante el ciclo menstrual. Gel representativo de Zimografía al 10% PAGE (A) y de western blot al 12% PAGE (B), descritos en Materiales y Métodos. PRO: proliferativo; SI: secretor inicial; SM: secretor medio; ST: secretor tardío. N: Normal, E: Endometriosis. C (-): gel incubado con EDTA. STD: estándar de MMPs.

Tabla 6. Actividad proteolítica de MMP-2 (A) y MMP-9 (B) en endometrios con y sin endometriosis durante el ciclo menstrual

A

Fase del ciclo menstrual	Control		Endometriosis		p
	Pro-MMP-2 <i>n</i> = 13	MMP-2 <i>n</i> = 13	Pro-MMP-2 <i>n</i> = 15	MMP-2 <i>n</i> = 15	
Proliferativo	1.32 ± 0.28	0.80 ± 0.22	1.13 ± 0.21	0.97 ± 0.21	ns
Secretor Inicial	0.75 ± 0.04 ^a	0.77 ± 0.41	1.25 ± 0.18	0.65 ± 0.15	ns
Secretor Medio	0.99 ± 0.07	0.61 ± 0.11	1.01 ± 0.08	0.70 ± 0.20	ns
Secretor Tardío	1.38 ± 0.29 ^a	1.03 ± 0.19	1.11 ± 0.12 ^b	0.49 ± 0.07 ^b	ns

B

Fases del ciclo menstrual	Control		Endometriosis		p
	Dímero Pro-MMP-9 <i>n</i> = 18	Pro-MMP-9 <i>n</i> = 18	Dímero Pro-MMP-9 <i>n</i> = 17	Pro-MMP-9 <i>n</i> = 17	
Proliferativo	1.46 ± 0.42 ^a	0.34 ± 0.12	1.26 ± 0.47	0.48 ± 0.08 ^b	ns
Secretor Inicial	1.14 ± 0.33	0.62 ± 0.10	1.41 ± 0.35 ^c	0.35 ± 0.05 ^c	ns
Secretor Medio	0.82 ± 0.29	0.50 ± 0.11 ^p	0.93 ± 0.32	0.21 ± 0.03 ^{p,b}	0.02
Secretor Tardío	0.34 ± 0.15 ^a	0.35 ± 0.10	0.97 ± 0.34	0.30 ± 0.10	ns

Los resultados son el promedio ± EE normalizados con las bandas observadas de cada gelatinasa en el estándar de MMPs colocado en cada gel de zimografía. El *n* indicado es el número total de muestras. Diferencia significativa de *p*<0.05: letras iguales, dentro del mismo grupo; *p*, entre grupos y ns: no significativo.

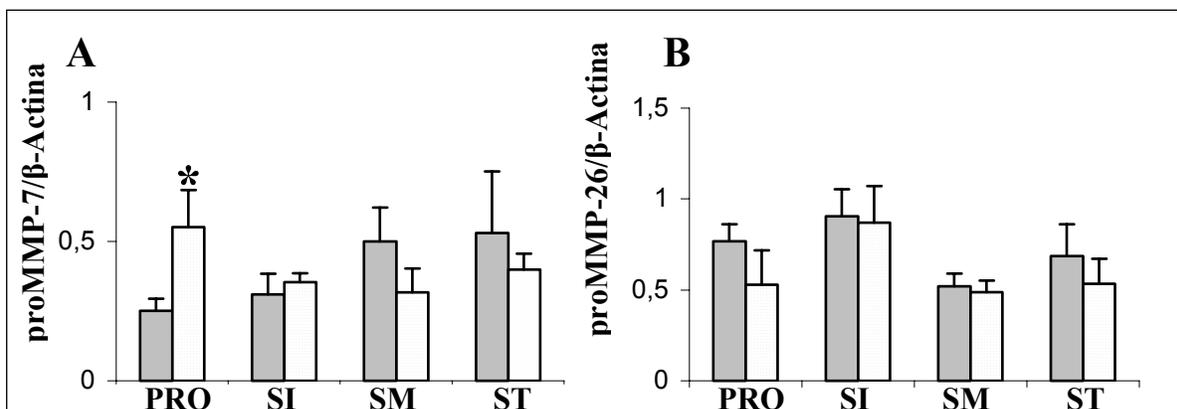


Figura 6. Contenido de proteína de pro-MMP-7 y pro-MMP-26 en endometrios obtenidos de mujeres con y sin endometriosis durante el ciclo menstrual. A, la proteína de pro-MMP-7 (28 kDa) se detectó en 26 muestras del grupo control y 22 del grupo endometriosis. B, la proteína de pro-MMP-26 (30 kDa) se detectó en 21 muestras del grupo control y 19 del grupo endometriosis. Los resultados muestran el promedio ± EE normalizados con β-actina. PRO: proliferativo (*n* controles: 6;6, *n* endometriosis: 6;6); SI: fase secretora inicial (*n* controles: 5;4, *n* endometriosis: 5;5); SM: fase secretora media (*n* controles: 7;7, *n* endometriosis: 6;6); ST: fase secretora tardía (*n* controles: 6;4, *n* endometriosis: 6;5), respectivamente. **p*<0.05 vs control. Barras grises: Normal, barras claras: Endometriosis.

Tabla 7. Contenido proteico de TIMP-2 (A), TIMP-3 (B) y TIMP-4 (C) en endometrios con y sin endometriosis durante el ciclo menstrual

A

Fase del ciclo Menstrual	Control <i>n</i> = 14	Endometriosis <i>n</i> = 14	p
Proliferativo	0.52 ± 0.40	0.69 ± 0.12 ^{a,b}	ns
Secretor Inicial	0.79 ± 0.15	0.24 ± 0.07 ^a	0.045
Secretor Medio	0.77 ± 0.21	0.36 ± 0.05 ^b	ns
Secretor Tardío	0.52 ± 0.08	0.39 ± 0.09	ns

B

Fase del ciclo Menstrual	Control <i>n</i> = 21	Endometriosis <i>n</i> = 22	p
Proliferativo	0.40 ± 0.15	0.40 ± 0.17	ns
Secretor Inicial	0.34 ± 0.06	0.19 ± 0.05	ns
Secretor Medio	0.22 ± 0.07	0.29 ± 0.07	ns
Secretor Tardío	0.36 ± 0.13	0.41 ± 0.14	ns

C

Fase del ciclo Menstrual	Control		Endometriosis		p
	29KDa (<i>n</i> = 21)	23 KDa (<i>n</i> = 21)	29KDa (<i>n</i> = 22)	23 KDa (<i>n</i> = 22)	
Proliferativo	0.90 ± 0.29	1.08 ± 0.33	0.53 ± 0.16	0.64 ± 0.17	ns
Secretor Inicial	0.59 ± 0.26	0.86 ± 0.40	0.53 ± 0.14	0.89 ± 0.23	ns
Secretor Medio	0.77 ± 0.27	0.99 ± 0.31	0.65 ± 0.22	0.82 ± 0.21	ns
Secretor Tardío	0.41 ± 0.23	1.06 ± 0.41	0.23 ± 0.14	0.83 ± 0.11	ns

La proteína de TIMP-2 (21 kDa), TIMP-3 (30 kDa, forma glicosilada) y las dos formas de TIMP-4 (29, glicosilada y 23 kDa, no glicosilada) se detectaron por western blot. Los resultados muestran el promedio ± EE normalizados con β-actina y el *n* indicado es el número total de muestras. Las letras iguales indican diferencia significativa de $p < 0.05$ dentro del mismo grupo, p: entre grupos; ns: no significativo.

Razones entre los contenidos de mRNA o proteína de las MMPs y TIMPs según fases del ciclo menstrual.

Los TIMPs se unen al dominio catalítico de las MMPs inhibiendo su actividad enzimática. Observamos el efecto inhibitorio de los TIMPs analizando las razones MMPs/TIMPs de fases proliferativa y secretora del ciclo menstrual en endometrios con y sin endometriosis.

Gelatinasas: MMP-2 puede ser inhibida por todos los TIMPs descritos (Dong y cols, 2002, Lamber y cols, 2004). Al comparar con el grupo normal, la razón de mRNA de MMP-2/TIMP-2 fue 72% y 52% mayor en los endometrios de fase proliferativa y secretora

de endometriosis ($p=0.016$ y $p=0.034$, respectivamente). Las razones de mRNA de TIMP-3 y TIMP-4 con MMP-2 no fueron distintos entre ambos grupos (Figura 7A y Tabla 8A).

Las razones de mRNA de MMP-9 con los TIMPs estudiados mostraron que MMP-9/TIMP-2 de fase proliferativa de endometriosis fue 46% mayor al grupo control ($p=0.039$). La razón MMP-9/TIMP-3 mostró diferencias a través del ciclo menstrual en ambos grupos, pero no entre ellos. La razón mRNA de MMP-9/TIMP-4 en cada grupo estudiado fue constante a través del ciclo menstrual, pero la fase secretora tardía de endometriosis fue 53% mayor que el grupo control (datos no mostrados) ($p=0.015$) (Figura 7B y Tabla 8B).

Matrilisinas: MMP-7 es inhibida por los TIMPs estudiados (Dong y cols, 2002). En endometriosis la razón mRNA de MMP-7/TIMP-2 fue mayor al grupo normal, tanto en fase proliferativa (67%, $p=0.016$), como secretora (54%, $p=0.029$). Las razones de mRNA de TIMP-3 y TIMP-4 con MMP-7, no fueron diferentes entre los grupos (Figura 7C y Tabla 8C). Sólo la razón proteica entre pro-MMP-7 y TIMP-4 en fase proliferativa de endometriosis fue 70% mayor al grupo control ($p=0.012$) (Figura 8A y Tabla 9A).

MMP-26 ha sido asociada principalmente a TIMP-4 (Chegini y cols, 2003). La razón de mRNA de MMP-26/TIMP-4 en ambos endometrios estudiados fue constante a través del ciclo menstrual. Sin embargo, la razón proteica de proMMP-26/TIMP-4 glicosilada en fase proliferativa de endometriosis fue 67% mayor al grupo de endometrios controles ($p=0.038$) (Figura 8B y Tabla 8D). Se realizaron las razones con TIMP-2 y TIMP-3, donde la razón de mRNA MMP-26/TIMP-2 de fase proliferativa de endometriosis fue 64% mayor al grupo control ($p=0.033$) (Figura 7D), la razón de mRNA con TIMP-3 de fase proliferativa de endometriosis, fue mayor, pero no estadísticamente diferente al control (Tabla 8D). Las razones proteicas de TIMP-2 y TIMP-3 con MMP-26 no fueron distintas entre los grupos (Tabla 9B).

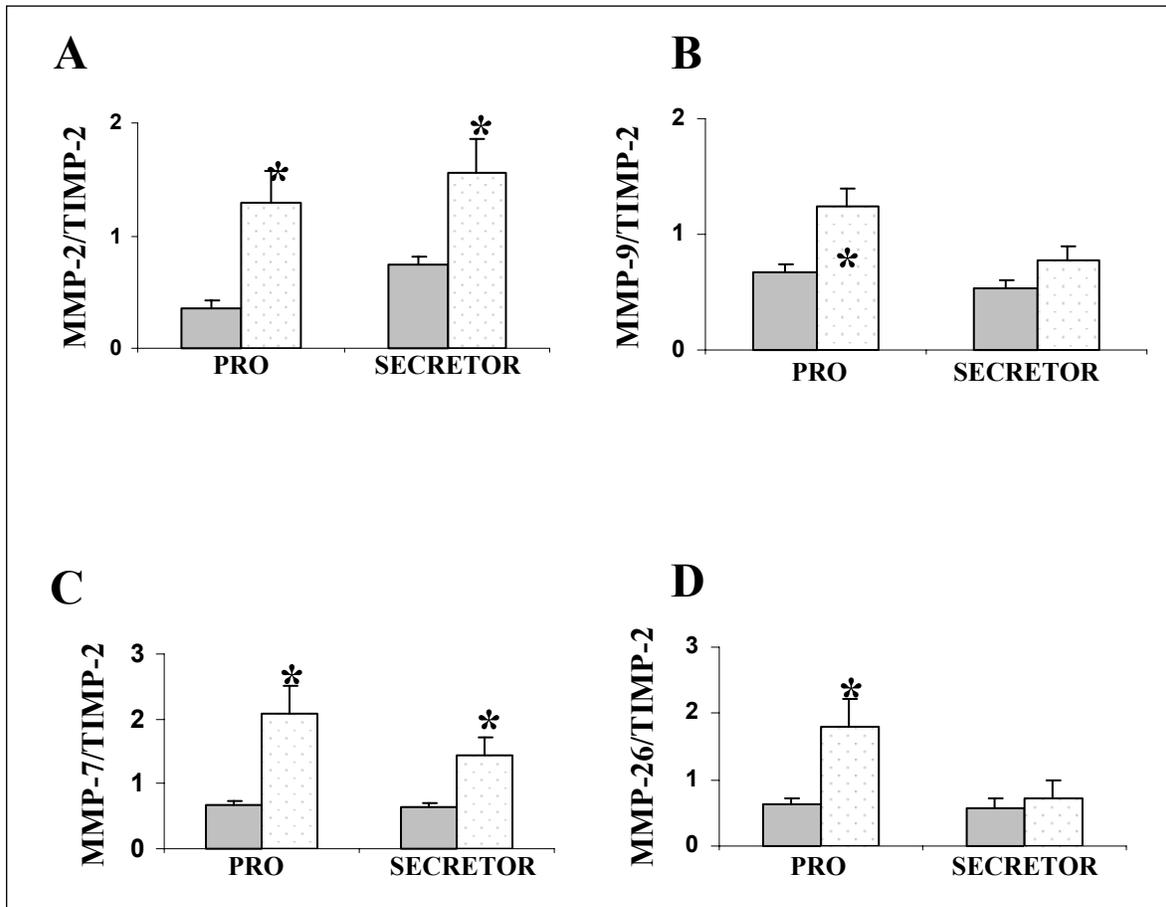


Figura 7. Razones del mRNA entre MMPs y TIMPs en endometrios controles y de endometriosis según fases del ciclo menstrual. Razones entre los niveles de mRNA de MMP-2 (A), MMP-9 (B), MMP-7 (C) y MMP-26 (D) con los niveles de mRNA de TIMP-2. Los resultados muestran el promedio \pm EE normalizados cada uno con la subunidad ribosomal 18S. PRO: proliferativo (n control: 3;3;3;3, n endometriosis: 7;3;4;4); SECRETOR (n control: 11;9;5;7, n endometriosis: 12;8;7;9), respectivamente. * $p < 0.05$ vs control. Barras grises: Normal, barras claras: Endometriosis.

Tabla 8. Razones del mRNA entre MMPs y TIMPs en endometrios controles y de endometriosis según fases del ciclo menstrual

A

MMP-2	Proliferativo Control	Proliferativo Endometriosis	p	Secretor Control	Secretor Endometriosis	p
TIMP-3	3.11 ± 1.00 (3)	5.31 ± 1.27 ^b (6)	ns	2.53 ± 0.64 (5)	2.14 ± 0.33 ^b (12)	ns
TIMP-4	1.40 ± 0.15 (3)	1.45 ± 0.51 (5)	ns	2.31 ± 0.43 (7)	2.67 ± 0.47 (12)	ns

B

MMP-9	Proliferativo Control	Proliferativo Endometriosis	p	Secretor Control	Secretor Endometriosis	p
TIMP-3	3.10 ± 0.50 (3)	5.41 ± 1.06 ^b (3)	ns	2.61 ± 0.72 (12)	1.54 ± 0.35 ^b (11)	ns
TIMP-4	2.03 ± 0.26(3)	2.20 ± 0.56(5)	ns	1.65 ± 0.27 (8)	1.72 ± 0.32(15)	ns

C

MMP-7	Proliferativo Control	Proliferativo Endometriosis	p	Secretor Control	Secretor Endometriosis	p
TIMP-3	4.53 ± 2.12 (3)	8.70 ± 1.36 ^a (3)	ns	2.70 ± 0.74 (7)	2.12 ± 0.58 ^a (9)	ns
TIMP-4	2.00 ± 0.19 (3)	2.89 ± 0.68 (4)	ns	2.89 ± 0.68 (13)	2.25 ± 0.39(14)	ns

D

MMP-26	Proliferativo Control	Proliferativo Endometriosis	p	Secretor Control	Secretor Endometriosis	p
TIMP-3	3.07 ± 2.29 (3)	7.10 ± 1.18 ^b (4)	ns	2.49 ± 1.25 (8)	1.00 ± 0.47 ^b (12)	ns
TIMP-4	1.89 ± 0.28 (6)	2.59 ± 0.66 (6)	ns	1.45 ± 0.28 (17)	1.61 ± 0.24 (19)	ns

Razones entre los niveles de mRNA de MMP-2 (A), MMP-9 (B), MMP-7 (C) y MMP-26 (D) con los niveles de mRNA de TIMP-3 y TIMP-4 normalizados cada uno con la subunidad ribosomal 18S. Los resultados son el promedio ± EE del número de muestras indicadas en paréntesis. Diferencia significativa de $p < 0.05$: letras iguales, dentro del mismo grupo; p, entre grupos; ns, no significativo.

