



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS

BIOQUÍMICAS

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL ENDOMETRIO EN FASE
SECRETORA MEDIA EN MUJERES INFÉRTILES SOMETIDAS A
INDUCCIÓN FARMACOLÓGICA DE OVULACIÓN**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

P R E S E N T A

BIOL. FRANCISCO JAVIER VALDEZ MORALES

TUTOR: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES

MÉXICO D.F.

Junio 2011.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

1. ABSTRACT	6
1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	8
3. ANTECEDENTES	10
3.1 EL SISTEMA HIPOTÁLAMO HIPOFISIS.....	10
3.1.1 El Hipotálamo.....	11
3.1.2 La hipófisis.....	11
3.1.3 Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).....	12
3.1.4 Mecanismo de acción de la GnRH.....	13
3.1.5 Las gonadotropinas: FSH y LH.....	14
3.1.6 Actividad de la FSH y LH en el desarrollo folicular.....	15
3.1.7 La ovulación.....	17
3.2 ESTRUCTURA DEL ÚTERO HUMANO.....	18
3.3 CARACTERÍSTICAS DEL ENDOMETRIO HUMANO.....	19
3.4 EL CICLO MENSTRUAL.....	22
3.4.1 Las fases del ciclo menstrual.....	22
3.4.2 El ciclo endometrial.....	23
3.5 REGULACIÓN HORMONAL DEL DESARROLLO ENDOMETRIAL.....	26
3.5.1 Hormonas esteroideas y sus receptores.....	26
3.5.2 Los estrógenos y su mecanismo de acción.....	27
3.5.3 La progesterona y su mecanismo de acción.....	28
3.6 PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR ENDOMETRIAL DURANTE EL CICLO MENSTRUAL.....	29
3.6.1 Proliferación celular durante el ciclo menstrual.....	29
3.6.2 Muerte celular durante el ciclo menstrual.....	31

3.7 REGENERACIÓN DEL TEJIDO ENDOMETRIAL.....	32
3.7.1 Participación de factores de crecimiento en la regeneración endometrial.....	33
3.7.2 Participación de las células troncales en la regeneración endometrial.....	34
3.7.3 Evidencias de la existencia de células troncales en el endometrio.....	36
3.8 RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL.....	37
3.8.1 La ventana de implantación.....	38
3.9 INFERTILIDAD.....	39
3.9.1 Disfunción Hipotálamo Hipofisiaria.....	39
3.10 INDUCCIÓN DE OVULACIÓN.....	40
3.10.1 El citrato de clomifeno.....	40
3.10.2 Mecanismo de acción del citrato de clomifeno.....	42
3.10.3 Las gonadotropinas recombinantes: La FSHr.....	43
3.10.4 Mecanismo de acción de la FSHr.....	44
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	45
5. OBJETIVOS.....	46
5.1 Objetivo General.....	46
5.2 Objetivos particulares.....	46
6. HIPÓTESIS.....	47
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	48
7.1 Pacientes incluidas en el estudio.....	48
7.1.1 Criterios de inclusión.....	48
7.1.2 Criterios de exclusión.....	48
7.2 Grupos de estudio.....	49
7.3 Procesamiento del tejido.....	50
7.4 Tinción hematoxilina-eosina.....	50
7.5 Inmunohistoquímica.....	51
7.6 Inmunofluorescencia.....	52

7.7 Determinación de la muerte celular por el método de TUNEL.....	52
7.8 Análisis estadístico.....	53
8. RESULTADOS.....	54
8.1 Descripción morfológica del endometrio mediante la tinción de hematoxilina-eosina.....	54
8.2 Determinación de la proliferación celular endometrial.....	56
A) Expresión endometrial del marcador Ki67.....	56
B) Expresión de PCNA en el endometrio humano.....	58
8.3 Expresión endometrial de receptores de hormonas esteroideas.....	60
A) El receptor de estrógenos alfa (ER α).....	60
B) El receptor de progesterona (PR).....	62
8.4 Determinación del índice de muerte celular mediante la expresión de Bcl-2 y Bax.....	64
A) Expresión endometrial de Bcl-2.....	64
B) Expresión endometrial de Bax.....	66
8.5 Determinación de la muerte celular por el método de TUNEL.....	68
8.6 Expresión de marcadores de células troncales en el endometrio.....	70
A) Expresión de Oct-4 y Nanog en el endometrio humano.....	71
B) Expresión de Sox-2 en el endometrio humano.....	72
9. DISCUSIÓN.....	74
10. CONCLUSIONES.....	83
11. PERSPECTIVAS.....	84
12. REFERENCIAS.....	85

RESUMEN

El uso de inductores de ovulación como el citrato de clomifeno (CC) y la FSHr esta encaminado a restituir la foliculogénesis. Se han obtenido tasas ovulación del 80%; sin embargo, las tasas de embarazo son menores al 30%. La discrepancia entre estos datos, se deben a múltiples factores quizás a algunas alteraciones en el moco cervical y en la maduración endometrial. Sin embargo, no existen evidencias que detallen los efectos a nivel molecular del CC y FSHr sobre el endometrio, por ello el objetivo de este trabajo es caracterizar los patrones de expresión de marcadores de proliferación, muerte celular, receptores de estrógenos y progesterona y marcadores de células troncales en el endometrio de pacientes infértiles con disfunción hipotálamo-hipofisiaria sometidas a inducción farmacológica de ovulación con CC y FSHr. Se efectuó un estudio clínico transversal comparativo en pacientes infértiles sometidas a inducción farmacológica de la ovulación, que fueron divididas en 4 grupos: 1) Control (n= 12) pacientes infértiles ovulatorias. 2) Pacientes infértiles anovulatorias (n=11) manejadas con CC a razón de 100 mg/24 hrs, del día 5 al 9 del ciclo. 3) Pacientes infértiles anovulatorias (n=5) tratadas con FSHr bajo el esquema *step-up* y 4) Pacientes infértiles anovulatorias sin tratamiento (n=10). En todas las pacientes se realizó biopsia de endometrio en fase secretora media. Se efectuó el análisis histológico endometrial y a través de inmunohistoquímica la expresión de Ki 67, Bcl-2, Bax, ER α , PR, Oct-4 y Nanog. Sox-2 se detectó por inmunofluorescencia. Así como la determinación de la muerte celular a través de la técnica de TUNEL. Los datos de los conteos realizados con el programa Image J para cada marcador fueron analizados utilizando T de Student, en el programa Prisma 5.0, y también se calcularon los valores de la desviación estándar (\pm DE) estableciéndose un nivel de significancia <0.05 .

Se observaron algunas características morfológicas endometriales diferentes entre pacientes de los diferentes grupos, pero éstas no fueron muy claras. Por otro lado la expresión de Ki67 fue significativamente mayor en el grupo control respecto al grupo tratado con CC y FSH y ER α se expresó menos en el grupo de FSHr comparado con los otros grupos. La expresión de PR fue mayor en los grupos de CC y FSHr respecto al control. No se encontraron diferencias intergrupales en relación al número de células apoptóticas. La expresión de Bcl-2 fue similar en todos los grupos; pero Bax se expresó más en los grupos de pacientes con infertilidad. El único marcador de pluripotencia expresado fue Sox-2, sin diferencias entre los grupos de pacientes.

El tratamiento con inductores de ovulación produce diferencias en la expresión de marcadores relacionados con la proliferación y muerte celular y de receptores de hormonas esteroides en la fase secretora media de mujeres infértiles con disfunción hipotálamo hipofisiaria.

ABSTRACT

The medical treatment of infertile patients with hypothalamic-pituitary dysfunction is intended to restore folliculogenesis through the use of ovulation-inducing drugs such as clomiphene citrate (CC), which is one of the most common drugs used in the clinic, and with recombinant follicular stimulating hormone rFSH, these methods rise ovulation rates of about 80%. Nevertheless, pregnancy rates with this treatment were less than 30%. The discrepancy between ovulation rates and pregnancy is due to many factors, perhaps some changes in the cervical mucus and endometrial maturation. However, there is no evidence describing the molecular effects of CC and rFSH on human endometrium.

The aim of this work was to characterize the expression patterns of proliferation and cell death markers, estrogen and progesterone receptors and stem cell markers in the endometrium of infertile patients with hypothalamic-pituitary dysfunction treated with CC and rFSH. We performed a comparative cross-sectional clinical study in infertile patients undergoing medical ovulation induction, which were divided into 4 groups: 1) Control (n = 12) ovulatory infertile patients; 2) anovulatory infertile patients (n = 11) treated daily with 100 mg of CC, from the 5th to the 9th day of the cycle; 3) anovulatory infertile patients (n = 5) treated with the rFSH step-up scheme 4) anovulatory infertile patients without treatment (n = 10). All patients underwent endometrial biopsy in mid-secretory phase. Histological analysis of the endometrium was performed and Ki 67, Bcl-2, Bax, ER α , PR, Oct-4 and Nanog were detected by immunohistochemistry and Sox-2 by immunofluorescence. Cell death was assayed by TUNEL reaction. Positive and total nuclei for each marker were counted with the Image J Software. Statistical analysis was performed using Student's T test (P <0.05) with Prism 5.0 Software (\pm SD).

In spite of some morphological differences in the endometrium observed among patients of different groups, these were not consistent. However Ki67 expression was significantly higher in the control group when compared with the CC- and FSH-treated groups. ER α expression was significantly lower in the rFSH-group when compared with the control and CC-treated groups. PR expression was significantly higher in CC and rFSH groups compared with control. There were no intergroup differences in the number of apoptotic cells. The expression of Bcl-2 was similar in all groups, but Bax was expressed more in the infertile groups. Sox-2 was the only pluripotency marker detected and there were no differences between groups.

These data demonstrate that treatment of infertile women with hypothalamic pituitary dysfunction with ovulation-inducing drugs produces significant differences in the expression of molecular markers associated with proliferation and cell death as well as steroid hormone receptors in mid secretory phase-endometrium.

INTRODUCCIÓN

Se define a la infertilidad como la incapacidad de llevar un embarazo a término. El proceso fisiológico que culmina con el embarazo es bastante complejo y en él están involucrados muchos factores. Actualmente se sabe que es un problema frecuente ya que aproximadamente el 20% de las parejas sufren alguna patología que deriva en infertilidad.

Las causas de la infertilidad son múltiples pero podemos dividir las para su estudio en factores femeninos y masculinos. En este trabajo hemos abordado los factores femeninos, particularmente la disfunción hipotálamo hipofisiaria, que se caracteriza por ciclos anovulatorios, trastornos en el ciclo menstrual e insuficiencia en la fase lútea. En un ciclo normal el endometrio experimenta un proceso de maduración, resultado de una serie de eventos bioquímicos y moleculares tales como proliferación y muerte celular, expresión de receptores de hormonas esteroides y el estímulo cíclico de estas hormonas, la acción de factores de crecimiento y evidencias recientes sugieren que también participan células troncales endometriales aportando los componentes celulares del endometrio (células epiteliales y estromales), cuya finalidad es proporcionar al embrión, un medio idóneo, para su implantación y desarrollo. Durante este periodo, el endometrio aumenta en grosor y todos sus componentes dan signos de intensa actividad secretora particularmente las glándulas; por ello una diferenciación endometrial insuficiente e incluso cualquier estado de receptividad endometrial incompleto de la fase secretora no permite la implantación (Beier, *et al.*, 2001). Por lo tanto el éxito de este importante proceso depende de la calidad del blastocisto y la receptividad endometrial (Giudice, 1995).

En mujeres con infertilidad por disfunción hipotálamo-hipofisaria la funcionalidad del eje que controla el crecimiento y maduración folicular se encuentra alterada, por eso es necesario restablecer la sincronía del desarrollo folicular ovárico, utilizando inductores farmacológicos de ovulación como la hormona estimulante del folículo de origen recombinante (FSHr) y el citrato de clomifeno (CC) que es uno de los inductores de ovulación más utilizados en la práctica clínica. Con ellos se ha reportado que las tasas acumuladas de ovulación son de aproximadamente el 80%; sin embargo, las tasas de embarazo son menores al 30% (Homburg, 2005). La discrepancia entre estos datos se ha explicado parcialmente por los efectos antiestrogénicos del CC en el moco cervical y en la maduración endometrial (Sereepapong *et al.*, 2000, Triwitayakorn, *et al.*, 2002), pero no existen evidencias moleculares que detallen los efectos de dichos tratamientos sobre los procesos más importantes que se llevan a cabo durante el ciclo menstrual, tales como proliferación y muerte celular, expresión de receptores de hormonas esteroides y finalmente proteínas relacionadas con la pluripotencia celular y por ende en su participación en la regeneración y maduración endometrial en cada ciclo.

ANTECEDENTES

3.1 EL SISTEMA HIPOTÁLAMO HIPOFISIS

El sistema hipotálamo hipófisis gónada es el sistema de retroalimentación endocrina positiva y negativa más conservado que regula el proceso reproductivo, a través de la producción de gametos maduros; éste se establece durante el desarrollo del feto, pero muestra sus características fisiológicas durante la pubertad y en la etapa adulta. La comunicación del eje se lleva a cabo mediante mensajeros, principalmente hormonas, que comunican el sistema nervioso y el tejido reproductivo (Blackwell en Carr y Blackwell, 1998).

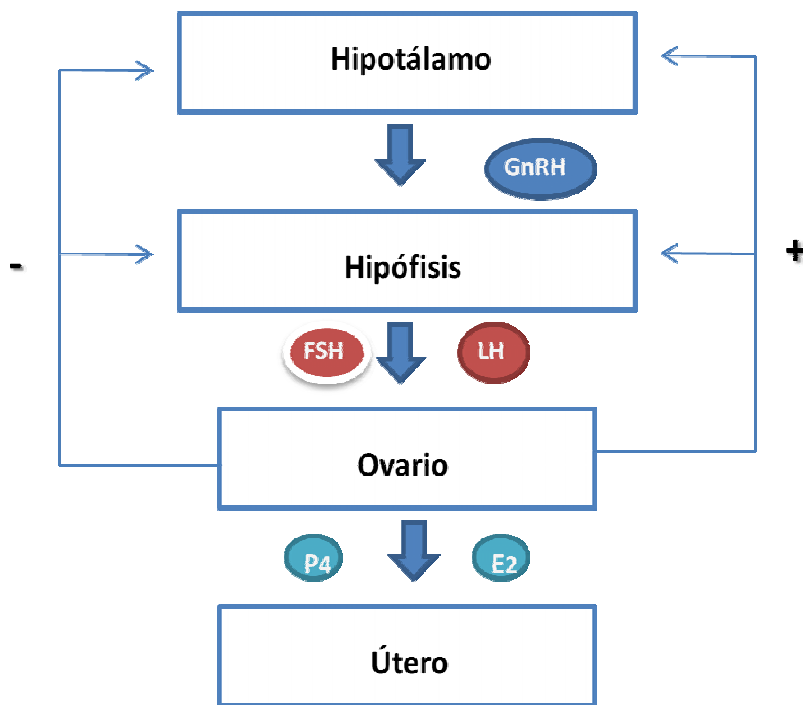


Figura 1. Estructura del eje hipotálamo hipófisis ovario. Este eje controla el crecimiento y desarrollo de los folículos en el ovario y la subsecuente secreción de hormonas esteroides que desarrollan al tejido uterino y por otro lado regula negativamente la liberación de GnRH y gonadotropinas.

