

Universidad de Chile

Facultad de Medicina
Escuela de Postgrado

Reguladores de la supervivencia celular en endometrios obtenidos de pacientes con síndrome de ovario poliquístico. Potenciales consecuencias en el desarrollo de hiperplasia endometrial

Título para optar al grado de Doctor en Ciencias Biomédicas

Alejandra Mariela Villavicencio Galdeano

Profesor : Dra. Margarita Vega Blanco

2005

Tesis disponible en: [www.cybertesis.uchile.cl/tesis/
uchile/2005/me-villavicencio_a/pdfAmont/me-villavicencio_a.pdf](http://www.cybertesis.uchile.cl/tesis/uchile/2005/me-villavicencio_a/pdfAmont/me-villavicencio_a.pdf)

| | |
|--|----------|
| Resumen . . | 4 |
| Disponible a texto completo . . | 7 |

Resumen

El endometrio es uno de los tejidos del organismo cuya función es regulada de manera cíclica por los esteroides de origen ovárico. El estradiol producido en la fase folicular del ciclo menstrual induce proliferación de las células endometriales, y la progesterona producida en la fase lútea promueve la diferenciación de dichas células. Para ello, las células endometriales expresan distintas isoformas de receptores esteroidales. También, la acción esteroideal a través de los receptores puede estar controlada por co-reguladores, tales como, co-activadores o corepresores.

Se ha reportado que estradiol regularía la expresión de varias moléculas involucradas en el control del ciclo celular, tanto en endometrio como en otros tejidos y diversas líneas celulares. Además, es ampliamente conocida la acción mitogénica de insulina en endometrio; no obstante, la acción proliferativa de los andrógenos no está aún claramente definida. Lo anterior podría explicar, en parte, el mayor riesgo relativo que presentan las pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) de desarrollar hiperplasia y carcinoma endometrial, ya que es una patología caracterizada por alteraciones endocrino-metabólicas.

En consecuencia, el propósito de esta tesis fue evaluar en endometrios de mujeres SOP si la expresión de receptores esteroidales y moléculas reguladoras del ciclo celular, así como el grado de proliferación y apoptosis, se relaciona con el desarrollo de hiperplasia endometrial. Además, determinar *in vitro* si la condición hiperandrogénica y/o hiperestrogénica y/o hiperinsulínica, contribuyen a modificar la expresión de marcadores del ciclo celular compatibles con hiperplasia endometrial.

Para llevar a cabo el estudio se utilizaron 19 endometrios obtenidos de mujeres con fertilidad probada en fase proliferativa del ciclo menstrual (EN), de pacientes SOP sin y con hiperplasia endometrial (ESOP, $n = 28$; y ESOPH, $n = 14$, respectivamente), y de mujeres con hiperplasia endometrial (HE, $n = 12$). En el estudio *ex vivo*, se evaluó en estos tejidos la expresión génica (RT-PCR) y proteica (Inmunohistoquímica y/o Western Blot) de los receptores de andrógenos (RA) y estrógenos (RE α y RE β), de co-reguladores, así como, de la enzima P450 aromatasas. Además, se estudió la proliferación celular por Ki67, y la apoptosis a través de estudios de fragmentación del DNA y de expresión proteica de Bcl-2, Bax, Pro-caspasa-3 y Caspasa-3. También, se investigó la expresión de la onco-proteína Ras, de la proteína supresora de tumores PTEN, y la expresión y actividad de la proteína Akt. Por otro lado, se evaluó la expresión de reguladores del ciclo celular tales como: p27, p21, proteína del retinoblastoma (Rb), Ciclina E y Cdk-2 (Western blot y/o Inmunohistoquímica), y la actividad de Cdk-2. Además, se realizó un estudio *in vitro*, en el cual se evaluó la respuesta del tejido endometrial (explantos) a hormonas esteroidales e insulina adicionados a los cultivos, con el propósito de simular la condición SOP. Los parámetros que se investigaron en el estudio *in vitro* fueron: el co-activador AIB1, y reguladores del ciclo celular tales como: p27, Rb, Ciclina E y Cdk-2.

Los resultados muestran que el endometrio SOP presenta una mayor sensibilidad a la acción esteroideal, lo cual fue evidenciado por la mayor expresión del RA en ESOP y ESOPH; el incremento observado en la expresión del co-activador AIB1 y del RE α en ESOP; junto

con la alta expresión del co-activador ARA70 y la localización citoplasmática del co-represor NCoR en todos los grupos de endometrios estudiados.