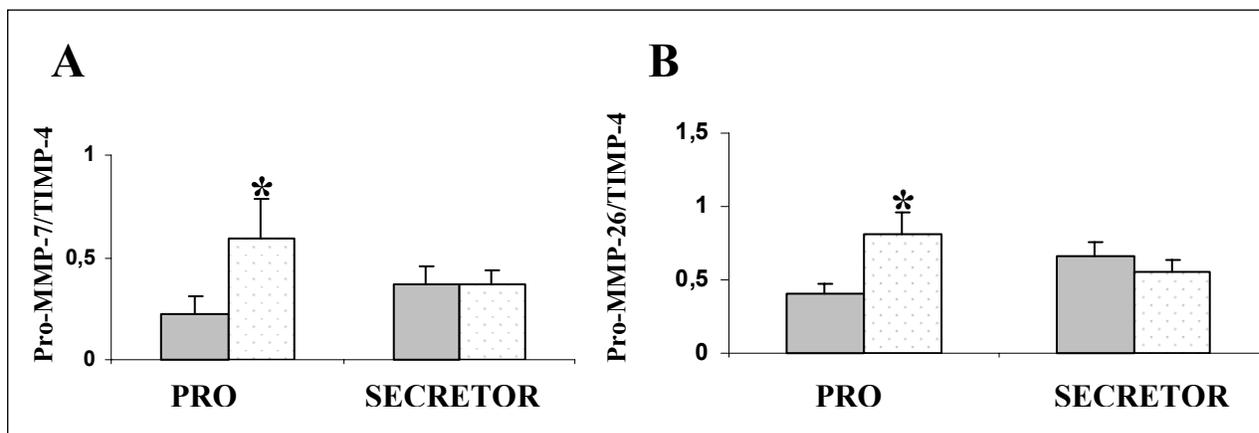


Figura 8. Razones proteicas entre MMPs y TIMPs en endometrios controles y de endometriosis según fases del ciclo menstrual. Razones entre los contenidos proteicos de proMMP-7 (A) y proMMP-26 (B), con los niveles proteicos de TIMP-4. Los resultados muestran el promedio \pm EE normalizados con β -actina. PRO: proliferativo (n control: 7;4, n endometriosis: 5;4); SECRETOR (n control: 15;13, n endometriosis: 14;9), respectivamente. * $p < 0.05$ vs control. Barras grises: Normal, barras claras: Endometriosis.

Tabla 9. Razones proteicas entre MMPs y TIMPs en endometrios controles y de endometriosis según fases del ciclo menstrual

A

ProMMP-7	Proliferativo Control	Proliferativo Endometriosis	p	Secretor Control	Secretor Endometriosis	p
TIMP-2	0.60 \pm 0.42 (4)	0.84 \pm 0.37 (4)	ns	0.53 \pm 0.12 (13)	0.95 \pm 0.23 (9)	ns
TIMP-3	1.47 \pm 0.53 (6)	1.36 \pm 0.55 (6)	ns	1.87 \pm 0.40 (18)	1.63 \pm 0.34 (14)	ns

B

ProMMP-26	Proliferativo Control	Proliferativo Endometriosis	p	Secretor Control	Secretor Endometriosis	p
TIMP-2	3.40 \pm 3.09 (4)	0.87 \pm 0.39 (4)	ns	1.98 \pm 0.48 (13)	2.39 \pm 0.73 (9)	ns
TIMP-3	4.76 \pm 1.85 (6)	7.44 \pm 6.44 (5)	ns	6.39 \pm 1.63 (16)	5.08 \pm 1.44 (13)	ns

Razones entre los contenidos proteicos de proMMP-7 (A) y proMMP-26 (B), con los niveles proteicos de TIMP-2 y TIMP-3 normalizados cada uno con β -actina. Los resultados son el promedio \pm EE del número de muestras indicadas en paréntesis. ns: no significativo.

Relación entre los contenidos de mRNA o de proteína de MMPs y TIMPs en endometrios de mujeres con endometriosis y su localización o su severidad.

Para ver si existe una diferencia entre las pacientes con endometriosis ovárica y peritoneal, se evaluaron los valores totales de los niveles de mRNA y proteicos de MMPs y TIMPs en los endometrios de estas mujeres.

Con respecto a la procedencia de la endometriosis, solamente MMP-26 (mRNA y proteína) fue diferente entre endometriosis peritoneal y ovárica, siendo mayor en los endometrios eutópicos con lesiones ováricas (mRNA: 47% y proteína: 44%, $p < 0.05$). Y de los TIMPs estudiados, sólo el mRNA de TIMP-4, y no la proteína mostró diferencias entre los endometrios, siendo las pacientes con lesiones ováricas 47% mayor que las pacientes con lesiones peritoneales ($p < 0.05$) (Tabla 10).

El grado de severidad de la endometriosis se agrupó en mínima-leve y moderada-severa. No se observaron diferencias significativa entre los niveles de mRNA o proteicos de las MMPs y TIMPs.

Tabla 10. Relación entre los niveles de mRNA y proteicos de MMPs y TIMPs en endometrios de mujeres con endometriosis y su procedencia

A

mRNA endometrial	Endometriosis Ovárica	<i>n</i>	Endometriosis Peritoneal	<i>n</i>	<i>p</i>
MMP-26	0.48 ± 0.10	7	0.26 ± 0.06	19	0.049
TIMP-4	0.34 ± 0.04	7	0.18 ± 0.04	21	0.023

B

Proteína endometrial	Endometriosis Ovárica	<i>n</i>	Endometriosis Peritoneal	<i>n</i>	<i>p</i>
MMP-26	0.86 ± 0.20	5	0.48 ± 0.06	14	0.025
TIMP-4 Total	0.69 ± 0.10	5	0.67 ± 0.11	21	ns

Niveles de mRNA (A) y proteicos (B) de proMMP-26 y TIMP-4 en endometrios de mujeres con endometriosis agrupadas por el tipo de endometriosis según la ubicación de la lesión endometriósica (ovárica o peritoneal), detectados por RT-PCR o por western blot. Los resultados, normalizados con la subunidad ribosomal 18S o con β -actina, son el promedio \pm EE. El *n* indicado es el número total de muestras. *p*: diferencia significativa entre grupos. ns: no significativo.

VI.2. MMPs y TIMPs en cultivos celulares endometriales provenientes de endometrios eutópicos de mujeres con y sin endometriosis.

Niveles de mRNA de las MMPs y los TIMPs en condición basal en cultivos celulares endometriales provenientes de endometrios eutópicos de mujeres con y sin endometriosis.

En cultivos celulares de endometrio de mujeres con y sin endometriosis la presencia del mRNA de MMP-2, MMP-7, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 fue detectada en todos los protocolos realizados en los cultivos celulares endometriales, tiempos cortos y tiempo largo, a diferencia del mRNA de MMP-9 que fue observado solamente en cultivos celulares estromales y epiteliales de 24 horas, y del mRNA de MMP-26 que no se detectó en ningún compartimento celular analizado en los tiempos estudiados (Figura 9).

En cultivos cortos, los niveles de mRNA en condición basal de MMP-2, MMP-7, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 fueron similares en las células epiteliales y estromales provenientes de endometrios controles y de endometriosis (Tabla 11).

En los cultivos de 24 horas de células epiteliales provenientes de endometrios de mujeres controles, los niveles basales de mRNA de MMP-7 y de MMP-9 fueron 75% ($p=0.04$) mayor y 46% ($p=0.008$) menor a los de células estromales. Aunque los mRNA de TIMP-2 y TIMP-3 mostraron variaciones entre ambos compartimientos celulares no fue significativo, y los de MMP-2 y TIMP-4 fueron similares en ambos tipos celulares. En endometriosis, los niveles basales de mRNA de MMP-7 y TIMP-4 de células epiteliales fueron 71% y 65% mayores que los de células estromales ($p=0.01$ y $p=0.06$, respectivamente). Los niveles basales de mRNA de MMP-2, MMP-9, TIMP-2 y TIMP-3 fueron similares en ambos tipos celulares (Tabla 11).

Comparación del nivel basal de mRNA de las MMPs y los TIMPs en cultivos celulares endometriales entre los endometrios de mujeres con y sin endometriosis.

No se observaron diferencias en el nivel basal de mRNA de los genes estudiados en los cultivos de 2-3 h de células epiteliales y estromales entre ambos grupos de endometrios. (Tabla 11).

Gelatinasas: los niveles basales de mRNA de MMP-2 no fueron diferentes entre ambos grupos de endometrios. En cambio los niveles basales de mRNA de MMP-9 en cultivos de

24 horas de células estromales y epiteliales de endometriosis fueron 42% menor y 84% mayor comparado con el grupo normal ($p=0.036$ y $p=0.028$, respectivamente) (Tabla 11).

Matrilisinas: En los cultivos de 24 horas de células estromales y epiteliales de endometriosis, el nivel basal de mRNA de MMP-7 fue mayor 62 y 58% con respecto al control ($p=0.01$ y $p=0.04$, respectivamente) (Tabla 11).

TIMPs: Los niveles basales de mRNA de TIMP-3 y TIMP-4 pero no de TIMP-2, en cultivos de células estromales de 24 horas provenientes de las pacientes con endometriosis, fueron 37% ($p=0.040$) y 39% ($p=0.029$) menores comparados al grupo control, respectivamente. En cambio, en cultivos celulares epiteliales fueron similares entre los grupos (Tabla 11).

Efecto de TNF- α sobre los niveles de mRNA de MMPs y TIMPs en cultivos celulares endometriales provenientes de mujeres con y sin endometriosis.

El efecto de TNF- α sobre el comportamiento del mRNA de MMPs y TIMPs en los cultivos celulares endometriales normales y de endometriosis fue observado por RT-PCR, tal como se describe en Materiales y Métodos.

En cultivos de tiempos cortos de 2 o 3 horas en ninguna de las concentraciones utilizadas de TNF- α modificó los niveles basales del mRNA de MMPs y TIMPs (Figura 9).

Se estableció una concentración única de TNF- α (10 ng/mL) en cultivos de 24 horas, ya que había sido demostrada en el laboratorio como suficiente para la estimulación de genes como LIF e IL-6. Para confirmar si el sistema NF κ B participa en la regulación del sistema de las MMPs, se adicionó el inhibidor BAY 11-7085, 30 minutos antes de la estimulación con TNF- α .

Gelatinasas: En células estromales y epiteliales de 24 horas de cultivo provenientes de endometriosis de mujeres con y sin endometriosis, la presencia de TNF- α no afectó los niveles de mRNA de MMP-2 siendo éstos constantes. (Figuras 9).

En células estromales provenientes de endometriosis con y sin endometriosis de 24 horas de cultivo, TNF- α aumentó 25% y 55% los niveles del mRNA respecto al basal ($p=0.026$ y $p=0.005$, respectivamente). Bay previno parcialmente el efecto de TNF- α . En células epiteliales normales, TNF- α aumentó el mRNA de MMP-9, pero no significativamente, en cambio, en endometriosis, aumentó 26% y la presencia de Bay previno el efecto estimulador de esta citoquina ($p=0.002$ y $p=0.048$, respectivamente) (Figuras 9 y 10).

Matrilisinas: En células epiteliales normales de 24 horas tratadas con TNF- α , los niveles de mRNA de MMP-7 aumentaron 26% respecto al basal ($p=0.003$) y Bay no previno este aumento. En tanto en células estromales normales y con endometriosis y cultivos epiteliales de endometriosis no fueron modificados. (Figuras 9 y 10).

El mRNA de MMP-26 no fue detectado en condición basal ni en presencia de TNF- α en cultivos endometriales controles o de endometriosis en ningún tiempo de cultivo o concentración de TNF- α (Figuras 9).

TIMPs: Los tiempos de incubación con TNF- α estudiados en ambos tipos de cultivo celular no modificaron los niveles de mRNA de TIMP-2 ni de TIMP-3 en los endometrios con y sin endometriosis. TNF- α en células epiteliales de 24 horas controles y de endometriosis redujo los niveles de TIMP-4 en 25% y 14% respecto al basal, ($p=0,049$ y $p=0,0003$, respectivamente), efecto prevenido por Bay. TNF- α no afectó los niveles basales células estromales (Figuras 9 y 11).

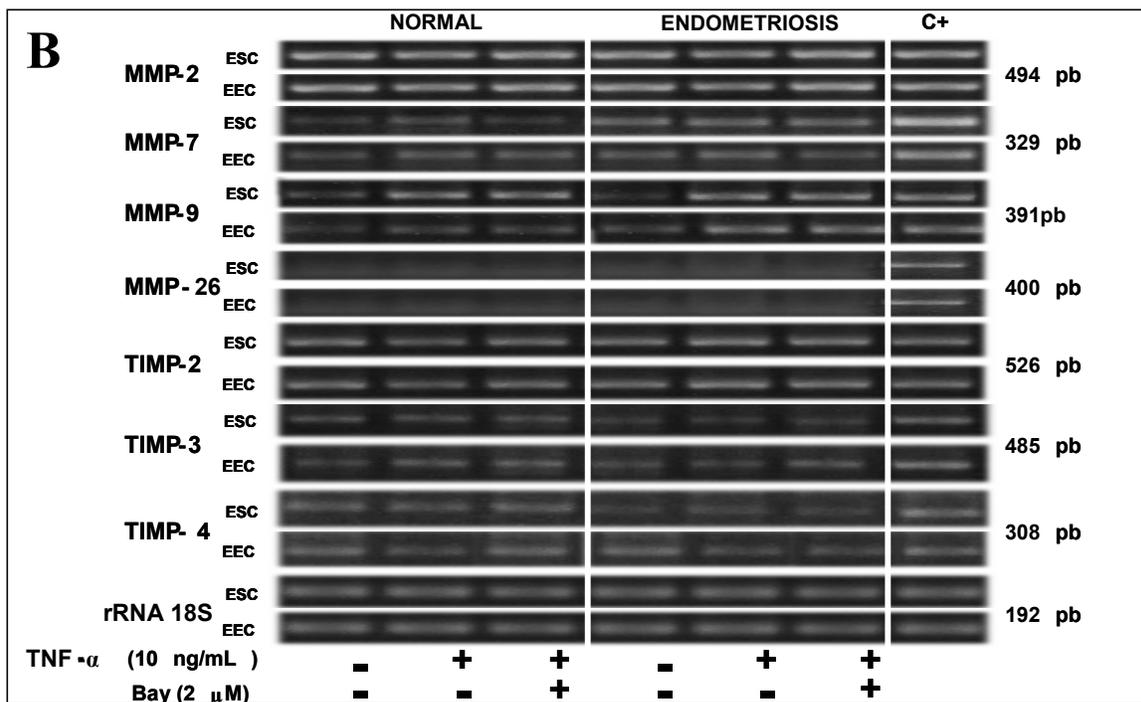
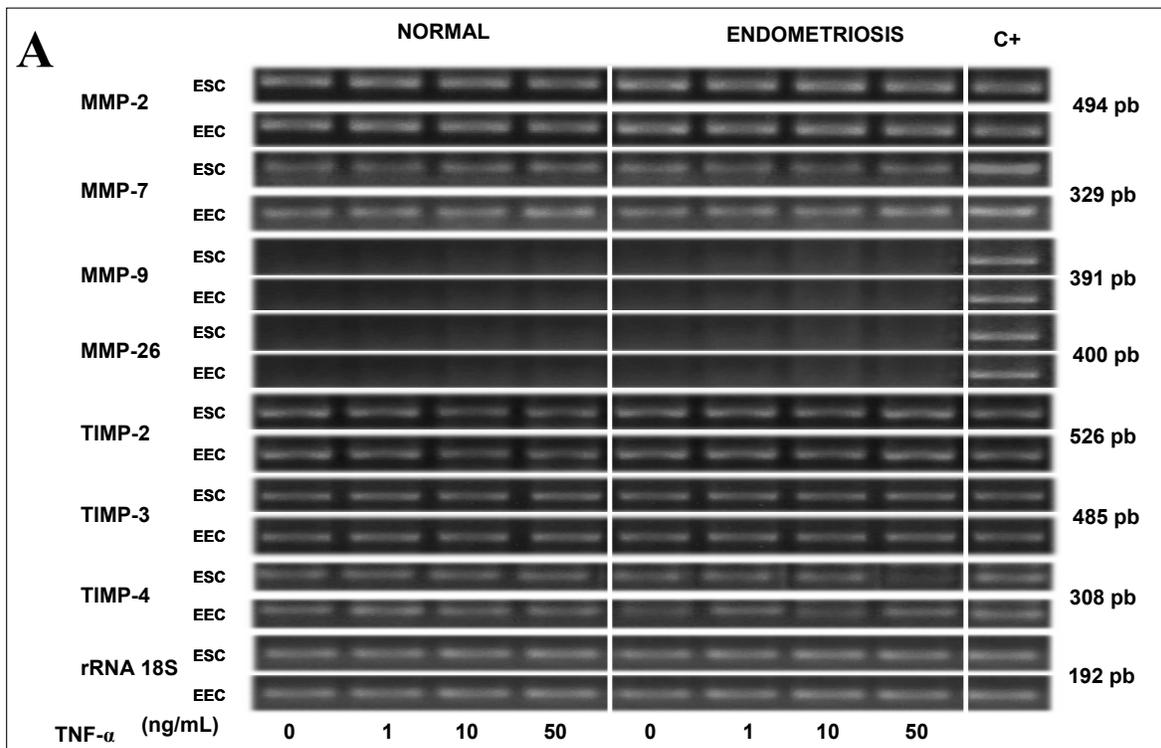


Figura 9. Gel electroforético representativo de amplificados de MMPs y TIMPs en cultivos estromales (ESC) y epiteliales (EEC) de endometrios con y sin endometriosis. **A,** Cultivos de 2-3 horas expuestos a distintas concentraciones de TNF- α . **B,** Cultivos expuestos a una concentración fija de TNF- α (10 ng/mL) a 24 horas descrito en Materiales y Métodos. Los productos de PCR normalizados con la subunidad ribosomal 18S. Control positivo (C+): amplificado de cada gen en tejido endometrial.