3.1.1 El Hipotálamo

El hipotálamo se encuentra en la base del cerebro por arriba de los nervios ópticos y de la hipófisis. Es una estructura neural con actividad glandular endocrina que forma parte del diencefalo, y se sitúa por debajo del tálamo. Libera al menos nueve hormonas que actúan como inhibidoras o estimulantes en la secreción de otras hormonas en la adenohipófisis, por lo que se puede decir que trabaja en conjunto con ésta (Wang *et al.*, 2010).

La eminencia media del hipotálamo es la vía final de comunicación con la hipófisis anterior. Recibe neuronas del tracto túbero-infundibular. El núcleo arcuato es uno de los núcleos hipotalámicos mediales y se encuentra sobre la eminencia media y adyacente al tercer ventrículo. La eminencia recibe neuronas peptidérgicas que contienen factores liberadores e inhibidores. La eminencia media libera estas hormonas a los capilares porta hipofisarios y estas son transmitidos al hipotálamo anterior donde actúan sobre los gonadotropos para liberar hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) (Bouligand, *et al.*, 2010). La circulación en este sistema porta es del cerebro hacia la hipófisis, aunque existe también un flujo retrógrado que permite el transporte de hormonas hipofisarias hacia el hipotálamo (Calaf y Webb en Vanrell *et al.*, 1992).

3.1.2 La hipófisis

La hipófisis es una glándula que está situada debajo del hipotálamo dentro de la silla turca del hueso esfenoides. Embriológicamente y funcionalmente se divide en dos partes. La parte posterior o nerviosa denominada neurohipófisis, constituye una prolongación del tejido nervioso hipotalámico y está formada por axones de las

neuronas de los núcleos supraóptico y paraventricular, que contienen en su interior gránulos de neurosecreción de oxitocina y vasopresina.

La parte anterior o glandular denominada adenohipofisis está integrada por células de tipo epitelial rodeadas de una red capilar. Su origen embrionario es ectodérmico. Esta región actúa como transductor entre el hipotálamo y las glándulas periféricas responsables de las funciones hormonales por medio de la producción de hormonas proteicas, como la LH, FSH y prolactina (Bouligand, *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010).

La adenohipófisis está compuesta por 5 tipos celulares principalmente, los cuales son células de tipo secretor: gonadotropas, lactotropas, tirotropas, corticotropas y somatotropas, siendo las gonadotropas las células que liberan las gonadotropinas bajo el estímulo de la GnRH hipotalámica (Wang *et al.*, 2010).

3.1.3 Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)

La traducción de impulso nervioso a secreción hormonal se produce en una célula mixta que se denomina neurosecretora y se diferencia de la neurona en que el material de secreción es de tipo peptídico y no se produce en la región terminal de la dendrita, sino en el citoplasma, cerca del núcleo. Desde ahí es transportada de manera activa en vesículas a lo largo de los microtúbulos hasta la terminal y ahí el material neuroendocrino es liberado al torrente circulatorio (Bouligand, *et al.*, 2010). La GnRH se produce en el citoplasma perinuclear de las neuronas del hipotálamo mediobasal en forma de prohormona con peso molecular de 10kD, este precursor está compuesto de un decapeptido que tiene unido una secuencia o péptido señal de 23 aminoácidos denominados GAP (del inglés GnRH associated peptide). En los humanos las neuronas

productoras de GnRH no están agrupadas en núcleos separados sino formando redes laxas diseminadas en el hipotálamo, especialmente en el núcleo paraventricular posterior, el hipotálamo medio basal y el área preóptica; la mayoría están localizadas en el núcleo arcuato (Keung Cheng y Leung, 2005). Sus axones se proyectan hacia muchas áreas en el cerebro, pero especialmente hacia la eminencia media, a través del tracto túbero-infundibular. Así la GnRH se produce en el núcleo arcuato y por un mecanismo de transporte activo recorre los axones hasta ser liberada en los capilares del sistema vascular que comunica con la hipófisis (Calaf y Webb en Fertilidad y Esterilidad Humanas, 1992, Bouligand *et al.*, 2010).

3.1.4 Mecanismo de acción de la GnRH

La regulación de la secreción de gonadotropinas está controlada por GnRH que potencia en la célula gonadotropa sus dos funciones principales: biosíntesis y liberación de gonadotropinas. La GnRH se une a un receptor específico de membrana en la célula gonadotropa que activa la fosfolipasa C, induciendo la fragmentación de los polifosfoinositoles y liberando inositol trifosfato (IP3) hacia el interior de la célula, con lo cual se movilizan los depósitos de calcio intracelular y se liberan las gonadotropinas. Si el estímulo persiste la liberación de un segundo depósito se mantiene gracias a la entrada de calcio extracelular a través de canales de membrana. La fosfolipasa C induce en la propia membrana la producción de diacilglicerol (DAG) que activa a la proteína cinasa C y potencia el mecanismo primario dependiente de calcio.

Las gonadotropinas son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso y se acumulan en forma de gránulos en la reserva celular, de allí son enviadas a un segundo depósito cercano a la membrana plasmática para ser liberadas potenciado por GnRH mediante un

proceso denominado activación (Karges *et al.*, 2003, Keung Cheng y Leung, 2005). Los estrógenos favorecen la síntesis y la activación, pero disminuyen la sensibilidad de la membrana a la GnRH, dificultando su liberación. Por otra parte los niveles estrogénicos condicionan la producción de gonadotropinas ya que si los niveles son bajos se produce mayor cantidad de FSH y en condiciones hiperestrogénicas se sintetiza principalmente LH. El ovario produce inhibina y activina que modulan de forma específica la secreción de FSH. Por lo que se ha establecido que los esteroides sexuales tienen un papel central en la comunicación del sistema hipotálamo hipofisiario lo cual es vital para la regulación del ciclo menstrual. Otra función primordial de la GnRH es el control de la producción de cadenas alfa y beta de la LH, de la subunidad b de la FSH y la unión de las dos cadenas (Richards y Pangas, 2010).

3.1.5 Las gonadotropinas: FSH y LH

Como se mencionó anteriormente las gonadotropinas son los mensajeros encargados de comunicar el sistema nervioso central con las gónadas y su secreción depende de la actividad de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que estimula la liberación de las gonadotropinas en la hipófisis anterior (Richard y Pangas, 2010)

Son glucoproteínas compuestas por dos subunidades denominadas alfa y beta. La subunidad alfa es específica para cada especie y común para las tres hormonas glicoproteicas hipofisiarias, la hormona folículo estimulante (FSH), la hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona luteinizante (LH) y también para la gonadotropina coriónica humana (HCG) placentaria. La subunidad beta es distinta para cada hormona. La producción de las subunidades alfa es mayor de la necesaria para

mantener el nivel de secreción hormonal, pero no se ha demostrado que estas subunidades circulantes tengan actividad biológica (Levallet, *et al.*, 1999, Matzuk y Lamb, 2008).

Las hormonas proteicas debido a su peso molecular no atraviesan la membrana plasmática y actúan en la célula efectora estimulando un receptor de membrana que a través de la adenilatociclasa que convierte ATP y AMP cíclico, este último se combina con la subunidad reguladora de la proteína cinasa intracelular liberando la subunidad catalítica, así mediante la fosforilación se activan actividades esteroideogénicas o la síntesis de proteínas incrementando la actividad transcripcional (Richards y Pangas, 2010).

La liberación de FSH y LH depende de la frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH, siendo fisiológicos entre 60 y 90 minutos. Esos pulsos tienen características diferentes durante el ciclo ovárico, siendo de baja amplitud y alta frecuencia durante la fase folicular, mientras que en la fase lútea son de alta amplitud y baja frecuencia. Si la frecuencia es menor se produce anovulación y si es mayor o continua se frena la liberación de gonadotropina (Calaf y Webb, 1992; Matzuk y Lamb, 2008).

3.1.6 Actividad de la FSH y LH en el desarrollo folicular

La FSH participa en la formación del antro folicular que son espacios rellenos de líquido entre las células de la granulosa, debido a un incremento en la secreción de glucosaminoglicanos en los espacios extracelulares, así la formación del antro folicular es un proceso que depende de la acción de FSH hasta que el folículo alcanza un diámetro aproximado de 5 mm, los folículos con este diámetro entran a una fase de precursora a la maduración final dependiente también de FSH, así la elevación de los

niveles séricos de FSH recluta una serie de folículos precursores que comenzaran el desarrollo preovulatorio. Sin embargo solamente uno de estos folículos resultara dominante durante la fase folicular avanzada, y este folículo es el que responde mejor al estímulo de FSH, debido a que posee un mayor número de receptores en las células de la granulosa, por lo tanto tiene una mayor capacidad para secretar estrógenos. La FSH induce también la síntesis de inhibina que actúa con los estrógenos en la regulación negativa de la secreción de FSH en la adenohipófisis, lo cual causa que los folículos con menor capacidad de respuesta a la FSH involucionen hasta la atresia, mientras el folículo dominante continua su crecimiento hasta alcanzar un diámetro de 20-25 mm en el momento de la ovulación (Balash J en Remohí *et al.*, 2002, Shanon *et al.*, 2008).

La LH actúa como promotor de la esteroidogénesis, en la teca aumentando la producción de precursores androgénicos y en las células de la granulosa principalmente después del rompimiento folicular. Actúa sinérgicamente con FSH promoviendo el desarrollo del folículo y la salida del ovulo. Su acción se basa en la modificación de características fisicoquímicas del ambiente intrafolicular, cambios hormonales en el ambiente ovárico y desbloqueo de la meiosis en el ovocito por acción del AMP cíclico (Shanon *et al.*, 2008). Entonces la existencia de un nivel adecuado de FSH es importante para que el folículo se desarrolle hasta la fase preantral. La FSH estimula la proliferación de las células de la granulosa actuando sinérgicamente con estrógenos y LH. Esto implica un aumento en la cantidad de receptores de LH en las células de la granulosa preparándolas para la síntesis de progesterona, que se produce después del pico preovulatorio y en la fase lútea; también aumenta la capacidad de aromatización transformando los precursores androgénicos en estrógenos (Shanon *et al.*, 2008).

3.1.7 La ovulación

Cuando el folículo llega a la fase de madurez, el pico preovulatorio de estradiol actúa mediante un mecanismo de retroalimentación positivo sobre la hipófisis desencadenando la liberación de LH en la mitad del ciclo, denominado pico preovulatorio de LH (Tsafriri, 1998; Shanon et al. 2008). El pico de LH activa la señal mediada por AMPc, que suprime la división de las células de la granulosa y activa una cascada de genes relacionados con la inflamación que conducen al rompimiento de la pared del folículo por un mecanismo de proteólisis y controlan estrechamente la secuencia natural de la lesión y la reparación rápida de la superficie ovárica, la liberación del ovocito y la formación del cuerpo lúteo (Tsafriri, 1998; Tsafriri en Remohí *et al.*, 2002). (Figura 2).

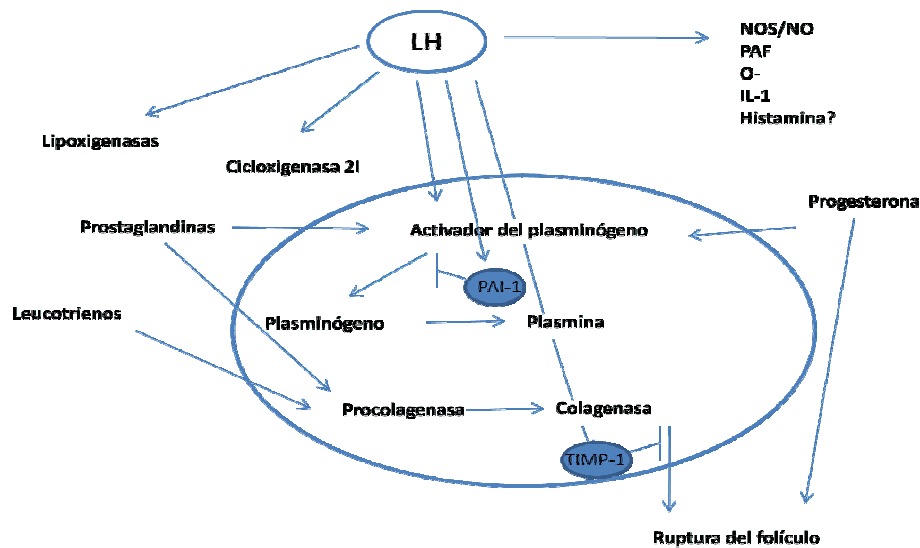


Figura 2. Algunos de los factores principales que participan en la ruptura folicular, el papel de la proteólisis es fundamental. Modificado de Remohí *et al.*, 2002.

Uno de los tejidos blanco de las hormonas esteroides producidas por las células foliculares es el útero, por lo que la secreción de estas hormonas es vital para la maduración del tejido endometrial.

3.2 ESTRUCTURA DEL ÚTERO HUMANO

El útero humano está compuesto de dos secciones anatómica y funcionalmente distintas, el cuerpo y el cuello, que están separadas por una zona denominada istmo que fuera del período de embarazo tiene escasa importancia. En la mujer sexualmente madura el cuerpo uterino representa las dos terceras partes del volumen total del útero, ocupa la porción superior de este y es eminentemente muscular. En su centro posee una cavidad aplanada y de perfil triangular. Esta cavidad se comunica en su extremo superior con las trompas y en su extremo inferior, a través del istmo, con el cuello uterino. El cuello al igual que el cuerpo esta tunelizado formando la cavidad cervical, ésta cavidad tiene forma cilíndrica o de huso y comunica la cavidad corporal con la vagina. La extremidad superior de la cavidad cervical o zona de unión con el istmo se denomina orificio cervical interno y la extremidad inferior, orificio cervical externo que su morfología es distinta según la paridad de la mujer. El istmo es una pequeña zona mal delimitada situada entre el cuello y el cuerpo, en la gestación esta zona aumenta sus dimensiones. A lo largo de la vida de la mujer, el útero sufre cambios importantes que se reflejan fundamentalmente en la relación entre volumen del cuerpo y del cuello y en la estructura histológica de la mucosa (Staff, *et al.*, 2003, Boya Vegue, 2004, Mills, 2007). El cuerpo del útero está formado por tres capas bien diferenciadas que desde la parte externa hacia la interna se denominan peritoneo uterino, miometrio y endometrio. El peritoneo recubre el cuerpo uterino en sus caras anterior y posterior en toda su

extensión. El miometrio es la capa uterina más voluminosa ya que tiene un espesor que oscila entre 1 y 2 cm. Está constituido por fibras musculares lisas y tejido conjuntivo. Las fibras musculares se disponen formando tres grupos: a) una capa delgada externa constituida por fibras musculares que se disponen longitudinalmente; b) el grupo más voluminoso de fibras musculares se dispone formando espiras que rodean la cavidad uterina y c) una capa circular mal definida de fibras musculares. Las zonas más internas de la pared uterina del cuerpo contienen más fibras musculares que las zonas externas y las regiones anterior y posterior de la pared del cuerpo contienen más fibras musculares que las regiones laterales. El endometrio es la capa mucosa que recubre el cuerpo uterino. Esta mucosa responde a cambios morfológicos importantes a los estímulos hormonales del ovario y posee la capacidad de desprenderse y renovarse en cada ciclo (Staff, *et al.*, 2003, Mills, 2007).

