



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

NIVELES DE EXPRESION DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
DEL ENDOTELIO VASCULAR, DEL FACTOR CRECIMIENTO
NERVIOSO Y DE SU RECEPTOR DE ALTA AFINIDAD EN
ENDOMETRIOS DE MUJERES CON SINDROME DE OVARIO
POLIQUISTICO

ALEJANDRA CERDA AGUAYO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

PROFESOR GUÍA: DRA. MARGARITA VEGA BLANCO

SANTIAGO, CHILE
2009

[Escribir texto]



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

NIVELES DE EXPRESION DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
DEL ENDOTELIO VASCULAR, DEL FACTOR CRECIMIENTO
NERVIOSO Y DE SU RECEPTOR DE ALTA AFINIDAD EN
ENDOMETRIOS DE MUJERES CON SINDROME DE OVARIO
POLIQUISTICO

ALEJANDRA CERDA AGUAYO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

NOTA FINAL:.....

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: MARGARITA VEGA B.
PROFESOR CONSEJERO	: MONICA DE LOS REYES S.
PROFESOR CONSEJERO	: BESSIE URQUIETA M.

SANTIAGO, CHILE
2009

A Ernestina

“La abuela sostiene nuestras manecitas por un rato, pero nuestros corazones para siempre”

AGRADECIMIENTOS

Después de este largo proceso que termina, no quisiera dejar de agradecer a todas las personas que de algún modo estuvieron a mi lado, tanto en la realización de mi memoria de título, como en los años de formación profesional y por lo tanto, son parte importante de este logro.

Para comenzar, quiero agradecer a mi Profesora Guía, la Dra. Margarita Vega, la cual no sólo me brindó todo el cariño, paciencia, buena disposición y disciplina para desarrollar esta investigación, sino que junto con su preocupación maternal, me brindó las herramientas que me ayudaran para siempre en el desarrollo de mi vida profesional dejando una impresión imborrable en mi vida.

A mi madre Verónica, que con su paciencia y comprensión fue clave en este proceso, junto a mis tíos Viviana, Hilda y Luis Alberto, que también siempre estuvieron apoyándome. A mi abuelo por sus sabios consejos, a Luis y a mis primos. También a mi padre, a María Olga, que junto a mis hermanas Carmen e Isabel y a Manuel, me dieron el cariño y compañía en los meses de verano.

De igual modo, quiero agradecer a mis compañeros y amigos, Sebastián, Marcela, Leidy, Manuel, Verónica y Loreto, que estuvieron durante toda la carrera junto a mí, en especial a Marianela, por la confianza de que llegaría al final del camino, también a Alejandra, gracias a la cual conocí a la Dra. Margarita y a su grupo de trabajo. También a mis amigas, Fanny, Andrea y Patricia que durante años estuvieron conmigo, acompañándome en las buenas y malas decisiones.

Quisiera agradecer además, a la Dra. Carmen Romero, por su apoyo y cariño desinteresado, de quien guardaré un grato recuerdo. A mis compañeros de laboratorio, Francisca, María-Paz, Carlos, Paulina, Rodrigo R., Rodrigo C. y un doble agradecimiento a Karla K. También a Marcela M., Luis L., Ketty y Romina, que con mucha paciencia me ayudaron en el inicio de mi trabajo en el laboratorio. Igualmente, a Natalia, Susana, Ximena, Macarena, Lorena y Enrique.

De manera muy especial, quiero agradecer a Verónica Tapia, la hermana mayor que nunca tuve y una de las personas más especiales que he conocido, principalmente por su alegría y preocupación desinteresada por todos los integrantes del laboratorio.

Además, debo agradecer a todo el personal del Laboratorio de Endocrinología, Erminia, Salomé, Doris, Soledad, Filomena, Carlos, Nicolás, Jaime y Egardo, por su cooperación y amistad.

Finalmente, agradezco a mis consejeras las Dras. Bessie Urquieta y Mónica de Los Reyes por su gran voluntad y buena disposición. A la Comisión examinadora, Dres. Juan Egaña, Adolfo Godoy y Claus Köbrich. Al Departamento de Fomento de la Producción Animal. A Marcela Peñaloza, Patricia Molina y Fernanda Urrutia, de la Biblioteca de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, que tanta paciencia me tuvieron y a Don Octavio y la tía Patty.

INDICE

	Página
INDICE.....	I
INDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRAFICOS.....	IV
RESUMEN.....	VIII
SUMMARY.....	IX
FINANCIAMIENTO.....	X
INTRODUCCION.....	1
REVISION BIBLIOGRAFICA.....	3
1. Síndrome de ovario poliquístico.....	3
1.1. Características del síndrome de ovario poliquístico.....	3
1.2. Fisiopatología del síndrome de ovario poliquístico.....	4
1.3. Consecuencias del síndrome de ovario poliquístico.....	6
2. Endometrio.....	7
2.1. Características morfológicas y bioquímicas del endometrio normal...	7
2.2. Angiogénesis en el endometrio normal.....	9
2.3. Características del endometrio de mujeres con síndrome de ovario poliquístico.....	10
3. Factor de crecimiento del endotelio vascular.....	12
3.1. Características generales del VEGF.....	12
3.2. Funciones biológicas del VEGF.....	13
3.3. Isoformas de VEGF y sus propiedades bioquímicas.....	15
3.4. Regulación de la expresión de VEGF.....	16
3.5. Presencia de VEGF en el endometrio de mamíferos.....	16
4. Factor de crecimiento nervioso y su receptor de alta afinidad.....	18
4.1. Características generales de NGF y trkA.....	18
4.2. Funciones biológicas de NGF y trkA.....	19
4.3. Presencia de NGF en endometrio de mamíferos.....	20
HIPOTESIS.....	22
OBJETIVO GENERAL.....	22

OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	22
MATERIAL Y METODOS.....	23
1. Obtención de las muestras.....	23
1.1. Endometrio de mujeres controles.....	23
1.2. Endometrio de mujeres con SOP.....	23
1.3. Análisis morfológico y fechaje histológico.....	24
2. Diseño experimental.....	25
3. Métodos de análisis de muestras.....	26
3.1. Estudio inmunohistoquímico.....	26
3.2. Estudio de la reacción de polimerización en cadena de DNA complementario (RT-PCR).....	27
4. Análisis estadístico.....	31
RESULTADOS.....	32
1. Características clínicas y metabólicas de las pacientes en estudio.....	32
2. Inmunodetección y semicuantificación de VEGF, NGF y trkA a través del ciclo menstrual y en endometrios de mujeres con SOP.....	35
2.1. Estudio inmunohistoquímico de VEGF durante el ciclo menstrual.....	35
2.2. Inmunodetección de VEGF en endometrios de mujeres con SOP y en endometrios de mujeres controles.....	36
2.3. Estudio inmunohistoquímico de NGF durante el ciclo menstrual.....	39
2.4. Inmunodetección de NGF en endometrios de mujeres con SOP y en endometrios de mujeres controles.....	40
2.5. Estudio inmunohistoquímico de trkA durante el ciclo menstrual.....	43
2.6. Estudio inmunohistoquímico en endometrio de mujeres con SOP y en endometrio de mujeres controles.....	44
3. Niveles de mRNA de NGF y VEGF en endometrios de mujeres controles a través del ciclo menstrual y en endometrios de mujeres con SOP.....	47
3.1. Niveles de expresión de mRNA de NGF en endometrios de mujeres controles, a través del ciclo menstrual y en endometrios de mujeres con SOP.....	47

3.2. Niveles de expresión de mRNA de VEGF en endometrios de mujeres controles, a través del ciclo menstrual y en endometrios de mujeres con SOP.....	48
DISCUSION.....	50
CONCLUSIONES.....	58
BIBLIOGRAFIA.....	59
ANEXO 1.....	67
1. Consentimiento informado para la obtención de tejido endometrial de mujeres controles.....	67
2. Consentimiento informado para la obtención de tejido endometrial de pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico.....	68

INDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRAFICOS

FIGURAS	Página
Figura 1: Fisiopatología del SOP.....	6
Figura 2: Morfología del endometrio humano normal.....	8
Figura 3: Interacción de la familia VEGF con sus receptores.....	12
Figura 4: Receptor trkA y p75 de NGF.....	19
Figura 5: Vías de señalización de NGF.....	20
Figura 6: Diseño experimental.....	25
Figura 7: Inmunotinción para VEGF en endometrios controles.....	35
Figura 8: Inmunotinción para VEGF en mujeres controles de fase proliferativa (ENp) y diagnosticadas con SOP de fase proliferativa (ESOPp).....	37
Figura 9: Inmunotinción para VEGF en endometrios controles de fase secretora (ENs) y SOP de fase secretora (ESOPs).....	38
Figura 10: Inmunotinción para NGF en endometrios controles.....	39
Figura 11: Inmunotinción para NGF en endometrios controles de fase proliferativa (ENp) y endometrios de mujeres con SOP de fase proliferativa.....	41
Figura 12: Inmunotinción para NGF en endometrios controles de fase secretora (ENs) y SOP de fase secretora (ESOPs).....	42
Figura 13: Inmunotinción para trkA en endometrios controles.....	43
Figura 14: Inmunotinción para trkA en mujeres controles de fase proliferativa (ENp) y diagnosticadas con SOP de fase prliferativa (ESOPp).....	45

Figura 15: Inmunotinción para trkA en endometrios controles de fase secretora (ENs) y SOP de fase secretora (ESOPs).....	46
Figura 16: Gel representativo de los resultados obtenidos de la semicuantificación del mRNA para NGF en los cuatro grupos de estudio.....	47
Figura 17: Imagen representativa de los resultados obtenidos de la semicuatificación del mRNA de VEGF para sus isoformas 121, 165 y 189 en los cuatro grupos de estudio.....	48

TABLAS

Página

Tabla 1: Características de los anticuerpos utilizados en la realización de las técnicas de inmunohistoquímica.....	26
Tabla 2: Secuencia de partidores utilizados.....	29
Tabla 3: Condiciones de RT-PCR de los diferentes partidores.....	30
Tabla 4: Antecedentes clínicos de las pacientes en estudio.....	33
Tabla 5: Antecedentes hormonales de las pacientes en estudio.....	33
Tabla 6: Valores de glicemia y de insulinemia basal y postcarga de las pacientes con SOP sometidas a test de tolerancia a la glucosa oral (TTGO).....	34

GRAFICOS

Página

Gráfico 1: Semicuantificación por inmunohistoquímica de VEGF en endometrios de mujeres controles de fase proliferativa (ENp) y fase secretora (ENs).....	36
--	----

Gráfico 2: Semicuantificación por inmunohistoquímica de VEGF en endometrios de mujeres controles de fase proliferativa (ENp) y con SOP de fase proliferativa (ESOPp).....	37
Gráfico 3: Semicuantificación por inmunohistoquímica de VEGF en endometrios de mujeres controles de fase secretora (ENs) y con SOP de fase secretora (ESOPs).....	38
Gráfico 4: Semicuantificación por inmunohistoquímica de NGF a través del ciclo menstrual.....	40
Gráfico 5: Semicuantificación por inmunohistoquímica de NGF en endometrios de mujeres controles de fase proliferativa (ENp) y con SOP de fase proliferativa (ESOPp).....	41
Gráfico 6: Semicuantificación por inmunohistoquímica de NGF en endometrios de mujeres controles de fase secretora (ENs) y con SOP de fase secretora (ESOPs).....	42
Gráfico 7: Semicuantificación por inmunohistoquímica de trkA en endometrios de mujeres controles de fase proliferativa (ENp) y de fase secretora (ENs).....	44
Gráfico 8: Semicuantificación por inmunohistoquímica de trkA en endometrios de mujeres controles de fase proliferativa (ENp) y con SOP de fase proliferativa (ESOPp).....	45
Gráfico 9: Semicuantificación por inmunohistoquímica de trkA en endometrios de mujeres controles de fase secretora (ENs) y con SOP de fase secretora (ESOPs).....	46
Gráfico 10: Semicuantificación del mRNA para NGF en los cuatro grupos de estudio.....	47

Gráfico 11: Semicuantificación del mRNA para VEGF ₁₂₁ en los cuatro grupos de estudio.....	49
Gráfico 12: Semicuantificación del mRNA para VEGF ₁₆₅ en los cuatro grupos de estudio.....	49
Gráfico 13: Semicuantificación del mRNA para VEGF ₁₈₉ en los cuatro grupos de estudio.....	49

RESUMEN

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es una patología que afecta directamente la homeostasis endometrial, debido a la pérdida de la función normal del ovario. Se ha sugerido un aumento en la sensibilidad a la acción de los esteroides ováricos en mujeres con esta patología, lo cual podría llevar a que factores de crecimiento que responden a las hormonas esteroidales, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), poderoso angiogénico, y el factor de crecimiento nervioso (NGF), por medio de su receptor *trkA*, alteren su expresión. Ambos factores participan en la angiogénesis y dada la gran vascularización del endometrio, participarían en la regulación de la función endometrial, junto a otras moléculas.

El objetivo de este trabajo es determinar si existen diferencias en los niveles de VEGF, NGF y de su receptor de alta afinidad, *trkA*, en endometrios de mujeres con síndrome de ovario poliquístico, respecto a los endometrios de mujeres controles. Para esto, se evaluó la localización y tipo de tinción a través de inmunohistoquímica para VEGF, NGF y *trkA* con anticuerpos específicos y el mRNA, a través de RT-PCR de los transcritos de VEGF, NGF y *rRNA18S* en endometrios controles de fase proliferativa (ENp, n=9), fase secretora (ENs, n=6), endometrios SOP de fase proliferativa (ESOPp, n=8) y de fase secretora (ESOPs, n=4). Los resultados presentaron una tinción homogénea y de predominio citoplasmático para VEGF, NGF y *trkA* en todos los grupos estudiados. Junto a ello se observó un aumento significativo en la intensidad de la tinción en los ENs y en los ESOPp, en el epitelio y el estroma comparados con los ENp, en las tres proteínas analizadas. El nivel de mRNA de VEGF-189 fue mayor en ESOPs versus ENs y el transcrito VEGF-165 fue el mayormente expresado a través del ciclo menstrual. Los niveles de mRNA-NGF disminuyeron en ESOPp versus ENp.

Las diferencias encontradas entre los endometrios controles y los SOP sugieren alteración en la vascularización del tejido endometrial de mujeres con SOP. Además, *trkA* y NGF podrían tener un papel funcional en la fase secretora del ciclo, y el aumento de estas tres moléculas en los ESOP podría indicar un rol de ellas en esta patología.

SUMMARY

The Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is a condition that directly affects the endometrial homeostasis due to the loss of normal ovarian function. It has been suggested an increased endometrial sensitivity to the action of ovarian steroids in women with this disease. This could lead to an alteration on the expression of growth factors that respond to steroid hormones, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), a potent inducer of angiogenesis, and nerve growth factor (NGF), through its receptor trkA. Both factors are involved in angiogenesis and given the large endometrial vascularization, these are important molecules implicated in the regulation of endometrial function.

The aim of this study is to determine whether there are differences in the levels of VEGF, NGF and trkA, in the endometrium from women with PCOS, compared to endometrium from control women. For this purpose, we assessed the location and type of staining by immunohistochemistry for VEGF, NGF and trkA (specific antibodies), and mRNA using RT-PCR of transcripts for VEGF, NGF and rRNA18S in proliferative phase endometrium from controls (ENp, n=9), secretory phase (ENs, n=6), proliferative phase endometrium of PCOS (ESOPp, n=8), and secretory phase (ESOPs, n=4). The results showed a homogeneous staining, predominantly in the cytoplasm for VEGF, NGF and trkA in all studied groups. Also, a significant increase in the intensity of staining in ENs and ESOPp in epithelium and estroma compared to ENp, in the three proteins tested. The levels of mRNA for VEGF 189 were higher in ESOPs versus ENs and VEGF 165 transcript was the most expressed through the menstrual cycle. The NGF-mRNA levels decreased in ESOPp versus ENp.

The difference found between controls and PCOS endometria, suggests alterations in the vascularization of the endometrial tissue of women with PCOS. In addition, NGF and trkA could have a functional role in the secretory phase of the cycle, and the increase of these three molecules in ESOP could indicate a role for them in this pathology.

FINANCIAMIENTO

Este estudio fue realizado en el Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Se desarrolló en el marco de los proyectos FONDECYT 1050098 y 1095127. La investigadora responsable fue la Dra. Margarita Vega Blanco.

INTRODUCCION

El síndrome de ovario poliquístico (SOP), es un desorden endocrino metabólico que afecta entre el 5 y 10% de las mujeres en edad reproductiva. Es diagnosticado en base a los criterios planteados por el consenso de Rotterdam y presenta múltiples signos y síntomas. En estas mujeres existe disfunción ovárica, lo cual lleva a una desregulación de la homeostasis de tejidos blanco de las hormonas esteroidales ováricas, como el endometrio. Así, los procesos y respuesta celular de este tejido pueden verse afectados.

La regulación esteroidal del endometrio se traduce en una serie de cambios, representados por la diferenciación de fases dependiendo del esteroide predominante en cada una de ellas. De este modo, en la fase preovulatoria o proliferativa existe predominio de estrógenos y en la fase posterior a la ovulación o secretora, predomina la progesterona. Para que ésto se lleve a cabo, debe existir una normal expresión de los receptores esteroidales y de moléculas correguladoras a través del ciclo menstrual, lo cual no ocurre en el endometrio de las mujeres con SOP, pues se ha reportado que existe una sobreexpresión de receptores esteroidales y de sus coactivadores, sugiriendo que el endometrio de estas mujeres presentaría una sensibilidad aumentada a la acción estrogénica y androgénica. Lo anterior llevaría a una mayor acción esteroidal que afectaría la producción normal de factores de crecimiento, que responden a los estrógenos y que tendrían un papel importante en los procesos que normalmente ocurren en el endometrio a través del ciclo menstrual. Entre estos factores que responden a estrógenos están el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF). Se sabe que durante el ciclo menstrual o estral normal ocurre gradualmente una vascularización del endometrio y que el aumento de la permeabilidad capilar uterina, inducida por el estradiol, es requerida para el crecimiento del endometrio y la implantación embrionaria. VEGF es un potente angiogénico, que actuaría sobre sus receptores en las células endoteliales del endometrio y también se ha relacionado la participación de VEGF en la angiogénesis de neoplasias dependientes de estrógenos. El otro factor de crecimiento que pudiese regular la función endometrial es NGF. Este factor podría

participar en la angiogénesis directamente, ya que se ha reportado que induce la migración de células endoteliales en cultivos de células aórticas humanas o, indirectamente, actuando sobre los niveles de VEGF, como se ha reportado en cultivos de ovario de ratas neonatales. También, se ha sugerido su actividad como regulador de la proliferación y crecimiento del tejido endometrial en el hámster dorado durante el ciclo estral, inhibiendo la apoptosis a través de su receptor de alta afinidad trkA.

Considerando el aumento de la sensibilidad del endometrio a la acción de estrógenos y el aumento de los niveles de andrógenos sanguíneos en pacientes con SOP, el objetivo de este estudio es determinar si la alteración hormonal presente en estas pacientes, modifica el nivel de expresión de VEGF, de NGF y de su receptor de alta afinidad trkA, en los endometrios de estas mujeres.

REVISION BIBLIOGRAFICA

1. SINDROME DE OVARIO POLIQUISTICO

1.1. Características del síndrome de ovario poliquístico

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es un desorden endocrino-metabólico, que afecta entre el 5 y 10% de las mujeres en edad reproductiva, con una variada presentación de signos y síntomas (Marx y Mehta, 2003). Entre ellos destacan irregularidades menstruales, hiperandrogenismo, hirsutismo, obesidad, infertilidad, abortos recurrentes, insulino-resistencia y la presencia de ovarios poliquísticos visualizados por ultrasonido pélvico (Futterweit, 1999).