Tabla 11. Expresión basal de 2-3 (A) y 24 (B) horas del mRNA de MMPs y TIMPs en cultivos de células estromales (ESC) y epiteliales (EEC) provenientes de endometriosis de mujeres con y sin endometriosis.

A

MMP-2	Grupo Normal	Grupo Endometriosis	p
ESC	0.87 ± 0.20	1.09 ± 0.55	ns
EEC	0.93 ± 0.05	0.98 ± 0.33	ns
MMP-7	Grupo Normal	Grupo Endometriosis	p
ESC	0.34 ± 0.06	0.35 ± 0.18	ns
EEC	0.83 ± 0.23	0.74 ± 0.12	ns
TIMP-2	Grupo Normal	Grupo Endometriosis	p
ESC	0.34 ± 0.12	0.42 ± 0.15	ns
EEC	0.49 ± 0.10	0.71 ± 0.20	ns
TIMP-3	Grupo Normal	Grupo Endometriosis	p
ESC	0.70 ± 0.11	0.59 ± 0.23	ns
EEC	0.49 ± 0.16	0.56 ± 0.22	ns
TIMP-4	Grupo Normal	Grupo Endometriosis	p
ESC	0.62 ± 0.18	0.28 ± 0.04	ns
EEC	0.35 ± 0.07	0.28 ± 0.20	ns

B

MMP-2	Grupo Normal	Grupo Endometriosis	p
ESC	0.92 ± 0.09	0.89 ± 0.09	ns
EEC	1.09 ± 0.15	1.04 ± 0.06	ns
MMP-9	Grupo Normal	Grupo Endometriosis	p
ESC	0.61 ± 0.06 ^a	0.35 ± 0.09	0.036
EEC	0.33 ± 0.05 ^a	0.61 ± 0.05	0.028
MMP-7	Grupo Normal	Grupo Endometriosis	p
ESC	0.32 ± 0.04 ^a	0.52 ± 0.07 ^a	0.010
EEC	0.56 ± 0.08 ^a	0.89 ± 0.12 ^a	0.040
TIMP-2	Grupo Normal	Grupo Endometriosis	p
ESC	0.94 ± 0.09	0.80 ± 0.15	ns
EEC	1.49 ± 0.39	1.15 ± 0.21	ns
TIMP-3	Grupo Normal	Grupo Endometriosis	p
ESC	0.54 ± 0.07	0.34 ± 0.03	0.040
EEC	0.36 ± 0.06	0.38 ± 0.10	ns
MMP-4	Grupo Normal	Grupo Endometriosis	p
ESC	0.48 ± 0.05	0.29 ± 0.05 ^a	0.029
EEC	0.43 ± 0.07	0.48 ± 0.07 ^a	ns

Cultivos celulares de 2-3 y 24 horas fueron incubados como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados normalizados con la subunidad ribosomal 18S son el promedio ± EE de un mínimo de 3 cultivos celulares de segundo pasaje provenientes cada uno de individuos distintos. Diferencia significativa: letras iguales, dentro del grupo; p, entre los grupos.

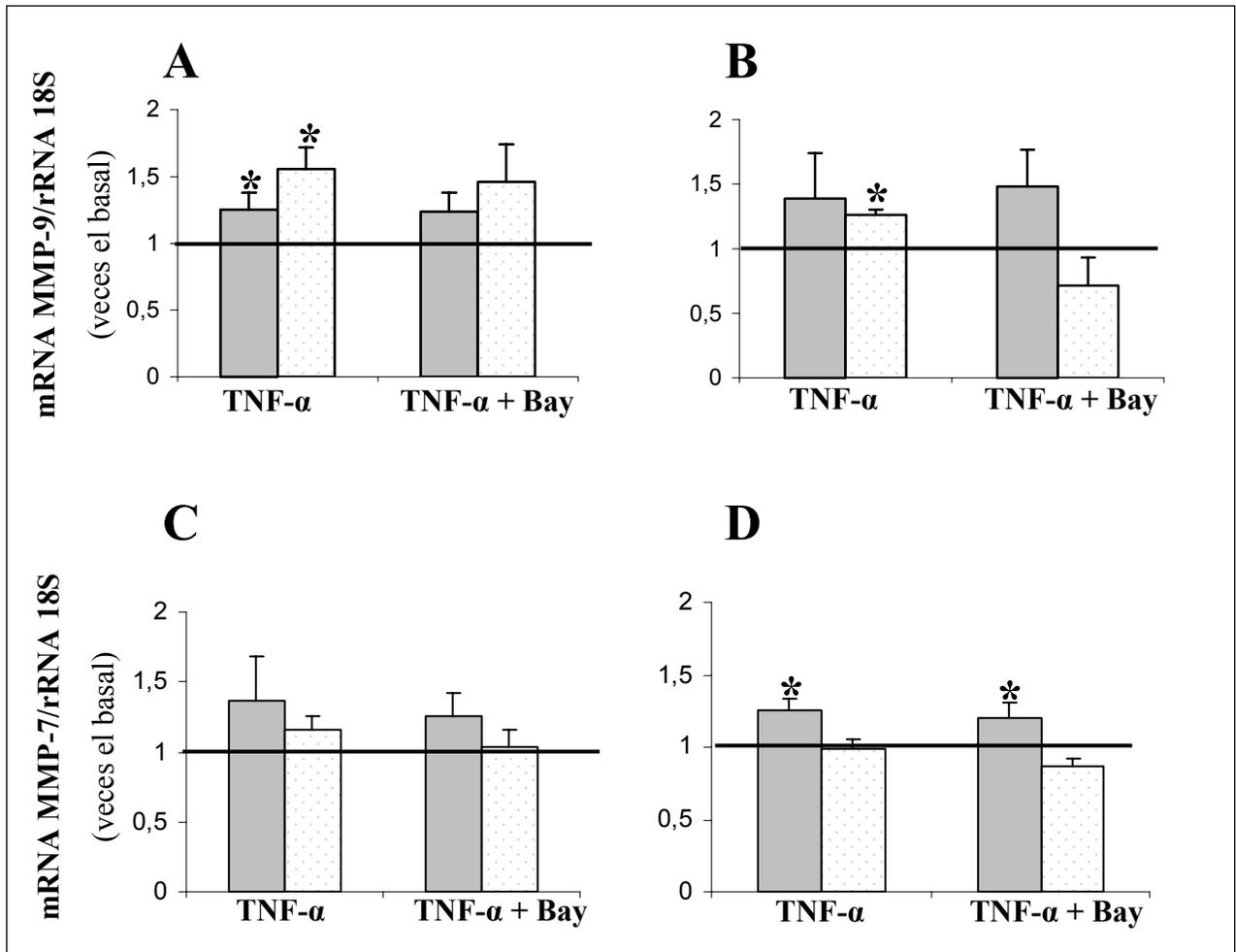


Figura 10. Efecto de TNF- α sobre la expresión del mRNA de MMP-9 (A y B) y MMP-7 (C y D) en cultivos de células endometriales estromales (A y C) y epiteliales (B y D) provenientes de endometrios de mujeres con y sin endometriosis. Los cultivos celulares fueron expuestos a una concentración fija de 10 ng/mL de TNF- α durante 24 horas, como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados normalizados con la subunidad ribosomal 18S son el promedio \pm EE, expresados en veces respecto al basal de un mínimo de 3 cultivos celulares de segundo pasaje provenientes cada uno de individuos. Barras grises: normal, barras claras: endometriosis. * $p < 0.05$ respecto al basal. Línea continua indica el valor basal.

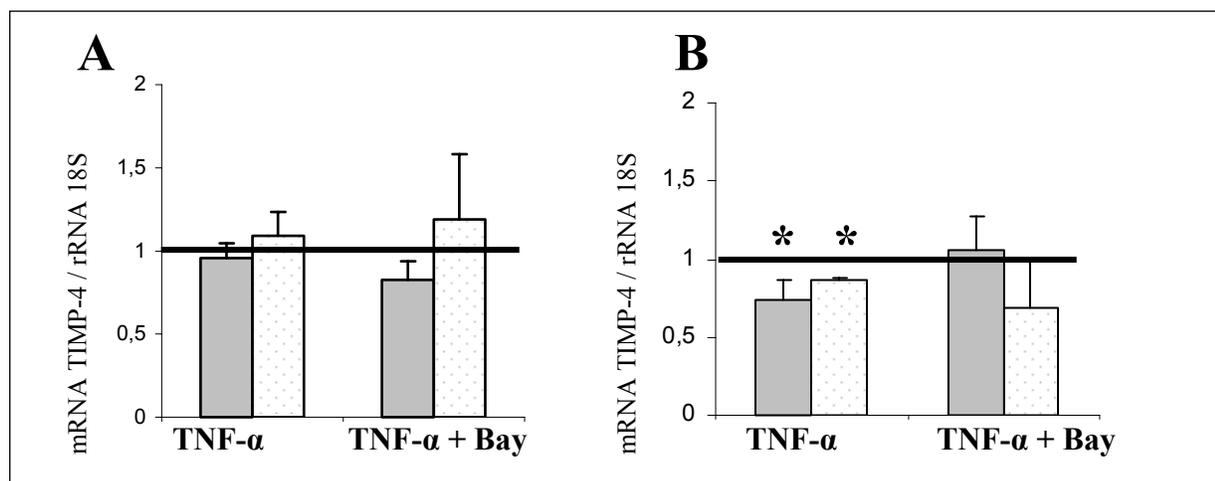


Figura 11. Efecto de $TNF-\alpha$ sobre la expresión del mRNA de TIMP-4 en cultivos de células endometriales estromales (A) y epiteliales (B) provenientes de endometrios de mujeres con y sin endometriosis. Los cultivos celulares fueron expuestos a $TNF-\alpha$ (10 ng/mL) durante 24 horas como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados normalizados con la subunidad ribosomal 18S son el promedio \pm EE, expresados en veces respecto al basal de un mínimo de 3 cultivos celulares de segundo pasaje provenientes cada uno de individuos distintos. Barras grises: normal, barras claras: endometriosis. * $p < 0.05$ respecto al basal. Línea continua indica el valor basal.

Niveles proteicos de MMPs y TIMPs en condición basal en cultivos celulares endometriales provenientes de endometrios eutópicos de mujeres con y sin endometriosis.

Se estudió, en cultivos de 24 horas, la actividad proteolítica de MMP-2 y MMP-9 en el medio de cultivo de células estromales y epiteliales por zimografía y el contenido proteico de MMP-7, MMP-26 y de los TIMPs en homogenizados de ambos tipos celulares por western blot. Figuras 12 y 13.

Gelatinasas: En los medios de cultivo de células estromales y epiteliales de endometrios con y sin endometriosis se detectó solamente el zimógeno y no la forma activa de MMP-2. La secreción basal del zimógeno entre ambos grupos estudiados fue similar, tanto en los cultivos estromales, como en los epiteliales (Figura 12 y 14).

En ambos grupos, MMP-9 fue diferente en el medio de cultivo proveniente de células epiteliales y estromales. En grupo control, se detectó el zimógeno en el total de los cultivos estudiados, mientras que la proteína activa fue detectada a nivel basal sólo en uno de cinco cultivos de células epiteliales, diferente fue en los cultivos de células estromales donde ambas formas de la enzima fueron indetectables por zimografía. En endometriosis, en

células epiteliales la secreción del zimógeno de MMP-9 fue mucho menor a los cultivos controles y su forma activa, a diferencia del grupo normal, no se detectó en ningún medio de cultivo. Similar a lo observado en células estromales normales, en endometriosis la proenzima de MMP-9 no se detectó a nivel basal; sin embargo, la enzima activa fue detectada en uno de cuatro cultivos (Figuras 12 y 15).

Matrilisinas: La proteína MMP-7 fue detectada como zimógeno (28 kDa) en ambos tipos celulares endometriales con y sin endometriosis. La proteína activa no fue observada. En células estromales de endometriosis, los niveles basales del zimógeno de MMP-7 fueron 75% menores al grupo normal, contrario a lo observado en el mRNA ($p=0.020$). En cultivos epiteliales los niveles basales fueron similares entre ambos grupos (Figura 13 y Tabla 12).

La presencia de MMP-26 en ambos tipos de cultivos celulares no fue detectada.

Ninguna de las matrilisinas fue detectada en los medios de cultivo por western blot.

TIMPs: En ambos tipos celulares provenientes de endometrios con y sin endometriosis se detectó la proteína de TIMP-2 (21 kDa), TIMP-3 y TIMP-4 (glicosiladas, 30 y 29 kDa y no glicosiladas, 24 y 23 kDa, respectivamente). El contenido proteico de TIMP-2 fue similar en los cultivos estromales y epiteliales del grupo control y de endometriosis. La forma glicosilada de TIMP-3 fue 240% ($p=0.030$) mayor en células epiteliales que en las estromales normales, y la no glicosilada, aunque fue 130% mayor, no fue estadístico. Este comportamiento no fue observado en células de endometriosis (Figura 13 y Tabla 12).

En células epiteliales normales, ambas formas de TIMP-4 fueron 79% y 88% menor a las estromales, aunque no significativamente diferente. En endometriosis, los niveles basales de TIMP-4 no glicosilado fue 79% menor en los cultivos estromales y el glicosilado fue 273% mayor en los cultivos epiteliales al compararlo con el grupo control ($p<0.0001$ y $p=0.013$) (Figura 13 y Tabla 12). Ninguno de los TIMPs fue detectado en los medios de cultivo por western blot.

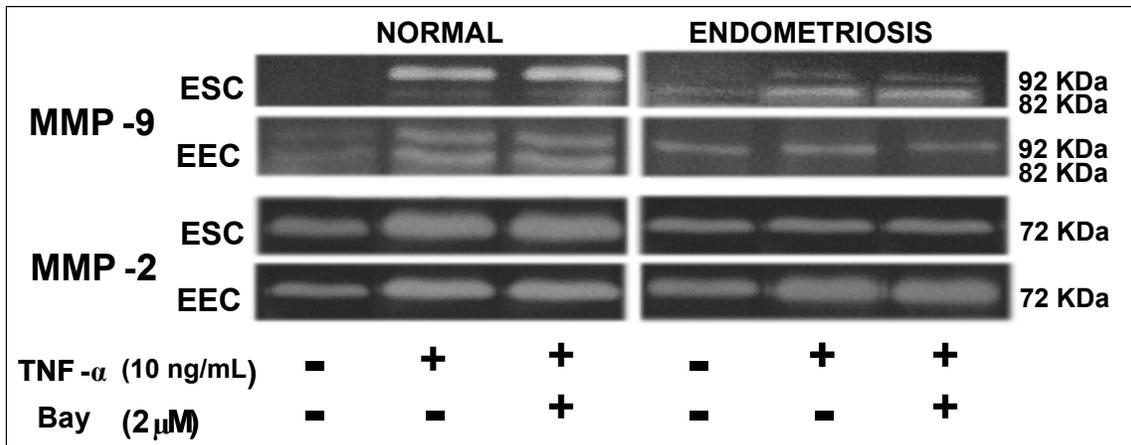


Figura 12. Expresión de la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 en cultivos de células endometriales y estromales provenientes de endometrios de mujeres con y sin endometriosis. Los cultivos celulares fueron expuestos a TNF- α (10 ng/mL) en presencia o ausencia de Bay (2 μ M) durante 24 horas, como se indica en Materiales y Métodos.