3.3 CARACTERÍSTICAS DEL ENDOMETRIO HUMANO

El endometrio del útero humano comprende el revestimiento mucoso hacia la luz, el cual es un tejido altamente regenerativo situado sobre el denso miometrio muscular. La unión miometrio-endometrio es irregular sin tejido submucoso que separe el tejido glandular endometrial del músculo liso del miometrio subyacente. El endometrio y el miometrio subendometrial se originan de los conductos de Müller durante la vida embrionaria, mientras que la capa externa del miometrio se desarrolla en etapas más avanzadas de la vida fetal y no tiene un origen Mülleriano. El endometrio está dividido estructural y funcionalmente en dos zonas principales, la superior funcional que contiene glándulas que se extienden desde el epitelio luminal apoyadas en estroma y la inferior basal que consiste en la base de las glándulas, estroma denso y

agregados linfoides, esta capa es responsable de generar una nueva funcional cada ciclo (Figura 3). (Gargett, 2007, Diedrich, *et al.*, 2007, Gargett, *et al.*, 2008). Los elementos celulares que componen el endometrio son las células epiteliales (de superficie y glandulares) y mesenquimales (estroma y tejido vascular).

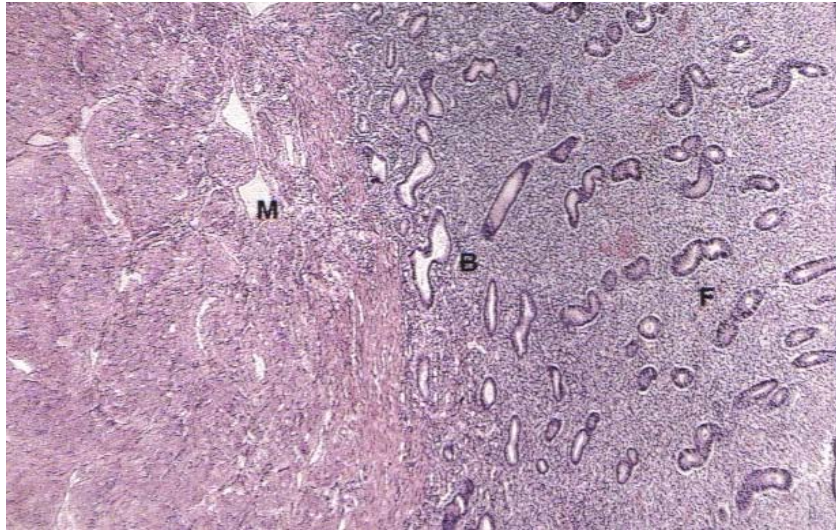


Figura 3. Estructura histológica del endometrio humano. M: miometrio, capa muscular, B: endometrio basal y F capa funcional. Tomado de Ross, 2007.

Los elementos epiteliales son los epitelios glandular y luminal que están morfológicamente compuestos por cuatro tipos distintos de células, dos de las cuales son variantes funcionales de la misma célula. Las células proliferativas de la capa funcional y la basal son morfológicamente similares, poseen una proporción núcleo/citoplasma elevada y núcleos con forma alargada con cromatina densa y nucléolos discretos. El citoplasma es escaso. Cuando las células proliferativas son las predominantes en el epitelio, los núcleos se ven estratificados. Las células secretoras se caracterizan por una secreción no mucosa. Después de la ovulación los productos secretorios se acumulan en una posición subnuclear en las células proliferativas, estos productos gradualmente cambian a una posición supranuclear y son descargados finalmente al lumen glandular. Así son reconocibles dos tipos secretorios: células

secretoras vacuoladas y no vacuoladas. Otro tipo de célula epitelial son las células ciliadas que tienen un núcleo redondo ligeramente vesiculado. Las primeras células ciliadas identificadas están situadas adyacentes a la membrana basal de la glándula y son de forma piramidal. Poseen citoplasma claro con núcleo redondo. Las glándulas endometriales normales están compuestas por estas células organizadas en un epitelio cuboidal-columnar no estratificado, el cual, durante la fase proliferativa aparentemente es estratificado. A principios de la fase proliferativa las glándulas tienen lúmenes estrechos. Comenzando la fase proliferativa media y terminando el resto del ciclo las glándulas muestran un incremento en los grados de enrollamiento pero no se observan bifurcaciones culminando con la apariencia dentada de las glándulas del endometrio en la etapa secretora tardía y menstrual (Boya Vegue, 2004, Mills, 2007, Ross, 2007).

Dentro de los elementos mesenquimales se encuentran las células estromales que son el tipo celular predominante del estroma y su apariencia varía según la fase del ciclo menstrual. Así al principio de la etapa proliferativa estas células poseen escaso citoplasma y un núcleo fusiforme-oval denso. Hacia el fin de la etapa proliferativa y dentro de la fase secretora las cantidades de retículo endoplásmico y el colágeno intra y extracitoplásmico aumentan. Al final de la fase secretora las células estromales perivasculares se vuelven redondas, adquieren más citoplasma y los núcleos se vuelven vesiculares con nucléolos prominentes (Diedrich *et al.*, 2007; Mills, 2007). Un segundo componente celular particularmente en la etapa secretora tardía son las células Natural Killer uterinas (uNK) que son células redondas con núcleo bilobulado y citoplasma pálido. Las células estromales endometriales elaboran un armazón de reticulina que se vuelve más denso a medida que el endometrio se desarrolla durante el ciclo menstrual (Mills, 2007; Ross, 2007).

3.4 EL CICLO MENSTRUAL

La liberación de folículos maduros y la preparación del endometrio para la implantación mediante ciclos definidos de proliferación, diferenciación y eliminación de tejido uterino es lo que se define como ciclo menstrual, el cual responde al ambiente endócrino predominante. Si el embarazo no se establece, el endometrio es eliminado para regenerarse en el ciclo siguiente. La capa funcional del endometrio que equivale a dos tercios de este, es la capa muerte y reparación recurrentes (Jabbour *et al.*, 2006; Shanon *et al.*, 2008). Estudios realizados por Markee, Corner y Allen desde 1929 y 1940, establecieron el papel de los esteroides ováricos, estradiol y progesterona en la regulación de cambios en la conformación endometrial a lo largo del ciclo menstrual. La progesterona es esencial para el mantenimiento del embarazo consecuencia de la transformación del endometrio preparado por los estrógenos. Por lo tanto el flujo menstrual es la respuesta del endometrio a la disminución de progesterona y estrógenos que ocurre con la regresión del cuerpo lúteo en ausencia de un embarazo.

3.4.1 Las fases del ciclo menstrual

Para su estudio, podemos dividir al ciclo menstrual en dos ciclos distintos pero que están muy relacionados entre sí. El ciclo ovárico el cual involucra las diferentes etapas de desarrollo de los folículos y consta de dos fases, la que antecede a la ovulación es denominada fase folicular y posterior a esta es la fase lútea y el otro ciclo importante es el ciclo endometrial el cual también podemos dividirlo en dos fases, de igual forma, la fase que antecede a la ovulación es la fase proliferativa y después de la ovulación se denomina fase secretora (Jabbour *et al.*, 2006).

Un ciclo completo ideal dura normalmente 28 días, aunque existen variaciones considerables entre mujeres y en periodos distintos. La fase secretora del ciclo endometrial tiene siempre la misma duración, que son 14 días, por lo que la fase proliferativa es variable. Así, el primer día del ciclo menstrual se ha identificado convencionalmente como el primer día del flujo menstrual (Shanon *et al.*, 2008).

3.4.2 El ciclo endometrial

El endometrio que ha proliferado por acción de los estrógenos, factores de crecimiento y otros factores, responde simultáneamente al estímulo de estos y de la progesterona, diferenciándose. Los cambios morfológicos observados en el endometrio se pueden dividir en cuatro periodos que son: la fase del intervalo o inicio, la fase proliferativa, la fase secretora y la fase menstrual (Stevens, 1998, Gargett, 2007).

La fase de menstruación dura aproximadamente 5 días y es seguida por la fase proliferativa endometrial, la cual como hemos comentado exhibe en duración grandes variaciones pero en promedio dura 10 días. (Stevens, 1998, Mills, 2007). Durante la menstruación se elimina toda la capa funcional del endometrio permaneciendo solo el endometrio compacto basal, comenzando así un nuevo ciclo de maduración folicular ovárica debido al aumento de la secreción de estrógenos por el folículo en desarrollo que estimula la actividad mitótica de las glándulas tubulares rectas rodeadas por estroma (Stevens, 1998).

Durante la fase proliferativa, el endometrio responde a los crecientes niveles de estrógenos con proliferación sincrónica de glándulas, estroma y vasos sanguíneos. (Santoro *et al.* 2000; Mills, 2007). La proliferación continua de estas células durante 10-12 días regenera una capa funcional endometrial completa (Stevens, 1998; Critchley, *et al.*, 2001). Durante el primer tercio de la fase proliferativa llamada también proliferativa

temprana, la tasa de crecimiento de estos tres elementos está coordinada y como consecuencia los vasos y las glándulas no están contorneados. En la fase proliferativa media y tardía las glándulas y los vasos sanguíneos ya se ven contorneados. Las glándulas están compuestas por células columnares pseudoestratificadas activas mitóticamente con una proporción alta de núcleo/citoplasma y cromatina densa. Estas células están presentes a lo largo de la fase proliferativa e incluso al inicio de la fase secretora. Después de 10 u 11 días las vacuolas subnucleares irregulares comienzan a aparecer. Durante los últimos dos días de la fase proliferativa la actividad mitótica disminuye, el contorno glandular se hace más evidente y se observan más vacuolas. Después 48 horas de la ovulación las células se ven uniformemente vacuoladas, por lo que ésta característica es indicativa del segundo día posovulatorio. Aún durante este periodo las células mantienen sus características proliferativas (Stevens, 1998; Mills, 2007).

La ovulación está mediada por una oleada de secreción de la hormona luteinizante y un pico simultáneo de secreción de la hormona folículo estimulante en el día 14 de un ciclo ideal de 28 días. La ovulación ocurre aproximadamente de 10 a 12 horas después de este pico. Esta secreción de hormonas hipofisarias inicia una serie de eventos que resultan en la expulsión del ovocito del folículo terciario y la transformación del folículo a un cuerpo lúteo. Como consecuencia de esta transformación el perfil biosintético del folículo cambia secretándose estradiol y grandes cantidades de progesterona. El tiempo de vida del cuerpo lúteo define la fase lútea ovárica que corresponde al desarrollo del endometrio secretor (Stevens, 1998; Mills, 2007; Shanon *et al.*, 2008).

Después de la ovulación suceden una serie de cambios en el estroma y en las glándulas, característicos de la fase secretora. Los cambios cíclicos del endometrio

funcional están influenciados por los cambios en el patrón de secreción hormonal de los ovarios, que depende a su vez de la secreción cíclica de las hormonas FSH y LH de la hipófisis (Stevens, 1998; Critchley, *et al.*, 2001). Las primeras 24 a 36 horas de la fase secretora el endometrio se ve morfológicamente igual a la fase proliferativa y este periodo es el denominado intervalo. La primera señal que indica que la ovulación ha ocurrido es la presencia de vacuolas subnucleares uniformes en el polo apical de las células en más del 50% de las glándulas endometriales (Stevens, 1998; Mills, 2007). Después de unos días estas vacuolas cambian a una posición supranuclear y hacia el día 5 postovulatorio la mayor parte de la secreción se ha descargado hacia el lumen de las glándulas. La fase secretora media dura desde el día postovulatorio 5 al día 9 y se caracteriza por glándulas secretoras contorneadas y no vacuoladas montadas dentro del estroma edematoso. La secreción luminal es más evidente en este periodo y la apariencia global es de un tejido repleto de glándulas. La característica distintiva del endometrio en la etapa secretora tardía que comprende desde el día postovulatorio 10 hasta el 14 es la predecidualización del estroma con prevalencia de arterias espirales (Mills, 2007); esta fase se denomina también premenstrual y en ella las glándulas se hacen irregulares y comienzan a degenerar. Estos cambios son precipitados por la disminución drástica de la secreción de progesterona y estrógenos debido a la involución del cuerpo lúteo (Stevens, 1998; Critchley, *et al.*, 2001).

3.5 REGULACIÓN HORMONAL DEL DESARROLLO ENDOMETRIAL

Además del estímulo hormonal por sí mismo, los estrógenos y progesterona también interactúan con factores de crecimiento producidos localmente de forma autocrina y/o paracrina (Ohno y Fujimoto, 1998; Critchley, *et al.*, 2001).

3.5.1 Hormonas esteroides y sus receptores

Los esteroides ováricos más estudiados son los estrógenos y la progesterona que tienen una actividad muy importante durante el ciclo menstrual femenino. Los estrógenos son los esteroides responsables de la proliferación endometrial y solamente si los receptores de progesterona están presentes se llevará a cabo la diferenciación de las células endometriales (Jabbour, *et al.*, 2006).

El receptor de las hormonas esteroides pertenece a una superfamilia de receptores nucleares (NR) los cuales son factores de transcripción que regulan la expresión genética de manera dependiente de su unión al ligando. Estas proteínas poseen unidades estructurales y funcionales bien definidas, las cuales son una estructura común y dominios funcionales denominados A/B, C, D, E y F. La región A/B está localizada en la región N-terminal y no está bien conservada; esta región contiene un dominio de transactivación denominado AF1. La región C contiene un dominio de unión a DNA altamente conservado que consiste de dos dedos de zinc. Las secuencias que se encuentran dentro del dominio C determinan la especificidad de los diferentes receptores para elementos de respuesta a hormonas específicos. Las mutaciones ocurridas en esta región pueden resultar en pérdida de la función del receptor. La región D es altamente variable y se encuentra próxima a la región C. El dominio E es el de

unión al ligando (LBD) y tiene una región de dimerización y dos dominios de transactivación (AF-2 y AF-2a). El dominio LBD determina si el receptor es activado o no. También existen proteínas accesorias que están involucradas en la estabilización y desestabilización de los complejos transcripcionales necesarios para la acción de las hormonas esteroideas (Jabbour, *et al.*, 2006)

3.5.2 Los estrógenos y su mecanismo de acción

Los estrógenos pertenecen a la familia de hormonas esteroideas, las cuales ejercen una gran variedad de efectos sobre el crecimiento, desarrollo y diferenciación. La acción reguladora primaria de los estrógenos está enfocada principalmente a los órganos reproductivos; sin embargo, pueden participar en otros procesos en prácticamente todos los tejidos como el hueso, hígado, sistema cardiovascular y cerebro.