El diagnóstico del síndrome se realiza, presentando al menos dos de las siguientes tres condiciones establecidas en el Consenso de Rotterdam (The Rotterdam Eshre/ASRM-sponsored PCOS Consensus Workshop group, 2004):

- a) Oligo o anovulación. Manifestándose irregularidades menstruales como oligomenorrea (ciclos menstruales mayores a 35 días y menores a 90 días) o amenorrea (ciclos menstruales mayores a 90 días). Para esto, se debe incluir la evaluación de las concentraciones séricas de la hormona folículo estimulante (FSH) y de estradiol (E_2) para descartar hipogonadismo hipogonadotrófico (disfunción ovárica de origen central) o falla ovárica primaria con bajos niveles de E_2 y altos niveles de FSH. Así, en el SOP existe anovulación normogonadotrófica.
- b) Signos clínicos y/o bioquímicos de hiperandrogenismo. El hiperandrogenismo se puede expresar clínicamente a través del hirsutismo, acné o alopecia androgénica, aunque estas manifestaciones clínicas han sido poco estudiadas, pueden ser subjetivas y muchas veces son tratados antes que la paciente sea evaluada. Bioquímicamente, se presenta hiperandrogenemia, junto con un alto índice de andrógenos libres, incremento aislado de los niveles de dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS) y androstenediona, entre otros.

- c) Ovarios poliquísticos. La presencia de ovarios con múltiples quistes es evaluada a través de ultrasonografía y debe existir la presencia de 12 o más folículos, en cada ovario con medidas de 2-9 mm de diámetro o un aumento del volumen ovárico mayor a 10 ml.

Los criterios mencionados previamente, se establecen luego de la exclusión de otras posible patologías con similar presentación clínica, tales como: hiperplasia adrenal congénita, tumores secretores de andrógenos y síndrome de Cushing, entre otros (Bhatia, 2005).

En consecuencia, éste es principalmente un síndrome de disfunción ovárica y la presencia de hiperandrogenismo y morfología de ovarios poliquísticos son clave, pues juegan un papel importante en la fisiopatología del síndrome.

1.2. Fisiopatología del Síndrome de Ovario Poliquístico

La fisiopatología del síndrome depende de una gran cantidad de factores y aún no ha sido dilucidada totalmente. Así, por un lado existen defectos en la esteroidogénesis inherente a las células de la teca ovárica, debido al aumento en la actividad de varias enzimas que están involucradas en la esteroidogénesis ovárica (Diamanti-Kandarakis, 2008). Por otro lado, se han señalado anormalidades en el eje hipotálamo-hipófisis en un subgrupo de pacientes con SOP, en las cuales se observa una mayor liberación de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), que se manifiesta con aumento en la concentración, de la frecuencia y amplitud de los pulsos de hormona luteinizante (LH) en la circulación y aumento en la razón LH:FSH. Este aumento en la LH, actúa sobre el ovario estimulando a las células tecaes del folículo ovárico a incrementar la eficiencia en la síntesis de andrógenos a partir de precursores androgénicos (Ehrmann, 2005; Marx y Mehta, 2003). Los niveles de FSH constantes o disminuidos, junto al aumento de los niveles de LH y el aumento de los andrógenos ováricos, actúan directamente sobre las células de la granulosa del ovario, promoviendo el crecimiento de varios folículos en diferentes estados que detienen su maduración y aceleran su envejecimiento transformándose en quistes. Así, la ausencia de maduración folicular

causa anovulación, mientras los bajos niveles de E_2 junto con los elevados niveles de estrona predisponen al crecimiento del endometrio sin oposición por la ausencia cíclica de la P_4 , el cual es sólo parcialmente descamado durante episodios disfuncionales de sangramiento, predisponiendo al desarrollo de cáncer endometrial (Vignesh y Mohan, 2007; Marx y Mehta, 2003).

Por otro lado, un alto porcentaje de las mujeres que padecen este síndrome, son obesas y sobre un 50% presentan insulino-resistencia (The Rotterdam Eshre/asrm-sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2004; Ehrmann, 2005; Marx y Mehta, 2003). Ellas manifiestan hiperinsulinemia compensatoria y, precisamente, la insulina juega un rol directo e indirecto en la patogenia del hiperandrogenismo. Directamente, actúa de manera sinérgica con la LH aumentando la síntesis de andrógenos ováricos, lo cual realiza interactuando con su propio receptor o con el receptor para el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), de este modo aumenta la actividad de la enzima P_{450c17} (Marx y Mehta, 2003). Indirectamente, la insulina junto al aumento de las concentraciones de andrógenos sanguíneos disminuye la síntesis hepática de la proteína transportadora de esteroides sexuales (SHBG), la cual también se encuentra disminuida en las mujeres con SOP, incrementando los niveles de andrógenos libres en la sangre (Figura 1) (Ehrmann, 2005; Marx y Mehta, 2003).

Dado que el endometrio es un tejido dependiente necesariamente de las hormonas esteroidales provenientes del ovario para realizar adecuadamente sus funciones, todas estas variaciones endocrinas y metabólicas en las mujeres con SOP, además de la disfunción ovárica, podrían afectar al endometrio, alterando su función reproductiva.

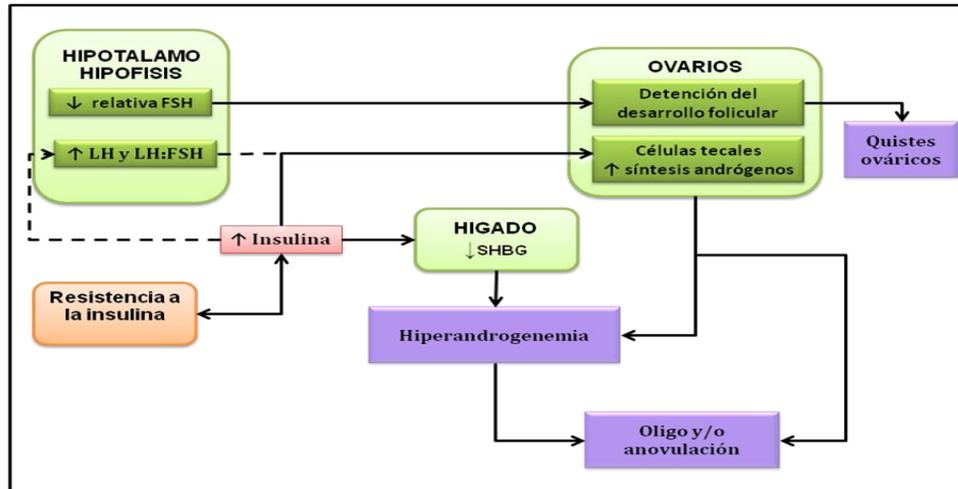


Figura 1. Fisiopatología del SOP. Gran cantidad de factores se relacionan con la fisiopatología y muchos de ellos aun no han sido estudiados completamente.

1.3. Consecuencias del Síndrome de Ovario Poliquístico

Las consecuencias del SOP se extienden afectando a todo el organismo, así, estas mujeres presentan mayor riesgo de desordenes metabólicos y cardiovasculares semejantes a los que ocurren en el síndrome metabólico, obesidad, diabetes mellitus, enfermedad coronaria, intolerancia a la glucosa, apnea obstructiva del sueño, hiperplasia y cáncer endometrial (The Rotterdam Eshre/asrm-sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2004; Ehrmann, 2005; Marx y Mehta, 2003). Junto a estas consecuencias, se suman la baja fertilidad y un alto porcentaje de abortos en estas pacientes (Porter y Scott, 2005), consecuencias relacionadas con la función reproductiva y asociadas a la función endometrial que son de gran interés en este trabajo. Precisamente, el endometrio, un tejido regulado directamente por la función ovárica, se verá alterado por estos trastornos hormonales.

2. ENDOMETRIO

2.1. Características morfológicas y bioquímicas del endometrio normal

El endometrio es la mucosa que recubre la cavidad uterina, está compuesto principalmente por dos poblaciones celulares, epitelial y estromal. Las células epiteliales se disponen en un epitelio superficial, el cual se invagina dando origen a las glándulas uterinas tubulares (epitelio glandular). El estroma está compuesto de tejido conectivo, linfocitos, fibroblastos, células endoteliales, células musculares lisas y leucocitos. Otro componente importante de todo este microambiente celular lo constituye la matriz extracelular (MEC), presentando variaciones en su constitución molecular a través del ciclo menstrual. La MEC está formada por la membrana basal en la que descansan las células epiteliales y por una matriz intersticial rica en colágeno en la que se localizan los fibroblastos, y que, además, rodea al endotelio de los vasos y a las células deciduales. (Salamonsen y Nancarrow, 1994). Estructuralmente, el endometrio se dispone en dos capas, una superficial, que es removida y regenerada cíclicamente en el ciclo menstrual, denominada funcional y otra subyacente a ella, la capa basal. La serie de cambios morfológicos clásicos que ocurren en respuesta a la actividad cíclica del ovario, determinan tres fases en el ciclo menstrual, una fase preovulatoria dominada por estrógenos, otra fase postovulatoria dominada por progesterona, secretora y la fase menstrual, que sigue a la caída de las concentraciones de progesterona acompañada de la desaparición del cuerpo lúteo (Jabbour *et al.*, 2006). Estos cambios producen características determinadas en la arquitectura endometrial, lo que llevó a Noyes, en la década de los 50, a establecer una serie de criterios para determinar el día del ciclo en el cual se encuentra el tejido endometrial (fechaje histológico) (Noyes *et al.*, 1950). Basado en lo anterior, es factible definir en el endometrio dos etapas principales a través del ciclo menstrual: la fase proliferativa y la fase secretora, cada una con sus características morfológicas propias (Figura 2).

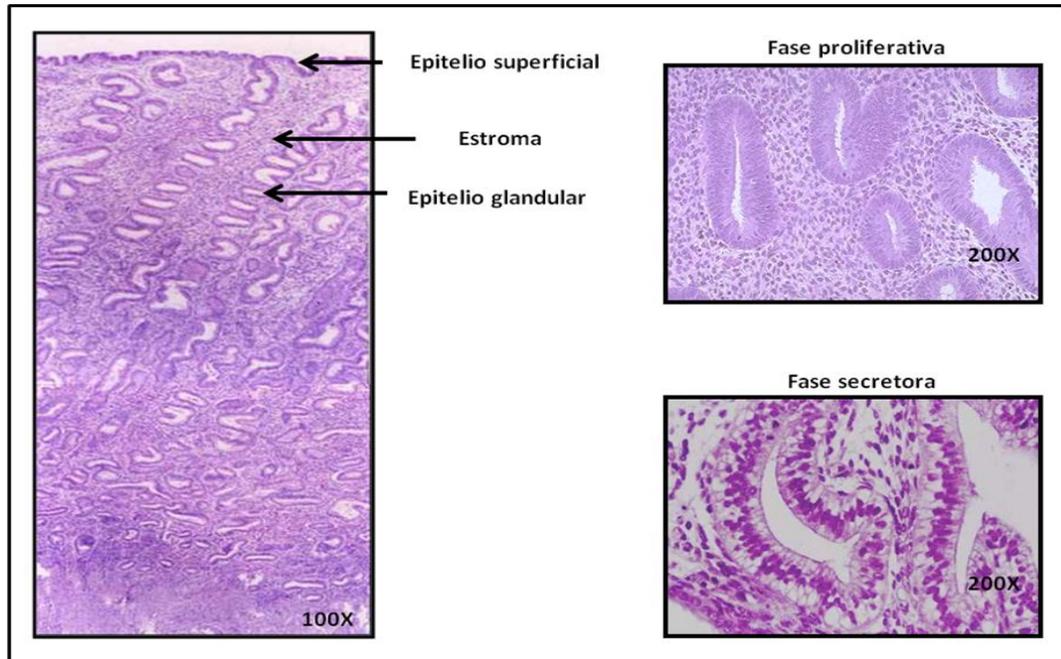


Figura 2. Morfología del endometrio humano normal. En la fase proliferativa existen glándulas rectas, y el estroma es compacto. En la fase secretora secretora inicial (día 16- 17 del ciclo), en cambio, se observan glándulas tortuosas, con vacuolas sub-nucleares en las células epiteliales, signo de que la ovulación ha ocurrido, y edema en el estroma.

En la fase proliferativa, el aumento de las concentraciones circulantes de E_2 resultado del crecimiento del folículo ovárico, promueve una activa proliferación celular del endometrio aumentando el grosor del mismo, mientras son suprimidos los factores apoptóticos (Giudice, 2003). Junto a ésto, comienza la angiogénesis, para asegurar la nutrición del nuevo tejido en formación (Smith *et al.*, 1998). Un adecuado desarrollo durante esta fase del ciclo es crucial para la sincronización del proceso de maduración que requiere el endometrio para la implantación durante la fase secretora. El E_2 induce la proliferación celular y estimula la síntesis de receptores esteroidales, tales como: receptores de progesterona, claves para que la progesterona ejerza su efecto en la fase secretora; receptores de estrógenos α y β y receptor de andrógenos (Jabbour *et al.*, 2006).

Se ha descrito que la función endometrial también es regulada por factores de crecimiento, pero sólo algunos de ellos responden directamente a la acción del estradiol. Entre ellos, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF), poseen en sus promotores elementos de respuesta a estrógenos (Bjorling *et al.*, 2002; Meduri *et al.*, 2000). En resumen, la fase proliferativa

se caracteriza por una organización de factores dirigidos hacia la remodelación del tejido, proliferación y procesos anti-apoptóticos y a la estimulación de la angiogénesis (Strowitzki *et al.*, 2006).

En la fase secretora, la progesterona inhibe la proliferación e induce la diferenciación celular, siendo afectados todos los tipos celulares en el endometrio, mostrando diferenciación de las células endometriales características e infiltración de un gran número de células inmunitarias. Durante la fase secretora tardía, ocurren los cambios morfológicos que caracterizan la decidualización independiente de la existencia o no de gestación (Strowitzki *et al.*, 2006).

2.2. Angiogénesis en el endometrio normal

La angiogénesis es un proceso que involucra la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Puede ocurrir por varios mecanismos, entre ellos, brote, elongación e intususcepción. Dado que existe una alta proliferación tisular en el endometrio, la angiogénesis es necesaria en el aporte de nutrientes suficientes para el tejido (Smith, 1998).

Durante la primera parte del ciclo menstrual, la angiogénesis aumenta significativamente en la capa basal y en el plexo subepitelial. Así, en esta fase la elongación es dominante, ocurriendo en tejidos en crecimiento al existir vasos constantemente en reestructuración en respuesta a las demandas metabólicas de los tejidos (Gambino *et al.*, 2002); mientras, la intususcepción, proceso por el cual el lumen del vaso es internamente dividido en dos por la proliferación de células endoteliales que migran al interior, produciendo una intrincada red de vasos interconectados o una arcada de vasos paralelos, es el mecanismo principal durante la fase secretora temprana y media (Gambino *et al.*, 2002).

2.3. Características del endometrio de mujeres con Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP)

Morfológicamente, el endometrio de mujeres con SOP es comparable con el endometrio de mujeres normales en fase proliferativa, aunque difiere en algunas características bioquímicas. Así, en endometrios de mujeres con SOP sin tratamiento, los receptores de estrógenos y de andrógenos estarían aumentados en su expresión, al igual que los coactivadores de los receptores esteroidales (Apparao *et al.*, 2002; Maliqueo *et al.*, 2003; Villavicencio *et al.*, 2006), comparados con endometrios de mujeres normales. Esto sugiere que endometrios de mujeres con SOP tendrían una sensibilidad más alta a la acción de dichos esteroides (Apparao *et al.*, 2002; Maliqueo *et al.*, 2003; Giudice, 2006; Villavicencio *et al.*, 2006).

Por otro lado, en mujeres con SOP que han ovulado espontáneamente y que se encuentran en una fase compatible a la secretora media, se ha detectado una persistencia de los receptores de progesterona en la células epiteliales, junto con la disminución de la expresión epitelial de la integrina β_3 , marcador de receptividad uterina, coincidiendo con la disminución en la receptividad uterina de estas mujeres (Quezada *et al.*, 2006).

Además, en los endometrios de mujeres con SOP, tanto de fase proliferativa como secretora espontánea, existe alteración de la homeostasis tisular, manifestando un desbalance entre muerte celular, proliferación y viabilidad celular. En efecto, los endometrios de mujeres con SOP presentan un aumento en los marcadores de supervivencia celular (Bcl-2 y p-Bad) (Avellaira, 2006). También se ha observado aumento en la proliferación celular, determinado por la alta expresión de Ki67 (proteína nucleolar que está presente durante todas las etapas del ciclo celular, a excepción de la fase G_0 , por lo cual se considera un excelente marcador de la proliferación celular) en células epiteliales, acompañado por ausencia de apoptosis, pues marcadores de apoptosis, como Bax y caspasa-3, están disminuidos (Maliqueo *et al.*, 2003; Avellaira 2006; Villavicencio *et al.*, 2007). En endometrio de mujeres normales, la alta proliferación a la cual está expuesto el endometrio es compensada por la eliminación de la capa funcional mensualmente, pero en la mayoría de las mujeres con SOP no existe la descamación endometrial (Villavicencio *et al.*, 2006).

3. FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR

3.1. Características generales de VEGF

El VEGF, en particular VEGF-A es un potente mitógeno y morfógeno para células endoteliales, clave para la linfangiogénesis y angiogénesis fisiológica y tumoral. Pertenece a una familia que comprende, además, seis glicoproteínas secretables designadas VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, factor de crecimiento placentario (PlGF) y VEGF-F (Otrock *et al.*, 2007). Los miembros de la familia VEGF se unen a receptores identificados como VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (KDR/Flk-1), expresados selectivamente en el endotelio vascular, y, VEGFR-3, expresado principalmente en el endotelio linfático (Figura 3). Estos factores realizan su actividad biológica al unirse al dominio extracelular de sus receptores transmembrana tirosina-quinasa, activando una cascada de proteínas, luego de la dimerización y autofosforilación del receptor intracelular tirosina-quinasa. Se ha descrito otro tipo de receptores, neuropilina 1 y 2, también de alta afinidad, pero no tienen actividad tirosina - quinasa, que presentan un dominio citoplasmático pequeño y sus funciones no son bien conocidas aún (Xie *et al.*, 2004; Otrock *et al.*, 2007).

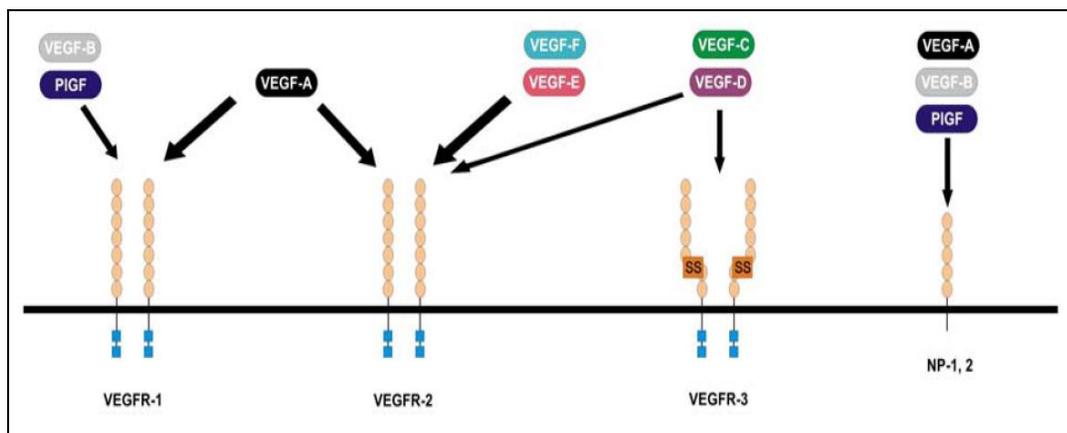


Figura 3. Interacción de la familia VEGF con sus receptores (Otrock *et al.*, 2007).