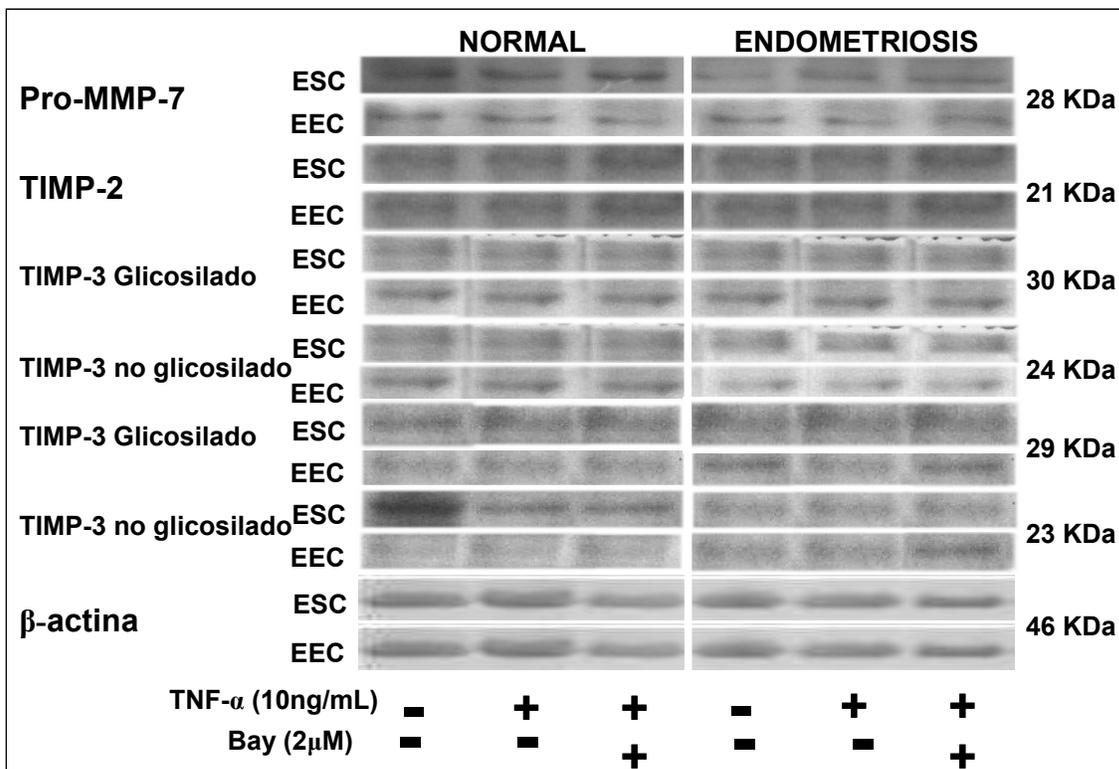


Figura 13. Expresión proteica de MMP-7, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 en cultivos de células endometriales y estromales provenientes de endometrios de mujeres con y sin endometriosis. Los cultivos celulares fueron expuestos a TNF- α (10 ng/mL) en presencia o ausencia de Bay (2 μ M) durante 24 horas, como se indica en Materiales y Métodos.

Efecto de TNF- α sobre la proteína de MMPs y TIMPs en cultivos celulares provenientes de endometrios con y sin endometriosis.

El efecto de TNF- α sobre el comportamiento de la proteína de MMPs y TIMPs en los cultivos celulares endometriales normales y de endometriosis fue observado, por zimografía para MMP-2 y MMP-9 y por western blot para MMP-7, MMP-26 y TIMPs, tal como se describe en Materiales y Métodos. Figuras 12 y 13.

Gelatinasas: En los cultivos de células estromales y epiteliales controles, la presencia de TNF- α aumentó 170% y 60% la secreción de pro-MMP-2 respecto a su basal ($p=0.023$ y $p<0.0001$, respectivamente). No se detectó la forma activa de la enzima. La presencia de Bay no afectó la estimulación de la secreción del zimógeno de MMP-2 en los cultivos estromales y la previno parcialmente en los cultivos epiteliales. En endometriosis, TNF- α no modificó la secreción de pro-MMP-2 en cultivos estromales, en células epiteliales la secreción de pro-MMP-2 aumentó 70% respecto a su basal ($p=0.026$). Bay no previno completamente el efecto de TNF- α (Figuras 12 y 14). En el grupo normal, TNF- α indujo fuertemente la secreción del zimógeno de MMP-9 en los cultivos estromales y aumentó 2 veces en cultivos epiteliales respecto a su basal ($p=0.005$ y $p=0.037$, respectivamente). La forma activa de MMP-9 fue secretada sólo en presencia de la citoquina en cultivos estromales ($p=0.049$). En los cultivos epiteliales la presencia de la citoquina, no afectó la secreción basal de la forma activa de MMP-9. Bay no previno el aumento de la secreción del zimógeno en ambos tipos celulares y parcialmente de la forma activa en células estromales. En los cultivos estromales de endometriosis, la adición de TNF- α provocó una fuerte secreción de la pro-MMP-9 al medio ($p=0.008$). La enzima activa, con una mínima secreción basal, TNF- α aumentó su secreción pero no fue significativo. En los cultivos epiteliales, TNF- α incrementó 4 veces la secreción del zimógeno de MMP-9 respecto a su basal ($p=0.015$), pero la enzima activa fue detectada en una muestra de tres ante la presencia de la citoquina. La adición de Bay previno parcialmente la secreción de ambas formas de MMP-9 en cultivos estromales, no así en células epiteliales (Figuras 12 y 15).

Matrilisinas: en cultivos celulares normales, TNF- α no afectó los niveles proteicos de pro-MMP-7, diferente a lo descrito para el mRNA en cultivo epitelial. En endometriosis, los resultados fueron similares al normal, sin embargo, en células estromales de endometriosis la proteína de la pro-MMP-7 fue 65% menor al grupo normal (Figura 13 y Tabla 12).

TIMPs: En cultivos celulares controles y de endometriosis, TNF- α no afectó el contenido proteico de TIMP-2, como tampoco de TIMP-3 glicosilado y no glicosilado. La presencia de Bay no modificó los valores basales (Tabla 12). En células estromales controles, TNF- α disminuyó los niveles proteicos basales de TIMP-4 glicosilado y no glicosilado, en presencia o ausencia de Bay, sin embargo no fue significativo; en células epiteliales, se mantuvo el nivel basal en ambas formas de TIMP-4. En los cultivos epiteliales de endometriosis, TNF- α redujo solamente la forma glicosilada basal de TIMP-4 en 52% (p=0.028), efecto prevenido por Bay. En cultivos estromales de endometriosis, TNF- α no afectó los niveles proteicos basales de ambas formas de TIMP-4 (Figura 16).

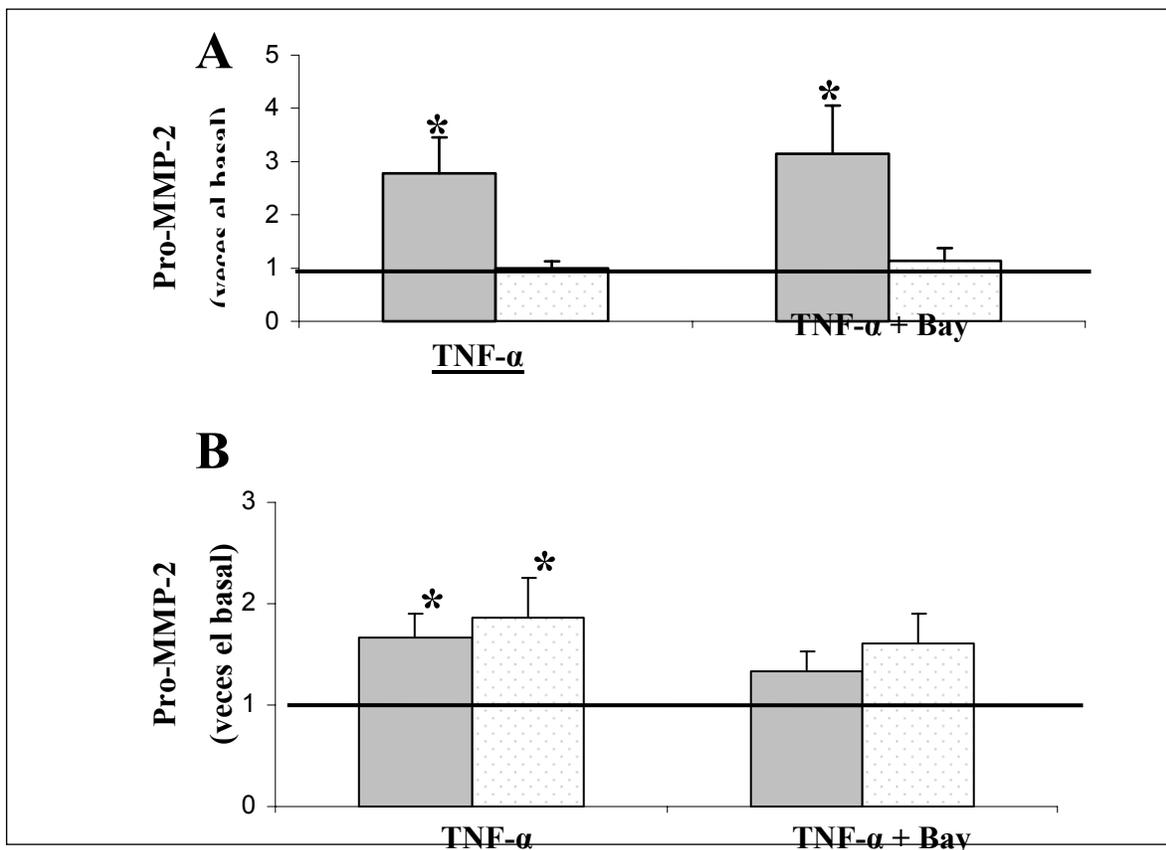


Figura 14. Efecto de TNF- α sobre la actividad gelatinasa de Pro-MMP-2 en el medio de cultivo de células endometriales estromales (A) y epiteliales (B) provenientes de endometrios de mujeres con y sin endometriosis. Los cultivos celulares fueron expuestos a TNF- α (10 ng/mL) en presencia o ausencia de Bay (2 μ M) durante 24 horas, como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados mostrados en veces respecto al basal son el promedio \pm EE de 5 cultivos celulares de segundo pasaje provenientes cada uno de individuos distintos. Valores absolutos basales expresados en unidades arbitrarias, Grupo normal; ESC: 305715 \pm 117104, EEC: 280120 \pm 100646; Grupo endometriosis; ESC: 194639 \pm 62251, EEC: 185788 \pm 100828. Barras grises: normal, barras claras: endometriosis. *p<0.05 respecto al basal. Línea continua indica el valor basal.

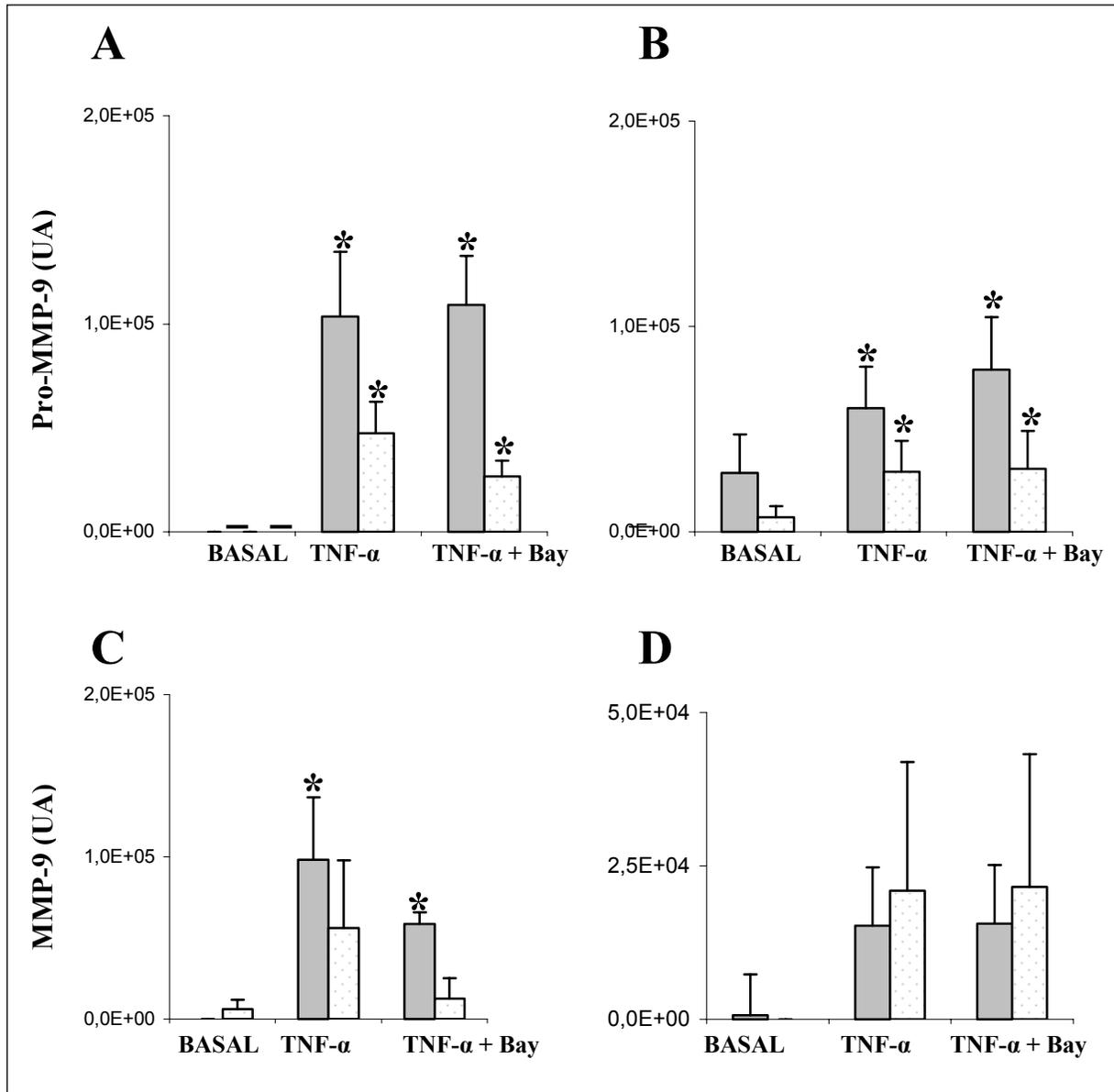


Figura 15. Efecto de TNF- α sobre la actividad gelatinasa de pro-MMP-9 (A y B) y MMP-9 (C y D) en medio de cultivo de células endometriales estromales (A y C) y epiteliales (B y D) provenientes de endometrios de mujeres con y sin endometriosis. Los cultivos celulares fueron expuestos a TNF- α (10 ng/mL) en presencia o ausencia de Bay (2 μ M) durante 24 horas, como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados son el promedio \pm EE de un mínimo de 3 cultivos celulares de segundo pasaje provenientes cada uno de individuos distintos. UA: Unidad Arbitraria. Barras grises: normal, barras claras: endometriosis. * $p < 0.05$ respecto al basal.

Tabla 12. Efecto de TNF- α sobre la expresión proteica de pro-MMP-7(A), TIMP-2(B) y TIMP-3(C) en cultivos de células estromales y epiteliales provenientes de Endometriosis de mujeres con y sin endometriosis

MMP-7	Control ESC	Endometriosis ESC	p	Control EEC	Endometriosis EEC	p
BASAL	0.81 ± 0.10	0.28 ± 0.02	0.0096	0.76 ± 0.14	0.70 ± 0.07	ns
TNF- α	0.96 ± 0.03	0.28 ± 0.07	0.0012	0.93 ± 0.22	1.25 ± 0.48	ns
TNF+BAY	1.02 ± 0.05	0.30 ± 0.08	0.0022	0.83 ± 0.12	1.46 ± 0.37	ns

B

TIMP-2	Control ESC	Endometriosis ESC	p	Control EEC	Endometriosis EEC	p
BASAL	0.24 ± 0.04	0.46 ± 0.15	ns	0.17 ± 0.04	0.34 ± 0.07	ns
TNF- α	0.18 ± 0.009	0.50 ± 0.21	ns	0.32 ± 0.09	0.46 ± 0.07	ns
TNF+BAY	0.21 ± 0.02	0.66 ± 0.08	ns	0.25 ± 0.03	0.29 ± 0.03	ns

C

TIMP-3 Glicosilado	Control ESC	Endometriosis ESC	p	Control EEC	Endometriosis EEC	p
BASAL	0.25 ± 0.04 ^a	0.77 ± 0.44	ns	0.85 ± 0.17 ^a	0.45 ± 0.10	ns
TNF	0.21 ± 0.03	0.56 ± 0.17	ns	0.80 ± 0.15	0.60 ± 0.11	ns
TNF + BAY	0.30 ± 0.01	0.55 ± 0.06	ns	0.63 ± 0.16	0.76 ± 0.18	ns

TIMP-3 No Glicosilado	Control ESC	Endometriosis ESC	p	Control EEC	Endometriosis EEC	p
BASAL	0.29 ± 0.06	0.51 ± 0.11	ns	0.67 ± 0.18	0.28 ± 0.10	ns
TNF	0.42 ± 0.06	0.72 ± 0.28	ns	0.63 ± 0.15	0.54 ± 0.23	ns
TNF + BAY	0.50 ± 0.04	0.67 ± 0.22	ns	0.69 ± 0.05	0.63 ± 0.12	ns

Los cultivos celulares fueron expuestos a una concentración fija de TNF- α (10 ng/mL) en presencia o ausencia de Bay (2 μ M) durante 24 horas, como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados normalizados con β -actina son el promedio \pm EE de un mínimo de 3 cultivos celulares de segundo pasaje provenientes cada uno de individuos distintos. p: entre grupos. Diferencia significativa: letras iguales, dentro del mismo grupo; p, entre los dos grupos.