El mecanismo de acción de esta hormona esteroide se lleva a cabo a través de su unión a un factor de transcripción específico localizado en el citoplasma y núcleo celular denominado receptor de estrógenos (ER) el cual regula la actividad de genes blanco para esta hormona (Edwards, 2005; Ellman *et al.*, 2009).

Actualmente se han identificado dos subtipos de receptores de estrógenos conocidos como receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$) y receptor de estrógenos beta ($ER\beta$) formados por una cadena de 565 y 530 aminoácidos, respectivamente. Existen otros receptores de estrógenos como el receptor transmembranal denominado GPR30 que actúa de manera independiente de $ER\alpha$ y $ER\beta$, pero influye en la activación del factor de crecimiento epidérmico (EGF) participando así en el desarrollo del cáncer de mama (Mylonas *et al.*, 2009) y los receptores mitocondriales. Los receptores de estrógenos α y β son codificados por diferentes genes cuya expresión varía dependiendo del tejido o tipo celular en el que se encuentren. El $ER\alpha$ es expresado predominantemente en los

tejidos reproductivos como el útero, glándulas mamarias y los ovarios, así como en el hígado y el sistema nervioso central, mientras que la forma β es expresada principalmente en el hueso, endotelio, pulmones, tracto urogenital, los ovarios, sistema nervioso central y próstata (Mylonas *et al.*, 2007) En el endometrio los estrógenos regulan la supervivencia de las células endometriales, su viabilidad y efectos mitogénicos mediante el receptor ER α . El receptor β de estrógenos (ER β) es expresado en bajos niveles en el endometrio y promueve la diferenciación epitelial a través de regulación negativa de respuestas mediadas por ER α (Wada-Hiraike *et al.*, 2006; Gargett *et al.* 2008).

3.5.3 La progesterona y su mecanismo de acción

Se han descrito al menos dos isoformas para el receptor de progesterona humana (PR) que son PRA y PRB, las cuales derivan de un mismo gen y funcionan como reguladores transcripcionales de genes que responden a progestinas (Jabbour, *et al.*, 2006; Mylonas *et al.*, 2009). La expresión de los receptores de hormonas esteroides en el endometrio varía temporalmente y espacialmente durante el ciclo menstrual. De igual manera que los estrógenos la acción de la progesterona se lleva a cabo mediante su unión a PR, lo cual inhibe la proliferación del epitelio endometrial estimulada por 17 β -estradiol después de la ovulación e induce la diferenciación hacia células secretoras. La expresión de ER α y PR está bajo control de estradiol y progesterona aunque ambos receptores son sobrerregulados durante la fase proliferativa mediante el estradiol ovárico y subsecuentemente subregulados en la fase secretora por progesterona actuando a nivel transcripcional y postranscripcional. Así la presencia del receptor de progesterona es una evidencia de que existe una vía funcional mediada por el receptor de estrógenos (Critchley y Saunders, 2009; Lanišnik Rižner, 2009).

3.6 PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR ENDOMETRIAL DURANTE EL CICLO MENSTRUAL

Los cambios cíclicos predecibles del endometrio, así como la posibilidad de obtener biopsias hacen posible su estudio en relación a los cambios hormonales durante el ciclo menstrual respecto a la proliferación, diferenciación y muerte celular (Dahmoun *et al.*, 1999).

3.6.1 Proliferación celular durante el ciclo menstrual

En la capa funcional del endometrio, la proliferación celular y la diferenciación están reguladas por cambios secuenciales en hormonas esteroides sexuales circulantes durante el ciclo menstrual, mientras que la capa basal sufre poca proliferación y responde menos a cambios hormonales.

La proliferación estimulada por 17β -estradiol llega a su máximo nivel al momento de la ovulación. Como el nivel estrogénico aumenta durante la etapa proliferativa del ciclo menstrual se induce la expresión de receptores de estrógenos y progesterona en el epitelio y el estroma y la capa funcional crece rápidamente con una proliferación intensiva de células del epitelio glandular y células estromales (Brenner *et al.*, 2003). Después de la ovulación la proliferación disminuye gradualmente y la capa funcional comienza a diferenciarse bajo la influencia de progesterona que disminuye la expresión de los receptores de estrógenos alfa y progesterona (Jabbour *et al.*, 2006). Las glándulas producen grandes cantidades de glucógeno y productos secretores histotrópicos como preparación para la implantación del blastocisto (Spencer *et al.*, 2005). Los receptores de progesterona persisten en las células estromales de la capa

funcional y sufren algunos cambios predeciduales alrededor de las arteriolas espirales y bajo el epitelio luminal. La diferenciación endometrial también está acompañada de cambios en los perfiles de expresión genética (Ponnampalam *et al.*, 2004).

Los niveles crecientes de progesterona durante la fase secretora bloquean la mitosis epitelial y las células comienzan a diferenciarse. Los receptores a progesterona en células estromales de la capa funcional persisten y la proliferación de células estromales también se reduce. Ocurriendo la implantación, las células estromales endometriales completan la decidualización y la diferenciación. Si la implantación no sucede las células estromales decidualizadas sufren apoptosis, pues los niveles de progesterona circulante decaen debido a la regresión del cuerpo lúteo (Chan *et al.*, 2004, Gargett, *et al.* 2005).

En algunos estudios se ha descrito a nivel molecular la proliferación celular del endometrio no patológico en diferentes fases del ciclo menstrual y también se ha caracterizado la expresión de ER α y PR. La proliferación celular se determinó con la expresión marcador Ki67, una proteína nuclear que se encuentra en todas las fases del ciclo celular; por ejemplo en la interfase se detecta en el núcleo, en la fase de mitosis se encuentra localizada en la superficie de los cromosomas. Está presente también durante las fases activas del ciclo celular G1, G2 y S, pero está ausente en la fase G0. Ki67 se expresa desde la etapa proliferativa hasta la secretora media, disminuyendo su expresión de acuerdo a la progresión del ciclo menstrual, desapareciendo en la fase secretora tardía, aunque su expresión se mantiene en el estroma endometrial (Kokawa *et al.*, 1996, Shiosawa, 1996, Vaskivuo, 2000, Mertens, *et al.*, 2002, Jabbour *et al.*, 2006).

3.6.2 Muerte celular durante el ciclo menstrual

Cuando la implantación no ocurre, las células estromales decidualizadas sufren muerte celular mientras los niveles de progesterona circulantes disminuyen debido a la regresión del cuerpo lúteo (Jabbour *et al.*, 2006). La ausencia de esteroides ováricos en la fase lútea induce una cadena de eventos con autodigestión lisosomal e involución de las células seguida por deterioro vascular con trombosis y sangrados intersticiales.

La muerte celular es un proceso fisiológico fundamental responsable del mantenimiento de la homeostasis en organismos multicelulares. La progresión ordenada de eventos durante la apoptosis resulta en la muerte celular sin la salida de enzimas proteasas y contenidos celulares de las células que están muriendo, por eso se reduce la probabilidad de una respuesta inflamatoria (Dmowski, *et al.*, 2001). Múltiples evidencias sugieren que la apoptosis está directamente involucrada en la regulación del ciclo menstrual por la eliminación de células senescentes de la capa funcional del endometrio uterino durante las fases secretoria tardía y menstrual (Hopwood y Levison, 1976; Kokawa *et al.*, 1996). Esto es seguido por una fase proliferativa del siguiente ciclo (Dmowski, *et al.*, 2001). Se ha observado apoptosis en el endometrio humano principalmente en la fase lútea tardía y durante la menstruación, pero también en la fase proliferativa temprana (Dahmoun *et al.*, 1999; Izawa *et al.*, 2006). También se ha reportado que la muerte celular se detecta en las glándulas a partir de la fase secretora media y en el estroma en la secretora tardía y no hay evidencias de apoptosis en la etapa proliferativa tardía, mediante el índice de expresión de proteínas de la familia Bcl-2. La familia Bcl-2 son un grupo de proteínas que regulan procesos de permeabilización mitocondrial y constituyen un punto clave en la vía intrínseca de apoptosis celular. Bcl-2 es un péptido que promueve la supervivencia celular bloqueando la vía final común que resulta en la muerte celular (Jones, *et al.* 1998, Mertens *et al.*, 2002). La proteína

Bax puede contrarrestar el efecto anti-apoptótico de Bcl-2 al formar heterodímeros con éste; lo cual sugiere que la susceptibilidad a la muerte celular depende del índice Bcl-2/Bax (Kokawa, *et al.*, 1996, Vaskivuo, *et al.*, 2000). La expresión de Bcl-2 incrementa en la etapa proliferativa y disminuye en la fase secretora media especialmente en glándulas, desapareciendo en secretora tardía. Bax se expresa durante toda la fase secretora (Kokawa *et al.*, 1996, Shiosawa, 1996, Vaskivuo, 2000, Mertens, *et al.*, 2002, Jabbour *et al.*, 2006).

3.7 REGENERACIÓN DEL TEJIDO ENDOMETRIAL

Las primeras etapas de regeneración endometrial involucran migración de células epiteliales desde los remanentes de las glándulas basales sobre la superficie desnuda en las primeras 48 horas de eliminación de tejido; entonces la reparación temprana ocurre mientras los niveles circulantes de estrógeno son muy bajos y cuando las células epiteliales carecen del receptor de estrógenos α (ER α). De igual forma varios estudios (Kaitu'u-Lino *et al.*, 2007) que se han efectuado con modelos murinos, sugieren que la regeneración ocurre en ausencia de estrógenos.

Cada mes, el tejido mucoso crece de 4-7mm dentro de 4 a 10 días de la primera mitad del ciclo menstrual (Gargett, *et al.*, 2008). La regeneración del endometrio se lleva a cabo mediante crecimiento epitelial, angiogénesis y proliferación de células estromales. En la capa basal las células epiteliales reciben estímulos mitogénicos vía TGF α y EGF a través del mismo receptor y PDGF (Chan *et al.*, 2004). Al segundo día de menstruación el epitelio inicia el crecimiento desde los remanentes de las glándulas. En el cuarto día, dos tercios de la superficie luminal se cubre de epitelio que creció fuera de los límites de las glándulas. El proceso de epitelialización está esencialmente terminado a los seis días. También es muy importante el crecimiento de los vasos

endometriales, la angiogénesis exitosa y la remodelación de la red de vasos es dependiente de una serie de moléculas de señalización y receptores (Chan *et al.*, 2004). Por ejemplo, factores de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), angiopoyetinas, angiogenina y epirinas (epirins) y su receptor juegan un papel importante en este proceso (Chan *et al.*, 2004, Gargett *et al.*, 2008).

3.7.1 Participación de factores de crecimiento en la regeneración endometrial

Los factores de crecimiento producidos localmente participan en la regeneración endometrial mediante los efectos mitogénicos de los estrógenos y de diferenciación de la progesterona a través de interacciones autocrinas y paracrinas entre las células epiteliales y estromales. Los estrógenos inducen proliferación de células epiteliales y estromales del endometrio a través de la sobre regulación de la síntesis y secreción del factor de crecimiento transformante beta (TGF β) (Gargett, *et al.*, 2008).

Las células epiteliales endometriales sintetizan y secretan varios factores, incluyendo el factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF α) y el factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-I). También durante el rápido crecimiento asociado con la etapa proliferativa en las células epiteliales, se incrementa la expresión de los receptores a TGF α , IGF-I, factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) y el factor beta de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF β). El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor inhibidor de la leucemia (LIF) y el factor de células troncales (SCF) también pueden tener un papel importante en la proliferación celular endometrial, la angiogénesis, la implantación y posiblemente en la regeneración. Estos factores de crecimiento podrían también modular los efectos de estrógenos o

progesterona alterando la expresión de su receptor (Gargett, *et al.*, 2008, Maruyama, *et al.* 2010)

3.7.2 Participación de las células troncales en la regeneración endometrial

Debido a que la capa funcional del endometrio es la que se elimina durante la menstruación y subsecuentemente es regenerada a partir de la capa basal permanente, se sugiere que las células troncales residen en esta capa basal y que son responsables de la capacidad de regeneración endometrial en cada ciclo menstrual (Padykula *et al.* 1989, Padykula 1991, Gargett, 2008). Diversos estudios apoyan esta idea (Prianishnikov 1978, Padykula *et al.* 1989, Padykula 1991) pues existen evidencias de ensayos de proliferación y clonogenicidad de pequeñas poblaciones de células aisladas del endometrio (Tanaka *et al.* 2003, Chan *et al.*, 2004, Gargett 2007). Esto sugiere que la capa basal se comporta como un compartimento germinal del cual varios tipos celulares endometriales proliferan y se diferencian. (Figura 4).

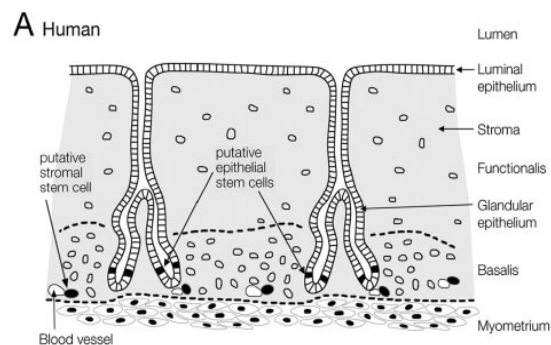


Figura 4. Posible localización de células troncales en el endometrio humano. Existen dos poblaciones de células troncales/progenitoras en la capa basal, las células troncales estromales y epiteliales. Tomado de Gargett *et al.*, 2008.

Las células troncales en tejidos adultos se caracterizan por ser indiferenciadas y pueden definirse por sus propiedades funcionales, como su capacidad proliferativa elevada, potencial de autorrenovación y la habilidad de diferenciarse a uno o más linajes o tipos celulares especializados. La autorrenovación o la capacidad de producir células troncales hijas idénticas se requiere para mantener el *pool* de células troncales del tejido, mientras que las otras características permiten regenerar el tejido en el cual albergan mediante la producción de los tipos celulares que lo componen. De hecho, el proceso de diferenciación celular es definido como el cambio en el fenotipo de la célula debido a la expresión de genes asociados con la función celular más que con la división (Chan *et al.*, 2004).