En los estudios *in vitro* también se observó un incremento en la expresión de AIB1, en presencia de una alta concentración de andrógenos, estrógenos e insulina. Por otro lado, no encontramos expresión de la enzima P450 aromataasa en los endometrios estudiados, lo que nos hace pensar que será necesario realizar estudios de actividad de la enzima a fin de conocer si aumenta la biodisponibilidad de estrógenos en los endometrios SOP.

Concordantemente con nuestra proposición de que cambios en la expresión de receptores esteroidales y co-reguladores, podrían desregular la expresión de moléculas importantes en el control de la homeostasis tisular, encontramos un aumento de la proliferación celular (por Ki67) en los endometrios SOP, en ausencia de apoptosis en todos los grupos de endometrios estudiados. Por lo tanto, las pacientes SOP presentan una desregulación en su homeostasis endometrial. Tal desregulación fue evidenciada al estudiar a reguladores del ciclo celular como p27, encontrando una disminución en su expresión nuclear en las células estromales de pacientes SOP (específicamente, pacientes SOP insulino-resistentes) y de ESOPH. Lo anterior, coincide con los hallazgos del estudio *in vitro* donde se observó que en presencia de insulina existe una leve tendencia a la disminución de p27. Esto sugiere una posible contribución de esta proteína para el progreso hacia la fase S del ciclo celular. Por otro lado, se detectó un incremento en la expresión citoplasmática de p27 en células epiteliales de ESOP, lo que podría indicar que en este tipo celular, p27 favorecería el ensamblaje del complejo Ciclina E/Cdk-2 e inhibiría la apoptosis.

En cuanto a Ciclina E y Cdk-2, se encontró que ambas proteínas se expresaron principalmente en las células epiteliales de los grupos de endometrios estudiados, igual que para el caso de Ki67. Además, no se detectaron cambios en la expresión y/o actividad de Ciclina E y Cdk-2 entre los cuatro grupos de endometrios, a excepción de Cdk-2 donde se observó un aumento en su expresión nuclear desde ESOP a ESOPH y EH. Estos resultados son importantes si tenemos en cuenta que los endometrios de las mujeres normales expresan estas proteínas en fase proliferativa, mientras que dicha expresión disminuye en fase secretora. En cambio, los endometrios SOP expresan continuamente estas moléculas, dado que las mujeres SOP son amenorreicas u oligo-menorreicas.

En el caso de la proteína supresora de tumores Rb, no se observaron cambios en su expresión entre los endometrios estudiados. Sin embargo, en los ensayos *in vitro*, en presencia de insulina se observó una tendencia a la disminución de Rb.

También se estudió a la proteína supresora de tumores PTEN, la cual no cambia su expresión entre los endometrios de interés; no obstante, a través de estos resultados no podemos concluir acerca de la funcionalidad de PTEN. Para ello, se analizó a la proteína anti-apoptótica Akt, la que se encuentra río abajo de PTEN y que se activa por fosforilación en ausencia o inactividad de PTEN. Encontramos un aumento en la fosforilación de Akt en el residuo de Ser473 en ESOP y ESOPH al comparar con EN, lo que sugiere que ésta sería una de las vías que conducen al aumento de la supervivencia de las células endometriales de las pacientes SOP. Otra de las vías que podría colaborar con lo anteriormente señalado es la de Ras, ya que observamos sobreexpresión de esta proteína en los endometrios de pacientes SOP sin y con hiperplasia, principalmente a nivel de las células epiteliales.

En lo que se refiere a los estudios *in vitro*, tal como fue descrito anteriormente, no observamos cambios importantes en condiciones hiperandrogénicas, hiperestrogénicas y/o hiperinsulínicas. Es factible pensar que ello puede deberse a que en 18 h de cultivo es difícil

reproducir un síndrome como es el SOP, y que además, los cambios en la expresión de las proteínas que nos interesaron estudiar pueden requerir más tiempo para ser visualizados.

Por lo expuesto anteriormente, podemos concluir que la condición endocrinometabólica inherente al SOP afecta la función normal del endometrio, a nivel de la homeostasis tisular y de la supervivencia celular. De modo tal que los endometrios sometidos a estos ambientes hormonales anormales, experimentan descoordinación entre proliferación y apoptosis, constituyendo éste un evento importante que puede conducir al crecimiento inadecuado o patológico del endometrio de mujeres con SOP, y potencialmente al desarrollo de hiperplasia y/o carcinoma endometrial.

Disponible a texto completo

Tesis disponible en: www.cybertesis.uchile.cl/tesis/uchile/2005/me-villavicencio_a/pdfAmont/me-villavicencio_a.pdf