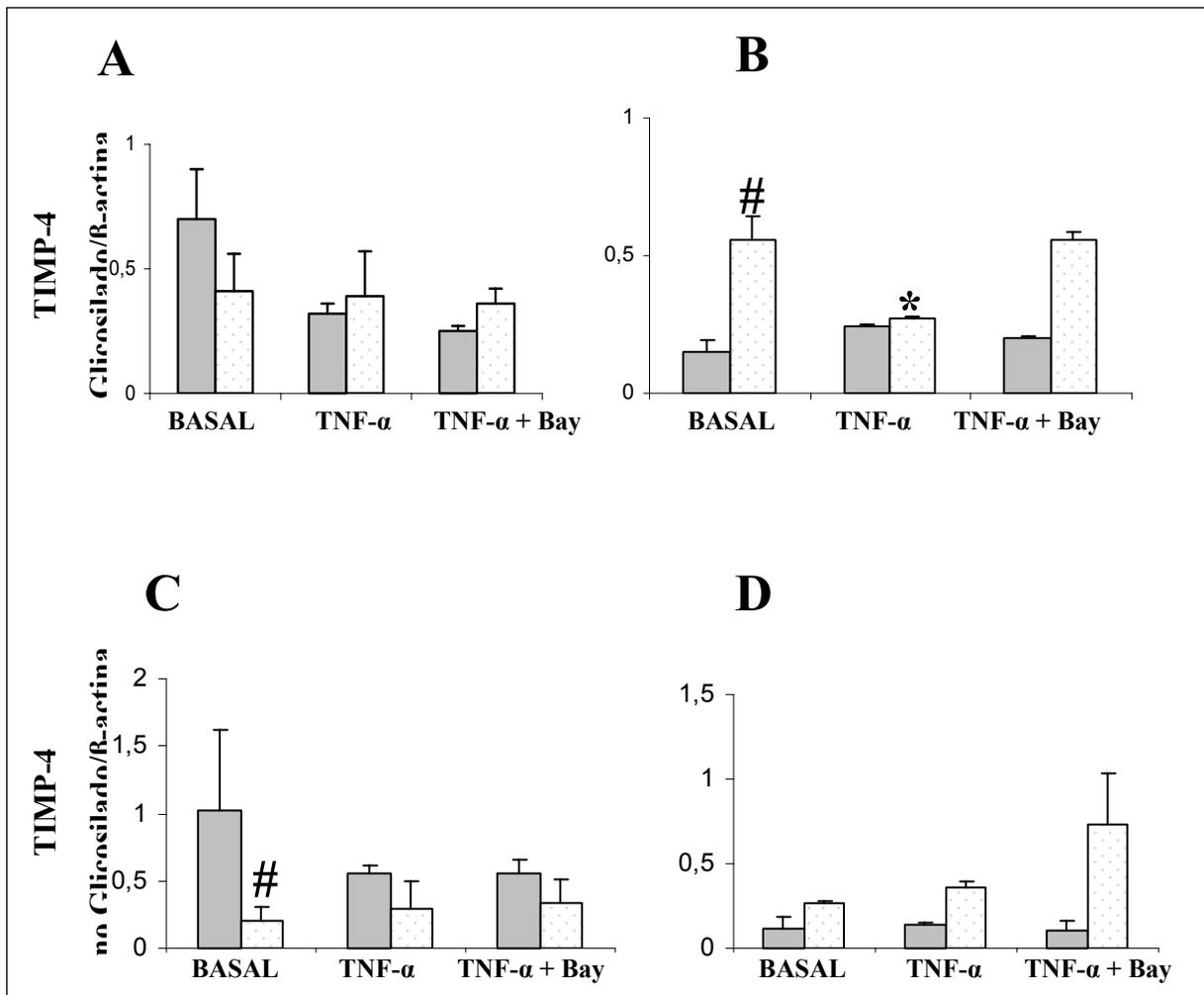


Figura 16. Efecto de TNF- α sobre la expresión proteica de TIMP-4 glicosilada (A y B) y no glicosilada (C y D) en cultivos de células estromales (A y C) y epiteliales (B y D) provenientes de endometrios de mujeres con y sin endometriosis. Los cultivos celulares fueron expuestos a TNF- α (10 ng/mL) en presencia o ausencia de Bay (2 μ M) durante 24 horas, como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados normalizados con β -actina son el promedio \pm EE de un mínimo de 3 cultivos celulares de segundo pasaje provenientes cada uno de individuos distintos. Barras grises: normal, barras claras: endometriosis. * $p < 0.05$ respecto al basal, # $p < 0.05$ respecto al grupo control.

VII. DISCUSIÓN

Durante el ciclo menstrual, la proteólisis es un proceso fisiológico importante en el remodelamiento del endometrio, en donde MMPs y TIMPs tienen un rol tanto en la degradación como en la reparación de este tejido. Situaciones patológicas, como la endometriosis, presentan una expresión aumentada de MMPs en lesiones endometriósicas y fluido peritoneal (FP), involucrándolas en los eventos invasivos de degradación de la MEC durante la penetración al mesotelio peritoneal (Gottschalk y cols, 2000; Kayma y cols, 2003; Liu y cols, 2002; Koks y cols, 2000; Spuijbroek y cols, 1992, Szamatowicz y cols, 2002; Wolber y cols, 2003). Pocos son los estudios de expresión de MMPs en el endometrio eutópico de estas pacientes (Chen y cols, 2004; Chung y cols, 2001; Collete y cols, 2004), y menos aún, los que han sugerido posibles vías de regulación de este sistema en el endometrio eutópico (Bruner-Tran y cols, 2002; Sillem y cols, 2001).

En la presente tesis se estudiaron las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), las matrilisinas (MMP-7 y MMP-26) y sus inhibidores TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 en el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis y se comparó con el de mujeres controles.

Las gelatinasas presentan similitudes estructurales y en la especificidad de sustrato, siendo su regulación transcripcional distinta y tejido dependiente (Yan y Boyd, 2007). En el presente estudio se encontró un incremento de los niveles de mRNA y proteína de MMP-2 en la fase secretora tardía en el endometrio normal, similar a lo observado por Zhang y cols (2000). Este aumento no fue observado en los endometrios eutópicos de mujeres con endometriosis y la presencia de MMP-2 activa en los homogenizados de endometriosis fue menor que la del zimógeno en fase secretora tardía, sugiriendo una mayor secreción hacia el espacio extracelular. Sin embargo, Collette y cols (2004) no observaron un aumento de la secreción de MMP-2 en cultivos de 24 horas de explantes endometriales de mujeres con y sin endometriosis; posiblemente esta diferencia se deba a la consideración de la fase secretora total y no subdividida en inicial, media y tardía como en nuestro estudio. La expresión de MMP-2 no mostró variación con el estadio o severidad de la endometriosis, similar a lo descrito por Chung y cols (2002), quienes, aunque observaron un incremento significativo del mRNA en la fase secretora en endometriosis moderada-severa, la proteína no fue diferente a endometrios normales o ectópicos. Como se señaló en la introducción, la regulación de la actividad de MMP-2 es compleja y única, involucrando su interacción con

MT1-MMP y TIMP-2, siendo la concentración de TIMP-2 un regulador de la actividad de la gelatinasa. La disminución de TIMP-2 en estas pacientes observada en este estudio, sugiere una posible desregulación de la actividad proteolítica de MMP-2 relacionada a otras proteínas más que a cambios en su expresión, lo que es apoyado por el aumento de MT1-MMP y la disminución de TIMP-2 en endometrio ectópico descrito por Ueda y cols (2002) y Gottschalk y cols (2000).

La expresión de MMP-9 depende del tejido blanco y, en el endometrio normal, esta enzima es regulada por las hormonas sexuales encontrándose su expresión máxima en las fases secretora tardía y menstrual (Curry y Osteen, 2003; Goffin y cols, 2003), lo que no fue observado en el presente trabajo, posiblemente por la metodología usada ya que no se detectó su forma activa. Por otro lado, en forma similar a los resultados de Chung y cols (2001), no se observaron diferencias significativas entre los mRNA de MMP-9 de endometrios de mujeres con y sin endometriosis a través del ciclo menstrual o asociado con la severidad de la endometriosis. No obstante, en la fase media-tardía, la enzima latente fue menor en endometrios de endometriosis, sugiriendo una posible activación y posterior secreción de la forma activa. Este supuesto estaría apoyado por la mayor secreción de pro-MMP-9 observada en cultivos de endometrios eutópicos de endometriosis que coincide con el incremento de la proteólisis del receptor soluble 2 de IL-1, sugiriendo la participación de MMP-9 en mecanismos post-transduccionales (Bellehumer y cols, 2005; Collette y cols, 2006). Además, la disminución de MMP-9 en el estadio secretor medio-tardío en endometriosis podría estar afectando la receptividad uterina ya que en conjunto con MMP-3, la MMP-9 regula la proteólisis de la proteína de unión del factor de crecimiento similar a insulina (IGFBP-1), producto marcador de células estromales predecidualizadas endometriales cuya secreción es mucho menor en pacientes con endometriosis (Coppock y cols, 2004; Kabir-Salmani y cols, 2005; Klemmt y cols, 2006).

Las matrilisinas se localizan predominantemente en células epiteliales (Goldman y Shalev, 2003). En el endometrio humano, el mRNA de la MMP-7 se expresa principalmente en la fase menstrual, manteniéndose hasta la fase proliferativa temprana (Goffin y cols, 2003; Rogerds y cols, 1994), lo que no fue observado en esta tesis, y por el contrario, fue constante en el endometrio normal a través del ciclo menstrual coincidentemente con Vassilev y cols (2005). No obstante, este patrón fue detectado en el endometrio eutópico de

endometriosis, con expresión elevada durante la fase proliferativa. Dentro de las funciones descritas para MMP-7, además de remodelar la MEC y activar numerosas moléculas de superficie celular, como el precursor de TNF- α , FasL e integrinas, participa en la re-epitelización y angiogénesis durante la fase proliferativa (Berton y cols, 2007). La expresión de MMP-7 elevada durante la fase proliferativa, podría estar involucrada con la aumentada proliferación celular observada en el endometrio de estas pacientes (Johnson y cols, 2005a). Además, MMP-7 activa secretada desde células epiteliales de carcinoma endometrial y de tejido endometrial normal es unida en sitios lipid rafts (pequeñas regiones de la membrana ricas en esfingolípidos y colesterol), localizados en la membrana plasmática de estas células, otorgándole una mayor resistencia a la acción inhibitoria de TIMP-2 (Berton y cols, 2007). Esta información en conjunto con los resultados obtenidos en esta tesis, sugieren que MMP-7 podría tener una mayor actividad en endometrios eutópicos de endometriosis siendo favorecida además, por la disminución observada de TIMP-2 en estos tejidos. Aún más, MMP-7 en endometriosis podría estar activando otras MMPs, incluso provenientes de células estromales contribuyendo así, a una mayor actividad proteolítica en el medio extracelular, como ha sido establecida la activación de pro-MMP-2 en co-cultivos entre la línea celular de mieloma humano con MMP-7 constitutiva y células estromales provenientes de médula ósea humana (Barillé y col, 1999). La MMP-26, caracterizada por Marchenko y cols (2001) y Park y cols (2000), es expresada normalmente en útero y placenta, como también en células cancerígenas de origen epitelial donde tendría un rol importante en la progresión tumoral (Pilka y cols, 2004b). En endometrio normal, los niveles de mRNA de MMP-26 fueron máximos en las fases proliferativa y secretora inicial, coincidiendo con resultados descritos por otros autores (Goffin y cols, 2003; Pilka y cols, 2003), sugiriendo una regulación estrogénica sobre el gen de MMP-26. Respecto a la proteína de MMP-26, nuestros resultados muestran una tendencia a ser mayor en la fase secretora inicial y no elevada hasta la fase secretora media como reporta Chegini y cols (2003). Estas diferencias pueden ser producto de la utilización de diferentes técnicas (western blot vs inmunohistoquímica) y anticuerpos utilizados (solo proenzima y no ambas: proenzima y activa).

No se encontraron en la literatura, reportes referidos a la MMP-26 en endometriosis. Nuestros resultados muestran una desregulación a nivel transcripcional, siendo mucho

menor en la fase secretora inicial comparado al endometrio normal, no obstante, los niveles proteicos de la proenzima no fueron distintos. Probablemente en endometriosis, la MMP-26 activa esté alterada, pero las condiciones utilizadas no permitieron su análisis. La presencia de elemento de respuesta a estrógeno en el promotor de la MMP-26 y estudios *in vitro* apoyan la dependencia de MMP-26 a estrógenos (Li y cols, 2004; Pilka y cols, 2006). Además, otros sitios funcionales han sido identificados como AP-1 y Tcf-4 siendo otras vías posibles de regulación en el endometrio (Marchenko y cols, 2002). Esto sugiere que las diferencias en la expresión de MMP-26 observadas entre ambos grupos de endometrio podrían ser consecuencia de desregulaciones del microambiente endometrial.

Las MMPs son reguladas por diferentes factores a nivel transcripcional, secreción, endocitosis y activación (Sternlicht y Werb, 2001), entre los que se cuentan los TIMPs. En el endometrio humano, estos inhibidores se han observado en la mayoría de los compartimientos celulares y a través del ciclo menstrual, pero con distintos patrones.

TIMP-1 se ha asociado principalmente a la inhibición de la MMP-9 por su alta afinidad con esta enzima (Baker y cols, 2002; Lambert y cols, 2004). En endometriosis es uno de los inhibidores más estudiados encontrándose su expresión disminuida en células endometriósicas y casi indetectable en el fluido peritoneal (Szamatowicz y cols, 2002; Uzan y cols, 2004). En cambio, en el endometrio eutópico de endometriosis su patrón es similar al del endometrio normal (Chen y cols, 2004; Collette y cols, 2006; Li y Lang, 2006). Por lo tanto nos interesó estudiar a TIMP-2 y TIMP-3 por su comportamiento controversial en endometriosis y a TIMP-4 porque no hay antecedentes en esta patología.

Como fue discutido más arriba, la expresión de TIMP-2 está disminuida en endometrios de endometriosis concordando con otros autores (Chung, y cols, 2002; Uzan y cols, 2004). Estos bajos niveles de TIMP-2 en estos endometrios podría afectar el balance del sistema MMPs incrementando la actividad proteolítica y otorgando características más invasivas al tejido endometrial. Nuestros resultados mostraron expresión de TIMP-3 similar en ambos endometrios e independiente de la severidad de la endometriosis en desacuerdo con Chung y cols (2001), quienes detectaron mRNA disminuido respecto al grupo control en endometrio secretor de endometriosis moderada-severa. La proteína detectada fue distinto al mRNA y sólo detectamos la forma glicosilada de TIMP-3. Estudios de localización de TIMP-3 en endometrio normal coinciden en una predominante expresión de la proteína en

epitelio luminal y glandular, pero en células estromales es aún materia de discusión (Chegini y cols, 2003; Zhang y Salamonsen, 1997). TIMP-3 se une con alta afinidad a la MEC, limitando su acción en la cercanía de la superficie celular. Además inhibe selectivamente a TACE (enzima convertidora de TNF- α), metaloproteinasa desintegrina unida a membrana que cliva a proTNF- α unido a la superficie celular a la forma soluble madura (Murphy y cols, 2003). La expresión de TACE en el tejido endometrial eutópico y ectópico de endometriosis está significativamente aumentada comparada al endometrio normal (Gottschalk y cols, 2003; Johnson y cols, 2005b). Nuestro estudio sobre TIMP-3 no nos permite diferenciar su comportamiento, localización y distribución en estas pacientes, lo cual puede ser de gran importancia pensando las características particulares de este inhibidor. En cuanto a TIMP-4, aunque nuestros resultados no fueron concluyentes, Pilka y cols (2004a) describieron en endometrio normal una alta expresión en la fase secretora inicial y media del ciclo menstrual, posiblemente regulado por los esteroides ováricos y coincidiendo con la alta expresión de la MMP-26 en este periodo, indicando ser un inhibidor potencial de esta enzima. En endometriosis no hay reportes previos de la expresión de mRNA y proteína de TIMP-4; en este trabajo encontramos una disminución notoria de su mRNA hacia la fase secretora tardía, sin embargo la proteína (glicosilada y no glicosilada) fue constante durante el ciclo menstrual. La localización de TIMP-4 es principalmente en células epiteliales, y en menor grado en células estromales (Chegini y cols, 2003; Pilka y cols, 2006) y su acción inhibitoria como otras funciones en las que se ha involucrado (crecimiento celular, procesos antiinflamatorios o angiogénicos), podrían estar afectadas por una inadecuada localización en endometrios de endometriosis (Çeliker y cols, 2002; Fernández y Moses, 2006; Lambert y cols, 2004).

Los TIMPs inhiben la activación de las MMPs uniéndose a ellas en forma estequiométrica 1:1. La razón MMP/TIMP en endometrios eutópicos de endometriosis favoreció a las MMPs sobre TIMP-2 y TIMP-4 sugiriendo un aumento de la actividad proteolítica en este tejido y que podría aumentar su capacidad invasiva como afirman reportes relacionados con el desbalance de este sistema en el endometrio eutópico de endometriosis (Chen y cols, 2004; Chung y cols, 2001 y 2002; Li y Lang, 2006).