El gen para el VEGF humano está ubicado en el cromosoma 6p12 y organizado en 8 exones, separados por 7 intrones. Es expresada y secretada tanto por múltiples

células tumorales humanas y animales (Senger *et al.*, 1993), como por células no tumorales. Sus efectos se observan principalmente en células endoteliales vasculares, incrementando su proliferación, migración, sobrevivencia y permeabilidad vascular (Xie *et al.*, 2004; Otrrock *et al.*, 2007) y participa en procesos angiogénicos como reparación de heridas, mantención de la presión sanguínea, ovulación, menstruación y preñez (Otrrock *et al.*, 2007).

3.2. Funciones biológicas de VEGF

Las células endoteliales son su principal blanco para ejercer sus funciones de sobrevivencia, proliferación y migración. Así, actúa como factor de sobrevivencia e inhibidor de la apoptosis principalmente a través de la activación de la vía anti-apoptótica PI3K (fosfatidil inositol 3 quinasa). Ésta, al producir PIP3 (fosfatidil inositol trifosfato) activa a AKT (proteína quinasa B) (Gerber, *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 2004). A través de una potente activación de ERK1/2 (quinasa reguladora de la señal extracelular 1/2), y junto a la activación de PKC (proteína quinasa C), tendrían un papel clave en la respuesta proliferativa de las células endoteliales (Otrrock *et al.*, 2007). La vía PI3K/AKT reorganiza los filamentos de actina y a través de la activación de p38 MAPK (proteína quinasa activadora mitogénica), estimularía la migración de las células endoteliales (Xie *et al.*, 2004; Otrrock *et al.*, 2007).

El VEGF también participa en la angiogénesis fisiológica promoviendo la proliferación de vasos, crucial para una amplia variedad de procesos fisiológicos, tales como la curación de heridas y funciones reproductivas como el desarrollo embrionario, ovulación y la menstruación, mediante la interacción con sus receptores, actuando sobre las células endoteliales (Ferrara y Davis-Smith, 1997; Otrrock *et al.*, 2007). Ahora bien, VEGF del mismo modo actúa en la angiogénesis patológica, ya que a través de hibridación *in situ* se ha demostrado una regulación positiva del mRNA de VEGF en células tumorales de pulmón, tiroides, glándula mamaria, tracto gastrointestinal, riñón y vejiga, ovario y cérvico-uterinas, carcinomas, angiosarcomas, tumores de células germinales, entre otros. También se han encontrado aumentados las concentraciones séricas de VEGF en pacientes con cáncer (Ferrara y Davis-Smith, 1997).

Por otro lado, VEGF podría promover la permeabilidad vascular como paso de la angiogénesis, causando la extravasación de proteínas plasmáticas, que formarían una base de fibrina extravascular que soportaría la migración y crecimiento de las células endoteliales, aunque existen investigaciones con ratones *knockout*, tendientes a demostrar que la angiogénesis y la permeabilidad vascular en respuesta a VEGF son procesos independientes y tienen lugar por vías diferentes de señalización (Eliceiri *et al.*, 1999).

La participación VEGF es clave en la angiogénesis a través de la acción con sus receptores, manifestándose en el adulto, principalmente en el sistema reproductivo femenino en condiciones fisiológicas, como en el folículo ovárico, cuerpo lúteo y endometrio (Maas *et al.*, 2002). Participa también en el desarrollo embrionario, en el crecimiento normal y diferenciación, en la ovulación y menstruación (Ferrara y Davis-Smith, 1997; Otrrock *et al.*, 2007). El VEGF y sus receptores han sido implicados como participantes claves en la remodelación vascular y placentación de la mujer, oveja, cerda y marmota en la fase tardía de la preñez, por lo que alteraciones en el balance con sus receptores en el momento de la implantación, podría resultar en defectos en el desarrollo del trofoblasto (Meduri *et al.*, 2000), así como también la inhibición de VEGF en ratón, impide el edema uterino inducido por los estrógenos y la implantación, y, en ratas, el número de sitios de implantación se reduce después de bloquear a VEGF (Rockwell *et al.*, 2002; Rabbani y Rogers, 2002).

Otras funciones han sido descritas para VEGF, tales como: inmunosupresión, estimulación y reclutamiento de células hematopoyéticas derivadas de la médula ósea y regulación de la supervivencia de células troncales hematopoyéticas (Xie *et al.*, 2004). Además, parece tener un efecto proliferativo en las células epiteliales del endometrio de fase proliferativa tardía, actuando a través del receptor de neuropilina, el cual se encuentra aumentado en estas células (Strowitzki *et al.*, 2006).

3.3. Isoformas de VEGF y sus propiedades bioquímicas

Al menos cinco proteínas se originan del gen VEGF producto de *splicing* alternativo y han sido identificadas y designadas como VEGF 121, VEGF 145, VEGF 165, VEGF 189 y VEGF 206 de acuerdo al número de aminoácidos que las componen (Otrock *et al.*, 2007).

Las isoformas originadas tienen propiedades bioquímicas que dependen de su capacidad de unión a la heparina, determinada por los exones 6 y 7. Así, la ausencia del exón 6 y 7 en la isoforma VEGF 121 le impide unirse a la matriz extracelular (MEC), siendo totalmente difundible; VEGF 145 carece de un fragmento del exón 6 y de todo el 7, junto a VEGF 165 en la cual el exón 6 está ausente, y al ser secretadas, una parte queda retenida en la MEC y otra difunde; VEGF 189 carece de una parte del exón 6 y posee una inserción de 24 aminoácidos ricos en restos básicos y VEGF 206 contiene los 2 exones, quedando completamente en la MEC. Precisamente, se sugiere que las diferentes isoformas pueden estar biodisponibles mediante difusión libre o después de la acción de proteasas sobre las isoformas más grandes (Dvorak, 2002; Ferrara y Davis-Smith, 1997).

Las VEGF 121 y VEGF 165 son las mayormente expresadas en numerosas células normales y anormales del organismo (Xie *et al.*, 2004). Recientemente, se ha observado que VEGF 189 es sobre-expresada en pacientes con metástasis de adenocarcinoma pulmonar (Otrock *et al.*, 2007).

3.4. Regulación de la expresión de VEGF

La expresión del gen VEGF es regulada por una variedad de mecanismos tales como la hipoxia, factores de crecimiento, mutaciones de p53, estrógenos, TSH, promotores de tumores, NO y citoquinas (Meduri *et al.*, 2000; Shibuya, 2001).

La hipoxia es uno de los principales reguladores de la expresión de VEGF (Shibuya, 2001; Xie *et al.*, 2004). Así, en condiciones de hipoxia los factores de transcripción inducibles por la hipoxia-1 y 2 (HIF-1 y HIF-2) son estabilizados y traslocados al núcleo donde activan el gen VEGF a través de un elemento específico denominado elemento de respuesta a la hipoxia (HRE).

También factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor transformante β (TGF- β) y el factor de crecimiento de los queratinocitos inducen la expresión del mRNA de VEGF (Xie *et al.*, 2004). Además, se ha reportado que el factor de crecimiento nervioso (NGF) aumentaría los niveles de mRNA de VEGF y los niveles de proteína en cultivos de ovario de ratas neonatales (Julio-Pieper *et al.*, 2006).

Otro mecanismo que regula la expresión de VEGF son las hormonas esteroidales del ovario; por ejemplo, se ha reportado que el tratamiento con estradiol de células estromales y epiteliales del endometrio, provoca un aumento significativo del mRNA de VEGF, principalmente para las isoformas 121 y 165. Esta inducción no tiene cambios significativos después de la adición de progesterona (Meduri *et al.*, 2000).

3.5. Presencia de VEGF en el endometrio de mamíferos

La presencia del mRNA y de la proteína de VEGF ha sido demostrada en el endometrio humano (Sugino *et al.*, 2002) y en otros mamíferos como primates no humanos (Niklaus *et al.*, 2003; Nayak y Brenner, 2002; Rowe *et al.*, 2003), cerdo (Vonnahme y Ford, 2004), ratón (Chakraborty *et al.*, 1995), hámster dorado (Yi *et al.*, 1999), rata (Rabbani y Rogers, 2001) y conejo (Das *et al.*, 1997) durante todo el ciclo menstrual y estral.

En el endometrio humano se expresa diferencialmente a través del ciclo menstrual, con un aumento en la fase proliferativa tardía y en la fase luteal, periodo que corresponde a la mayor angiogénesis y al aumento de la permeabilidad vascular (Meduri *et al.*, 2000). En mamíferos de ciclo estral, como en el conejo, se ha observado una mayor expresión de los niveles de mRNA de VEGF el día del estro y en la fase secretora durante el periodo peri-implantacional (Das *et al.*, 1997).

4. FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO Y SU RECEPTOR DE ALTA AFINIDAD

4.1. Características generales de NGF y de su receptor de alta afinidad

El NGF fue descubierto hace cinco décadas, y, originalmente caracterizado por su habilidad para estimular el crecimiento, diferenciación, sobrevivencia y mantenimiento de una población específica de neuronas del sistema nervioso periférico y central, durante el desarrollo y después de un daño (Micera *et al.*, 2007). Pertenece a la familia de las neurotrofinas compuesta, además, por el factor nervioso derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3) y neurotrofina 4-5 (NT 4-5). Las neurotrofinas son péptidos glicosilados que se sintetizan en una forma inmadura en los tejidos; NGF es sintetizado como un precursor (proNGF) y experimenta un proceso post-traducciona, a través de las proteasas convertasas (furina y convertasa 1 y 2) responsables de su maduración, para generar y secretar la forma madura b-NGF (Levi-Montalcini *et al.*, 1996; Micera *et al.*, 2007).

NGF se acumula en diferentes tejidos y en la sangre, pero los mecanismos de regulación de su síntesis y liberación aún no han sido completamente clarificados. Por otro lado, NGF es producido y utilizado por varios tipos celulares no neuronales, incluyendo células inflamatorias del sistema inmune, células epiteliales, queratocitos, células musculares lisas y células no neuronales del ovario de rata fetal y neonatal, indicando que NGF puede tener roles fuera del sistema nervioso y, actualmente, es reconocido como un factor pleiotrópico (Lara *et al.*, 1991; Dissen *et al.*, 1995; Micera *et al.*, 2007).

La regulación de NGF podría tener relación con los esteroides ováricos ya que se ha reportado que bajo ciertas condiciones, los estrógenos y la progesterona tiene la capacidad de estimular el mRNA y la proteína NGF en órganos periféricos, específicamente en el útero y glándulas salivales del ratón (Bjorling *et al.*, 2002).

4.2. Funciones biológicas de NGF y de su receptor de alta afinidad

El NGF posee dos receptores con especificidad y actividad celular diferentes, trkA y p75. Mientras p75 une a toda la familia de neurotrofinas con afinidad similar, el receptor trkA es altamente específico en su unión (Figura 4).

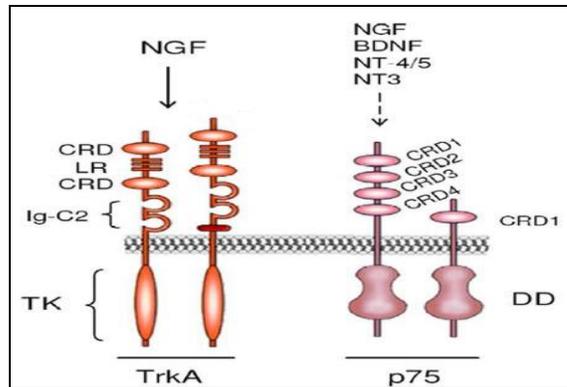


Figura 4. Receptor trkA y p75 de NGF. (De Pablo, 2006). Las flechas discontinuas señalan menor afinidad de la neurotrofina por el receptor y las flechas continuas mayor afinidad de la neurotrofina por el receptor.

El receptor trkA es un receptor transmembrana, perteneciente a la familia tirosina-quinasa y una vez unido a NGF se desencadena una cascada de eventos bioquímicos, manifestando sus funciones biológicas, que van desde la diferenciación y activación hasta la proliferación y la supervivencia de células del tejido nervioso y no nervioso. La realización de estas actividades se deben a la autofosforilación y subsiguiente activación de varias cascadas de transducción de señales, destacándose la activación de MEK la cual activa a ERK, quinasa reguladora extracelular, perteneciente a la familia de las MAPK, desatando la actividad proliferativa de NGF (Nico *et al.*, 2008; Micera *et al.*, 2007). Por otro lado, la activación de la vía PI3K y AKT desencadena la actividad de supervivencia de NGF (Figura 5) (Nico *et al.*, 2008).

Junto con los roles de NGF en el sistema nervioso central y periférico, existen antecedentes de que NGF contribuye en procesos básicos de proliferación y diferenciación de órganos no-neuronales selectivos, tales como el ovario y esto se sustenta en experimentos realizados en ratones con deficiencia de trkA. Estos animales presentan varias anomalías estructurales, incluyendo la reducción de la densidad celular, pérdida de la diferenciación y organización de las células epiteliales y

aparición de estructuras quísticas dentro del epitelio del ovario. Además, de los profundos efectos de la ablación del gen NGF en el crecimiento folicular temprano y la infertilidad posterior de los ratones a los cuales post-natalmente se les bloqueó NGF (Dissen *et al.*, 2001).

Una de las acciones de NGF es su mediación de la angiogénesis durante los procesos de reparación (Micera *et al.*, 2007), destacando que NGF induce la migración de células endoteliales, a través de su receptor trkA y podría hacerlo independientemente de VEGF, como se ha comprobado en cultivos de células aórticas humanas (Dollé *et al.*, 2005).

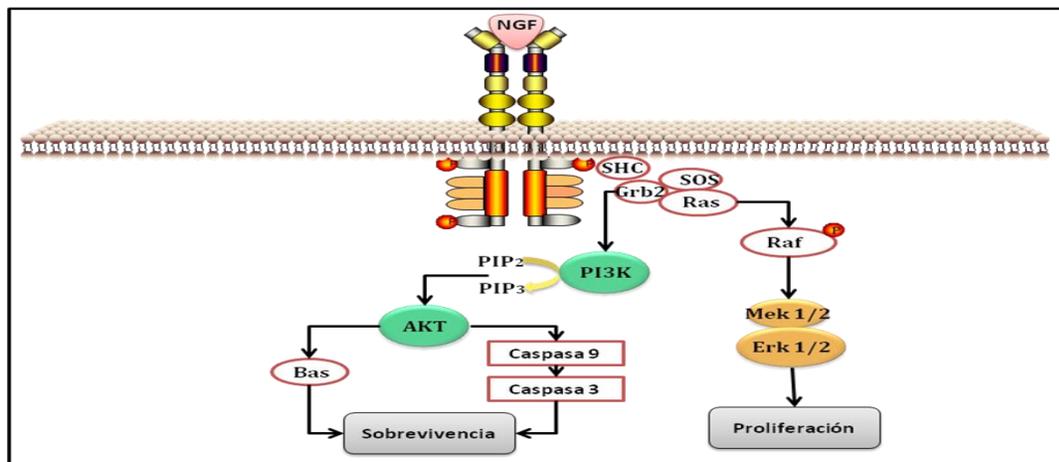


Figura 5. Vías de señalización de NGF. NGF al interactuar con su receptor de alta afinidad, activa sus funciones de proliferación y supervivencia en las células neuronales y no neuronales.

4.3. Presencia de NGF en endometrio de mamíferos

El NGF y trkA están presentes en el útero del hámster dorado y su expresión es estimulada por estrógeno y progesterona, sugiriendo que NGF y trkA podrían estar involucrados en la regulación del crecimiento uterino y proliferación del endometrio durante el ciclo estral (Shi *et al.*, 2006).

En el endometrio humano se ha detectado la presencia de trkA, escasamente expresado en endometrio de fase proliferativa en comparación a los endometrios de fase secretora (Shibayama y Koizumi, 1996).

En consecuencia, los antecedentes indican que tanto la expresión de NGF como de VEGF, importantes participantes del proceso de angiogénesis y crecimiento del tejido endometrial, está regulada por los esteroides de origen ovárico. Por lo tanto, la alteración endocrina metabólica presente en el SOP pudiese constituir un factor negativo que llevaría a una desregulación de la homeostasis de tejidos blanco de las hormonas esteroidales ováricas, como el endometrio. Así, los procesos y respuesta celular de este tejido pueden verse afectados en esta patología.

HIPOTESIS

Los niveles de expresión de VEGF, de NGF y de su receptor de alta afinidad trkA, están elevados en el endometrio de mujeres con síndrome de ovario poliquístico (SOP), en relación a los endometrios de mujeres controles.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si existen diferencias en los niveles de VEGF, NGF y de su receptor de alta afinidad, trkA, en endometrios de mujeres con síndrome de ovario poliquístico, respecto a los endometrios de mujeres controles.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar, por inmunohistoquímica, si se modifica la expresión proteica de VEGF, NGF y trkA en endometrios de mujeres controles, a través del ciclo menstrual.
2. Detectar, por inmunohistoquímica, y semicuantificar la presencia de VEGF, NGF y trkA en tejidos endometriales de mujeres con SOP, y analizar si difieren de los datos obtenidos en los endometrios de mujeres controles.
3. Evaluar, por RT-PCR, si los niveles de mRNA de VEGF y NGF son mayores en endometrios de mujeres con SOP comparados con endometrios controles.

MATERIALES Y METODOS

1. OBTENCION DE LAS MUESTRAS

Los tejidos endometriales fueron obtenidos de cuatro grupos de mujeres que asistieron al Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (HCUCH), Campus Norte. Previamente firmaron un consentimiento escrito e informado, aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y del HCUCH (Anexo 1).

1.1. Endometrio de mujeres controles

Los endometrios correspondientes a controles fueron extraídos de mujeres voluntarias, con fertilidad probada, ciclos menstruales regulares, sin tratamiento hormonal tres meses previo a la obtención de la muestra; sometidas a histerectomía por patologías benignas de útero, las cuales no interfieren con este estudio. Las muestras fueron separadas en dos grupos, de acuerdo a la fase del ciclo en que se encontraban al momento de su obtención.

1.2. Endometrio de mujeres con SOP

Estas muestras de endometrio fueron obtenidas, mediante una cánula de Pipelle, de mujeres diagnosticadas con SOP, sin tratamiento hormonal ni farmacológico a la fecha del estudio, cumpliendo con al menos dos de los criterios establecidos en el consenso de Rotterdam para el diagnóstico de la patología. Estos son: oligo o anovulación; ovarios poliquísticos a la ultrasonografía; signos clínicos y/o bioquímicos de hiperandrogenismo (testosterona sérica > 0,6 ng/mL y/o índice de andrógenos libres (IAL) > 4,5).

Se debe mencionar que algunas pacientes presentaron signos clínicos de hiperinsulinemia (obesidad androide: índice de masa corporal > 27, índice cintura/cadera >88 cm, con o sin acantosis nigricans). Debido a esto último, se realizó

un test de tolerancia a la glucosa oral (TTGO) a cada paciente, con el fin de conocer su condición de resistencia a la insulina. Para ello, se extrajo una muestra de sangre de cada paciente, a las cuales se les midió glicemia e insulinemia basal y post carga a los 120 min, previa ingestión de 75 g de glucosa.

Los criterios de exclusión para la toma de muestras fueron pacientes con prolactina (PRL) > 35ng/mL, testosterona total > 2ng/mL, dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS) > 4000 ng/mL, 17-OH progesterona > 2,5ng/mL, TSH > 5 μ UI/L, diabetes, tratamiento hormonal, insulino sensibilizadores y/o con citrato de clomifeno.

1.3. Análisis morfológico y fechaje histológico

Se realizaron cortes de 5 μ m de espesor en las muestras de tejidos endometriales incluidas en parafina, y luego teñidos con hematoxilina-eosina para la evaluación de la arquitectura endometrial y fechaje histológico por un médico anatómo patólogo. Para determinar la etapa del ciclo menstrual en la cual se encontraban las donantes de los tejidos extraídos, se consideró, además, la fecha de la última menstruación (FUM) referida por la paciente, las concentraciones plasmáticas de estradiol, progesterona y el ya mencionado fechaje histológico mediante el criterio de Noyes (Noyes *et al.*, 1950). En cuanto a los tejidos SOP correspondieron a aquéllos compatibles morfológicamente con la fase proliferativa del ciclo menstrual (ESOPp) y los de fase secretora (ESOPs), fueron clasificados por similitud morfológica con los endometrios controles de fase secretora y por concentraciones plasmáticas de progesterona por sobre los 4 ng/mL, correspondiendo a mujeres con ovulación espontánea, que no fueron sometidas a inducción de ovulación, ni recibieron terapia hormonal.