Actualmente, se sabe que la mayoría de tejidos en el ser humano adulto presentan células troncales, que son capaces de participar en la renovación tisular. En el tracto reproductivo femenino existen células troncales capaces de participar en la remodelación y proliferación celular, particularmente en la glándula mamaria, el endometrio y recientemente se ha demostrado que también el ovario presenta células troncales con capacidad de diferenciarse hacia diferentes tipos celulares (Bukovsky *et al.*, 2005, Tilly y Rueda, 2008; Virant-Klun, *et al.*, 2008) lo cual abre un enorme campo de investigación.

3.7.3 Evidencias de la existencia de células troncales en el endometrio

Las primeras evidencias publicadas sobre la existencia de estas células en el endometrio provienen de estudios de clonogenicidad demostrando la presencia de dos tipos celulares. Se han encontrado unidades formadoras de colonias (CFU) epiteliales y estromales en el tejido endometrial normal, peri-menopáusicas y en el de mujeres tratadas con anticonceptivos. Se ha postulado que esas CFU pueden ser responsables de

regenerar cíclicamente este tejido (Chan *et al.*, 2004; Gargett, 2007; Gargett, *et al.*, 2008). Respecto a las células epiteliales del endometrio humano, se ha demostrado que 0.2% de las células epiteliales tienen actividad de CFU, formándose dos tipos, las CFU grandes y pequeñas. Las primeras son originadas por una célula troncal progenitora probablemente localizada en la base de las glándulas, en la capa basal, y las CFU pequeñas son originadas por una célula amplificada transitoriamente, comúnmente localizadas en la capa funcional y que son responsables de la intensa proliferación observada en la etapa proliferativa (Chan *et al.* 2004). También se ha reportado la existencia de células mesenquimales/estromales con propiedades de troncales en el endometrio humano y de ratón. En el humano se han identificado pequeñas poblaciones que corresponden al 1.25 % de células en el estroma endometrial que poseen la capacidad de formar colonias. Al igual que las CFU epiteliales, hay dos tipos de células CFU estromales las grandes y pequeñas (Chan *et al.*, 2004; Schwab *et al.*, 2005; Gargett, *et al.*, 2008). Estas células inician la diferenciación *in vitro* a linajes mesodérmicos como adipocitos, osteocitos y condrocitos, lo cual también apoya fuertemente la hipótesis de que el endometrio humano contiene pequeñas poblaciones de células troncales multipotentes adultas con actividad de células troncales mesenquimales (Schwab *et al.*, 2005). Las células troncales adultas son poco comunes en los tejidos y su identificación *in situ* usando marcadores comunes para células troncales no es suficiente para definir las de una manera definitiva como células troncales específicas del tejido (Shostak, 2006). Por lo que se requiere un mejor y mayor análisis para poder validar el hecho de que las células que expresan estos marcadores funcionan como células troncales/progenitoras y son propias del tejido. Por ejemplo, se ha demostrado que el marcador Oct-4 se expresa en el 40% de las muestras de endometrio analizadas en mujeres sanas o con alguna patología invasiva y

proliferativa, aunque no se encontró una correlación entre la expresión del marcador y la fase del ciclo menstrual en la que se expresa, ni con las patologías. Por otro lado la expresión de Oct-4 se observó predominantemente en el estroma endometrial (Matthai, *et al.*, 2006). Por lo anterior, la identificación de marcadores de células troncales/progenitoras endometriales es fundamental para determinar su localización y posiblemente el nicho de estas células en el endometrio humano. Al identificar y caracterizar a las células troncales/progenitoras del endometrio humano, se ofrece la posibilidad de entender y abordar desde una perspectiva nueva, muchas de las patologías ginecológicas como la infertilidad y sugiere una utilidad futura en el área terapéutica de la medicina reproductiva.

3.8 RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL

El objetivo biológico de la diferenciación y maduración de los componentes del tejido endometrial durante el ciclo menstrual es lograr condiciones apropiadas para la implantación y el establecimiento del embarazo, (Beier, *et al.*, 2001 Gargett, *et al.* 2008).

Después de la ovulación y sí se lleva a cabo la fecundación, el endometrio proporciona un sitio de unión y una fuente de alimento para el embrión hasta que desarrolla la placenta. Por lo tanto, el desarrollo del endometrio es crucial para un embarazo exitoso (Giudice, 1995; Tabibzadeh, 1998; Bromer, *et al.* 2009). En las mujeres la fase receptiva o ventana para que el embrión pueda implantarse dura aproximadamente 5 días y la adquisición de la receptividad endometrial es influenciada por estradiol y progesterona (Tapia, *et al.*, 2008).

3.8.1 La ventana de implantación

La etapa en la que el blastocisto puede implantarse en el endometrio ocurre en un periodo entre los días 20 y 24 de un ciclo regular normal que corresponden al día LH+7 al LH+11 o en la fase endometrial denominada secretora media. Este periodo es denominado ventana de implantación (Psychoyos, 1973; Achache y Revel, 2006).

La implantación embrionaria representa un paso crítico en el proceso reproductivo de muchas especies, el cual consiste en la conexión del blastocisto a la superficie endometrial materna para formar la placenta que proporcionara la interfase entre el feto en crecimiento y la circulación materna. La implantación exitosa requiere de un endometrio receptivo, un embrión funcional en la etapa de blastocisto y un dialogo sincronizado entre los tejidos materno y embrionarios (Denker, 1993; Tabibzadeh, 1998; Aplin, 2000; Simon *et al.*, 2000, Achache y Revel, 2006). El proceso de implantación se clasifica en tres etapas: aposición, adhesión e invasión. Durante la aposición del blastocisto las células del trofoblasto se adhieren al epitelio endometrial. El blastocisto se anclará a la lámina basal y a la matriz extracelular estromal. Así la implantación involucra una serie de eventos de señalización que son cruciales para el establecimiento del embarazo. Por ejemplo, se han identificado un gran número de mediadores moleculares que actúan bajo la influencia de las hormonas ováricas, los cuales también participan en la interacción materno-fetal temprana. Estos mediadores engloban una gran variedad de moléculas interrelacionadas que incluyen factores de adhesión celular, citocinas, factores de crecimiento, lípidos y otros (Lessey *et al.*, 1992; Simon *et al.*, 2000; Achache y Revel, 2006), así la receptividad endometrial consiste en la adquisición de ligandos de adhesión y una pérdida de componentes inhibitorios que

pueden actuar como una barrera contra el anclaje del embrión (Aplin, 2000; Achache y Revel, 2006).

3.9 INFERTILIDAD

La infertilidad y la pérdida temprana del embrión son causadas frecuentemente por la diferenciación endometrial insuficiente, incluso cualquier estado de receptividad endometrial incompleto de la fase lútea evita la implantación (Beier, *et al.*, 2001). Aunque los factores que están relacionados con la infertilidad son múltiples, podemos agruparlos para su estudio en factores masculinos y femeninos. Dentro de estos últimos, las disfunciones ovulatorias y particularmente la disfunción hipotálamo hipofisiaria es un problema frecuente.

3.9.1 Disfunción Hipotálamo Hipofisiaria

Entre las causas de una disfunción ovulatoria se encuentra la falla en la comunicación hipotálamo hipofisiaria, sus características son: deficiencia en la fase lútea, amenorrea y ciclos anovulatorios (Matzuk y Lamb 2008). Una proporción importante de patologías que derivan en infertilidad corresponde a la disfunción hipotálamo hipofisiaria. La disfunción hipotálamo hipofisiaria es un trastorno tales manifestaciones clínicas. Como hemos visto, para que la ovulación suceda, se requiere una serie de eventos perfectamente coordinados entre el hipotálamo, la hipófisis y el microambiente ovárico; cualquier alteración en alguno de estos niveles puede conducir a la anovulación. El tratamiento de esta patología consiste en la administración de inductores de ovulación hasta que es producido un ciclo ovulatorio (Homburg, 2005), logrando en su mayoría altas tasas de ovulación corroboradas por los niveles de

progesterona en el día siete posterior al pico preovulatorio de LH; sin embargo, las tasas de embarazo son bajas. La disfunción ovulatoria es una de las causas más comunes de alteraciones reproductivas en parejas infértiles. En ausencia de otros factores la inducción de ovulación exitosa comúnmente restaura la fertilidad (Homburg, 2005).

3.10 INDUCCIÓN DE OVULACIÓN

La inducción de ovulación es comúnmente utilizada en el tratamiento de mujeres con diagnóstico de oligoanovulación para producir una respuesta ovulatoria que culmine con la expulsión del folículo maduro (Hughes, 1997). Dentro de los inductores de ovulación más utilizados en la clínica está el citrato de clomifeno (CC) y las gonadotropinas recombinantes como FSH recombinante (FSHr).

3.10.1 El citrato de clomifeno

La introducción del CC en la práctica clínica significó un gran avance en la endocrinología reproductiva. Este agente no esteroideo de uso oral ha servido para superar problemas de infertilidad previamente intratables gracias a su capacidad de producir la ovulación. A lo largo de los años se han introducido varias modificaciones a las pautas de uso del citrato de clomifeno con el fin de incrementar su eficacia en casos de disfunción ovulatoria a la vez que se han expandido las indicaciones para su uso. Sin embargo, a casi medio siglo de su síntesis original, siguen existiendo dudas sobre los mecanismos de acción del CC en paralelo con su capacidad para iniciar la ovulación en los seres humanos. De hecho, el papel de este fármaco que es el más prescrito en el mundo para tratar problemas de infertilidad, en el endometrio, el moco cervical, los ovarios e incluso los ovocitos todavía no está completamente claro (Kolibianakis y

Devroey en Remohí *et al.*, 2002). El citrato de clomifeno es un miembro de la familia de los estilbenos y una mezcla racémica de citrato de enclomifeno y zuclomifeno. El zuclomifeno es, por mucho, el más potente de los dos componentes con el 38% del contenido total de una tableta y tiene una vida media más larga que el enclomifeno, siendo detectable en el plasma un mes después de su administración. La dosis más utilizada va de 50 a 250 mg por día durante 5 días, comenzando con la dosis más baja e incrementándose en 50 mg por día hasta que es producido un ciclo ovulatorio (Homburg, 2005).

Una serie de trabajos publicados han revelado que existe una discrepancia entre las tasas de ovulación y embarazo, lo cual probablemente es debido al efecto antiestrogénico del CC en el endometrio y el moco cervical (Sereepapong, *et al.*, 2000; Triwitayakorn, *et al.*, 2002; Homburg, 2005). Estos estudios revelan una tasa de ovulación del 73% y una tasa de embarazo del 36% en datos de 5268 pacientes. Del total de 4054 embarazos aproximadamente el 20% sufrió un aborto espontáneo (Homburg, 2005). Por otro lado los análisis morfométricos llevados a cabo a mujeres fértiles e infértiles con ciclos regulares en la fase lútea media sugieren que los efectos antiestrogénicos del CC se observan más en las glándulas (diámetro y altura) que en el estroma (Li, *et al.* 1992; Sereepapong, *et al.*, 2000). Se han supuesto efectos adversos del citrato de clomifeno en el endometrio debido a que este tratamiento posiblemente interfiere con la inducción de receptores de estrógenos y progesterona en el endometrio lo cual ha sido implicado como un mecanismo responsable del incremento en la incidencia de la deficiencia en la fase lútea (Amita, *et al.* 2010)

3.10.2 Mecanismo de acción del citrato de clomifeno

El mecanismo de acción del CC consiste en su unión a los receptores de estrógenos en varios sitios del sistema reproductor, incluyendo el hipotálamo, la hipófisis, el ovario, el endocervix y el endometrio, actuando como un agonista o antagonista de estrógenos sobre los tejidos sensibles a esta hormona (Sereepapong, *et al.*, 2000; Homburg, 2005). En el hipotálamo se une a los receptores de estrógenos disminuyendo el número disponible de éstos. El hipotálamo y la hipófisis interpretan esta señal como un nivel bajo de estrógenos lo cual dispara un mecanismo de retroalimentación positiva que resulta en la secreción de GnRH (Triwitayakorn, *et al.*, 2002) y a su vez esta secreción induce la descarga de FSH de la hipófisis anterior la cual es suficiente para activar el ciclo de eventos que llevan a la ovulación (Homburg, 2005). Recientemente, se ha descrito el mecanismo de acción del citrato de clomifeno a nivel molecular. Como se sabe, el reclutamiento de los coactivadores de ER es esencial para la transcripción dependiente de ER α y en general para la actividad estrogénica. Se examinó la interacción entre ER α y el coactivador 1 del ER (SRC-1). Por ensayos de coinmunoprecipitación, se determinó que la formación del complejo entre ER α y SRC-1 se incrementa significativamente pero se no se forma en presencia de CC. Los datos revelados por la colocalización de GFP-ER α y SCR-1 inducida por E₂ muestran que se previene en presencia de CC. Se observó también que la reducción de SRC-1 usando un pequeño RNA de interferencia para SRC-1 resultó en la inhibición de la proliferación celular inducida por E₂ y la activación transcripcional del gen ER. Esto sugiere que el CC puede inhibir la proliferación celular epitelial endometrial inducida por E₂ y la transactivación de ER inhibiendo el reclutamiento de SRC-1 por ER (Amita *et al.*, 2010).

3.10.3 Las gonadotropinas recombinantes: La FSHr

La FSH pertenece a una familia de glucoproteínas estructuralmente relacionadas, entre ellas la LH, la gonadotropina corionica humana (HCG) y la hormona estimulante de la tiroides (TSH). Esta hormona recombinante se produce mediante procesos que implican la creación de un vector de expresión de FSH, transformación celular y clonación (Maas y Hooren en Remohí *et al.*, 2002)

En pacientes infértiles por disfunción hipotálamo hipofisaria el tratamiento con FSHr suele iniciarse cuando han fallado otros tratamientos para la inducción de ovulación, pues el tratamiento inicial en la mayoría de los casos es el citrato de clomifeno. La FSHr carece de actividad intrínseca de LH, ya que se ha demostrado que las concentraciones séricas elevadas de LH están relacionadas con la infertilidad persistente, por lo tanto su administración puede ser adecuada para estas pacientes (Olijve, *et al.*, 1996).