Asociación entre la expresión de MMPs en el endometrio eutópico y la procedencia peritoneal u ovárica de la endometriosis, sólo fue observada entre MMP-26 y endometriosis

ovárica, lo que podría ser importante de considerar, ya que esta MMP ha sido detectada en varios tumores malignos de origen epitelial, incluso de origen ovárico (Marchenko y cols, 2002). Aún más, mujeres con endometriosis presentan mayor riesgo de padecer cáncer ovárico, particularmente aquellas que presentan lesiones ováricas a temprana edad (Melin y cols, 2006). Por ello, la expresión aumentada de MMP-26 en estos endometriosis podría relacionarse con el riesgo de cáncer ovárico en estas pacientes.

Las MMPs comparten y degradan los mismos sustratos con diferente eficiencia, por lo que su función biológica es dictada mayormente por su patrón de expresión temporal y espacial lo que le proporciona un rol único en el remodelamiento tisular. La expresión de las MMPs es altamente regulada a nivel transcripcional (Sternlicht y Werb, 2001). La zona promotora puede presentar varios elementos respuesta que permiten la regulación transcripcional por diversos activadores incluyendo AP-1, PEA3, Sp-1, β -catenina/Tcf-4 y NF κ B (Yan y Boyd, 2007), permitiendo la respuesta a una gran variedad de citoquinas y factores de crecimiento (Ulukus y cols, 2006). Aunque la regulación de la expresión de los TIMPs es menos estudiada, éstos pueden ser estimulados por factores que también regulan a las MMPs (Lambert y cols, 2004). La expresión de TNF- α y sus receptores (TNFR1/TNFR2) ha sido detectada en células estromales y epiteliales del endometrio humano normal durante el ciclo menstrual y ha sido implicada en la proliferación y el desprendimiento endometrial (Johnson y cols, 2005b; von Wolff y cols, 1999) y podría estar involucrada en la regulación del sistema de las MMPs. En el fluido peritoneal de mujeres con endometriosis TNF- α está aumentada y correlaciona con el estado de la enfermedad (Bullimore, 2003).

El segundo objetivo fue estudiar el efecto de TNF- α en la expresión de MMPs. Utilizamos cultivos de células endometriales provenientes de mujeres con y sin endometriosis, ya que el tejido ex vivo presenta dificultades en cultivo, su viabilidad es menor, y el fechaje de cada muestra es post-tratamiento dificultando obtener un n muestral apropiado.

TNF- α , aunque no afectó el mRNA de MMP-2, aumentó la secreción de la proenzima en los cultivos epiteliales y estromales normales, resultados similares a los descritos por Li y cols (2007) quienes publicaron el aumento de la secreción de proMMP-2 en estos cultivos por esta citoquina. La secreción de MMPs, sin afectar la expresión del mRNA, se ha descrito en otras MMPs, cómo MMP-12 que estaría regulada por plasmina sin requerir de una síntesis proteica inmediata en macrófagos de murino (Raza y cols, 2000). La secreción

del zimógeno de MMP-2 en los cultivos de 24 horas sugiere una activación tardía en los cultivos endometriales, tal como ocurre en cultivos de fibroblastos provenientes de piel humana que secretan MMP-2 activa recién a las 68 horas post estímulo con TNF- α , activación mediada por la inducción de la expresión de MT1-MMP (Han y cols, 2001). A diferencia de lo observado en las células epiteliales, en los cultivos estromales de endometriosis no se observó el efecto de TNF- α sobre la secreción de pro-MMP-2, posiblemente requiera de la presencia de otras citoquinas o MMPs, interacción entre los distintos tipos celulares endometriales, o bien, el tiempo estudiado fue insuficiente para observar su secreción.

A diferencia de MMP-2, tanto el mRNA como la secreción de MMP-9 en los cultivos estromales de ambos grupos de endometrios fueron estimulados por TNF- α , por vías no exclusivas del sistema NF κ B, debido a la prevención parcial de la estimulación de la expresión inducida por la citoquina en presencia del inhibidor Bay 11-7085, que impide la translocación del factor de transcripción del citoplasma al núcleo y posterior inducción génica. En células epiteliales normales a pesar del aumento encontrado no fue significativo, probablemente a la gran dispersión por el escaso número de muestras analizado, aunque no podemos descartar el requerimiento de otras moléculas inductoras, como IL-1 o factores de crecimiento, descritas como inductores de su expresión en otros sistemas (Yan y Boyd, 2007). En cambio, en cultivos epiteliales de endometriosis, TNF- α aumentó el mRNA de MMP-9, efecto prevenido por el inhibidor Bay sugiriendo la participación de NF κ B. El diferente comportamiento ante TNF- α de los cultivos epiteliales provenientes de endometrios normales y de endometriosis requiere de mayor estudio y análisis. Por otra parte, TNF- α indujo la secreción de pro-MMP-9 en células estromales y epiteliales de ambos endometrios independientemente de la activación de NF κ B, y aunque, MMP-9 activa fue detectada en muy pocos medios de cultivo de 24 horas, se observa el mismo comportamiento, por lo que la inducción de la secreción de MMP-9 a través de TNF- α estaría siendo regulada por otros mecanismos. Recientemente en neutrófilos de sangre periférica humana de pacientes normales se ha detectado que la secreción de MMP-9 inducida por TNF- α estarían involucradas isoformas de la proteína PKC (Chakrabarti y cols, 2006). Cabe señalar que resultados recientes en nuestro laboratorio detectan MMP-9 activa secretada en cultivos endometriales tratados con TNF- α por 48 horas por zimografía.

Las matrilisinas, detectadas principalmente en el epitelio endometrial (Isaka y cols, 2000; Rodgers y cols, 1993), en esta tesis, fue detectada preferentemente este compartimento, pero también en el estromal, lo que concuerda con Yanaihara y cols (2004). Aún más, la mayor abundancia de mRNA de MMP-7, pero no del contenido proteico de la enzima en las células estromales de endometriosis comparado con el grupo control, sugiere una mayor secreción al medio de cultivo, aunque no detectamos MMP-7 secretada en los medios de cultivo por western blot; por ello, probablemente el uso de anticuerpos más sensibles, zimografía de caseína, ELISA y/o el aumento de los tiempos de cultivos, como también el estudio de la viabilidad del RNA podría contribuir a aclarar este punto. El efecto estimulador de TNF- α sobre el mRNA de MMP-7 en cultivos epiteliales normales es independiente de Bay, sugiriendo una acción por vías alternativas a NF κ B. La región promotora de MMP-7 contiene varios elementos de respuesta como AP-1 y PEA3 (TNF- α), TIE (TGF- β) y NF-IL-6 (IL-6 e IL-1) (Yan y Boyd, 2007; Wilson y Matrisian, 1996). La diferente respuesta de las células epiteliales de endometriosis a TNF- α podría ser consecuencia de la sobre-expresión observada en condición basal en endometriosis. La similitud entre los niveles proteicos de pro-MMP-7 en células epiteliales entre los grupos, sugiere que probablemente se requiera de tratamiento con TNF- α más prolongado similar a lo observado en gelatinasas.

En contraste a la detección de MMP-7 en ambos compartimientos celulares, MMP-26 no se detectó en las condiciones analizadas en esta tesis. Dado que tanto el mRNA, como la proteína de MMP-26 fueron detectados en endometrio *ex vivo* de mujeres con y sin endometriosis y posiblemente los esteroides sexuales regularían su expresión, células endometriales aisladas incubadas con estradiol y progesterona (separadas y en conjunto) por 24 horas mostraron resultados similares (datos del laboratorio), por lo que probablemente la expresión de MMP-26 requiera de la intercomunicación entre los compartimientos endometriales a través de mecanismos paracrin, lo que podría ser analizado a través de co-cultivos entre células epiteliales y estromales. Siguiendo este razonamiento, en líneas celulares embrionarias de riñón (HEK293) transfectadas con el gen que codifica para c-Jun, que en conjunto con c-Fos forman el complejo AP-1, activa significativamente el promotor de MMP-26 (Marchenko y cols, 2002). En el endometrio humano, las proteínas Jun y c-Fos presentan patrones dependientes de los niveles

esteroidales ováricos circulantes, expresándose principalmente en las fases proliferativa y secretora inicial, estadios en los que MMP-26 también se expresa como ya se señaló previamente. Cabe destacar que TNF- α , además de la vía NF κ B, puede regular vía AP-1 por lo que no se descarta la participación de esta citoquina en su expresión.

Como último punto del segundo objetivo fue evaluar el efecto de TNF- α sobre los inhibidores endógenos de las MMPs. TIMP-3 y TIMP-4 presentaron las mayores diferencias de los niveles basales de mRNA entre los grupos normal y con endometriosis. TNF- α redujo la expresión de TIMP-4 en los cultivos epiteliales endometriales, y de la proteína glicosilada en endometriosis, acción prevenida por inhibidor Bay, indicando la participación del sistema NF κ B en su regulación. Es conocido que la glicosilación permite un correcto pliegue de la proteína, mejora el transporte de éstas a la superficie celular y aumenta la vida media (Lambert y cols, 2004). Además, la glicosilación influye en la actividad proteolítica de las MMPs, sin embargo, el desarrollo tecnológico para mantener estas proteínas de forma naturalmente glicosiladas y su interacción con otras proteínas aún es reducido (Van den Steen y cols, 2001). Estudios de interacción con MMP-9 y TIMP-1 han indicado que la presencia del inhibidor permite cambios conformacionales en esta proteasa, donde la glicosilación juega un rol importante para la eficiencia de la inhibición (Olson y cols, 1997; Van den Steen y cols, 2001) y que la mutación de sitios de glicosilación de TIMP-1 muestran que la ausencia de glicosilación no impide su función inhibitoria (Caterina y cols, 1998). Actualmente, no hay reportes sobre como estaría afectando TNF- α en los mecanismos de glicosilación. Ratas con artritis tratadas con TIMP-4 mediante terapia génica redujeron la concentración de TNF- α y la actividad proteolítica de MMPs, factores importantes en esta patología (Ramamurthy y cols, 2005) sugiriendo que TNF- α podría estar favoreciendo un ambiente inflamatorio aumentado en el endometrio, disminuyendo la expresión de proteínas antiinflamatorias como TIMP-4 y también permitiendo un aumento de la actividad proteolítica de las MMPs.

La disminución de TIMP-2 observada en los endometrios *ex vivo* de mujeres con endometriosis no fue observada en los cultivos de células aisladas obtenidos de los dos grupos de endometrios, situación no modificada por TNF- α , sugiriendo que otras citoquinas, factores de crecimiento, hormonas y/o mecanismos paracrinos entre ambos compartimientos celulares estén regulando a TIMP-2. Por otro lado, aunque el nivel basal

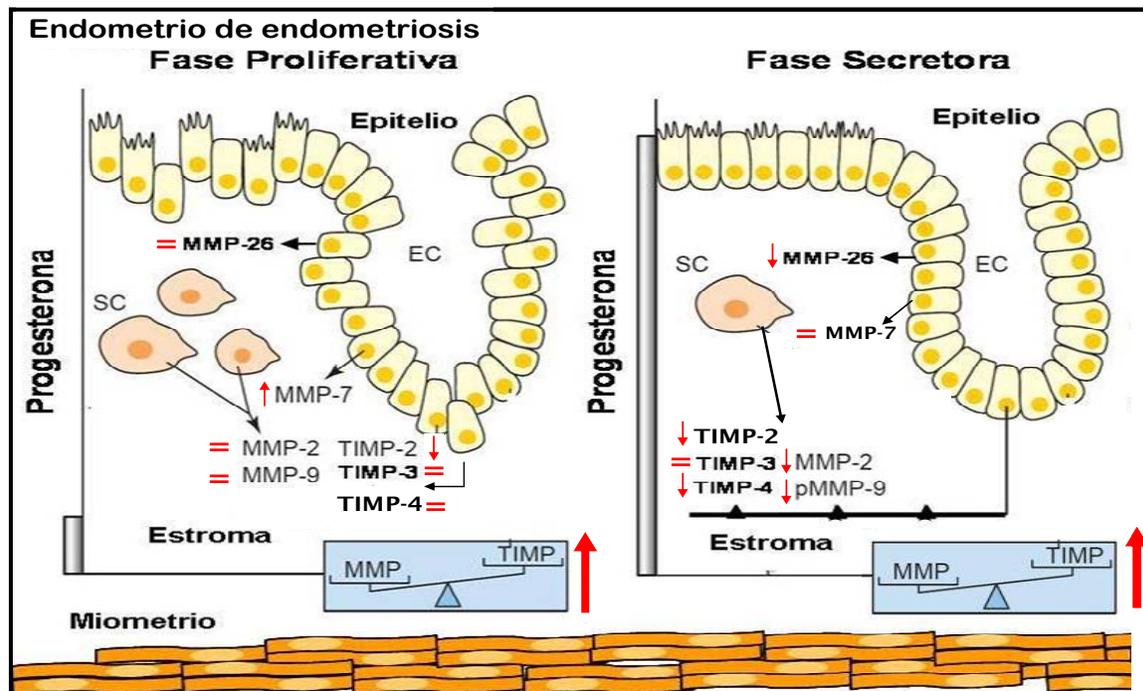
de mRNA de TIMP-3 fue menor en células estromales de endometriosis comparado con el grupo normal, esto no fue observado en la proteína, probablemente se requiera de un número muestral mayor para establecer con claridad una diferencia significativa entre los grupos. Tampoco TNF- α modificó TIMP-3 en ambos tipos celulares de los dos grupos estudiado, indicando que en las condiciones analizadas no participaría en la regulación de este inhibidor en células endometriales. La secreción proteica de los TIMPs no puede descartarse en el estudio del efecto de TNF- α y aunque se trató de detectar su secreción en el medio de cultivo no fue posible mediante western blot, quizás técnicas más sensibles (ELISA) o técnicas in situ en el cultivo celular (zimografía) podrían ser útiles para observar el efecto no génico de TNF- α sobre los TIMPs.

El remodelamiento endometrial es un proceso importante en la funcionalidad reproductiva de este tejido. El recambio tisular en cada menstruación requiere de procesos controlados de degradación, donde las MMPs y TIMPs son importantes en remodelamiento de la MEC. La expresión de este sistema en el endometrio es regulado por el ambiente hormonal presente, manifestando diferentes patrones a través del ciclo menstrual, pasando de ser un sistema que degrada la MEC, a un componente fundamental para el buen funcionamiento del endometrio. El desbalance de este sistema en muchas patologías es crucial (cáncer, artritis reumatoide). En la endometriosis, aunque benigna, la desregulación de este sistema permite la invasión de explantes endometriales en el tejido extra-uterino, lo que no es explicado por la menstruación retrógrada dado que más del 90% de la población femenina la presenta. El tejido endometrial de endometriosis es bioquímicamente distinto al normal, por lo tanto, el saber que la alta actividad proteolítica descrita en el tejido endometrial ectópico, también está presente en el tejido eutópico de estas pacientes. Nuestros resultados confirman una alteración de algunas MMPs y TIMPs en el endometrio eutópico de endometriosis, provocando un desbalance que favorece su actividad proteolítica, el que además, estaría sujeto a la regulación que TNF- α , dependiente o independiente de NF κ B, que ejerce sobre algunas de las MMPs y TIMP (MMP-2, MMP-9, MMP-7 y TIMP-4), según el compartimiento celular. En síntesis, el sistema de las MMPs está desregulado en el endometrio eutópico de endometriosis y TNF- α estaría, en parte, participando en su regulación.