Posteriormente, se procedió al desarrollo de los estudios detallados a continuación:

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Una vez diagnosticadas como pacientes SOP o Control y después de obtenerse las muestras de tejidos endometriales de las pacientes, una fracción de éstos fue congelada en N₂ líquido y almacenada a -80°C, para los estudios de semicuantificación génica. Por otro lado, otra fracción fue fijada en formalina tamponada e incluida en parafina para el análisis morfológico y para el estudio de inmunohistoquímica.

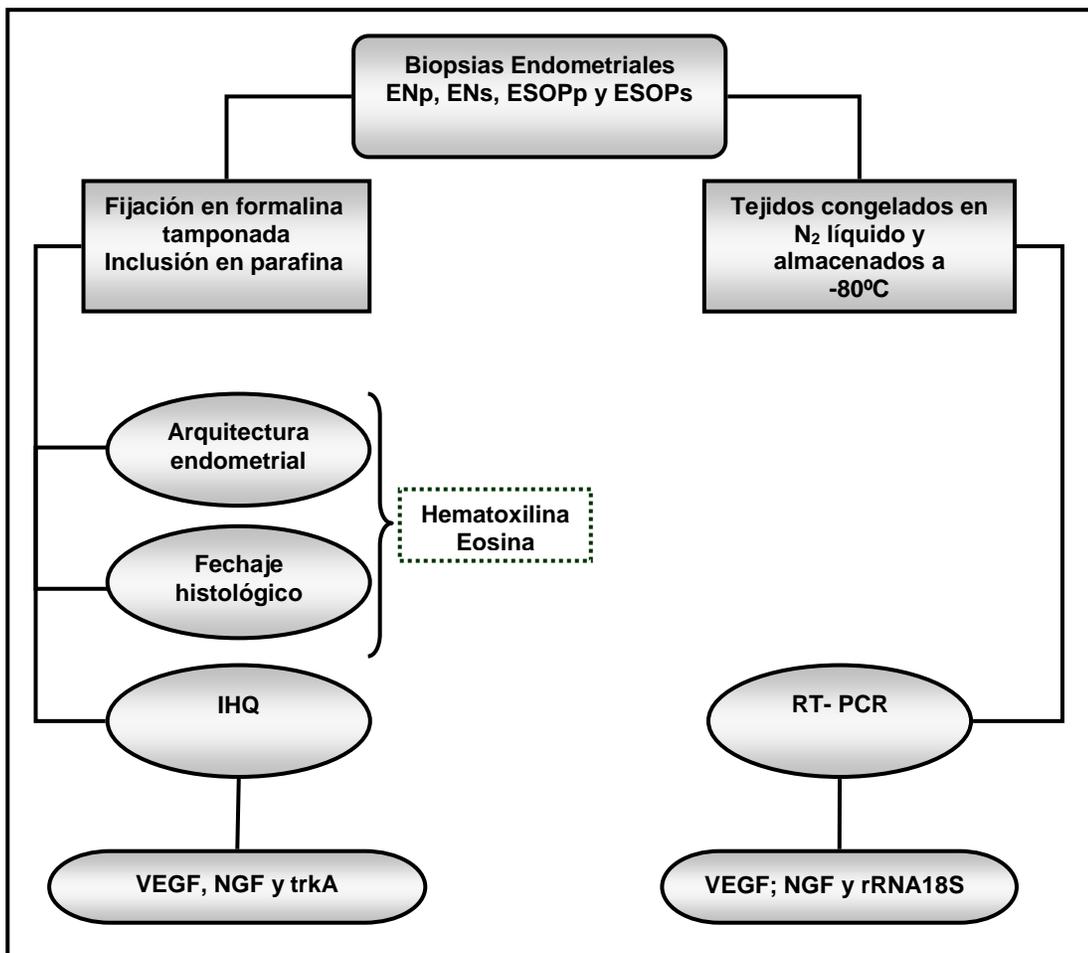


Figura 6. Diseño Experimental: Endometrio control de fase proliferativa (ENp); endometrio control de fase secretora (ENs); endometrio SOP de fase proliferativa (ESOPp); endometrio SOP de fase secretora (ESOPs).

3. METODOS DE ANALISIS DE MUESTRAS

3.1. Estudio Inmunohistoquímico

La evaluación histológica se realizó en cortes obtenidos de los cuatro subgrupos de estudio con el fin de describir las características morfológicas de cada tejido y de detectar la presencia en endometrio de las proteínas VEGF, NGF y trkA. Los tejidos fueron desparafinados en xilol y rehidratados en concentraciones seriadas de alcohol. La recuperación antigénica se realizó incubando en una solución de citrato de sodio 10 mM, pH 6 por 20 min a 96-98°C. Para bloquear la acción de peroxidasas endógenas, los cortes se trataron con peróxido de hidrógeno al 3% en agua destilada por 30 min. Posteriormente, para evitar las uniones inespecíficas, se incubaron por 10 min con el bloqueador específico del kit Histostain^R SP (Zimed laboratorios Inc, N° catálogo 95-9943-B, San Francisco, California, USA), y luego se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios correspondientes a cada ensayo. El tiempo, temperatura, dilución y los anticuerpos utilizados, se señalan en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los anticuerpos utilizados en la realización de las técnicas de inmunohistoquímica

Anticuerpo Primario	Procedencia	Tipo de Anticuerpo	Dilución	Tiempo	Temperatura
NGF	Donación del Dr. HF Urbansky Oregon Regional Primate Research Center	Policlonal	1:700	<i>Overnight</i>	4°C
trkA	Santa Cruz H-190: sc-14024	Policlonal	1:350	<i>Overnight</i>	4°C
VEGF	Ab cam: ab 1316	Monoclonal	1:1000	<i>Overnight</i>	4°C

Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se agregó el anticuerpo secundario biotinilado por 20 min y después se incubaron las muestras con el sistema estreptavidina-peroxidasa a temperatura ambiente por 20 min. Se utilizó peróxido de hidrógeno como sustrato final de la reacción y diaminobencidina como cromógeno, por lo cual la tinción positiva fue de color café. Los tejidos fueron

contrateñidos con hematoxilina para destacar los núcleos de color azul-claro. Cada muestra tuvo un control negativo, al cual no se le agregó el anticuerpo primario.

Para la evaluación de cada muestra, se realizaron tres observaciones distintas, por tres observadores independientes y ciegos a la categoría de ellas. Cada muestra fue evaluada según el porcentaje de células positivas en una escala de tinción, con las siguientes intensidades: 0 (sin tinción), 1 (leve), 2 (moderada) y 3 (intensa). Para el cálculo de las células teñidas se aplicó la siguiente fórmula de HScore (HS), validada en el Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción del HCUCH (Quezada *et al.*, 2006; Villavicencio *et al.*, 2006). HS, integra la intensidad de la tinción y el porcentaje de células positivas en la fórmula:

$$HS = \frac{\sum \% \text{ células teñidas } \times (i+1)}{100}$$

3.2. Estudio de la reacción de polimerización en cadena de DNA complementario (RT-PCR)

Por medio de esta técnica se evaluaron los niveles de mRNA de NGF y VEGF. Para la extracción del RNA total se utilizaron 20-50 mg de tejidos endometriales, aproximadamente, previamente congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C, los cuales fueron homogenizados con 800 µL de TRIZOL (Invitrogen N° catálogo 15596-026, Carlsbad CA, USA), en ultraturax. Las fases fueron separadas mediante centrifugación (16000 g por 15 min a 4°C), previa adición de 160 µL cloroformo. Luego, se traspararon 400 µL del sobrenadante a un nuevo tubo "Eppendorf", se le adicionó el mismo volumen de isopropanol frío y se dejó toda la noche a -20°C, para precipitar el RNA. La mezcla se centrifugó (16000 g por 20 min a 4°C), luego se eliminó el sobrenadante y se realizó un lavado con 1 mL de etanol al 75%. Nuevamente se centrifugó (16000 g, por 10 min a 4°C), se eliminó el sobrenadante y se dejó secar;

finalmente, fue suspendido en 10 μ L de buffer TE 1X y se midió en un espectrofotómetro a 260 y 280 nm para el cálculo de la concentración y pureza del RNA extraído,

El DNA complementario (cDNA) se sintetizó a partir de 2 μ g del RNA extraído y tratado con DNAasa I, utilizando la enzima M-MLV Transcriptasa Reversa (Invitrogen N° catálogo 28025-013, Carlsbad CA, USA), se amplificó según los protocolos estandarizados previamente en el Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción del HCUCH (Julio-Pieper *et al.*, 2006), utilizando partidores específicos para cada gen a evaluar. Para un volumen final de 25 μ L, fueron ajustados 2 μ L de cDNA en una mezcla que contenía los siguientes reactivos:

- a) NGF: 2,5 μ L Buffer PCR 10X (Tris-HCl pH 8,4 200 mM, KCl 500 mM, Biotools, Madrid, España), 1 μ L MgCl₂ (50mM), 0,5 μ L desoxinucleotidos (dNTPs)(10mM), 0,15 μ L DNA polimerasa (5 UI/ μ L, Biotools, Madrid, España), 2,5 μ L de cada partidador NGF (10mM).
- b) VEGF: 2,5 μ L Buffer PCR 10X (Tris-HCl pH 8,4 200 mM, KCl 500 mM, Biotools, Madrid, España), 1 μ L MgCl₂ (50mM), 0,5 μ L desoxinucleotidos (dNTPs)(10mM), 0,15 μ L DNA polimerasa (5 UI/ μ L, Biotools, Madrid, España), 2,5 μ L de cada partidador VEGF (10 mM).
- c) rRNA18S: 2,5 μ L Buffer PCR 10X (Tris-HCl pH 8,4 200 mM, KCl 500 mM, Biotools, Madrid, España), 1,5 μ L MgCl₂ (50mM), 0,5 desoxinucleotidos (dNTPs)(10mM), 0,15 μ L DNA polimerasa (5 UI/ μ L, Biotools, Madrid, España), 0,5 μ L de cada partidador rRNA18S (10mM).

La reacción se realizó en los termocicladores, Mastercycler Personal (Eppendorf AG, Foster city, CA, USA) y Termocycler PTC 100 (MJ Research Inc, Watertown MA, USA), utilizando los partidores y las condiciones expuestas (Tablas 2 y 3), que fueron estandarizadas en el Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción del HCUCH.

Los productos amplificados fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en presencia de bromuro de etidio y en todas las muestras se amplificó un control interno, rRNA18S. Los productos de PCR se visualizaron con un transiluminador UV conectado a una cámara digital. Las imágenes fotografiadas de los geles fueron grabadas en un computador. Posteriormente, las imágenes se analizaron con un programa de densitometría (UN-SCAN-IT gel 4.1, Silk Scientific Corporation, Orem UT, USA), el cual mide el número de píxeles en un área seleccionada de la muestra, y es normalizado con el valor densitométrico de un gen constitutivo. Los resultados se expresaron como la razón entre el mRNA del gen estudiado y el gen constitutivo (rRNA18S). Para comparar con los otros grupos de endometrios, a los endometrios controles (ENp y ENs) se les asignó el valor arbitrario de 1.

Tabla 2. Secuencia de partidores utilizados

PARTIDOR	PRODUCTO	SENSE	ANTISENSE
NGF	167 pb	5'-TAAAAAGCGGCGACTCCGTT-3'	5'-ATTCGCCCCTGTGGAAGATG-3'
VEGF ₁₂₁	307pb	5'-AGGCCAGCACATAGGAGAGA-3'	5'-ACCGCCTCGGCTTGTCACAT-3'
VEGF ₁₆₅	236pb		
VEGF ₁₈₉	104pb		
rRNA18S	198 pb	5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3'	5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'

Tabla 3. Condiciones de RT-PCR de los diferentes partidores

PARTIDOR	Nº DE CICLOS	DENATURACION	ANNEALING	EXTENSION
NGF	32	94°C	62°C	72°C
VEGF	27	94°C	62°C	72°C
rRNA 18S	20	94°C	55°C	72°C

4. ANALISIS ESTADISTICO

Para calcular el número de sujetos necesarios para el estudio, se consideró un α de 0,05 y un β de 0,20, siendo de interés detectar como estadísticamente significativa una diferencia entre las medias de 25%. Para dicho cálculo se utilizó la fórmula de comparación de medias, estableciéndose un número de 7 sujetos para cada grupo estudiado. La fórmula es detallada a continuación:

$$n = \frac{2 (Z\alpha + Z\beta)^2 x}{S^2}$$

Donde:

n = sujetos necesarios en cada una de las muestras

S = desviación estándar

d = diferencia que se espera estimar como estadísticamente significativa

Z α = Valor Z correspondiente al riesgo deseado

Z β = Valor Z correspondiente al riesgo deseado

Los resultados se expresaron en todos los ensayos como promedio \pm error estándar de la media (EEM), comparándose endometrios controles de fase proliferativa versus (vs) endometrios controles de fase secretora, endometrios controles de fase proliferativa vs SOP de fase proliferativa y endometrios controles de fase secretora vs SOP de fase secretora. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa computacional Graph Pad Prism 5.0, en el cual se realizó el test de Kolmogorov – Smirnov para evaluar la normalidad de la distribución de los datos. Posteriormente, para datos paramétricos se utilizó el test de t de Student, mientras que para datos no paramétricos se usó el test de Mann-Whitney. Como criterio de significación se consideró un $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y METABÓLICAS DE LAS PACIENTES EN ESTUDIO

Las biopsias endometriales fueron obtenidas de 18 mujeres controles de fase proliferativa, de 18 de fase secretora y 25 mujeres diagnosticadas con SOP, de las cuales se obtuvieron 12 endometrios compatibles morfológicamente con la fase proliferativa y 13 endometrios de mujeres que habían reactivado sus ciclos ovulatorios espontáneamente, y morfológicamente fueron compatibles con la fase secretora del ciclo menstrual.

Las características clínicas de las pacientes incluidas en este estudio, fueron comparadas entre los grupos controles y SOP en la Tabla 4. En ella se observa que las pacientes con SOP de fase proliferativa poseen un índice de masa corporal (IMC) significativamente mayor, indicando sobrepeso u obesidad, comparadas con las mujeres controles de la misma fase, lo cual es una característica de esta patología. Junto a esto, los niveles plasmáticos de testosterona (T) se encontraron aumentados significativamente en las mujeres con SOP comparadas con las pacientes controles en ambas fases, en cambio los andrógenos no mostraron diferencia significativa en la fase secretora. También, se observó una disminución en las concentraciones plasmáticas de SHBG en las pacientes con SOP versus las pacientes controles, lo que trajo como consecuencia el aumento significativo del índice de andrógenos libres (IAL), tanto en la fase proliferativa como en la secretora del ciclo menstrual. Respecto a las concentraciones plasmáticas de estradiol y progesterona, no se observaron diferencias significativas entre las pacientes en estudio (Tabla 5).

Utilizando como criterio de diagnóstico la medición de insulinemia 120 minutos post carga de 75 gramos de glucosa oral, se obtuvo un 36% de las pacientes SOP de fase proliferativa insulino resistentes y un 23% de las ESOPs (Tabla 6).

Tabla 4. Antecedentes clínicos de las pacientes en estudio

	ENp	ESOPp	ENs	ESOPs
EDAD (Años)	33,3 ± 1,60	26,5 ± 0,70	35,8 ± 2,70	29,9 ± 2,00
IMC (Kg/m²)	26,9 ± 1,30	34,1 ± 1,20*	25,0 ± 1,00	29,7 ± 1,90

Características generales de las pacientes con endometrios: control de fase proliferativa (ENp), con síndrome de ovario poliquístico de fase proliferativa (ESOPp), control de fase secretora (ENs) y con síndrome de ovario poliquístico de fase secretora (ESOPs) e índice de masa corporal (IMC). Los valores son expresados como promedio ± error estándar de la media. *: p<0,05 ENp vs ESOPp.

Tabla 5. Antecedentes hormonales de las pacientes en estudio

	ENp	ESOPp	ENs	ESOPs
E₂ (pg/mL)	73,8 ± 22,4	63,1 ± 4,70	91,0 ± 35,0	138 ± 25,0
P₄ (ng/mL)	0,90 ± 0,50	1,00 ± 0,25	6,90 ± 2,00	4,80 ± 0,90
A₄ (ng/mL)	1,70 ± 0,30	4,50 ± 1,60*	1,60 ± 0,05	2,20 ± 0,40
T (ng/mL)	0,44 ± 0,06	0,87 ± 0,07 *	0,40 ± 0,06	0,66 ± 0,05**
SHBG (nmol/L)	60,0 ± 16,0	23,4 ± 3,10 *	77,7 ± 7,00	38,0 ± 17,9**
IAL	2,70 ± 0,62	14,9 ± 2,50*	1,73 ± 0,20	8,85 ± 3,53**

Mediciones hormonales de las mujeres en estudio: Estradiol (E₂), progesterona (P₄), androstenediona (A₄), testosterona (T), globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG), índice de andrógenos libres (IAL), endometrio control de fase proliferativa (ENp), endometrio de mujeres con síndrome de ovario poliquístico de fase proliferativa (ESOPp), endometrio control de fase secretora y endometrio de mujeres con síndrome de ovario poliquístico de fase secretora (ESOPs). Los valores son expresados como promedio ± error estándar de la media. * p<0,05 ENp vs ESOPp; ** p<0,05 ENs vs ESOPs. **Valores de Referencia:** Fase Proliferativa normal: E₂: 20 – 300 pg/mL; P₄: < 4,0 ng/mL. Fase Secretora normal: E₂: 50 – 150 pg/mL; P₄: >4,0 ng/mL. Para ambos grupos: T: <0,6 ng/mL; A₄: 0,4 – 2,7 ng/mL; SHBG: 30 – 120 nmol/L; IAL < 4,5.

Tabla 6. Valores de glicemia y de insulinemia basal y post carga de las pacientes con SOP sometidas a test de tolerancia a la glucosa oral (TTGO)

	ESOPp nIR	ESOPp IR	ESOPs nIR	ESOPs IR
Glicemia basal (ng/mL)	72 ± 2,53	73,1 ± 4,12	63 ± 3,45	74 ± 5,5
Glicemia 120' post carga (ng/mL)	100 ± 7,5	116 ± 2,3	106 ± 5,5	114 ± 2,6
Insulinemia basal (mUI/mL)	11,3 ± 2,36	20,9 ± 2,1	6,2 ± 1,99	8,2 ± 2,5
Insulinemia 120' post carga (mUI/mL)	40,1 ± 5,3	152,1 ± 18,7	44,6 ± 6,9	161,7 ± 13,2

Mediciones de insulinemia basal y post carga y glicemia de las pacientes sometidas al test de tolerancia a la glucosa oral (TTGO) diagnosticadas con SOP con endometrios: de fase proliferativa no insulino-resistente (ESOPp nIR); de fase proliferativa insulino-resistente (ESOPp IR); de fase secretora no insulino-resistente (ESOPs nIR) y de fase secretora insulino-resistente (ESOPs IR). Índice de masa corporal (IMC). Los valores se expresan como promedio ± EEM. **Valores de Referencia:** Glicemia basal: 70 - 100 mg/dL, glicemia 120 min post carga de glucosa: < 140 mg/dL; Insulinemia Basal: < 20 (mUI/mL), Insulinemia a 120 min post carga de glucosa: < 60 (μIU/mL).

2. INMUNODETECCIÓN Y SEMICUANTIFICACIÓN DE VEGF, NGF Y trkA A TRAVÉS DEL CICLO MENSTRUAL Y EN ENDOMETRIOS DE MUJERES CON SOP

2.1. Estudio inmunohistoquímico de VEGF durante el ciclo menstrual

La inmunotinción de VEGF fue positiva través de todo el ciclo menstrual y estuvo presente en el citoplasma de las células estromales y del epitelio glandular, distribuyéndose de forma homogénea en todas las fases del ciclo.