3.10.4 Mecanismo de acción de la FSHr

El mecanismo de acción de la FSHr es a través de su propio receptor que es expresado principalmente en la membrana superficial de las células de la granulosa ováricas, estimulando la división celular y la formación de líquido en el antro folicular. Así como la activación subsecuente del sistema de adenilatociclasa, causando aumento de la síntesis de citocromo P450 aromatasa, con lo cual aumenta la conversión de andrógenos a estrógenos. Esta hormona también controla eventos morfológicos y

celulares, tales como la inducción de aparición de receptores de LH en las células de la granulosa y la activación de las enzimas involucradas en la biosíntesis de progesterona (Olijve, *et al.*, 1996; Maas y Hooren en Remohí *et al.*, 2002). La FSH suministrada al comienzo del ciclo, en la fase folicular temprana, actúa sobre el grupo de folículos reclutados en los últimos días de la fase lútea del ciclo anterior, permitiendo la selección de un mayor número de folículos que puedan evolucionar como dominantes. La respuesta del ovario dependerá de cada paciente en particular, pero ante el desarrollo de varios folículos y una producción de estradiol mayor de 150-200 pg/ml por más de 36 hs, se puede producir un pico endógeno de LH, que empeorará las condiciones del ovocito para ser fertilizado (Maas y Hooren en Remohí *et al.*, 2002)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El objetivo biológico de la diferenciación y maduración de los componentes del tejido endometrial durante el ciclo menstrual es lograr condiciones apropiadas para la implantación y el establecimiento del embarazo mediante la generación de un endometrio maduro, siendo este un proceso complejo en el que participan diversos factores tales como los estímulos hormonales cíclicos, factores de crecimiento, proliferación y muerte celular controlada y recientemente se ha sugerido que células troncales endometriales participan también en la regeneración endometrial.

Cuando el funcionamiento del eje hipotálamo hipófisis ovario que controla el desarrollo folicular y la maduración endometrial está alterado, se utilizan inductores de ovulación con los que se han obtenido tasas de ovulación altas, pero tasas de embarazo bajas. Desde esta perspectiva, el presente trabajo pretende determinar el efecto de estos inductores de ovulación en la proliferación, muerte celular y expresión de receptores a hormonas esteroides en el endometrio durante la fase secretora media, así como en la presencia de células troncales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los patrones de expresión de marcadores de proliferación, muerte celular, receptores de estrógenos, progesterona y células troncales en el endometrio de mujeres infértiles en fase secretora media con disfunción hipotálamo-hipofisiaria sometidas a inducción farmacológica de ovulación con citrato de clomifeno y FSHr

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar la proliferación celular endometrial utilizando el marcador de proliferación Ki67.

- 2.- Determinar la muerte celular endometrial a través del método del TUNEL y mediante el índice de expresión de Bcl-2/Bax.

- 3.- Evaluar la expresión de receptores de estrógenos y progesterona en el endometrio.

- 4.- Comparar la expresión endometrial de Ki67, Bcl2, Bax, de receptores de estrógenos y progesterona y la muerte celular endometrial obtenida en pacientes infértiles sometidas a inducción farmacológica de la ovulación, con la obtenida en pacientes ovulatorias y en pacientes infértiles sin tratamiento.

- 5.- Caracterizar e identificar células troncales endometriales mediante la expresión de los marcadores Oct-4, Nanog y Sox-2.

HIPÓTESIS

Se sabe que diversos factores, como la proliferación y muerte celular, los estímulos hormonales cíclicos que actúan a través de los receptores de estrógenos y de progesterona y también las células troncales, están involucrados en el desarrollo y la maduración endometrial. Por lo tanto, el tratamiento con inductores de ovulación como el citrato de clomifeno y FSHr en pacientes infértiles por disfunción hipotálamo-hipofisiaria, produciría cambios en los patrones de expresión de dichos factores en el endometrio en fase secretora media.

MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 PACIENTES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO

La población de estudio estuvo compuesta por pacientes que fueron atendidas en la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Gineco Obstetricia No. 3 La Raza, del IMSS, México DF.

7.1.1 Criterios de Inclusión

- Pacientes infértiles en edad reproductiva (de acuerdo a requisitos de admisión al servicio vigentes).
- Con diagnóstico de disfunción hipotálamo-hipofisiaria.
- Permeabilidad tubaria bilateral o al menos una tuba, corroborada a través de histerosalpingografía o laparoscopia.
- Otros factores de infertilidad ya corregidos.
- Carta de consentimiento informado

7.1.2 Criterios de exclusión

- Información clínica incompleta.
- Que rechacen participar en el estudio.

En todas las pacientes como parte del protocolo básico de estudio de la pareja infértil se realizaron exámenes básicos (biometría hemática, química sanguínea, pruebas de coagulación, VDRL, examen general de orina), histerosalpingografía, ultrasonido pélvico, exudado cervicovaginal, determinaciones hormonales séricas (FSH, LH, estradiol basales en el día 21-23 del ciclo) y en el varón espermatobioscopia.

Con las pacientes de cada grupo de estudio se realizó lo siguiente:

- Determinación basal de LH, FSH, E2, PRL, TSH en el día 3 a 5° ciclo.
- Determinación de progesterona y estradiol en el día 21 del ciclo.
- US endovaginal para el seguimiento folicular y la valoración del endometrio por un patrón ecográfico y grosor.
- Inducción farmacológica de la ovulación con Citrato de Clomifeno del 5° al 9° del ciclo con una dosis de 100 mg/día y con FSHr bajo el esquema *step-up*.
- Toma de biopsia de endometrio en el día 21° (LH+7) ciclo menstrual, utilizando cánula Pipelle, siguiendo la técnica médica habitual.

7.2 GRUPOS DE ESTUDIO

Los 4 grupos de estudio son los siguientes:

A.- 12 Pacientes infértiles con adecuada función ovulatoria. Grupo Control.

B.- 11 Pacientes infértiles con disfunción hipotálamo-hipofisaria sometidas a inducción farmacológica de ovulación con Citrato de Clomifeno (CC). Se administró una dosis de 100mg/día comenzando el día 5 hasta el día 9 del ciclo menstrual.

C.- 5 Pacientes infértiles con disfunción hipotálamo-hipofisaria sometidas a inducción de ovulación con hormona estimulante del folículo de origen recombinante (FSHr) bajo el esquema *step-up* con 75UI por día de FSHr.

D.- 10 Pacientes infértiles con disfunción hipotálamo-hipofisaria sin tratamiento con inductores de ovulación.

7.3 PROCESAMIENTO DEL TEJIDO

Los tejidos se fijaron en formalina al 3%; dejándolas hasta 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS para eliminar los residuos de formalina. Los tejidos se deshidrataron en un histoquinete con concentraciones de etanol crecientes desde 50 hasta 100%, se lavaron con xilol y se dejaron en parafina, posteriormente se impregnaron e incluyeron en parafina, colocandose en bloques. Se hicieron cortes de 5 μm de grosor y se colocaron en laminillas cargadas con poly-L-Lisina de Sigma.

7.4 TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA

Se realizaron cortes de 5 μm en el microtomo y se montaron en las laminillas. Posteriormente, las muestras se rehidrataron en etanol (100, 90, 80, 70 y 50%) y finalmente en agua destilada. Las muestras se teñieron con Hematoxilina de Harris por 5 minutos, se realizó el viraje y posteriormente se colocaron las laminillas por 10 segundos en la eosina. Finalmente se deshidrataron las muestras en soluciones de concentración creciente de etanol, y se montaron con un medio permanente (Clarion Mounting Medium, Biomeda) finalmente se observaron al microscopio de luz para su análisis.

7.5 INMUNOHISTOQUÍMICA

Los cortes histológicos se desparafinaron en un horno a 60 °C durante 1 hora y se rehidrataron en Xilol y etanol en concentraciones decrecientes desde 100 hasta 50%,

se lavaron con agua destilada y se dejaron en PBS 1X durante 3 minutos. Se llevó a cabo la recuperación del antígeno hirviendo los cortes en EDTA 10 mM a pH 8-9 por 40 minutos. Los cortes histológicos se colocaron en la cámara húmeda Kinetic Slide Stainer de Biocare. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con Peroxidase-Blocking Reagent 3% (Dako) durante 10 minutos y se incubó con el anticuerpo primario Ki67 (Biocare 1:50), ER α (Dako 1:20), PCNA (SantaCruz Biotechnology 1:500) PR (Thermo NeoMarkers1:75), Bcl-2 (Biocare 1:50), Bax (Biocare 1:50), Oct-4 (Santa Cruz 1:100), durante 2 horas a 25 °C. Para el control negativo se omitió el anticuerpo primario. Se incubó con el anticuerpo secundario (MATCH 4 Universal HRP Polymer Kit de Biocare) durante 15 minutos y posteriormente con el polímero (MR HRP-Polymer de Biocare) durante 15 minutos. La reacción se reveló con diaminobencidina (DAB Biocare) observando al microscopio los tejidos para comprobar el marcaje y se contratiñó con hematoxilina (Dako). Los tejidos se observaron en un microscopio Nikon y se tomaron 3 fotografías al azar de diferentes zonas del tejido con el objetivo de 20X. La cantidad de núcleos inmunopositivos en el estroma y en el epitelio glandular (Ki67, PCNA, ER α , PR) y citoplasma con marca positiva (Bcl-2 y Bax), se cuantificó mediante el programa de análisis de imagen Image J. Se asignaron los siguientes valores a la cantidad de marca positiva para los marcadores analizados en cada grupo: (-) sin marca positiva; (+) poca marca positiva; (++) marca positiva moderada; (+++) marca positiva abundante.

7.6 INMUNOFLUORESCENCIA

Los cortes histológicos se desparafinaron y se sometieron al mismo proceso de deshidratación descrito para la inmunohistoquímica. Posteriormente se llevó a cabo la

recuperación del antígeno hirviendo los cortes en citrato de sodio 0.01 M a pH 6 por 40 minutos. Los cortes histológicos se colocaron en la cámara húmeda y se dejaron lavando en PBS 1X durante 5 minutos. Se incubaron con el anticuerpo primario Nanog (R&D Systems 1:100) y Sox-2 (R&D Systems 1:100) durante 2 horas a temperatura ambiente. Para el control negativo se omitió el anticuerpo primario. Los cortes se lavaron con PBS 1X y se colocó el anticuerpo secundario (Zymed 1:200), incubando durante 1 hora a temperatura ambiente y protegiendo la cámara húmeda de la luz con papel aluminio. Se observaron los cortes en un microscopio de fluorescencia y las células positivas presentaron marca fluorescente en el núcleo. La cantidad de núcleos inmunopositivos en el estroma y en el epitelio glandular se cuantificó mediante el programa de análisis de imagen Image J.

7.7 DETERMINACIÓN DE LA MUERTE CELULAR MEDIANTE EL MÉTODO DE TUNEL

La determinación del índice de muerte celular en el endometrio se realizó mediante la técnica de TUNEL en los cortes histológicos. Se utilizó el kit de detección *in situ* de muerte celular (Roche Diagnostics), el cual se basa en el marcaje de los extremos libres 3'-OH (hidroxilo) del ADN generados a partir de la degradación del ADN durante la muerte celular, con un nucleótido modificado (Red- dUTP) por medio de la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). El ADN marcado se detectó y se analizó en un microscopio de fluorescencia.

Los cortes histológicos se rehidrataron con xilol, xilol-etanol, soluciones decrecientes de etanol (100%, 96%, 90%, 80%, 70% y 50%), agua corriente y PBS 1X. Posteriormente los cortes se incubaron con proteinasa K (Roche) a una concentración de

20 μ g/mL en Tris HCl 10mM a pH8 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS y se permeabilizaron con triton X-100 (Sigma Aldrich) al 0.1% en PBS durante dos minutos a 4°C. El control positivo se trató con DNasa (Boehringer Mannheim) durante 10 minutos a 37°C. Se lavó nuevamente con PBS y se incubaron con la mezcla de reacción del kit TUNEL (enzima deoxinucleotidil transferasa terminal TDT, con mezcla de nucleótidos en buffer de reacción) a 37 °C durante 1 hora. Después se eliminó la mezcla lavado los cortes con PBS y se realizó la contratinción nuclear con Hoechst 33258.

El índice de muerte celular se determinó contando el número de núcleos marcados respecto al número total de núcleos.

7.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

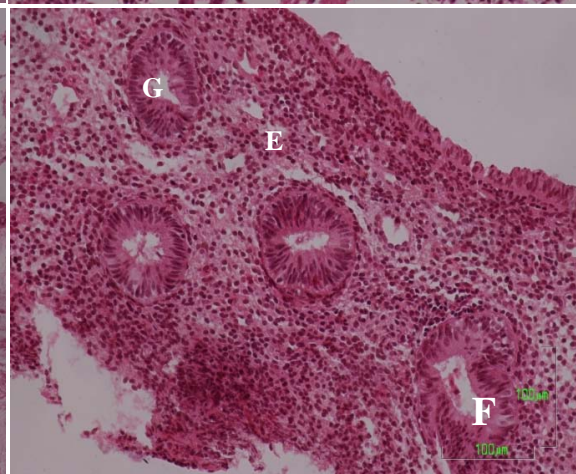
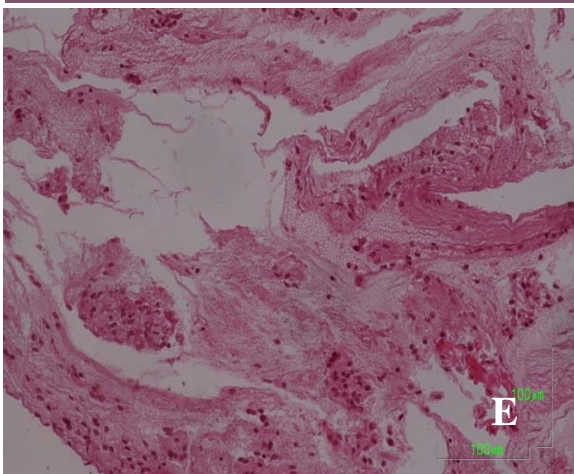
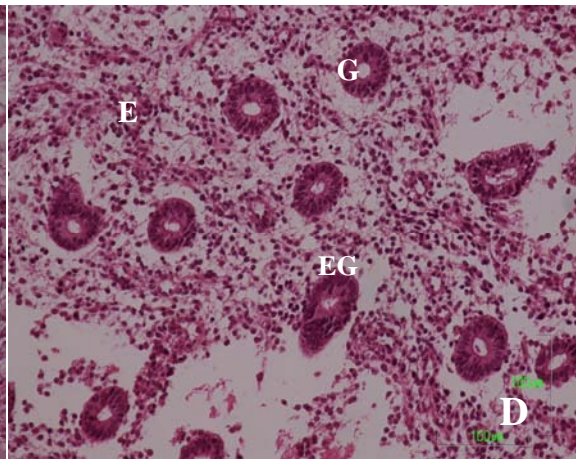
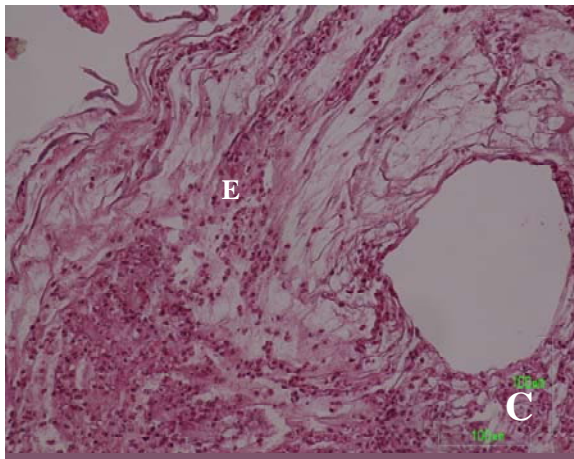
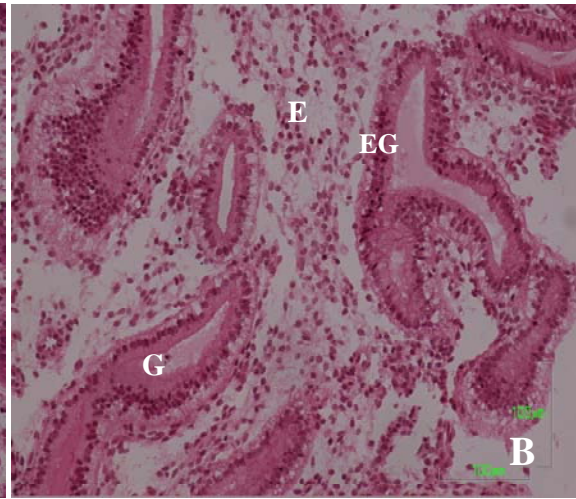
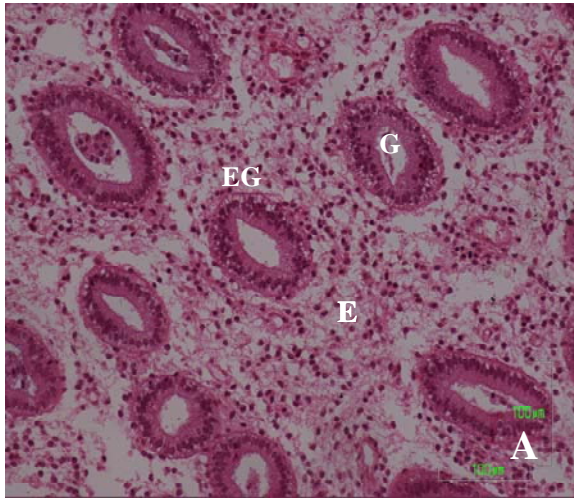
Los datos de los conteos realizados para cada marcador se analizaron con una t de Student y ANOVA de una vía, en el programa Prisma Graph Pad 5.0, el cual también calculó los valores de la desviación estándar (\pm DE). $P < 0.05$ se consideró significativa.