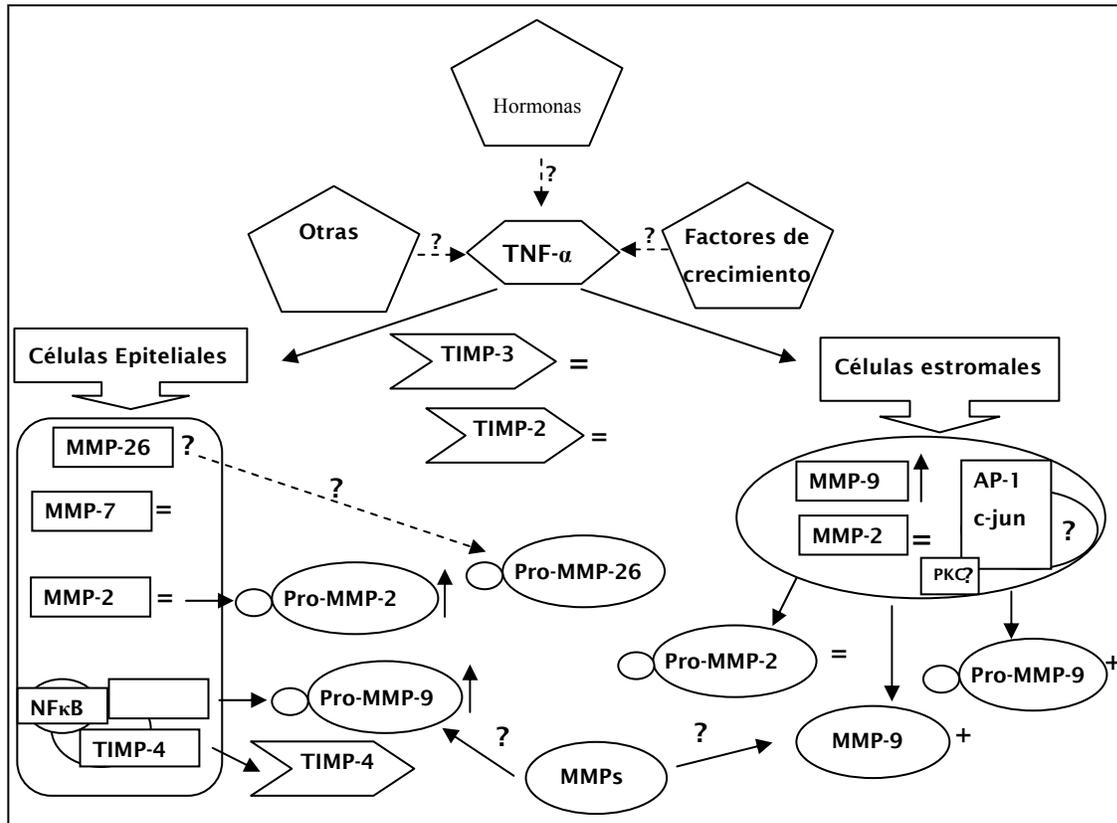
VIII. CONCLUSIONES

- En el endometrio eutópico de endometriosis, la expresión de MMPs y TIMPs presentes están alterados, sugiriendo un comportamiento anómalo de este sistema en el remodelamiento endometrial de estas pacientes.
- La razón aumentada entre MMPs/TIMPs en el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis favorecería una mayor actividad proteolítica de estas enzimas y capacidad invasiva de este tejido.
- TNF- α participaría en la regulación del sistema de MMPs, tanto a nivel transcripcional como secreción de estas proteínas, y ésta sería dependiente del compartimento celular endometrial.
- La regulación ejercida por TNF- α en el sistema de las MMPs requiere de otras vías que estén individualmente o en conjunto operando con el sistema de NF κ B.
- TNF- α podría estar regulando indirectamente la expresión de las MMPs, afectando otros factores involucrados en la activación de este sistema.

Esquema 3. Expresión del sistema de las MMPs en endometrio de endometriosis.



Esquema 4. Efecto de TNF- α sobre el sistema de las MMPs en endometrio eutópico de mujeres con endometriosis.



IX. PROYECCIONES

En la presente tesis encontramos que en el endometrio de mujeres con endometriosis el sistema de MMPs está alterado, ya sea a nivel del mRNA o proteína total en el tejido. A pesar de que los grupos de MMPs estudiados se presentan mayoritariamente en un compartimento que en otro (gelatinasas en células estromales y matrilisina en epiteliales), su actividad proteolítica es presentada en la matriz extracelular, por lo que sería interesante estudiar a través del ciclo menstrual de estas pacientes como sería la actividad proteolítica local de estas MMPs, la cual podría ser evaluada mediante zimografía *in situ*. Los TIMPs están presentes en ambos compartimentos celulares. A raíz de los resultados presentados, probablemente la localización de estos inhibidores en el endometrio eutópico de endometriosis sea diferente que en endometrios normales lo que podría ser fácilmente evaluado por inmunohistoquímica. La co-localización de MMPs y TIMPs puede ser otro punto de interés para apoyar los resultados presentados.

Dentro de los factores clínicos estudiados en esta tesis fueron la severidad de la endometriosis y la localización de las lesiones ectópicas, sería interesante además relacionar estos resultados con el dolor pélvico y la dismenorrea.

Otro de los puntos que surgen de esta tesis es la diferencia presentada en la expresión del sistema de las MMPs en cada compartimiento y su respuesta a TNF- α . No debemos descartar que elementos paracrinos, que en cultivo de células aisladas no se presentan, puedan ser importantes y dilucidar las respuestas diferentes entre cultivos normales y de endometriosis. Una alternativa podría ser la realización de co-cultivos entre los dos tipos celulares con TNF- α .

Los efectos observados de TNF- α en el sistema de las MMPs no fueron principalmente por la vía del sistema NF κ B. El estudio de otras vías involucradas mediante el uso de inhibidores, fármacos, anticuerpos, entre otros se hace necesario.

Además no se puede descartar la presencia de otras citoquinas o factores de crecimiento que en forma individual o en conjunta con TNF- α estén regulando el sistema de las MMPs. El conocer los patrones de expresión y las vías por los cuales este sistema está regulado en el endometrio eutópico son de gran trascendencia y podrían contribuir a esclarecer los mecanismos involucrados en esta patología que afecta negativamente la calidad de vida de estas pacientes.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. ACOSTA AA, BUTTRAM VC JR, BESCH PK, MALINAK LR, FRANKLIN RR, VANDERHEYDEN JD. A proposed classification of pelvic endometriosis. Obstet Gynecol; 42(1):19-25.1973
2. AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE (ASRM). Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. Fertil Steril; 67(5): 817-821. 1997
3. BAKER AH, EDWARDS DR, MURPHY G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. J Cell Sci; 115(Pt 19):3719-27. 2002
4. BARILLÉ S, BATAILLE R, RAPP MJ, HAROUSSEAU JL, AMIOT M. Production of metalloproteinase-7 (matrilysin) by human myeloma cells and its potential involvement in metalloproteinase-2 activation. J Immunol;163(10):5723-8. 1999
5. BARLOW DH, KENNEDY S. Endometriosis: new genetic approaches and therapy. Annu Rev Med; 56:345-56. 2005
6. BEDAIWY MA, FALCONE T. Laboratory testing for endometriosis. Clin Chim Acta; 340(1-2):41-56. 2004
7. BELLEHUMEUR C, COLLETTE T, MAHEUX R, MAILLOUX J, VILLENEUVE M, AKOUM A. Increased soluble interleukin-1 receptor type II proteolysis in the endometrium of women with endometriosis. Hum Reprod; 20(5):1177-84. 2005
8. BERTON A, SELVAIS C, LEMOINE P, HENRIET P, COURTOY PJ, MARBAIX E, EMONARD H. Binding of matrilysin-1 to human epithelial cells promotes its activity. Cell Mol Life Sci; 64(5):610-20. 2007
9. BRUNER KL, MATRISIAN LM, RODGERS WH, GORSTEIN F, OSTEEEN KG. Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human endometrium in nude mice. J Clin Invest; 99:2851-7. 1997
10. BRUNER-TRAN KL, EISENBERG E, YEAMAN GR, ANDERSON TA, MCBEAN J, OSTEEEN KG. Steroid and cytokine regulation of matrix metalloproteinase expression in endometriosis and the establishment of experimental endometriosis in nude mice. J Clin Endocrinol Metab; 87(10):4782-91. 2002
11. BRUNER-TRAN KL, ZHANG Z, EISENBERG E, WINNEKER RC, OSTEEEN KG. Down-regulation of endometrial matrix metalloproteinase-3 and -7 expression in vitro and therapeutic regression of experimental endometriosis in vivo by a novel nonsteroidal progesterone receptor agonist, tanaproget. J Clin Endocrinol Metab;91(4):1554-60. 2006
12. BULLIMORE DW. Endometriosis is sustained by tumour necrosis factor-alpha. Med Hypotheses; 60(1):84-8. 2003
13. CATERINA NC, WINDSOR LJ, BODDEN MK, YERMOVSKY AE, TAYLOR KB, BIRKEDAL-HANSEN H, ENGLER JA. Glycosylation and NH2-terminal domain mutants of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1). Biochim Biophys Acta; 1388(1):21-34. 1998
14. CELIKER MY, RAMAMURTHY N, XU JW, WANG M, JIANG Y, GREENWALD R, SHI YE. Inhibition of adjuvant-induced arthritis by systemic tissue inhibitor of metalloproteinases 4 gene delivery. Arthritis Rheum; 46(12):3361-8. 2002
15. CHAKRABARTI S, ZEE J, PATEL K. Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in TNF-stimulated neutrophils: novel pathways for tertiary granule release. J Leukoc Biol. 79:214-222. 2006
16. CHAKRABORTI S, MANDAL M, DAS S, MANDAL A, CHAKRABORTI T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. Mol Cell Biochem; 253(1-2):269-85. 2003
17. CHEGINI N, RHOTON-VLASAK A, WILLIAMS RS. Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 and -4 in endometrium

- throughout the normal menstrual cycle and alteration in users of levonorgestrel implants who experience irregular uterine bleeding. Fertil Steril; 80(3):564-70. 2003
18. CHEN QH, QU JY, XU YY, QIU NX, ZHUANG YZ, ZHONG S, FANG QQ. Expressions of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in ectopic and eutopic endometrium Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi; 39(12):809-12. 2004
 19. CHILD TJ, TAN SL. Endometriosis: aetiology, pathogenesis and treatment. Drugs; 61(12):1735-50. 2001
 20. CHUNG HW, LEE JY, MOON HS, HUR SE, PARK MH, WEN Y, POLAN ML. Matrix metalloproteinase-2, membranous type 1 matrix metalloproteinase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in ectopic and eutopic endometrium. Fertil Steril; 78(4):787-95. 2002
 21. CHUNG HW, WEN Y, CHUN SH, NEZHAT C, WOO BH, LAKE POLAN M Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 mRNA expression in ectopic and eutopic endometrium in women with endometriosis: a rationale for endometriotic invasiveness. Fertil Steril; 75(1):152-9. 2001
 22. COLLETTE T, BELLEHUMEUR C, KATS R, MAHEUX R, MAILLOUX J, VILLENEUVE M, AKOUM A. Evidence for an increased release of proteolytic activity by the eutopic endometrial tissue in women with endometriosis and for involvement of matrix metalloproteinase-9. Hum Reprod; 19(6):1257-64.2004
 23. COLLETTE T, MAHEUX R, MAILLOUX J, AKOUM A. Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in the eutopic endometrial tissue of women with endometriosis Hum Reprod;21(12):3059-67. 2006
 24. COPPOCK HA, WHITE A, APLIN JD, WESTWOOD M. Matrix metalloprotease-3 and -9 proteolyze insulin-like growth factor-binding protein-1. Biol Reprod; 71(2):438-43. 2004
 25. COX KE, PIVA M, SHARPE-TIMMS KL. Differential regulation of matrix metalloproteinase-3 gene expression in endometriotic lesions compared with endometrium. Biol Reprod; 65(4):1297-303. 2001
 26. CURRY TE JR, OSTEEEN KG. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. Endocr Rev; 24(4):428-65. 2003
 27. DAS S, MANDAL M, CHAKRABORTI T, MANDAL A, CHAKRABORTI S. Structure and evolutionary aspects of matrix metalloproteinases: a brief overview. Mol Cell Biochem; 253(1-2):31-40. 2003
 28. DONG JC, DONG H, CAMPANA A, BISCHOF P Matrix metalloproteinases and their specific tissue inhibitors in menstruation. Reproduction; 123(5):621-31. 2002
 29. FERNANDEZ CA, MOSES MA. Modulation of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-4. Biochem Biophys Res Commun;345(1):523-9. 2006
 30. GAZVANI R, TEMPLETON A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. Reproduction; 123(2):217-26. 2002
 31. GIUDICE LC, KAO LC. Endometriosis. Lancet. 13-19; 364(9447):1789-99. 2004
 32. GOFFIN F, MUNAUT C, FRANKENNE F, PERRIER D'HAUTERIVE S, BELIARD A, FRIDMAN V, NERVO P, COLIGE A, FOIDART JM. Expression pattern of metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in cycling human endometrium. Biol Reprod; 69(3):976-84. 2003
 33. GOLDMAN S, SHALEV E. The role of the matrix metalloproteinases in human endometrial and ovarian cycles. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 10; 111(2):109-21. 2003
 34. GOTTSCHALK C, MALBERG K, ARNDT M, SCHMITT J, ROESSNER A, SCHULTZE D, KLEINSTEIN J, ANSORGE S. Matrix metalloproteinases and TACE play a role in the pathogenesis of endometriosis. Adv Exp Med Biol; 477:483-6. 2000
 35. GRAESSLIN O, CORTEZ A, FAUVET R, LORENZATO M, BIREMBAUT P, DARAÏ E. Metalloproteinase-2, -7 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 expression in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium: a clinical-pathological correlation study.

- Ann Oncol; 17(4):637-45. 2006
36. GREENE J, WANG M, LIU YE, RAYMOND LA, ROSEN C, SHI YE. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. J Biol Chem; 271(48):30375-80. 1996
 37. HAN YP, TUAN TL, WU H, HUGHES M, GARNER WL. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. J Cell Sci; 114(Pt 1):131-139. 2001
 38. HUANG HY, WEN Y, IRWIN JC, KRUESSEL JS, SOONG YK, POLAN ML Cytokine-mediated regulation of 92-kilodalton type IV collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-3 messenger ribonucleic acid expression in human endometrial stromal cells. J Clin Endocrinol Metab; 83(5):1721-9. 1998
 39. HUDELIST G, LASS H, KECKSTEIN J, WALTER I, WIESER F, WENZL R, MUELLER R, CZERWENKA K, KUBISTA E, SINGER CF. Interleukin 1alpha and tissue-lytic matrix metalloproteinase-1 are elevated in ectopic endometrium of patients with endometriosis. Hum Reprod; 20(6):1695-701. 2005
 40. HULBOY DL, RUDOLPH LA, MATRISIAN LM. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. Mol Hum Reprod; 3(1):27-45 1997
 41. HUNT JS, CHEN HL, HU XL, TABIBZADEH S. Tumor necrosis factor-alpha messenger ribonucleic acid and protein in human endometrium. Biol Reprod; 47(1):141-7. 1992
 42. ISAKA K, NISHI H, NAKAI H, NAKADA T, FENG LI Y, EBIHARA Y, TAKAYAMA M. Matrix metalloproteinase-26 is expressed in human endometrium but not in endometrial carcinoma. Cancer; 1;97(1):79-89. 2003
 43. JABBOUR HN, KELLY RW, FRASER HM, CRITCHLEY HO. Endocrine regulation of menstruation. Endocr Rev; 27(1):17-46. 2006
 44. 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; 132 (12):1475-82. 2004
 45. JOHNSON MC, TORRES M, ALVES A, BACALLAO K, FUENTES A, VEGA M, BORIC MA. Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: expression of c-myc, TGF-beta1 and bax genes; Reprod Biol Endocrinol; 8;3:45. 2005a
 46. JOHNSON, M.C.; TORRES, M; CRISOSTO, N.; PONCE, C.; BACALLAO, K.; GABLER, F.; FUENTES, A.; BORIC, M.A.. "Altered TNF- α system in eutopic endometria with endometriosis compared to normal endometria". Human Reproduction 12th World Congress. CIC Edizioni Internazionali; 823-827, 2005b
 47. KABIR-SALMANI M, SHIMIZU Y, SAKAI K, IWASHITA M. Posttranslational modifications of decidual IGFBP-1 by steroid hormones in Vitro. Mol Hum Reprod; 11(9):667-71. 2005
 48. KAO LC, GERMeyer A, TULAC S, LOBO S, YANG JP, TAYLOR RN, OSTEEEN K, LESSEY BA, GIUDICE LC. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility Endocrinology; 144(7):2870-81. 2003
 49. KELLER NR, SIERRA-RIVERA E, EISENBERG E, OSTEEEN KG. Progesterone exposure prevents matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) stimulation by interleukin-1alpha in human endometrial stromal cells. J Clin Endocrinol Metab; 85:1611-9. 2000
 50. KHARFI A, LABELLE Y, MAILLOUX J, AKOUM A. Deficient expression of tumor necrosis factor receptor type 2 in the endometrium of women with endometriosis. Am J Reprod Immunol; 50(1):33-40. 2003
 51. KITAWAKI J, KADO N, ISHIHARA H, KOSHIBA H, KITAOKA Y, HONJO H. Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease. J Steroid Biochem Mol Biol; 83(1-5):149-55. 2002