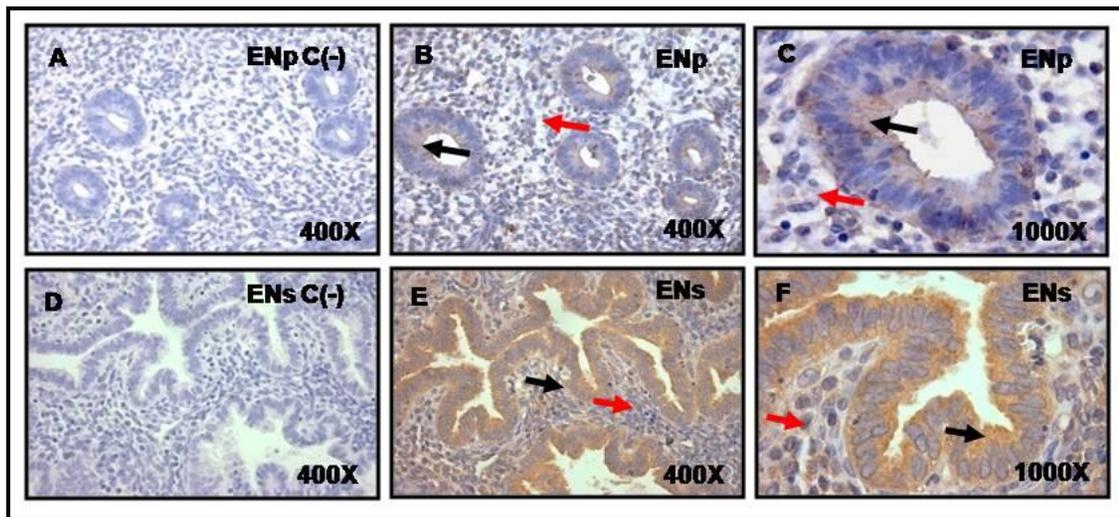


Figura 7. Inmunotinción para VEGF en endometrios controles. A) endometrio control de fase proliferativa (ENp), control negativo; B) ENp; C) ENp; D) endometrio control de fase secretora (ENs), control negativo; E) ENs; F) ENs. \blackrightarrow : Epitelio glandular; $\color{red}\blackrightarrow$: Estroma

La semicuantificación fue realizada por HScore (HS), el cual integra la intensidad de la tinción y porcentaje de células positivas, determinadas por tres evaluadores independientes. Mediante la semi-cuantificación con HS, se observó un aumento significativo de la tinción de los ENs al compararlos con los ENp, tanto para las células del epitelio glandular ($p < 0,001$) como para las células del estroma ($p < 0,01$) (Figura 7) (Gráfico 1). La tinción en las células del epitelio glandular fue más intensa que las de las células estromales en ambas fases del ciclo (Figura 7) (Gráfico 1).

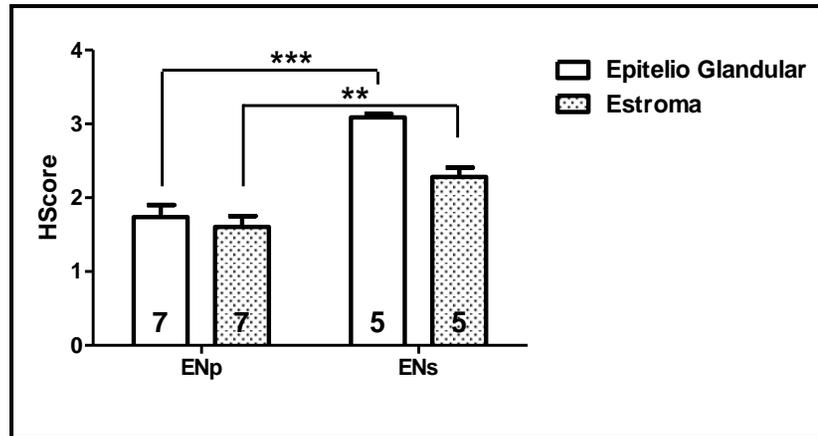


Gráfico 1. Semicuantificación por inmunohistoquímica de VEGF en endometrios de mujeres controles de fase proliferativa (ENp) y de fase secretora (ENs). El ensayo se realizó en células del epitelio glandular y células del estroma de endometrios ENp y ENs. El número de pacientes analizadas fue de 7 para ENp y 5 para ENs. Los resultados se expresaron como HScore promedio \pm error estándar de la media. **: P < 0,01 ENp vs ENs; ***: p < 0,001 ENp vs ENs.

2.2. Inmunodetección de VEGF en endometrios de mujeres con SOP y en endometrios de mujeres controles

Los niveles de expresión de la tinción de VEGF son significativamente mayores en los ESOPp, al compararlos con los ENp, en las células del epitelio glandular ($p < 0,001$) y del estroma ($p < 0,001$) (Figura 8) (Gráfico 2). Además, se debe destacar que la tinción se observó más intensa en las células del epitelio glandular en los ESOPp (Figura 8) (Gráfico 2).

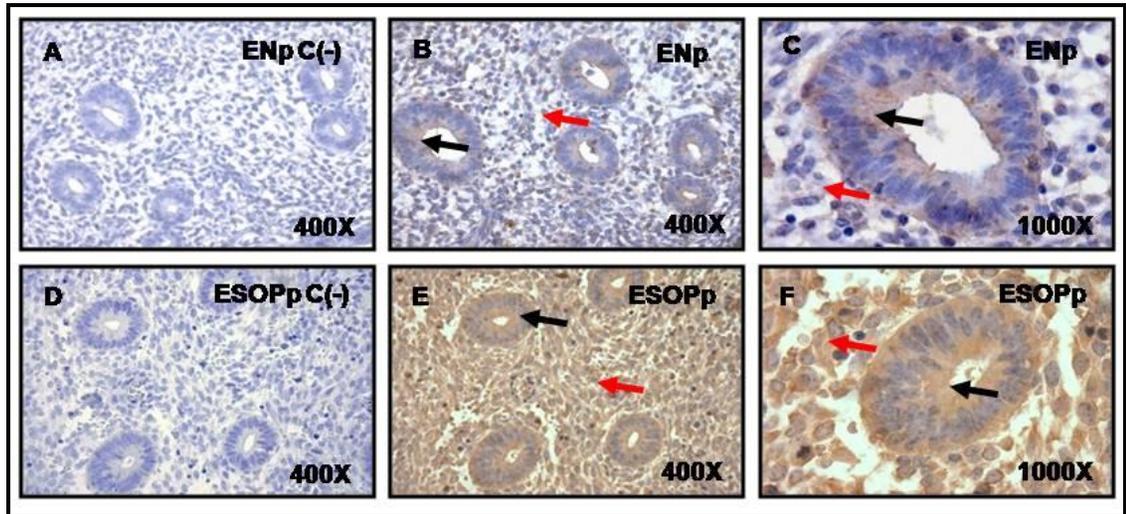


Figura 8. Inmunotinción para VEGF en endometrio de mujeres controles de fase proliferativa (ENp) y diagnosticadas con SOP de fase proliferativa (ESOPp). A) ENp, control negativo; B) ENp; C) ENp; D) ESOPp, control negativo; E) ESOPp; F) ESOPp. \blackrightarrow : Epitelio glandular; $\color{red}\blackrightarrow$: Estroma.

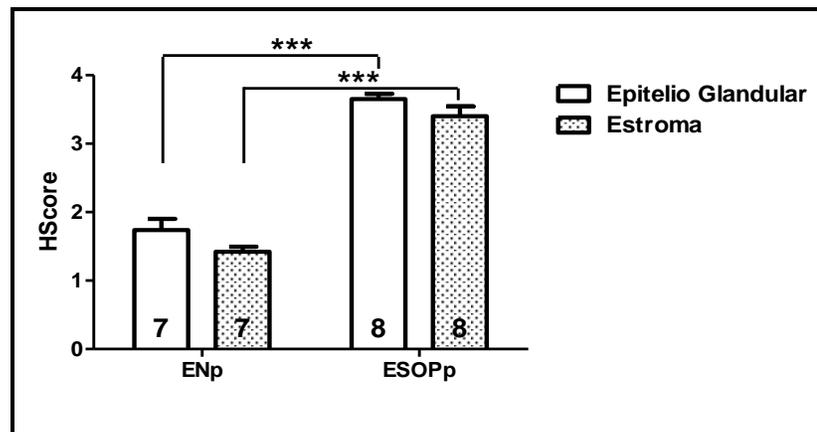


Gráfico 2. Semicuantificación por inmunohistoquímica de VEGF en endometrios de mujeres controles de fase proliferativa (ENp) y con SOP de fase proliferativa (ESOPp). El ensayo se realizó en células del epitelio glandular y células del estroma de endometrios ENp y de mujeres diagnosticadas con SOP de fase proliferativa (ESOPp). El número de pacientes analizadas fue de 7 para ENp y 8 para ESOPp. Los resultados se expresaron como media del HScore \pm error estándar de la media. ***: $p < 0,001$ ESOPp vs ENp.

Al comparar la tinción de VEGF en los ENs con los de ESOPs, no se observaron diferencias significativas (Figura 9) (Gráfico 3).

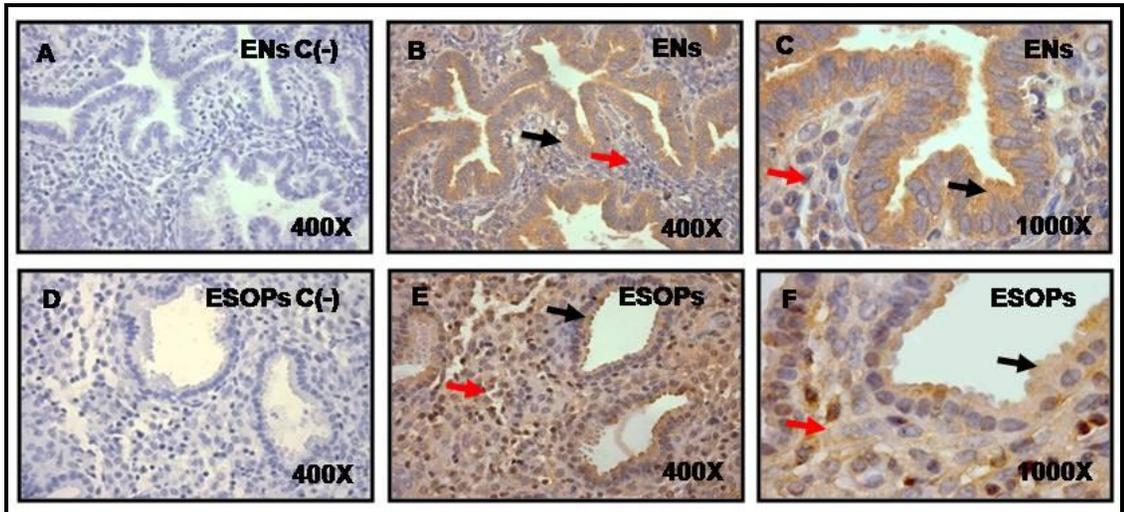


Figura 9. Inmunotinción para VEGF en endometrios controles de fase secretora (ENs) y SOP de fase secretora (ESOPs). A) ENs, control negativo; B) ENs; C) ENs; D) ESOPs, control negativo; E) ESOPs y F) ESOPs. \rightarrow : Epitelio glandular; \rightarrow : Estroma.

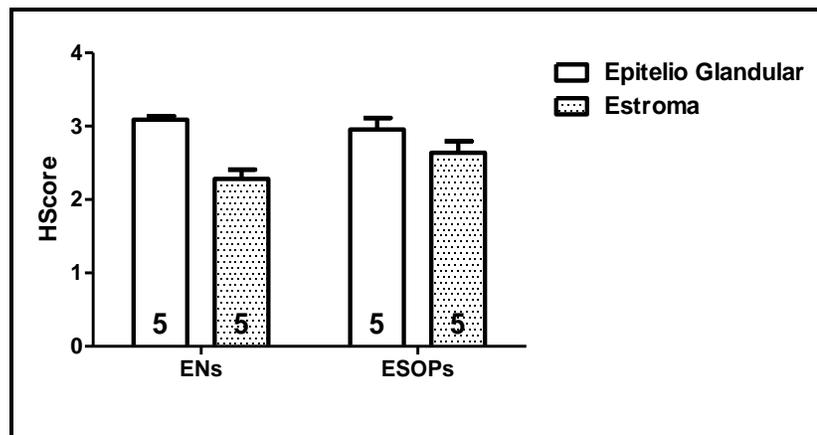


Gráfico 3. Semicuantificación por inmunohistoquímica de VEGF en endometrios de mujeres controles de fase secretora (ENs) y con SOP de fase secretora (ESOPs). El ensayo se realizó en células del epitelio glandular y células del estroma de endometrios ENs y de mujeres diagnosticadas con SOP de fase secretora (ESOPs). El número de pacientes analizadas fue de 5 para ENp y 5 para ESOPs. Los resultados se expresaron como HScore promedio \pm error estándar de la media.

2.3. Estudio inmunohistoquímico de NGF durante el ciclo menstrual

La tinción para NGF estuvo presente en ambas fases del ciclo, tanto en las células epiteliales como en el estroma, y fue predominantemente citoplasmática con distribución homogénea en ambas poblaciones celulares (Figura 10).

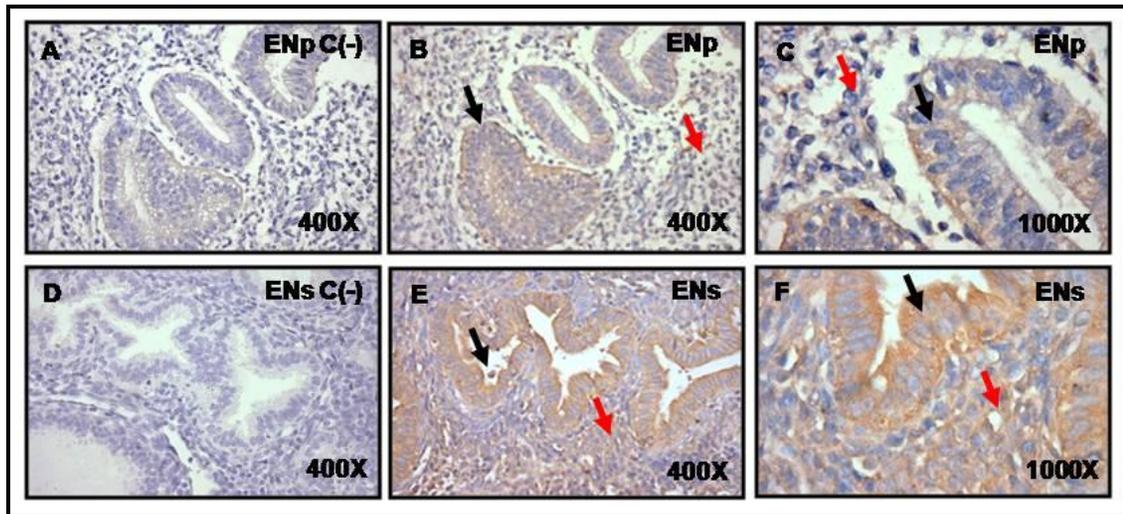


Figura 10. Inmunotinción para NGF en endometrios controles. A) endometrio control de fase proliferativa (ENp), control negativo; B) ENp; C) ENp; D) endometrio control de fase secretora (ENs), control negativo; E) ENs; F) ENs. \blackrightarrow : Epitelio glandular; $\color{red}\blackrightarrow$: Estroma.

Al semi-cuantificar la intensidad de la marca, se observó una expresión significativamente mayor de NGF en los ENs que en los ENp, tanto para el compartimento epitelial ($p < 0,01$) como para el estromal ($p < 0,001$) (Figura 10) (Gráfico 4). Al comparar las poblaciones celulares presentes en el endometrio, se distinguió una mayor intensidad de la tinción en las células epiteliales que en las estromales, en ambas fases del ciclo (Figura 10) (Gráfico 4).

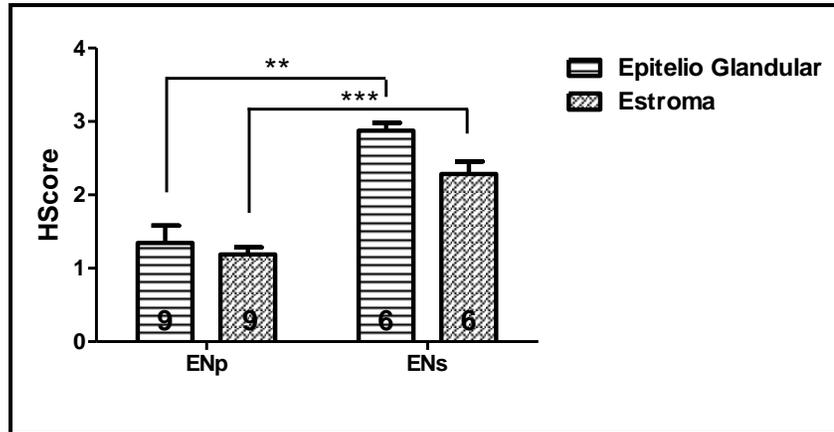


Gráfico 4. Semicuantificación por inmunohistoquímica de NGF a través del ciclo menstrual. El ensayo se realizó en células del epitelio glandular y células del estroma de endometrios control de fase proliferativa (ENp) y de control de fase secretora (ENs). Se evaluaron 9 endometrios de mujeres controles de fase proliferativa (ENp) y 6 de fase secretora (ENs). Los resultados se expresan como HScore promedio \pm error estándar de la media. ** $p < 0,01$ ENp vs ENs; *** $p < 0,001$ ENp vs ENs.

2.4. Inmunodetección de NGF en endometrios de mujeres con SOP y en endometrios de mujeres controles

La expresión de NGF en endometrios de mujeres con SOP fue predominantemente citoplasmática, de distribución homogénea y también presente en ambas poblaciones celulares del endometrio. Por un lado, la intensidad de la tinción de NGF fue significativamente mayor en los endometrios ESOPp, con respecto a los ENp, en las células del epitelio glandular ($p < 0,01$) y estromales ($p < 0,001$) (Figura 11) (Gráfico 5).