RESULTADOS

8.1 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DEL ENDOMETRIO MEDIANTE LA TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA.

Con el objetivo de describir las características histológicas del tejido endometrial en pacientes infértiles y ovulatorias, se realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina. Las características principales observadas en el endometrio secretor de pacientes tratadas con los inductores de ovulación fueron la presencia de vacuolaciones subnucleares lo cual es una evidencia de ovulación, un desarrollo irregular en diversas zonas del tejido. Se observó la presencia de vasos trombosados con fibrina y secreción en las luces de algunas glándulas y edema en el estroma que muestra mitosis celular. No se observa displasia en el tejido. Existe también un infiltrado inflamatorio con presencia de polimorfonucleares. Hay zonas del tejido en fase secretora y proliferativa por lo cual presenta asincronía en su desarrollo (Figura 5, A, B, D y F). En algunas biopsias de pacientes ovulatorias e infértiles con y sin tratamientos no se observaron glándulas ni epitelio, además no existe evidencia de ovulación pues no se observa vacuolación subnuclear (Figura 5, C, E). Con lo que determinamos que existe una diversidad histológica a nivel morfológico en las muestras de endometrio analizadas lo cual dificulta el análisis y diagnóstico patológico.

Figura 5. (Siguiendo página) Características histológicas observadas en el endometrio de mujeres ovulatorias e infértiles en fase secretora media. A) Paciente del grupo control, B y C) Paciente sometida a inducción de ovulación con CC, D y E) Paciente tratada con FSHr, F) Paciente infértil sin tratamiento. EG, epitelio glandular. E, estroma. G, glándula.



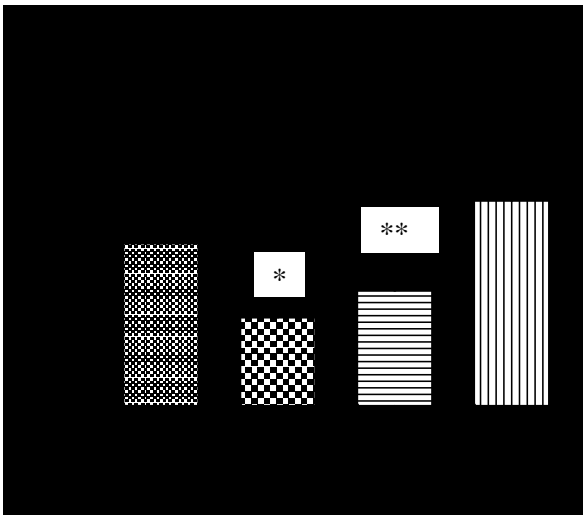
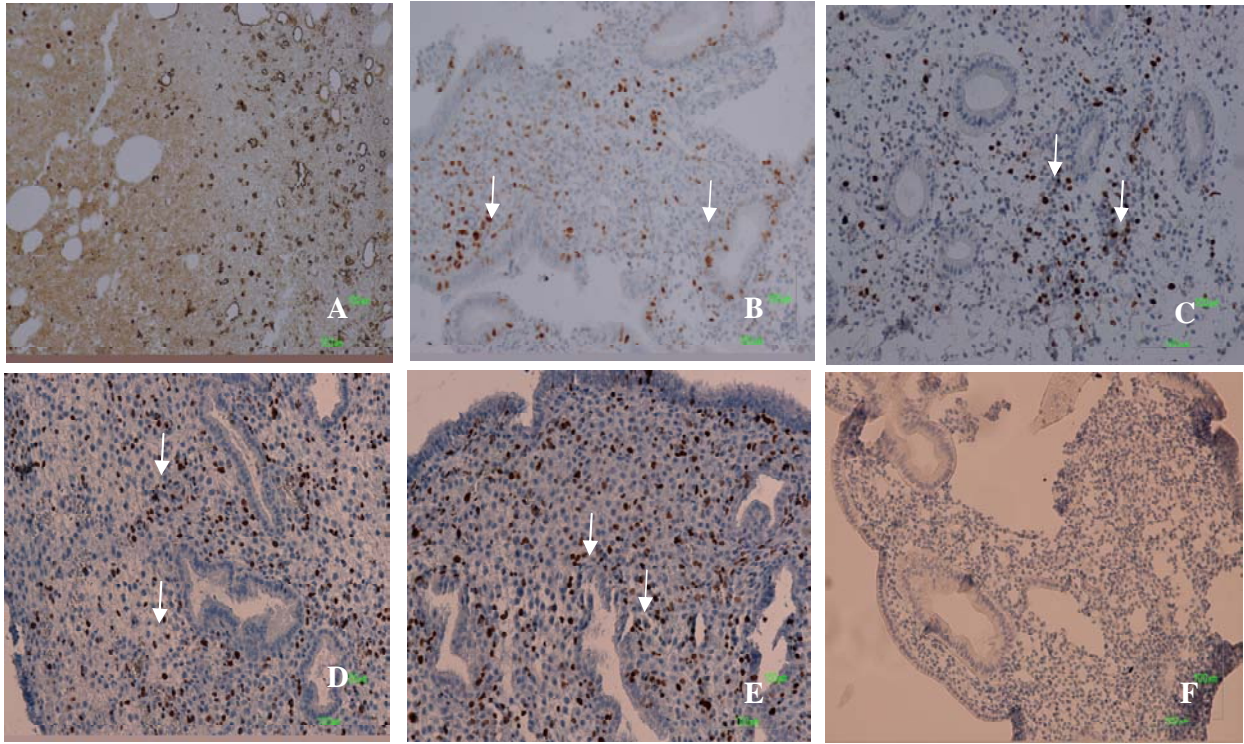
8.2 DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR ENDOMETRIAL

A) EXPRESIÓN ENDOMETRIAL DEL MARCADOR Ki67

Para determinar el índice de proliferación celular en el endometrio de pacientes ovulatorias y pacientes infértiles sometidas a inducción de ovulación, se evaluó la expresión de la proteína Ki67 y PCNA, las cuales se detectaron mediante inmunohistoquímica, y las células positivas a éstos, mostraron marca en el núcleo de las células epiteliales y estromales del endometrio (Figura 6). Se determinó que en pacientes ovulatorias o del grupo control, el 20 % del total de células expresan Ki67, mientras que los grupos tratados con los inductores de ovulación muestran una expresión significativamente menor.

También se observó una expresión moderada tanto en el epitelio glandular como en el estroma en el grupo control y una expresión baja en las mismas zonas en pacientes infértiles (Figura 7).

Figura 6. (Siguiendo página) Determinación de la expresión de Ki67 por inmunohistoquímica en el endometrio de pacientes ovulatorias e infértiles. Se presenta una imagen representativa de cada uno de los grupos analizados. Las flechas indican los núcleos con marca positiva a Ki67 de A y F) Control positivo (Amígdala de humano) y negativo respectivamente. B) paciente con adecuada función ovulatoria o Control y C) de mujer infértil sometidas a ovulación inducida con CC. D) paciente infértil sometida a inducción de ovulación con FSHr. E) Paciente infértil sin tratamiento.



	Estroma	Epitelio Glandular
Control	++	++
Tratamiento con CC	+	+
Tratamiento con FSHr	+	+
Sin Tratamiento	++	+

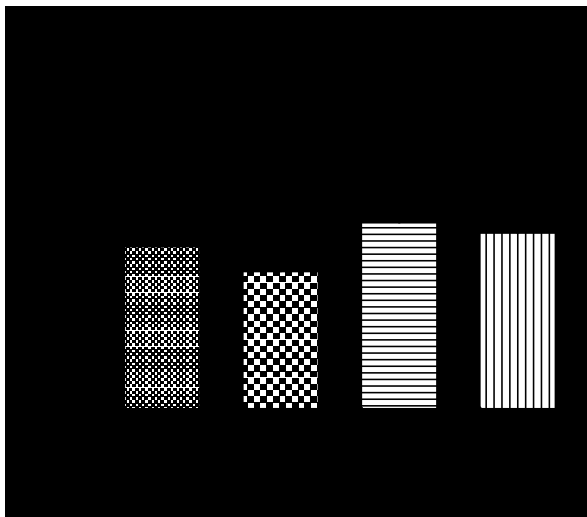
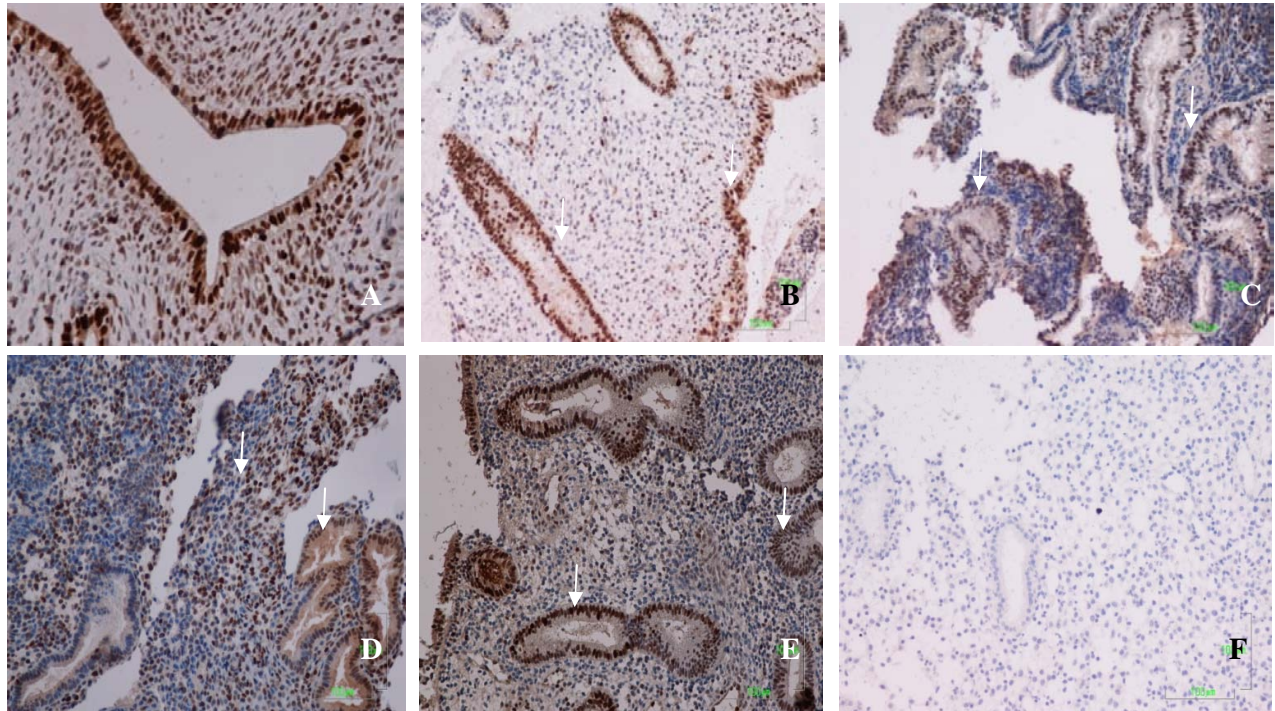
Figura 7. Expresión diferencial de Ki6, observada también entre el estroma y epitelio glandular.

Se determinó su expresión por inmunohistoquímica en pacientes con adecuada función ovulatoria (Control) y de pacientes con disfunción hipotálamo hipofisiaria sometidas a tratamiento con CC, en pacientes infértiles sometidas a inducción de ovulación con FSHr y de pacientes infértiles con disfunción hipotálamo hipofisiaria sin tratamiento (ST). Los resultados se expresan como la media \pm DE. * $p < 0.05$ comparado con el grupo control y el grupo ST. ** $p < 0.05$ comparado con el grupo control y el grupo ST.

B) EXPRESIÓN DE PCNA EN EL ENDOMETRIO HUMANO

Se determinó por inmunohistoquímica la expresión endometrial de PCNA en pacientes ovulatorias o del grupo control y en pacientes infértiles sometidas a inducción de ovulación y las células inmunopositivas presentan marca en el núcleo (Figura 8). El análisis de las imágenes demuestra que no se existen diferencias en la expresión de PCNA entre los diferentes grupos. La expresión en epitelio glandular fue abundante en todos los grupos y únicamente en el grupo tratado con FSHr se observó una expresión baja en el estroma, mientras los demás grupos muestran una expresión de PCNA moderada en el estroma. (Figura 9).