52. KLEMMT PA, CARVER JG, KENNEDY SH, KONINCKX PR, MARDON HJ. Stromal cells from endometriotic lesions and endometrium from women with endometriosis have reduced decidualization capacity. *Fertil Steril*; 85(3):564-72. 2006
53. KOKORINE I, NISOLLE M, DONNEZ J, EECKHOUT Y, COURTOY PJ, MARBAIX E. Expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) is related to the activity of human endometriotic lesions. *Fertil Steril*; 68:246– 51. 1997
54. KOKS CA, GROOTHUIS PG, SLAATS P, DUNSELMAN GA, DE GOEIJ AF, EVERS JL. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in antegradely shed menstruum and peritoneal fluid. *Fertil Steril*; 73(3):604-12. 2000
55. KUCHARWICZ I, KOWAL K, BUCZKO W, BODZENTA-LUKASZYK A. The plasmin system in airway remodeling. *Thromb Res*; 112(1-2):1-7. 2003
56. KYAMA CM, DEBROCK S, MWENDA JM, D'HOOGE TM. Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol*; 1:123. 2003
57. KYAMA CM, OVERBERGH L, DEBROCK S, VALCKX D, VANDER PERRE S, MEULEMAN C, MIHALYI A, MWENDA JM, MATHIEU C, D'HOOGE TM. Increased peritoneal and endometrial gene expression of biologically relevant cytokines and growth factors during the menstrual phase in women with endometriosis. *Fertil Steril*; 85(6):1667-75. 2006
58. LAIRD SM, TUCKERMAN EM, SARAVELLOS H, LI TC. The production of tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) by human endometrial cells in culture. *Hum Reprod*; 11(6):1318-23. 1996
59. LAMBERT E, DASSE E, HAYE B, PETITFRERE E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*; 49(3):187-98. 2004
60. LAUDANSKI P, SZAMATOWICZ J, RAMEL P. Matrix metalloproteinase-13 and membrane type-1 matrix metalloproteinase in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Gynecol Endocrinol*; 21(2):106-10. 2005
61. LEBEL G, DODIN S, AYOTTE P, MARCOUX S, FERRON LA, DEWAILLY E. Organochlorine exposure and the risk of endometriosis. *Fertil Steril*; 69:221–8. 1998
62. LEBOVIC DI, MUELLER MD, TAYLOR RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril*; 75(1):1-10. 2001
63. LI R, LUO X, ARCHER DF, CHEGINI N. Doxycycline alters the expression of matrix metalloproteinases in the endometrial cells exposed to ovarian steroids and pro-inflammatory cytokine. *J Reprod Immunol*; 73(2):118-29. 2007
64. LI W, SAVINOV AY, ROZANOV DV, GOLUBKOV VS, HEDAYAT H, POSTNOVA TI, GOLUBKOVA NV, LINLI Y, KRAJEWSKI S, STRONGIN AY. Matrix metalloproteinase-26 is associated with estrogen-dependent malignancies and targets alpha1-antitrypsin serpin. *Cancer Res*; 64(23):8657-65. 2004
65. LI Y, LANG JH. Expressions of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 mRNA in endometriosis *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*; 41(1):30-3. 2006
66. LICHT P, FLUHR H, NEUWINGER J, WALLWIENER D, WILDT L. Is human chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation?. *Mol Cell Endocrinol*; 269(1-2):85-92. 2007
67. LIU XJ, HE YL, PENG DX. Expression of metalloproteinase-9 in ectopic endometrium in women with endometriosis. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*; 22(5):467-9. 2002
68. MARCHENKO GN, MARCHENKO ND, LENG J, STRONGIN AY. Promoter characterization of the novel human matrix metalloproteinase-26 gene: regulation by the T-cell factor-4 implies specific expression of the gene in cancer cells of epithelial origin. *Biochem J*; 363(Pt 2):253-62. 2002
69. MCCAWLEY LJ, MATRISIAN LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!. *Curr Opin Cell Biol*; 13(5):534-40. 2001

70. MELIN A, SPAREN P, PERSSON I, BERGQVIST A. Endometriosis and the risk of cancer with special emphasis on ovarian cancer. Hum Reprod; 21(5):1237-42. 2006
71. MISSMER SA, CRAMER DW. The epidemiology of endometriosis. Obstet Gynecol Clin North Am; 30(1):1-19, vii. 2003
72. MURPHY G, KNÄUPER V, LEE MH, AMOUR A, WORLEY JR, HUTTON M, ATKINSON S, RAPTI M, WILLIAMSON R. Role of TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) in pericellular proteolysis: the specificity is in the detail. Biochem Soc Symp; (70):65-80. 2003
73. NAGASE H, WOESSNER JF JR. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem; 274(31): 21491-4. 1999
74. NOBLE LS, SIMPSON ER, JOHNS A, BULUN SE. Aromatase expression in endometriosis. J Clin Endocrinol Metab; 81:174- 9. 1996
75. NOYES R, HERTIG A, ROCK J. Dating the endometrial biopsy. Fertil Steril. 1(1): 3-25, 1950
76. OLIVE D, SCHWARTZ L. Endometriosis. New Engl J Med; 328(24): 1759-1769.1993
77. OLSON MW, GERVASI DC, MOBASHERY S, FRIDMAN R. Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. J Biol Chem;272(47):29975-83.1997
78. OSTEN K, BRUNER-TRAN KL, EISENBERG E. Reduced progesterone action during endometrial maturation: a potential risk factor for the development of endometriosis. Fertil Steril; 83(3):529-37. 2005
79. PARK HI, NI J, GERKEMA FE, LIU D, BELOZEROV VE, SANG QX. Identification and characterization of human endometase (Matrix metalloproteinase-26) from endometrial tumor. J Biol Chem; 275(27):20540-4. 2000
80. PILKA R, DOMANSKI H, HANSSON S, ERIKSSON P, CASSLEN B. Endometrial TIMP-4 mRNA is high at midcycle and in hyperplasia, but down-regulated in malignant tumours. Coordinated expression with MMP-26. Mol Hum Reprod; 10(9):641-50. 2004a
81. PILKA R, NORATA GD, DOMANSKI H, ANDERSSON C, HANSSON S, ERIKSSON P, CASSLÉN B. Matrix metalloproteinase-26 (matrilysin-2) expression is high in endometrial hyperplasia and decreases with loss of histological differentiation in endometrial cancer. Gynecol Oncol; 94(3):661-70.2004b
82. PILKA R, NOSKOVA V, DOMANSKI H, ANDERSSON C, HANSSON S, CASSLEN B. Endometrial TIMP-4 mRNA is expressed in the stroma, while TIMP-4 protein accumulates in the epithelium and is released to the uterine fluid. Mol Hum Reprod; 12(8):497-503. 2006
83. PILKA R, WHATLING C, DOMANSKI H, HANSSON S, ERIKSSON P, CASSLÉN B. Epithelial expression of matrix metalloproteinase-26 is elevated at mid-cycle in the human endometrium. Mol Hum Reprod; 9(5):271-7. 2003
84. RAMAMURTHY NS, GREENWALD RA, CELIKER MY, SHI EY. Experimental arthritis in rats induces biomarkers of periodontitis which are ameliorated by gene therapy with tissue inhibitor of matrix metalloproteinases. J Periodontol; 76(2):229-33. 2005
85. RAWDANOWICZ TJ, HAMPTON AL, NAGASE H, WOOLLEY DE, SALAMONSEN LA. Matrix metalloproteinase production by cultured human endometrial stromal cells: identification of interstitial collagenase, gelatinase-A, gelatinase-B, and stromelysin-1 and their differential regulation by interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha. J Clin Endocrinol Metab; 79(2):530-6. 1994
86. RAZA SL, NEHRING LC, SHAPIRO SD, CORNELIUS LA. Proteinase-activated receptor-1 regulation of macrophage elastase (MMP-12) secretion by serine proteinases. J Biol Chem; 275(52):41243-50. 2000
87. RILEY SC, LEASK R, DENISON FC, WISELY K, CALDER AA, HOWE DC. Secretion of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by human fetal membranes, decidua and placenta at parturition. J Endocrinol; 162(3):351-9. 1999

88. RODGERS WH, MATRISIAN LM, GIUDICE LC, DSUPIN B, CANNON P, SVITEK C, GORSTEIN F, OSTEEN KG. Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. J Clin Invest; 94(3):946-53. 1994
89. SAMPSON JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. Am J Obstet Gynecol; 14:422-69. 1927
90. SHARPE-TIMMS KL, KEISLER LW, MCINTUSH EW, KEISLER DH. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 concentrations are attenuated in peritoneal fluid and sera of women with endometriosis and restored in sera by gonadotropin-releasing hormone agonist therapy. Fertil Steril; 69:1128-34. 1998
91. SCHMITTGEN TD, ZAKRAJSEK BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. J Biochem Biophys Methods; 46(1-2):69-81. 2000
92. SCHREIBER E, MATTHIAS P, MÜLLER MM, SCHAFFNER W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells Nucleic Acids Res;17(15):6419.1989
93. SILLEM M, PRIFTI S, KOCH A, NEHER M, JAUCKUS J, RUNNEBAUM B Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in uterine endometrial cells of patients with and without endometriosis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol; 95(2):167-74. 2001
94. SIMPSON JL, BISCHOFF FZ, KAMAT A, BUSTER JE, CARSON SA. Genetics of endometriosis. Obstet Gynecol Clin North Am; 30(1):21-40, vii. 2003
95. SPUIJBROEK MDEH, DUNSELMAN GAJ, MENHEERE PPJA, EVERS JLH. Early endometriosis invades the extracellular matrix. Fertil Steril; 58:929-33. 1992
96. STERNLICHT MD, WERB Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol; 17:463-516. 2001
97. SZAMATOWICZ J, LAUDAŃSKI P, TOMASZEWSKA I. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1: a possible role in the pathogenesis of endometriosis. Hum Reprod; 17(2):284-8. 2002
98. TABIBZADEH S, SATYASWAROOP PG, VON WOLFF M, STROWITZKI T. Regulation of TNF-alpha mRNA expression in endometrial cells by TNF-alpha and by oestrogen withdrawal. Mol Hum Reprod; 5(12):1141-9. 1999
99. TALHOUK RS, BISSELL MJ, WERB Z. Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. J Cell Biol; 118(5):1271-82. 1992
100. TAYLOR RN. Endometriosis. En : STRAUSS III JF y BARBIERI RL (Eds) . Yen and Jaffe's reproductive endocrinology physiology, pathophysiology and clinical management. 5^a ed. USA. Elsevier Saunders. 2004. pp. 691-711
101. UEDA, M, YAMASHITA Y, TAKEHARA M, TERAJ Y, KUMAGAI K, UEKI K, KANDA K, HUNG YC, UEKI M. Gene expression of adhesion molecules and matrix metalloproteinases in endometriosis. Gynecol.Endocrinol; 16(5):391-402. 2002
102. ULUKUS M, CAKMAK H, ARICI A. The role of endometrium in endometriosis. J Soc Gynecol Investig; 13(7):467-76. 2006
103. UZAN C, CORTEZ A, DUFOURNET C, FAUVET R, SIFFROI JP, DARAI E. Eutopic endometrium and peritoneal, ovarian and bowel endometriotic tissues express a different profile of matrix metalloproteinases-2, -3 and -11, and of tissue inhibitor metalloproteinases-1 and -2. Virchows Arch; 445(6):603-9. 2004
104. VAN DEN STEEN PE, DUBOIS B, NELISSEN I, RUDD PM, DWEK RA, OPDENAKKER G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). Crit Rev Biochem Mol Biol; 37(6):375-536. 2002

105. VAN DEN STEEN PE, OPDENAKKER G, WORMALD MR, DWEK RA, RUDD PM. Matrix remodelling enzymes, the protease cascade and glycosylation. Biochim Biophys Acta; 1528(2-3):61-73. 2001
106. VASSILEV V, PRETTO CM, CORNET PB, DELVAUX D, EECKHOUT Y, COURTOY PJ, MARBAIX E, HENRIET P. Response of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases messenger ribonucleic acids to ovarian steroids in human endometrial explants mimics their gene- and phase-specific differential control in vivo. J Clin Endocrinol Metab; 90(10):5848-57.2005
107. VISSE R, NAGASE H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res; 92(8):827-39. 2003
108. VON WOLFF M, CLASSEN-LINKE I, HEID D, KRUSCHE CA, BEIER-HELLWIG K, KARL C, BEIER HM. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human endometrium and uterine secretion: an evaluation by immunohistochemistry, ELISA and semiquantitative RT-PCR. Mol Hum Reprod; 5(2):146-52. 1999
109. WILSON CL, MATRISIAN LM. Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. Int J Biochem Cell Biol;28(2):123-36. 1996
110. WOLBER EM, KRESSIN P, MEYHOFER-MALIK A, DIEDRICH K, MALIK E. Differential induction of matrix metalloproteinase 1 and 2 in ectopic endometrium. Reprod Biomed Online; 6(2):238-43. 2003
111. WU MY, HO HN. The role of cytokines in endometriosis. Am J Reprod Immunol; 49(5):285-96. 2003
112. YAN C, BOYD DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. J Cell Physiol; 211(1):19-26. 2007
113. YANAIHARA A, OTSUKA Y, IWASAKI S, KOIDE K, AIDA T, OKAI T. Comparison in gene expression of secretory human endometrium using laser microdissection. Reprod Biol Endocrinol; 2:66. 2004
114. YOON SO, PARK SJ, YUN CH, CHUNG AS. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. J Biochem Mol Biol; 36(1):128-37. 2003
115. ZHANG J, HAMPTON AL, NIE G, SALAMONSEN LA. Progesterone inhibits activation of latent matrix metalloproteinase (MMP)-2 by membrane-type 1 MMP: enzymes coordinately expressed in human endometrium. Biol Reprod; 62(1):85-94. 2000
116. ZHANG J, NIE G, JIAN W, WOOLLEY DE, SALAMONSEN LA. Mast cell regulation of human endometrial matrix metalloproteinases: A mechanism underlying menstruation. Biol Reprod; 59(3):693-703. 1998
117. ZHANG J, SALAMONSEN LA. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1, -2 and -3 in human endometrium during the menstrual cycle. Mol Hum Reprod; 3(9):735-41. 1997
118. ZHANG RJ, WILD RA, OJAGO JM. Effect of tumor necrosis factor-alpha on adhesion of human endometrial stromal cells to peritoneal mesothelial cells: an in vitro system. Fertil Steril; 59(6):1196-201.1993

XII. ANEXOS

DIFUSIÓN

Resultados parciales de la presente investigación han sido presentados en congresos científicos nacionales:

1. GALLEGUILLOS C, TORRES M, BORIC MA, GABLER F, FUENTES A, JOHNSON MC. Metaloproteinasas e inhibidores tisulares de la matriz en endometrio eutópico en endometriosis. XVI Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo. Reñaca, Chile. Libro de resúmenes. p 87, 2005.
2. GALLEGUILLOS C, PONCE C, TORRES M, BORIC MA, FUENTES A, GABLER F, JOHNSON MC. Efecto de TNF- α sobre citoquinas proinflamatorias y sistemas NF κ B y Metaloproteinasas de la matriz (MMPs) en endometriosis. XVII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo. Reñaca, Chile. Libro de resúmenes. p 129, 2006.
3. TORRES M, GALLEGUILLOS C, PONCE C, BORIC M.A, VEGA M, JOHNSON M.C. Differential molecule expression in eutopic secretory endometria from women with endometriosis. II Latinamerican Symposium on Fetal-Maternal Interaction and Placenta. Santiago, Chile. Placenta. 27(1): A59, 2006.

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Queremos invitarla a participar en el estudio sobre el funcionamiento y la regulación del endometrio (tejido que recubre el útero por dentro y se expulsa con la menstruación), y su interacción con el peritoneo (membrana que reviste la cavidad abdominal) y lesiones de endometriosis (focos de tejido endometrial localizados en el peritoneo u ovario). Este estudio se realiza en el Instituto de Investigaciones de Materno-Infantil. Para ello le solicitamos leer con detalle este documento.

Título del estudio: "Microambiente y funcionalidad del endometrio humano normal y patológico. Alteraciones moleculares"

Propósito del estudio: Conocer mejor los mecanismos que controlan al endometrio durante el ciclo menstrual normal y en condiciones patológicas como ocurre en la endometriosis.

Procedimiento: Durante la cirugía que su doctor ha indicado como parte de su estudio o tratamiento, en cuya indicación no interviene este proyecto, se obtendrán muestras de endometrio, líquido peritoneal, peritoneo o lesiones de endometriosis. En caso de no tener indicación de cirugía, la muestra de endometrio se obtendrá en forma ambulatoria mediante una cánula plástica que se introduce a través del cuello del útero y que puede provocar molestias, pero no tiene riesgos para su salud. Durante el mes en que se realiza el procedimiento es aconsejable usar algún método de barrera. Además de lo anterior, se tomará una muestra de sangre para realizar estudio hormonal y genético. En caso de sospecha de embarazo, se realizará una determinación de subunidad α de hCG urinaria.

Confidencialidad: La información de la ficha clínica sólo será conocida por los investigadores que participan en este proyecto y no será difundida sin previo consentimiento.

Beneficios: con la participación en este estudio solo obtendrá la satisfacción de contribuir a aumentar el conocimiento acerca del funcionamiento de los órganos de la mujer y de una enfermedad relacionada. Los nuevos conocimientos pueden favorecer a las mujeres infértiles con nuevas posibilidades de diagnóstico o tratamiento.

Riesgos: La obtención de las muestras durante la cirugía no significará ningún riesgo extra para su salud, ni interferirá con su estudio o tratamiento. Los riesgos relacionados con el procedimiento quirúrgico debe conversarlos con su médico tratante. La obtención de endometrio por cánula pipelle y muestra de sangre es posible que cause molestias (contracción uterina parecida al dolor menstrual de muy breve duración) o algo de dolor (pinchazo), respectivamente, pero no presenta otros riesgos asociado con este estudio. Estas molestias están referidas al excepcional caso en que la muestra no sea obtenida durante la cirugía.

Adherencia al estudio: dada la importancia del estudio, la invitamos a participar en el estudio. **Ud. puede retirarse en cualquier momento que lo desee, sin afectar de ninguna manera su atención médica.** En caso de tener alguna duda o problema en relación a su participación, éstas serán resueltas por el investigador clínico Dr Ariel Fuentes (Fono: 4248280, 5568866).

Declaro haber recibido una completa explicación respecto a mi participación en este protocolo de investigación por parte de los investigadores.

Estoy dispuesta a participar voluntariamente y sin presiones en este estudio en que se investigará el endometrio

NOMBRE

RUT FIRMA

TESTIGO

FECHA