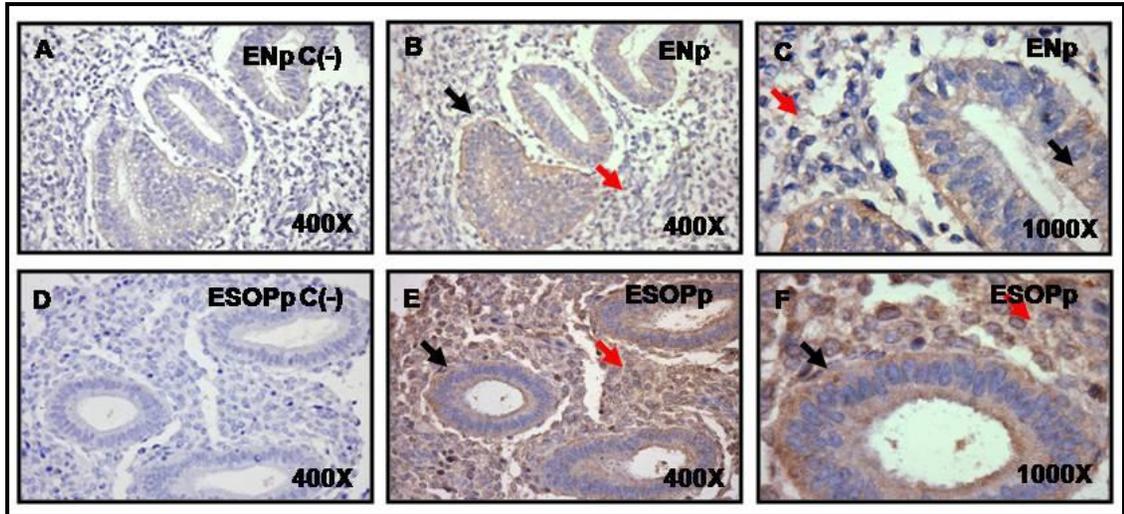


Figura 11. Inmunotinción para NGF en endometrios controles de fase proliferativa (ENp) y endometrios de mujeres con SOP de fase proliferativa (ESOPp). A) ENp, control negativo; B) ENp; C) ENp; D) ESOPp, control negativo; E) ESOPp; F) ESOPp. \blackrightarrow : Epitelio glandular; $\color{red}\blackrightarrow$: Estroma

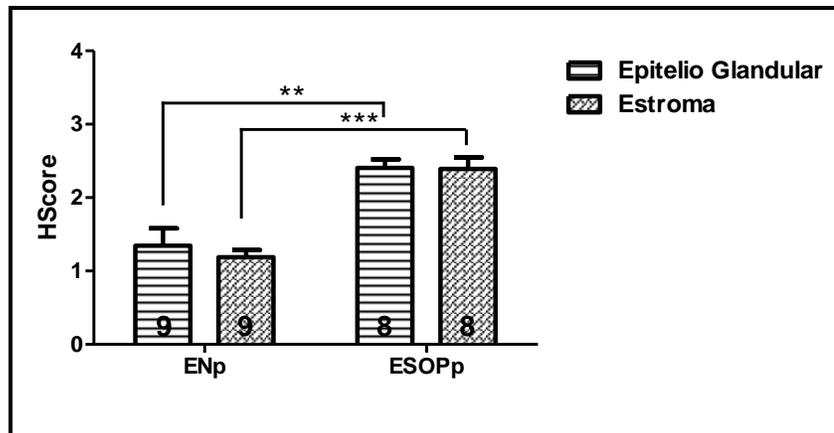


Gráfico 5. Semicuantificación por inmunohistoquímica de NGF en endometrios de mujeres controles de fase proliferativa (ENp) y con SOP de fase proliferativa (ESOPp). El ensayo se realizó en células del epitelio glandular y células del estroma de endometrios ENp y de mujeres diagnosticadas con SOP de fase proliferativa (ESOPp). Se evaluaron 9 endometrios de mujeres controles de fase proliferativa (ENp) y 8 con SOP de fase proliferativa (ESOPp). Los resultados se expresan como HScore promedio \pm error estándar de la media. **: $p < 0,01$ ENp vs ESOPp; ***: $p < 0,001$ ENp vs ESOPp.

Por otro lado, no existieron diferencias significativas al comparar el grado de tinción en los ENs, respecto a los ESOPs (Figura 12) (Gráfico 6).

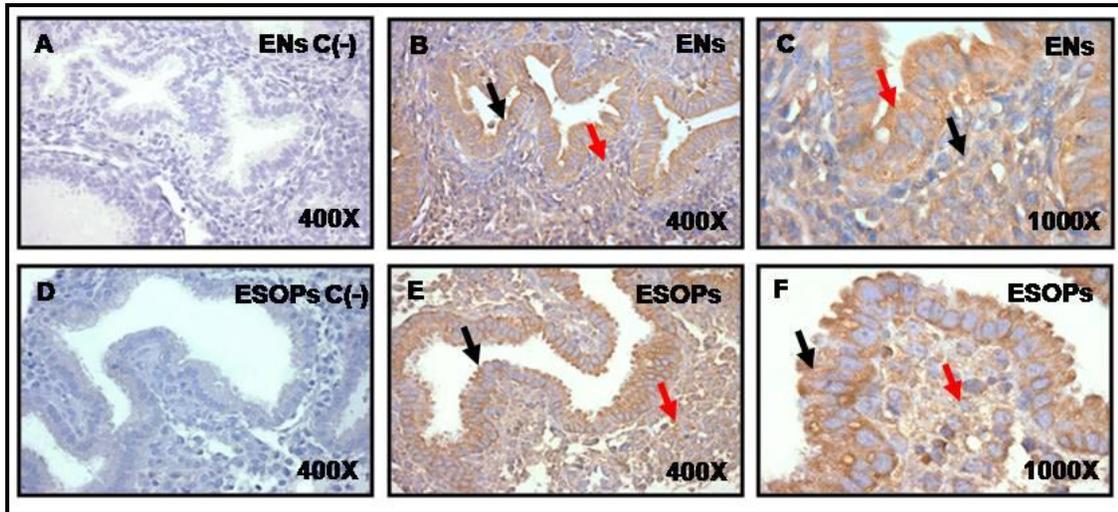


Figura 12. Inmunotinción para NGF en endometrios controles de fase secretora (ENs) y SOP de fase secretora (ESOPs). A) ENs, control negativo; B) ENs; C) ENs; D) ESOPs, control negativo; E) ESOPs y F) ESOPs. \rightarrow : Epitelio glandular; \rightarrow : Estroma.

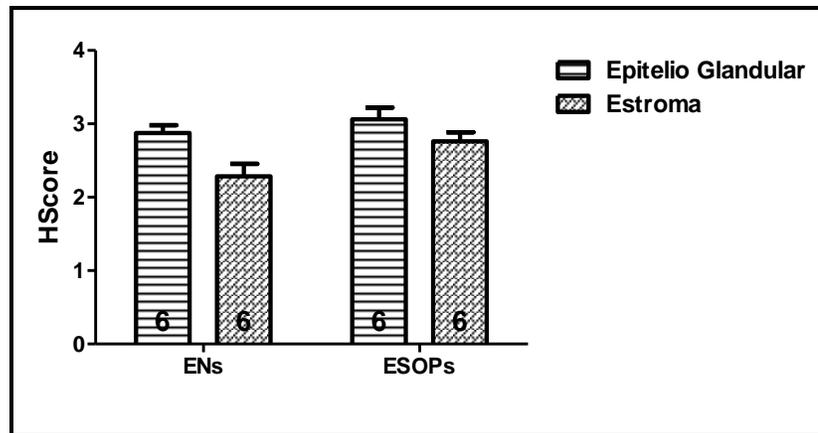


Gráfico 6. Semicuantificación por inmunohistoquímica de NGF en endometrios de mujeres controles de fase secretora (ENs) y con SOP de fase secretora (ESOPs). El ensayo se realizó en células del epitelio glandular y células del estroma de endometrios ENs y de mujeres diagnosticadas con SOP de fase secretora (ESOPs). El número de pacientes analizadas fue de 6 para ENs y 6 para ESOPs. Los resultados se expresaron HScore promedio \pm error estándar de la media.

2.5. Estudio inmunohistoquímico de trkA durante el ciclo menstrual

El receptor de alta afinidad de NGF, trkA, se localizó a nivel citoplasmático, tanto en las células epiteliales como estromales de los cuatro grupos en estudio, manifestándose durante todo el ciclo menstrual con diferentes intensidades y con distribución homogénea (Figura 13).

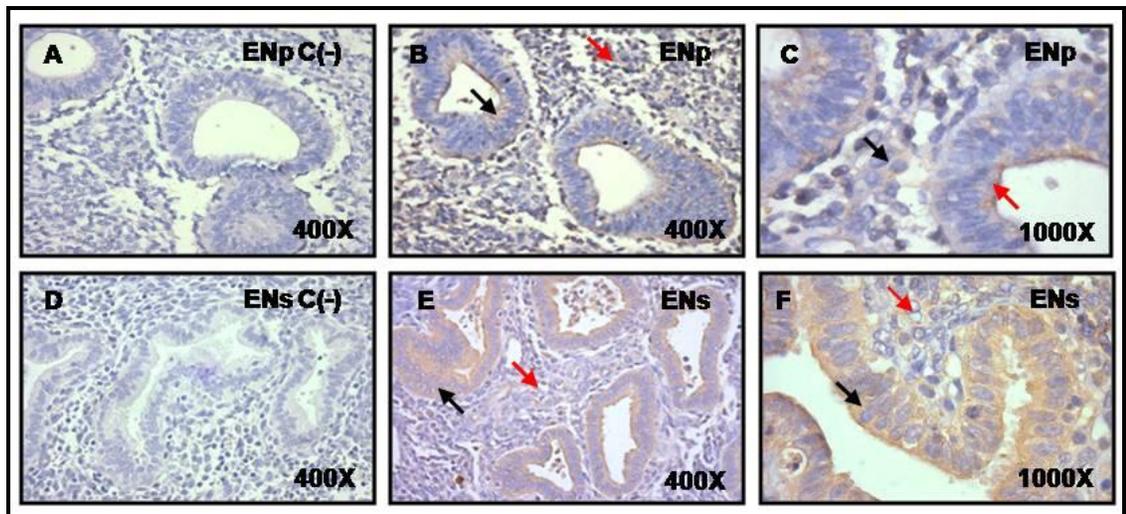


Figura 13. Inmunotinción para trkA en endometrios controles. A) endometrio control de fase proliferativa (ENp), control negativo; B) ENp; C) ENp; D) endometrio control de fase secretora (ENs), control negativo; E) ENs; F) ENs. \blackrightarrow : Epitelio glandular; $\color{red}\blackrightarrow$: Estroma.

Así, al semi-cuantificar la intensidad de la marca por medio de HScore en los endometrios controles, se observó una significativa mayor expresión de esta proteína en los ENs, en comparación con los ENp, tanto para el compartimento epitelial ($p < 0,001$) como para el estromal ($p < 0,001$) (Figura 12) (Gráfico 7). El nivel de intensidad fue mayor en el epitelio glandular que en el estroma, en ambas fases del ciclo (Figura 13) (Gráfico 7).

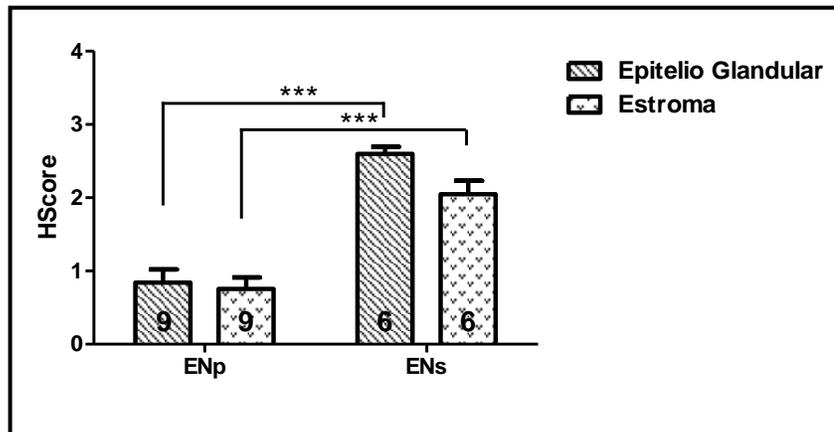


Gráfico 7. Semicuantificación por inmunohistoquímica de trkA en endometrios de mujeres controles de fase proliferativa (ENp) y de fase secretora (ENs). El ensayo se realizó en células del epitelio glandular y células del estroma de endometrios ENp y ENs. El número de pacientes analizadas fue de 6 para ENp y 6 para ENs. Los resultados se expresaron como HScore promedio \pm error estándar de la media. ***: $p < 0.001$ ENs vs ENp.

2.6. Estudio inmunohistoquímico de trkA en endometrio de mujeres con SOP y en endometrio de mujeres controles

La expresión del receptor trkA en los endometrios de mujeres diagnosticadas con SOP fue observada en ambas fases del ciclo, pero al realizar la semi-cuantificación con HScore se manifestó una diferencia significativa al comparar los ENp con los ESOPp, tanto en las células del epitelio glandular ($p < 0,01$) como del estroma ($p < 0,001$) (Figura 14) (Gráfico 8).

Además, la mayor diferencia se observó al comparar las células del estroma de ambos grupos. Sin embargo, no existieron diferencias significativas al comparar los ENs con los ESOPs (Figura 15) (Gráfico 9).

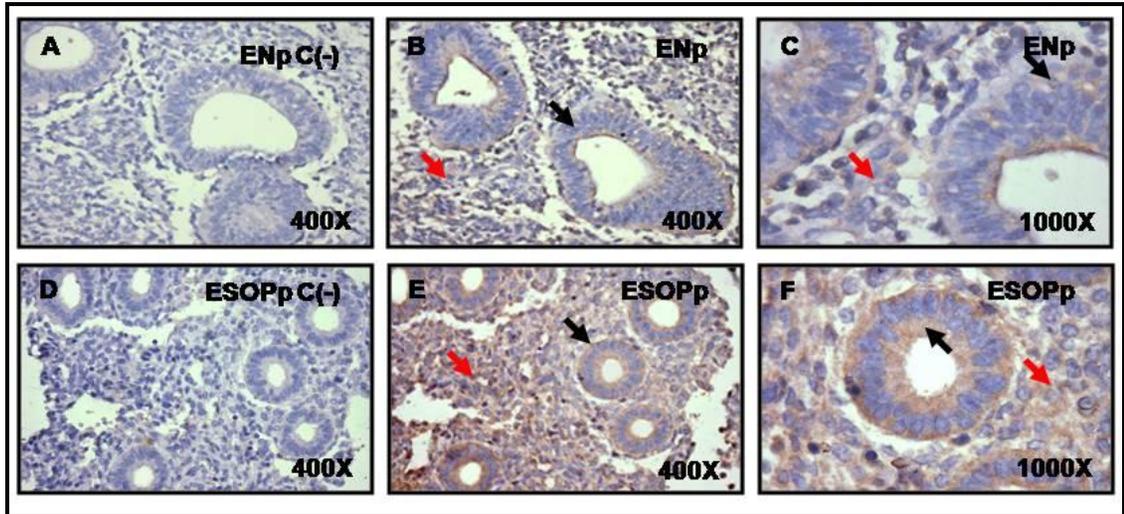


Figura 14. Inmunotinción para trkA en endometrio de mujeres controles de fase proliferativa (ENp) y diagnosticadas con SOP de fase proliferativa (ESOPp). A) ENp, control negativo; B) ENp; C) ENp; D) ESOPp, control negativo; E) ESOPp; F) ESOPp. \blackrightarrow : Epitelio glandular; $\color{red}\blackrightarrow$: Estroma.

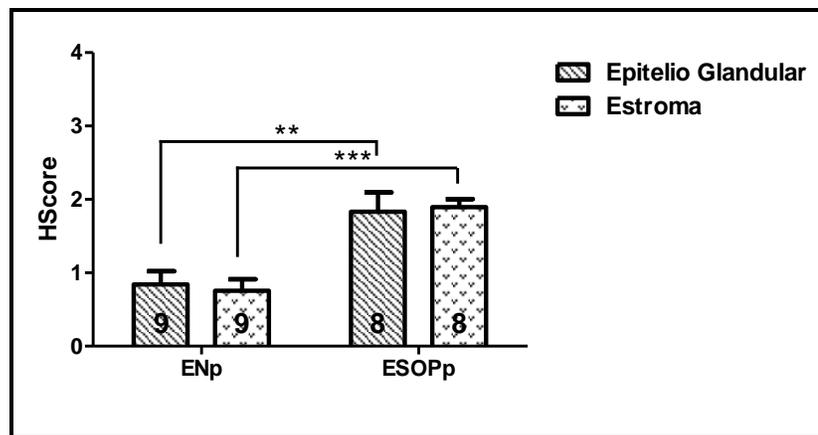


Gráfico 8. Semicuantificación por inmunohistoquímica de trkA en endometrios de mujeres controles de fase proliferativa (ENp) y con SOP de fase proliferativa (ESOPp). El ensayo se realizó en células del epitelio glandular y células del estroma de endometrios ENp y de mujeres diagnosticadas con SOP de fase proliferativa (ESOPp). Se evaluaron 9 endometrios de mujeres controles de fase proliferativa (ENp) y 8 SOP de fase proliferativa (ESOPp). Los resultados se expresan como HScore promedio \pm error estándar de la media. **: $p < 0,01$ ESOPp vs ENp; ***: $p < 0,001$ ESOPp vs ENp.

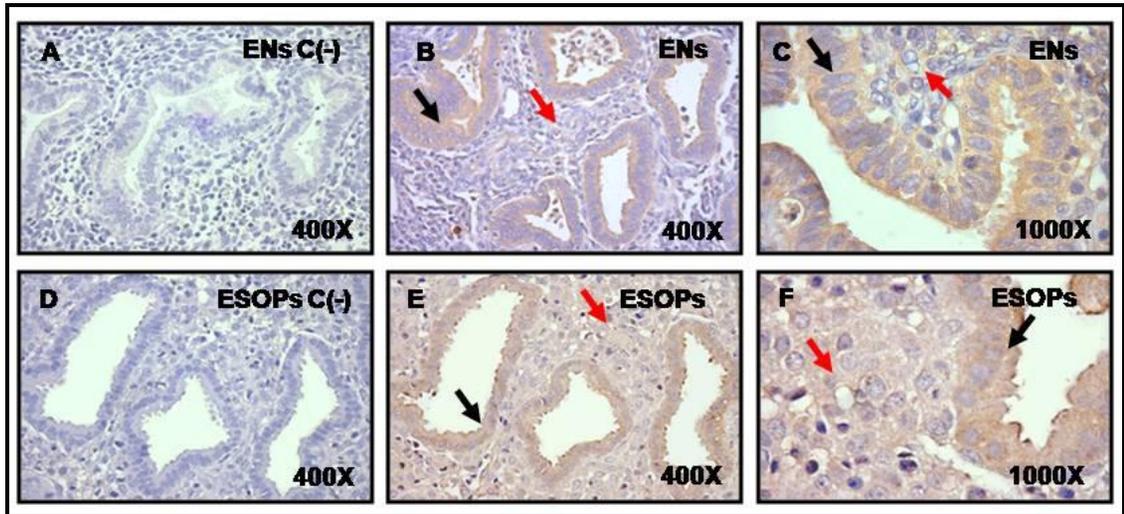


Figura 15. Inmunotinción para trkA en endometrios controles de fase secretora (ENs) y SOP de fase secretora (ESOPs). A) ENs, control negativo; B) ENs; C) ENs; D) ESOPs, control negativo; E) ESOPs y F) ESOPs. \blackrightarrow : Epitelio glandular; $\color{red}\blackrightarrow$: Estroma.

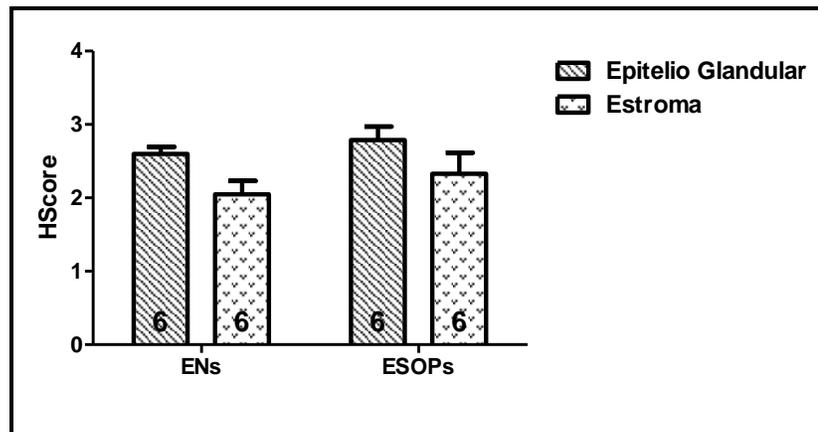


Gráfico 9. Semicuantificación por inmunohistoquímica de trkA en endometrios de mujeres controles de fase secretora (ENs) y con SOP de fase secretora (ESOPs). El ensayo se realizó en células del epitelio glandular y células del estroma de endometrios ENs y de mujeres diagnosticadas con SOP de fase secretora (ESOPs). El número de pacientes analizadas fue de 6 para ENs y 6 para ESOPs. Los resultados se expresaron como HScore promedio \pm error estándar de la media.

3. NIVELES DE mRNA DE NGF Y VEGF EN ENDOMETRIOS DE MUJERES CONTROLES A TRAVÉS DEL CICLO MENSTRUAL Y EN ENDOMETRIOS DE MUJERES CON SOP

3.1. Niveles de expresión de mRNA de NGF en endometrios de mujeres controles, a través del ciclo menstrual y en endometrios de mujeres con SOP

Los niveles de mRNA de NGF fueron semicuantificados en los cuatro grupos de estudio y se compararon ENp vs ENs, ENp vs ESOPp y ENs vs ESOPs, observando una disminución de los niveles de expresión en ESOPp, con respecto a ENp ($p < 0,05$). Sin embargo, al comparar ENp con ENs no se obtuvo diferencias significativas, al igual que entre ENs y ESOPs (Figura 16) (Gráfico 10).

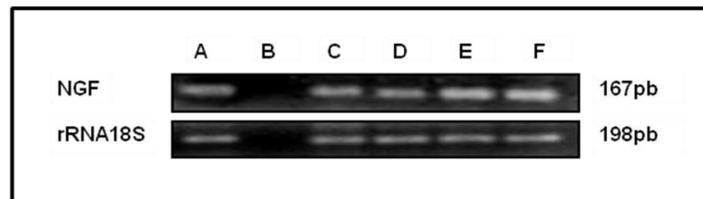


Figura 16. Gel representativo de los resultados obtenidos de la semicuantificación del mRNA para NGF en los cuatro grupos de estudio. (A) Control positivo, células de la granulosa humana; (B) Control negativo; (C) ENp; (D) ESOPp; (E) ENs y (F) ESOPs.

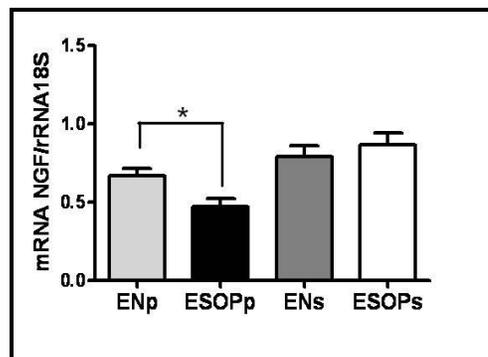


Gráfico 10. Semicuantificación del mRNA para NGF en los cuatro grupos de estudio. Los valores fueron normalizados con rRNA 18S y son expresados como media \pm EEM. *: $p < 0.05$ ESOPp vs ENp.

3.2. Niveles de expresión de mRNA de VEGF en endometrios de mujeres controles, a través del ciclo menstrual y en endometrios de mujeres con SOP

La semicuantificación de las isoformas de VEGF mostraron que la isoforma mayormente expresada en el endometrio humano fue VEGF₁₆₅ y la de menor expresión fue VEGF₁₈₉ (Figura 17). Las isoformas VEGF₁₂₁ y VEGF₁₆₅ no manifestaron cambios significativos a través del ciclo menstrual, ni al comparar los endometrios de mujeres controles con los de mujeres con SOP en ambas fases del ciclo menstrual (Figura 16) (Gráficos 11 y 12).

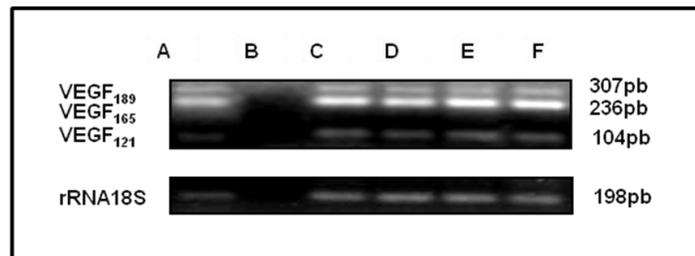


Figura 17. Imagen representativa de los resultados obtenidos de la semicuantificación del mRNA de VEGF para sus isoformas 121, 165 y 189 en los cuatro grupos de estudio. (A) Control positivo, células de la granulosa humana; (B) Control negativo; (C) ENp; (D) ESOPp; (E) ENs y (F) ESOPs.

Sin embargo, la isoforma VEGF₁₈₉, aunque no presentó cambios a través del ciclo menstrual, presentó diferencia significativa entre los ENs y los ESOPs ($p < 0,05$) (Figura 17) (Gráficos 13).

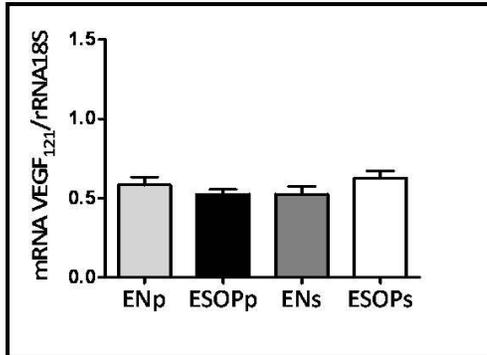


Gráfico 11. Semicuantificación del mRNA para VEGF₁₂₁ en los cuatro grupos de estudio. Los valores fueron normalizados con rRNA 18S y son expresados como promedio ± EEM.

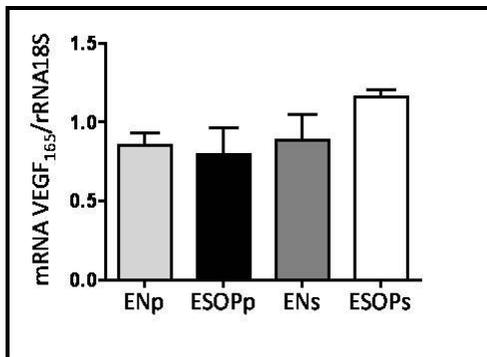


Gráfico 12. Semicuantificación del mRNA para VEGF₁₆₅ en los cuatro grupos de estudio. Los valores fueron normalizados con rRNA 18S y son expresados como promedio ± EEM.

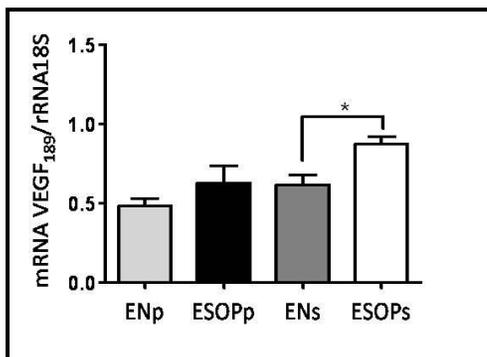


Gráfico 13. Semicuantificación del mRNA para VEGF₁₈₉ en los cuatro grupos de estudio. Los valores fueron normalizados con rRNA 18S y son expresados como promedio ± EEM.*: p<0.05 ESOPs vs ENs.

DISCUSION

Los diferentes cambios que experimenta el endometrio están determinados esencialmente por los esteroides ováricos. En presencia de alteraciones reproductivo-metabólicas como ocurre en el SOP, existen diferencias bioquímicas a nivel endometrial, que pueden afectar estos cambios perturbando la homeostasis tisular. En efecto, nuestro laboratorio y otros investigadores han demostrado el aumento de la expresión de los receptores de andrógenos (Apparao *et al.*, 2002; Villavicencio *et al.*, 2006) y de estrógenos, además de sus co-activadores en los endometrios de mujeres con SOP (Villavicencio *et al.*, 2006). Estos datos sugieren una mayor sensibilidad de estos endometrios a la acción de los esteroides ováricos. Frecuentemente estas pacientes presentan hiperandrogenemia e hiperinsulinemia, la cual regula negativamente la producción hepática de SHBG, lo que trae como consecuencia un aumento de los niveles de E₂ y T libre en la circulación (Marx y Mehta, 2003). Así, el crecimiento y diferenciación endometrial en mujeres con SOP está influenciado por andrógenos, y en ausencia del efecto regulador de la progesterona, el endometrio no experimenta la transformación secretora y está continuamente expuesto a la estimulación y efectos mitogénicos de los estrógenos que pueden llevar a sobrecrecimiento del endometrio, patrones de sangramiento impredecible, hiperplasia y cáncer endometrial (Elliot *et al.*, 2001; Cheung *et al.*, 2001). Junto con esto, nuestro laboratorio ha encontrado expresión anómala de diversas moléculas asociadas al ciclo celular, como Ki67 y p-H3, que sólo están presente en células que están en ciclo celular, y a la apoptosis, tales como la razón aumentada entre Bcl-2 (proteína anti-apoptótica) y Bax (pro-apoptótica), la falta de expresión de caspasa-3 activa y el aumento de p-Bad relacionado con la sobrevivencia celular, indicando un desbalance entre proliferación y apoptosis.

Estos antecedentes nos llevaron a proponer que al existir alteraciones hormonales, junto con la proliferación y sobrevida de las células endometriales, pueden estar alterados factores de crecimiento involucrados en el crecimiento y angiogénesis del endometrio en el ciclo menstrual, que responden a hormonas esteroidales como los estrógenos.

Uno de estos factores de crecimiento es VEGF, la molécula angiogénica más poderosa conocida hasta el momento. La proliferación, menstruación y placentación que ocurren en el endometrio involucran la remodelación de la vasculatura endometrial y VEGF juega un importante rol en la regulación de la permeabilidad vascular, el establecimiento de la formación de nuevos vasos e induce la proliferación, migración y diferenciación de las células endoteliales en el endometrio (Ferrara y Davis-Smith, 1997; Smith *et al.*, 1998; Jabbour *et al.*, 2005). La angiogénesis fisiológica en adultos se produce en pocos lugares del organismo y uno de éstos es el sistema reproductivo femenino. Normalmente es un proceso que se produce durante todo el ciclo menstrual, tanto en la fase proliferativa del endometrio como en la secretora. Así, estudios han localizado al mRNA y proteína VEGF en endometrio de humanos y primates, tanto en las células epiteliales como estromales (Smith, 1998; Sugino *et al.*, 2002; Jabbour *et al.*, 2005). Los resultados del presente trabajo no son diferentes a lo publicado por estos autores, pues se ha observado que la proteína VEGF se expresa durante todo el ciclo menstrual en el estroma y en el epitelio. Con respecto a esto, existen antecedentes que señalan que VEGF es secretado abundantemente por las células epiteliales y podría no estar asociado necesariamente a la actividad angiogénica (Jabbour *et al.*, 2005), sino a las otras acciones descritas para este factor de crecimiento. Además, se ha observado una mayor intensidad de la tinción de la proteína VEGF en las células epiteliales de las glándulas, que en las estromales, respecto a lo cual existen varios estudios que resaltan la mayor expresión de VEGF en las glándulas endometriales, siendo secretado apicalmente en gran cantidad por las células epiteliales del endometrio. Lo anterior podría constituir una señal para el desarrollo del blastocisto y la implantación (Hornugs *et al.*, 2003). También, según algunos autores existiría la posibilidad de que cantidades significativas difundan a través de las células epiteliales de la membrana basal para inducir un gradiente afectando los capilares del plexo sub-epitelial (Jabbour *et al.*, 2005).

Otra acción destacable atribuida a VEGF es un efecto proliferativo sobre las células epiteliales en la fase proliferativa tardía (Hastings *et al.*, 2003), aunque los típicos receptores de VEGF no han sido detectados en estas células, por lo tanto, este efecto podría ser transmitido a través de otro receptor atípico llamado neuropilina (Germeyer

et al., 2005). La mayor expresión de la proteína VEGF en las células epiteliales en los endometrios controles observada en este trabajo, señala funciones fisiológicas de VEGF que van más allá de la función angiogénica de esta proteína. Además, observamos que existe una mayor intensidad de la tinción en la fase secretora de los endometrios controles que en la fase proliferativa, tanto para el epitelio como para el estroma, y se sabe que existen diferencias en el proceso angiogénico entre ambas fases. Así, en la fase proliferativa al existir un rápido crecimiento del tejido endometrial, es necesario que se genere un soporte nutricional para este tejido en crecimiento, en cambio en la secretora el proceso angiogénico se genera a través del desarrollo y enrollamiento de las arteriolas espiraladas y el crecimiento del plexo capilar sub-epitelial (Gambino *et al.*, 2002), por lo tanto, podríamos atribuir un rol más activo de VEGF en la fase secretora, dada la mayor expresión de la proteína en esta fase, y sobre todo en las células epiteliales en el ciclo menstrual normal.

Por otro lado, al comparar los ESOPp con los ENp, se observó un incremento en la expresión de la proteína VEGF y, en cambio, en los ESOPs y en los ENs, los resultados en la expresión de VEGF fueron similares. Esta diferencia entre los ENp y ESOPp, se podría explicar por la respuesta de VEGF a los estrógenos, ya que existe una mayor sensibilidad a los estrógenos en el endometrio SOP. Si bien también se observó una tinción más intensa en las células epiteliales de los endometrios de las mujeres con SOP, no se puede evitar notar que hubo una mayor diferencia o cambio al comparar las células estromales de los endometrios de las mujeres controles con las células estromales de los endometrios SOP, sin olvidar que la diferencia en ambas poblaciones celulares fue significativa. Esto lleva a sugerir que VEGF tendría un papel en la patología del SOP a nivel de una angiogénesis aberrante, que impediría una adecuada preparación del endometrio para la implantación. Por otro lado, la mayor expresión en las células epiteliales, junto con la posible función proliferativa de VEGF en estas células reportada por Hastings *et al.* (2003), podrían explicar la mayor probabilidad de estas mujeres a desarrollar hiperplasia y cáncer endometrial. Además, el hecho de no encontrar diferencia entre los ENs y ESOPs, se podría explicar porque el aumento de VEGF en la fase secretora se asocia al aumento de la progesterona y la

angiogénesis producida en ese momento está relacionada con la remodelación del endometrio para prepararlo para la implantación (Nayak *et al.*, 2002).

Se sabe que, producto del gen VEGF, al menos cinco proteínas han sido identificadas y designadas como VEGF 121, VEGF 145, VEGF 165, VEGF 189 y VEGF206 (Ferrara y Davis-Smith *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 2004), de las cuales tres de ellas, 121, 165 y 189 han sido encontradas por medio de PCR en el endometrio humano (Torry *et al.*, 1996). Esto no se contrapone con los resultados de este estudio, en los cuales se expresaron las tres isoformas durante todo el ciclo, siendo las más abundantes 121 y 165, al igual que lo señalado en la literatura (Smith, 1998; Huang *et al.*, 1998). Además, los resultados no mostraron diferencias significativas del mRNA de todas las isoformas a través del ciclo menstrual. Cabe destacar que el mRNA de VEGF se expresa en los dos principales tipos celulares del endometrio, y en la fase proliferativa ha sido encontrado en las células del epitelio glandular y superficial y también en las células estromales de la misma fase (Smith *et al.*, 1998). En cambio, después de la ovulación, estos patrones se ven alterados, mientras las células epiteliales siguen produciendo VEGF, las células estromales dejan de producir VEGF (Smith *et al.*, 1998). Sin embargo, el semi-cuantificar el mRNA de las isoformas de VEGF en trozos de endometrio, sin separar las poblaciones celulares que lo componen, podría explicar que no se encontraran diferencias a través del ciclo menstrual, dado que una población celular podría encubrir los cambios de la otra. Ahora bien, los resultados de este trabajo, no mostraron diferencias de las isoformas al comparar los endometrios de mujeres controles con los endometrios de mujeres con SOP, con la excepción de las diferencias significativas observadas en el mRNA de la isoforma VEGF 189, al comparar ESOPs con ENs. Se sabe que en el endometrio humano, el E₂ regula positivamente a todas las isoformas de VEGF (Shifren *et al.*, 1996), mientras que la P₄ aumenta selectivamente la expresión de VEGF 189 en la fase secretora, sugiriendo una regulación transciente positiva de VEGF189 durante la fase secretora del ciclo (Ancelin *et al.*, 2002). Además, se debe recordar que en los endometrios de mujeres con SOP existe una persistencia de los receptores de P₄ en las células epiteliales en la fase secretora (Quezada *et al.*, 2006), lo que podría llevar a la P₄ a actuar sobre las células epiteliales y sobre-expresar el mRNA de VEGF 189. La

literatura también ha relacionado el aumento de la expresión de VEGF 189 con algunos cánceres, así, recientemente se ha observado que VEGF 189 es sobre-expresada en pacientes con metástasis de adenocarcinoma pulmonar (Otrock *et al.*, 2007), pudiéndose asociar esta alza con la mayor probabilidad de estas mujeres a desarrollar cáncer endometrial.

Ahora bien, hemos detectado las diferencias entre la expresión de la proteína VEGF y la semi-cuantificación del mRNA de VEGF a través del ciclo menstrual. La proteína fue semi-cuantificada separando su expresión en las dos poblaciones principales, células epiteliales y estromales, pero no se semi-cuantificaron las isoformas de VEGF. Respecto a mRNA, en cambio, se semi-cuantificaron las tres isoformas principales, pero no se hizo la diferencia entre poblaciones celulares.

Se sabe que VEGF es estimulado por numerosos factores de crecimiento, entre ellos NGF, al que también en los últimos años se le ha atribuido un rol en la angiogénesis, no sólo por la estimulación de VEGF, sino que también a través de su receptor de alta afinidad tendría efectos en la migración y proliferación de células endoteliales por sí mismo (Calzá *et al.*, 2000; Dollé *et al.*, 2005; Julio-Pieper *et al.*, 2006).

La neurotrofina NGF estimula el crecimiento, supervivencia y mantención de células del sistema nervioso central y periférico durante el desarrollo y después de un daño. Además, es producido y utilizado por varios tipos celulares no neuronales, incluyendo células del sistema inmune, células epiteliales, queratocitos y células musculares lisas, indicando que NGF puede tener roles en otros sistemas del organismo además del sistema nervioso (Micera *et al.*, 2007). Existen muy pocos antecedentes de la presencia de NGF en el sistema reproductivo, habiéndose encontrado en el útero murino (Bjorling *et al.*, 2002) y en endometrio de hámster (Shi *et al.*, 2006), asociándolo con su función. Los resultados de este trabajo, demuestran la presencia de la proteína NGF en el endometrio humano y su expresión diferencial a través del ciclo menstrual. Así, observamos una mayor expresión de NGF en los ENs comparados con los ENp, presumiendo un rol fisiológico en esta segunda fase del ciclo, incluyendo a la

preparación del endometrio para la implantación. Esto difiere de lo encontrado en el endometrio de hámster, en el cual se encontró una fuerte tinción en la fase proliferativa del ciclo.

También se ha sugerido que la regulación de NGF es a través de los estrógenos y de la progesterona, ya que aumenta su expresión en las glándulas salivales submandibulares de ratón y en el útero de ratón y de hámster, al estimularlos con ellos (Shi *et al.*, 2006; Bjorling *et al.*, 2002). Por lo tanto, no sorprende haber encontrado una mayor expresión en los ESOPp al compararlos con ENp. No se obtuvo diferencia significativa al comparar ESOPs con los ENs.

La expresión génica de NGF fue menor en los ESOPp comparados con los ENp, esto se podría atribuir a que el mRNA en los ENp no se estaría traduciendo completamente a proteína en estos endometrios y, en el caso de los ESOPp, el mRNA podría estar produciéndose en menor cantidad, pero estaría traduciéndose completamente a proteína. No hubo diferencias a través del ciclo menstrual, ni al comparar los ENs con los ESOPs.

Debido al aumento de la expresión de la proteína NGF en los ESOPp y su posible participación en el aumento de la expresión de VEGF, junto con su actividad en la sobrevivencia y proliferación celular, pareció interesante observar la expresión del receptor de alta afinidad de esta neurotrofina. La literatura es escasa en cuanto a la presencia de trkA en el endometrio humano. Shibayama y Koizumi (1996), detectaron la presencia de trkA en diversos órganos fuera del tejido nervioso y observaron que en endometrio de fase proliferativa no se expresaba en cuantía importante; en los endometrios de fase secretora, en cambio, sí existía una expresión de la proteína trkA, sobre todo en las células epiteliales. Así, al examinar los resultados de este trabajo con respecto a este receptor, observamos diferencias con el trabajo de los autores antes mencionados, ya que la expresión proteica de trkA la observamos a través de todo el ciclo menstrual, con una mayor expresión de la proteína en las células epiteliales, manifestándose mayormente en los ENs. Los ESOPp mostraron una mayor expresión

de la proteína que los ENp y no se manifestaron diferencias entre los ENs y los ESOPs.

Los resultados expuestos en este trabajo, sugieren la posibilidad de que estos factores, VEGF, NGF y el receptor trkA, tengan una función fisiológica en el endometrio normal, con mayor notoriedad en la fase secretora del ciclo y no por eso menos importante en la fase proliferativa. Ahora bien, al examinar los resultados en los endometrios patológicos, éstos manifestaron diferencias en la expresión de estas moléculas al compararlas con los endometrios controles. La mayor diferencia encontrada en los endometrios de fase proliferativa de las mujeres SOP para estas tres moléculas, nos permiten proponer un rol de ellas en la patología del SOP y que se presentaría principalmente en la fase proliferativa, considerando que en esta fase comienza a restituirse el tejido endometrial y la expresión anómala de estas moléculas llevarían a un crecimiento y angiogénesis alterados, que incidiría directamente en la fase secretora impidiendo un adecuado desarrollo de la función reproductiva.

En resumen, los resultados de este trabajo han confirmado que entre las múltiples alteraciones de la homeostasis tisular del endometrio, existen variaciones de factores de crecimiento que responden a las hormonas esteroidales ováricas como VEGF y NGF, además del receptor de alta afinidad de NGF, trkA. Estos factores de crecimiento han sido relacionados con funciones reproductivas en diferentes mamíferos, tales como la preparación del endometrio para la implantación a través del crecimiento y la angiogénesis de este tejido y también se han asociado al crecimiento del tejido endometrial. Así, en mujeres con trastornos reproductivos, como las mujeres con SOP, en las cuales existen cambios en el metabolismo esteroide, estos factores de crecimiento se manifiestan de forma aberrante en el endometrio, pudiendo participar en la mayor probabilidad de estas mujeres a desarrollar hiperplasia y cáncer endometrial, además de sus trastornos en la función reproductiva, que se traduce en mayor cantidad de abortos, mayor probabilidad de presentar abortos recurrentes, junto a la disminución en la fertilidad.

CONCLUSIONES

- Las proteínas VEGF, NGF y trkA, se expresan diferencialmente durante el ciclo menstrual normal, sugiriendo un rol fisiológico en el proceso angiogénico del endometrio. Además, el aumento de la expresión en la fase secretora sugiere un importante rol en esta fase de preparación para la implantación.
- Los ESOPp manifestaron un importante aumento de la expresión de las proteínas VEGF, NGF y trkA, indicando la posible participación de estas moléculas en la patología del SOP. La sobreexpresión anómala de estas tres proteínas en el inicio de la regeneración del tejido endometrial, después de la descamación producida por la menstruación, podría llevar a alteraciones en la formación del tejido que impedirían un adecuado desarrollo en la fase siguiente e impedir, por lo tanto, una adecuada implantación.
- La disminución de los niveles de mRNA de NGF en los ESOPp comparados con los niveles de mRNA en ENp, sugieren que existe la participación de este factor de crecimiento en esta patología.
- El mRNA de cada isoforma de VEGF se expresó durante todo el ciclo menstrual, no destacándose una mayor expresión en alguna fase del ciclo en particular, lo que podría llevar a pensar que se producen cantidades similares de mRNA a través del ciclo, pero la cantidad de proteína traducida sería mayor en la fase secretora del ciclo menstrual normal.
- El aumento del mRNA de VEGF189 en los ESOPs, podría estar relacionado, por un lado, con la mayor probabilidad de estas mujeres a desarrollar cáncer endometrial y, por otro, relacionarse con la baja fertilidad de estas mujeres, por una expresión exacerbada de este factor en la fase en la cual tiene lugar la implantación.

BIBLIOGRAFIA

- **ANCELIN, M.; BUTEAU-LOZANO, H.; MEDURI, G.; OSBORNE-PELLEGRIN, M.; SORDELLO, S.; PLOUET, J.; PERROT-APPLANAT, M.** 2002. A dynamic shift of VEGF isoforms with a transient and selective progesterone-induced expression of VEGF 189 regulates angiogenesis and vascular permeability in human uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(9): 6023-6028.

- **APPARAO, K.; LOVELY, L.; GUI, Y.; LININGER, R.; LESSEY, B.** 2002. Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome. *Biology of Reproduction* 66(2): 297–304.

- **AVELLAIRA, C.** 2005. Regulación de la función del receptor de andrógenos en endometrios de mujeres con síndrome de ovario poliquístico. Tesis Magíster en Ciencias Biológicas, mención Biología de la Reproducción. Santiago, Chile. Facultad de Medicina, Universidad de Chile. 114p.

- **BHATIA, V.** 2005. Insulin resistance in polycystic ovarian disease. *Southern Medical Journal* 98 (9):903-910.

- **BJORLING, D.; BECKMAN, M.; CLAYTON, K.; WANG, Z.** 2002. Modulation of nerve growth factor in peripheral organs by estrogen and progesterone. *Neuroscience* 110(1):155-167.

- **CHAKRABORTY, I.; DAS, S.; DEY, S.** 1995. Differential expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNAs in the mouse uterus around the time of implantation. *Journal of Endocrinology* 147(2): 339–352.

- **DE PABLO, Y.** 2006. Regulación de trkA a través del dominio intracelular: efecto de la unión a calmodulina y de la tirosina 701. Tesis Doctoral. Lleida, España. Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Universidad de Lleida. 154p.

- **DISSEN, G.; ROMERO, C.; HIRSHFIELD, A.; OJEDA, S.** 2001. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology* 142(5): 2078-2086.

- **DOLLÉ, J.; REZVAN, A.; ALLEN, F.; LAZAROVICI, P.; LELKES, P.** 2005. Nerve growth factor-induced migration of endothelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 315(3): 1220-1227.

- **DVORAK, H.** 2002. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 20(21): 4368-4380.

- **EHRMANN, D.** 2005. Polycystic ovary syndrome. *The New England Journal of Medicine* 352(12): 1223-1236.

- **ELICEIRI, B.; PAUL, R.; SCHWARTZBERG, P.; HOOD, J.; LENG, J.; CHERESH, D.** 1999. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Molecular Cell* 4(6): 915-924.

- **FERRARA, N.; DAVIS-SMITH, T.** 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Reviews* 18(1): 4-25.

- **FUTTERWEIT W.** 1999. Polycystic ovary syndrome: clinical perspectives and management. *Obstetrical & Gynecological Survey* 54(6): 403-413.

- **GAMBINO, L.; WREFORD, N.; BERTRAM, J.; DOCKERY, P.; LEDERMAN, F.; ROGERS, P.** 2002. Angiogenesis occurs by vessel elongation in proliferative phase human endometrium. *Human Reproduction* 17(5): 1199-1206.

- **GERBER, H.; MCMURTREY, A.; KOWALSKI, J.; YAN, M.; KEYT, B.; DIXIT, V.; FERRARA, N.** 1998. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *The Journal of Biological Chemistry* 273(46): 30336-30343.

- **GERMEYER, A.; HAMILTON, A.; LAUGHLIN, L.; LASLEY, B.; BRENNER, R.; GIUDICE, L.; NAYAK, N.** 2005. Cellular expression and hormonal regulation of neuropilin-1 and -2 messenger ribonucleic acid in the human and rhesus macaque endometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90(3): 1783–1790.

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

- **GIUDICE, L.** 2006. Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* 20(2): 235-44.

- **HASTINGS, J.; LICENCE, D.; BURTON, G.; CHARNOCK-JONES, D.; SMITH, S.** 2003. Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 inhibits edema and epithelial proliferation induced by 17beta-estradiol in the mouse uterus. *Endocrinology* 144(1): 326–334.

- **HORNUNG, D.; LBOVIC, D.; SHIFREN, J.; VIGNE, J.; TAYLOR, R.** 1998. Vectorial secretion of vascular endothelial growth factor by polarized human endometrial epithelial cells. *Fertility and Sterility* 69(5): 909-915.
- **JABBOUR, H.; KELLY, R.; FRASER, H.; CRITCHLEY, H.** 2006. Endocrine regulation of menstruation. *Endocrine Reviews* 27(1): 17-46.
- **JULIO-PIEPER, M.; LARA, H.; BRAVO, J.; ROMERO, C.** 2006. Effects of nerve growth factor (NGF) on blood vessels area and expression of the angiogenic factors VEGF and TGFbeta I in the rat ovary. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4(57): 1-11.
- **LEVI-MONTALCINI, R.; SKAPER, S.; DAL TOSO, R.; PETRELLI, L.; LEON, A.** 1996. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine. *Trends in Neurosciences* 19(11): 514-520.
- **LOPES, F.; DESMARAIS, J.; GÉVRY, N.; LEDOUX, S.; MURPHY, B.** 2003. Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and receptors flt-1 and KDR during the peri-implantation period in the mink, *Mustela vison*. *Biology of Reproduction* 68(5): 1926–1933.
- **MALIQUEO, M.; CLEMENTI, M.; GABLER., F; JOHNSON C, PALOMINO A, SIR PETERMANN T, VEGA M.** 2003. Expression of steroid receptors and proteins related to apoptosis in endometria of women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 80(suppl. 2): 812-819.
- **MARX, T.; MEHTA, A.** 2003. Polycystic ovary syndrome: Pathogenesis and treatment over the short and long term. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 70(1): 32-45.

- **MEDURI, G.; BAUSERO, P.; PERROT-APPLANAT, M.** 2000. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in the human endometrium: modulation during the menstrual cycle. *Biology of Reproduction* 62(2): 439–447.

- **MICERA, A.; LAMBIASE, A.; STAMPACHIACCHIERE, B.; BONINI, S.; BONINI, S.; LEVI-SCHAFFER, F.** 2007. Nerve growth factor and tissue repair remodeling: $\text{trkA}^{\text{NGFR}}$ and p75^{NTR} , two receptors one fate. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 18(3-4): 245–256.

- **MISKO, T.; MONTE, J.; SHOOTER, E.** 1987. Nerve growth factor in neuronal development and maintenance. *The Journal of Experimental Biology* 132(1):177-190.

- **NAYAK, N.; BRENNER, R.** 2002. Vascular proliferation and vascular endothelial growth factor expression in the Rhesus macaque endometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87(4): 1845–1855.

- **NIKLAUS, A.; BABISCHKIN, J.; ABERDEEN, G.; PEPE, G.; ALBRECHT, E.** 2002. Expression of vascular endothelial growth/permeability factor by endometrial glandular epithelial and stromal cells in baboons during the menstrual cycle and after ovariectomy. *Endocrinology* 143(10): 4007–4017.

- **NICO, B.; MANGIERI, D.; BENAGIANO, V.; CRIVELLATO, E.; RIBATTI, D.** 2008. Nerve growth factor as an angiogenic factor. *Microvascular Research* 75(2): 135–141.

- **NOYES, R.; HERTING, A.; ROCK, J.** 1950. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1(1): 3-25.

- **OTROCK, Z.; MAKAREM, J.; SHAMSEDDINE, A.** 2007. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: Review. *Blood Cells, Molecules & Diseases* 38(3): 258–268.
- **PORTER, T.; SCOTT, J.** 2005. Evidence-based care of recurrent miscarriage. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 19(1): 85-101.
- **QUEZADA, S.; AVELLAIRA, C.; JOHNSON, C.; GABLER, F.; FUENTES, A.; VEGA, M.** 2006. Evaluation of steroid receptors, coregulators, and molecules associated with uterine receptivity in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 85(4): 1017-1026.
- **RABBANI, M.; ROGERS, P.** 2001. Role of vascular endothelial growth factor in endometrial vascular events before implantation in rats. *Reproduction* 122(1): 85–90.
- **ROCKWELL, L.; PILLAI, S.; OLSON, C.; KOOS, R.** 2002. Inhibition vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor action blocks estrogen-induced uterine edema and implantation in rodents. *Biology of Reproduction* 67(6): 1804–1810.
- **ROWE, A.; WULFF, C.; FRASER H.** 2003. Localization of mRNA for vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietins and their receptors during the peri-implantation period and early pregnancy in marmosets (*Callithrix jacchus*). *Reproduction* 126(2): 227–238.
- **SALAMONSEN, L.; NANCARROW, C.** 1994. Cell Biology of the Oviduct and Endometrium. En: *Molecular biology of the female reproductive system*. Findlay JK ed. Academic Press.

- **SENGER, D.; VAN DE WATER, L.; BROWN, L.; NAGY, J.; YEO, K.; YEO, T.** 1993. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Reviews* 12(3-4): 303-324.

- **SHI, Z.; ARAI, K.; JIN, W.; WENG, Q.; WATANABE, G.; SUZUKI, A.; TAYA, K.** 2006. Expression of nerve growth factor and its receptors NTRK1 and TNFRSF1B is regulated by estrogen and progesterone in the uteri of golden hamsters. *Biology of Reproduction* 74(5): 850-856.

- **SHIBAYAMA, E.; KOIZUMI, H.** 1996. Cellular localization of the trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *American Journal of Pathology* 148(6): 1807-1818.

- **SHIBUYA M.** 2001. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Structure and Function* 26(1): 25-35.

- **SHIFREN, J.; TSENG, J.; ZALOUDEK, C.** 1996. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81(8): 3112–3118.

- **SMITH, S.** 1998. Angiogenesis vascular endothelial growth factor and the endometrium. *Human Reproduction Update* 4(5): 509-519.

- **STROWITZKI, T.; GERMAYER, A.; POPOVICI, R.; VON WOLFF, M.** 2006. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Human Reproduction Update* 12(5): 617-30.

- **SUGINO, N.; KASHIDA, S.; KARUBE-HARADA, A.; TAKIGUCHI, S.; KATO, H.** 2002. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Reproduction* 123(3): 379–387.

- **THE ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP.** 2004. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 81(1): 19-25.

- **TORRY, D.; HOLT, V.; KEENAN, J.; HARRIS, G.; CAUDLE, M.; TORRY, R.** 1996. Vascular endothelial growth factor expression in cycling human endometrium. *Fertility and Sterility* 66(1): 72–80.

- **VIGNESH, J; MOHAN, V.** 2007. Polycystic ovary syndrome: A component of metabolic syndrome? *Journal of Postgraduate Medicine* 53(2): 128-134.

- **VEGA, J.; GARCÍA-SUÁREZ, O.; HANNESTAD, J.; PEREZ-PEREZ, M.; GERMANÁ, A.** 2003. Neurotrophins and the immune system. *Journal of Anatomy* 203(1): 1-19.

- **VILLAVICENCIO, A.; BACALLAO, K.; AVELLAIRA,C.; GABLER, F.; FUENTES, A.; VEGA, M.** 2006. Androgen and estrogen receptors and co-regulators levels in endometria from patients with polycystic ovarian syndrome with and without endometrial hyperplasia. *Gynecologic Oncology* 103(1): 307-314.

- **VILLAVICENCIO, A.; BACALLAO, K.; GABLER, F.; FUENTES, A.; ALBORNOZ, J.; CASALS, A.; VEGA, M.** 2007. Deregulation of tissue homeostasis in endometria from patients with polycystic ovarian syndrome with and without endometrial hiperplasia. *Gynecologic Oncology* 104(2): 290–295.

- **VONNAHME, K.; FORD, S.** 2004. Differential expression of the vascular endothelial growth factor-receptor system in the gravid uterus of Yorkshire and Meishan pigs. *Biology of Reproduction* 71(1):163–169.

- **XIE, K.; WEI, D.; SHI, Q.; HUANG, S.** 2004. Constitutive and inducible expression and regulation of vascular endothelial growth factor. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 15(5): 297–324.

- **YI, X.; JIANG, H.; LEE, K.; O, W.; TANG, P.; CHOW, P.** 1999. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors during embryonic implantation in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Cell and Tissue Research* 296(2): 339–349.

ANEXO I

1. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA OBTENCIÓN DE TEJIDO ENDOMETRIAL DE MUJERES CONTROLES

Título del Proyecto: **“Participación del microambiente esteroideal sobre la proliferación y supervivencia celular en endometrios obtenidos de pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP)” (Proyecto FONDECYT # 1050098)**

Nombre del Investigador Principal: **Margarita Vega B.**

Institución: Hospital Clínico de la Universidad de Chile y Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Teléfonos: 978-8305

Le invitamos a participar en el proyecto **“Participación del microambiente esteroideal sobre la proliferación y supervivencia celular en endometrios obtenidos de pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP)”**. Este estudio pretende conocer los mecanismos por los que la enfermedad afecta la fertilidad de numerosas mujeres.

Si usted acepta participar en este protocolo, se le pedirá donar una muestra de tejido endometrial aprovechando su indicación médica de histerectomía por patología uterina benigna o su deseo de esterilización tubaria como método de planificación familiar. Dicho procedimiento no tendrá riesgo para usted, aunque puede producir un sangrado genital escaso, menor que una regla, en algunas pacientes sometidas a salpingoligadura. También se le solicitará donar 10cc de sangre para realizar gratuitamente exámenes hormonales. Usted no recibirá ninguna compensación económica por la participación en este estudio.

La participación en este protocolo la beneficiará del estudio hormonal y anatomopatológico del endometrio en forma gratuita. Usted es libre de participar o no en este estudio, de manera que si usted decide no participar, no habrá consecuencias negativas para usted y recibirá la atención previamente acordada con su médico tratante.

Toda la información será conservada con estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o de agencias supervisoras de la investigación. Además, la publicación de los resultados no incluirá su nombre ni identidad. Este estudio ha sido validado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. En caso de dudas respecto de sus derechos como participante de este estudio, puede consultar con la Dra. Margarita Vega B.

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto.

Nombre del sujeto

Firma

Fecha

Nombre de informante

Firma

Fecha

Nombre del investigador

Firma

Fecha

2. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA OBTENCIÓN DE TEJIDO ENDOMETRIAL DE PACIENTES CON SÍNDROME OVARIO POLIQUÍSTICO

Título del Proyecto: **“Participación del microambiente esteroideal sobre la proliferación y supervivencia celular en endometrios obtenidos de pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP)” (Proyecto FONDECYT # 1050098)**

Nombre del Investigador Principal: **Margarita Vega B.**

Institución: Hospital Clínico de la Universidad de Chile y Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Teléfonos: 978-8305

Le invitamos a participar en el proyecto **“Participación del microambiente esteroideal sobre la proliferación y supervivencia celular en endometrios obtenidos de pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP)”**. Este estudio pretende conocer los mecanismos por los que la enfermedad afecta la fertilidad de numerosas mujeres.

Si usted acepta participar en este protocolo, se le pedirá donar parte de una muestra de tejido endometrial aprovechando su indicación médica de biopsia de endometrio por el mayor riesgo de hiperplasia y cáncer endometrial que presentan las pacientes con SOP; parte de la muestra será utilizada en este estudio. Dicho procedimiento no tendrá riesgo para usted. Además, se le solicitará donar 10cc de sangre en la que se le realizará gratuitamente el estudio hormonal y metabólico, necesario para establecer el diagnóstico de su enfermedad, constituyendo este un beneficio para usted. Además, el estudio hormonal y anatomopatológico del endometrio se realizará en forma gratuita. No recibirá ninguna compensación económica por la participación en el estudio.

Asimismo, su contribución será importante para conocer algunas de las causas asociadas al Síndrome de Ovario Poliquístico. Usted es libre de participar o no en este estudio, de manera que si usted decide no participar, no habrá consecuencias negativas para usted y recibirá la atención previamente acordada con su médico tratante.

Toda la información será conservada con estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o de agencias supervisoras de la investigación. Además, la publicación de los resultados no incluirá su nombre ni identidad. Este estudio ha sido validado por el Comité de Ética Científico del Servicio de Salud Metropolitano Oriente y el de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. En caso de dudas respecto de sus derechos como participante de este estudio, puede consultar con la Dra. Margarita Vega B.

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto.

Nombre del sujeto

Firma

Fecha

Nombre de informante

Firma

Fecha

Nombre del investigador

Firma

Fecha