Figura 8. (Siguiendo página) Determinación de la expresión de PCNA por inmunohistoquímica en el endometrio en fase secretora media. Se presenta una imagen representativa de cada uno de los grupos analizados. Las flechas indican los núcleos con marca positiva a PCNA de A y F) Control positivo (Útero de rata en D1) y negativo respectivamente. B) paciente con adecuada función ovulatoria o Control y C) de mujer infértil sometidas a ovulación inducida CC. D) paciente infértil sometida a inducción de ovulación con FSHr. E) Paciente infértil sin tratamiento.



	Estroma	Epitelio Glandular
Control	+++	++
Tratamiento con CC	+++	++
Tratamiento con FSHr	+++	+
Sin Tratamiento	+++	++

Figura 9. Expresión intergrupal similar de PCNA y expresión en el estroma y epitelio glandular. Se determinó la expresión por inmunohistoquímica en pacientes con adecuada función ovulatoria (Control) y de pacientes con disfunción hipotálamo hipofisaria sometidas a tratamiento con CC, en pacientes infértiles sometidas a inducción de ovulación con FSHr y de pacientes infértiles con disfunción hipotálamo hipofisaria sin tratamiento (ST). Los resultados se expresan como la media \pm DE.

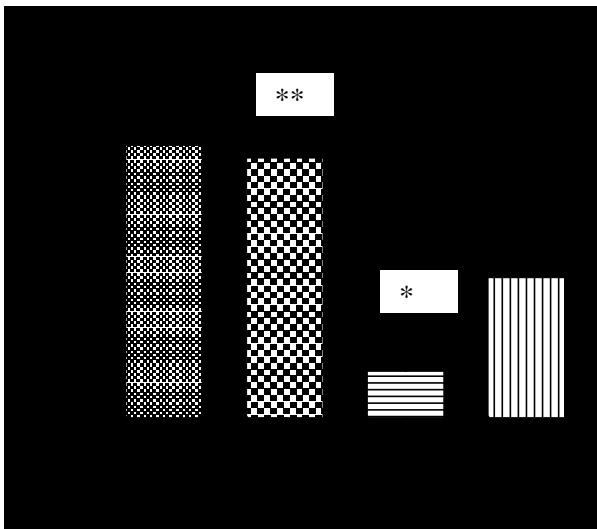
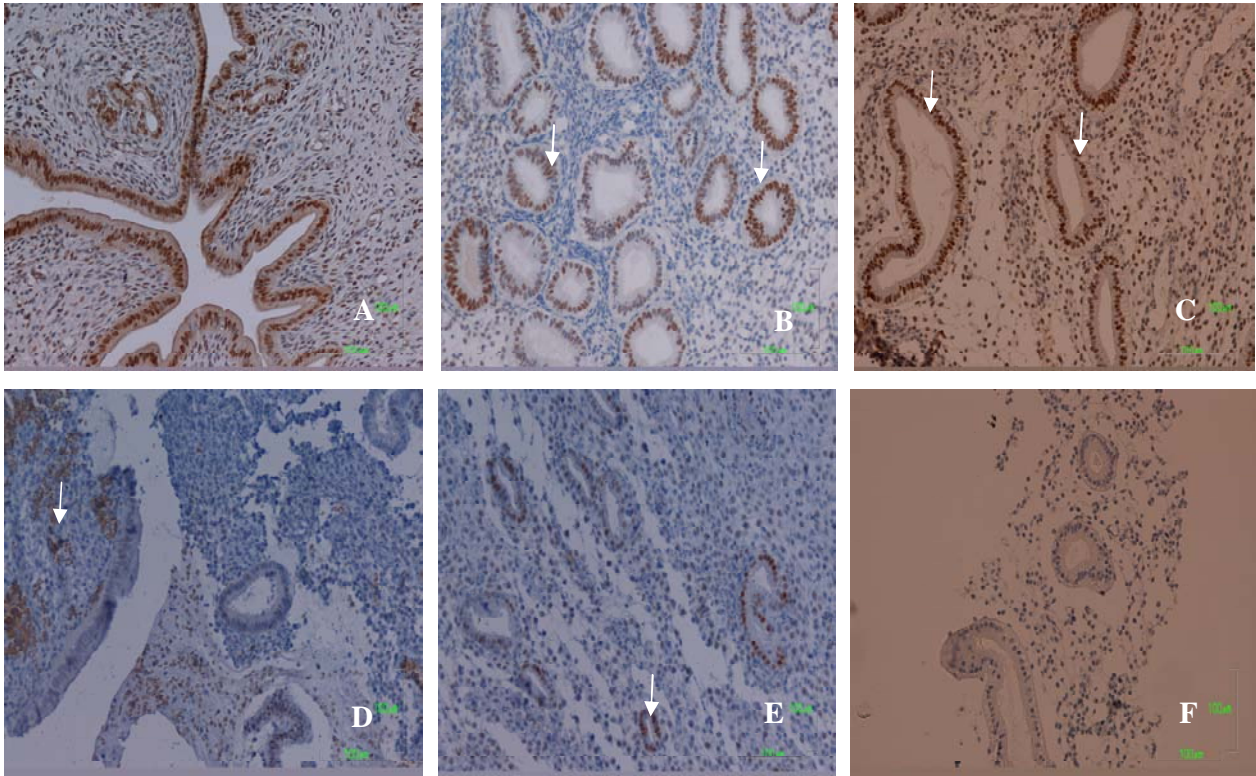
8.3 EXPRESIÓN ENDOMETRIAL DE RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDES

La expresión de los receptores de hormonas esteroideas (ER α y PR) se caracterizó por inmunohistoquímica. Las células inmunopositivas presentaron marca en el núcleo tanto en células estromales como epiteliales del endometrio en fase secretora media (Figura 10 y 12).

A) EL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA (ER α)

Se evaluó la expresión del ER α y se observaron diferencias en el índice de expresión entre pacientes ovulatorias o del grupo control donde el 50 % de células expresaron ER α respecto a las pacientes tratadas con FSHr, las cuales muestran una expresión significativamente menor. No se observaron diferencias en pacientes tratadas con CC. También se observaron diferencias en la expresión de ER α en el estroma y el epitelio glandular en pacientes tratadas con FSHr y pacientes infértiles sin tratamiento respecto al grupo control en el cual ER α se expresa en un nivel moderado en el estroma y abundante en el epitelio glandular (Figura 10 y 11).

Figura 10. (Siguiete página) Determinación de la expresión de ER α por inmunohistoquímica en el endometrio en fase secretora media. Se presenta una imagen representativa de cada uno de los grupos analizados. Las flechas indican los núcleos con marca positiva a ER α de A y F) Control positivo (Útero de rata en D1) y negativo respectivamente. B) paciente con adecuada función ovulatoria o Control y C) de mujer infértil sometidas a ovulación inducida con CC. D) paciente infértil sometida a inducción de ovulación con FSHr. E) Paciente infértil por disfunción hipotálamo hipofisiaria sin tratamiento.



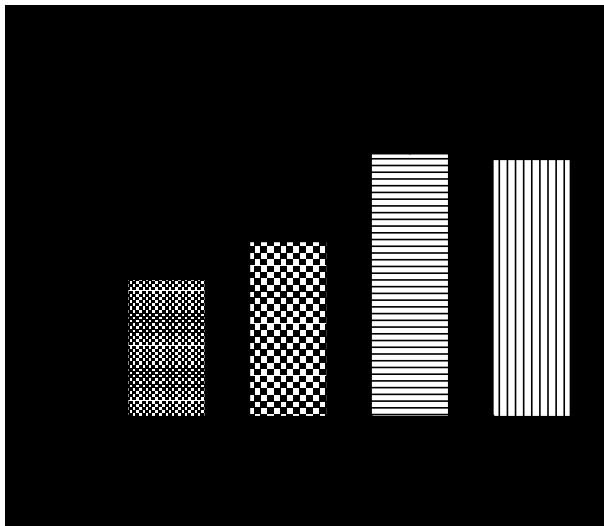
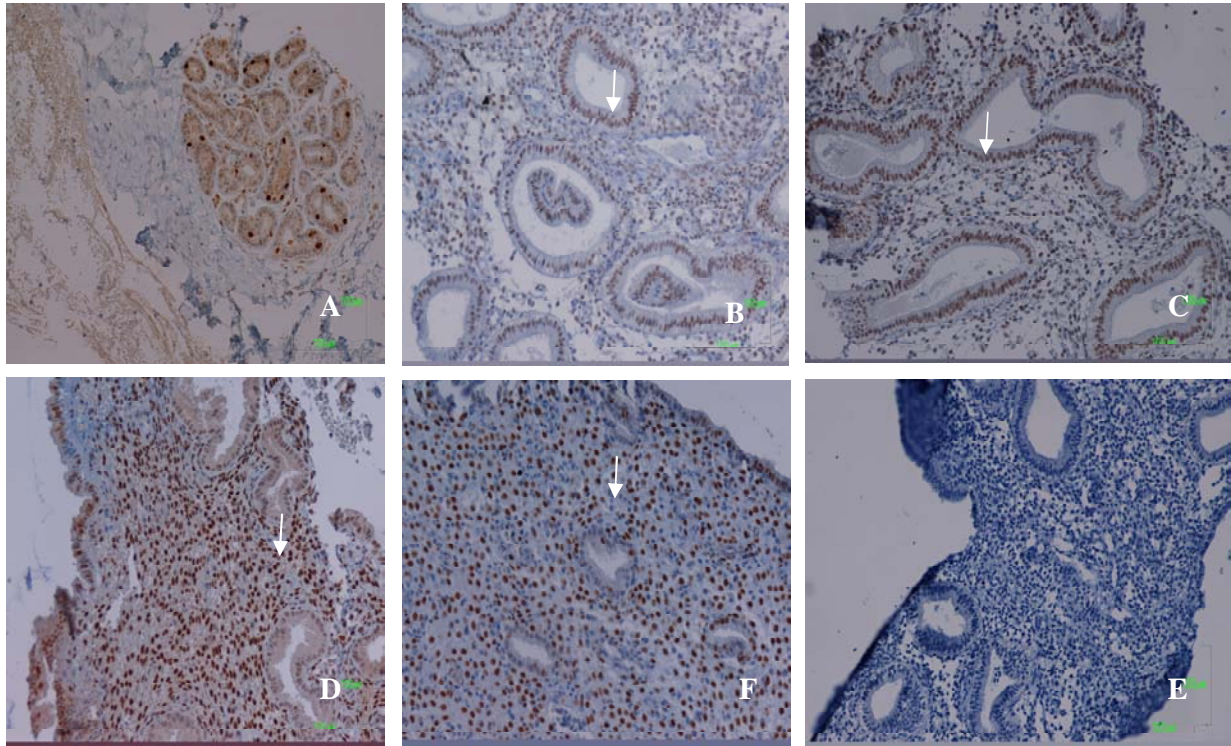
	Estroma	Epitelio Glandular
Control	++	+++
Tratamiento con CC	++	+++
Tratamiento con FSHr	-	-
Sin Tratamiento	+	++

Figura 11.- Disminución de la expresión de ER α en pacientes tratadas con FSHr, observada también en el estroma y epitelio glandular. Comparación con el endometrio de pacientes con adecuada función ovulatoria (Control) y de pacientes con disfunción hipotálamo hipofisaria sometidas a tratamiento con CC y de pacientes infértiles con disfunción hipotálamo hipofisaria sin tratamiento. Los resultados se expresan como la media. Los resultados se expresan como la media \pm DE. * $p < 0.05$ comparado con el grupo control y con ST. ** $p < 0.05$ comparado con ST.

B) EL RECEPTOR DE PROGESTERONA (PR)

De igual forma se determinó la expresión de PR y se observaron diferencias en el índice de expresión de PR entre pacientes ovulatorias o del grupo control y pacientes tratadas con FSHr donde aproximadamente el 50 % de células expresaron PR, lo que fue significativamente mayor respecto al grupo control. No se observaron diferencias en pacientes tratadas con CC. También se observaron diferencias en la expresión de PR en el estroma y el epitelio glandular en pacientes tratadas con FSHr y pacientes infértiles sin tratamiento, en las cuales la expresión de PR en el estroma es abundante pero en el epitelio glandular es moderada respecto al grupo control, donde PR se expresa en un nivel moderado en el estroma y abundante en el epitelio glandular (Figuras 12 y 13).

Figura 12. (Siguiendo página) Determinación de la expresión de PR por inmunohistoquímica en el endometrio en fase secretora media. Se presenta una imagen representativa de cada uno de los grupos analizados. Las flechas indican los núcleos con marca positiva a ER α de A y F) Control positivo (tejido mamario humano) y negativo respectivamente. B) paciente con adecuada función ovulatoria o Control. C) de mujer infértil sometidas a ovulación inducida CC. D) paciente infértil sometida a inducción de ovulación con FSHr y E) Paciente infértil sin tratamiento.



	Estroma	Epitelio Glandular
Control	++	+++
Tratamiento con CC	++	+++
Tratamiento con FSHr	+++	++
Sin Tratamiento	+++	+

Figura 13. Sobreexpresión de PR en el endometrio de pacientes infértiles tratadas con FSHr respecto a pacientes con adecuada función ovulatoria (Control) y de pacientes con disfunción hipotálamo hipofisiaria sometidas a tratamiento con CC y de pacientes infértiles con disfunción hipotálamo hipofisiaria sin tratamiento. Los resultados se expresan como la media. Los resultados se expresan como la media \pm DE. * $p < 0.05$ comparado con el grupo control. ** $p < 0.05$ comparado con CC.

8.4 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE MUERTE CELULAR MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE Bcl-2 Y Bax

La expresión de los marcadores Bax y Bcl-2 (de la familia Bcl-2), se detectó por inmunohistoquímica, tanto en membranas nucleares, como en el citoplasma. Bcl-2 es un péptido que promueve la supervivencia celular bloqueando la vía final común que resulta en la muerte celular (Jones, et al. 1998, Mertens *et al.*, 2002). La proteína Bax puede contrarrestar el efecto anti-apoptótico de Bcl-2 al formar heterodímeros con este, lo cual sugiere que la susceptibilidad a la muerte celular depende del índice Bcl-2/Bax (Kokawa, *et al.*, 1996, Vaskivuo, et al., 2000).

A) EXPRESIÓN ENDOMETRIAL DE Bcl-2

La expresión de Bcl-2 se evaluó por inmunohistoquímica y se observó una marca citoplásmica en las células inmunopositivas a este marcador (Figura 14). Se realizó un análisis de frecuencia de pacientes según el nivel de expresión de Bcl-2 y se observó que entre el 50% y 80% de las pacientes de todos los grupos presentaron poco marcaje positivo para Bcl-2 por lo que no existen diferencias significativas entre los diferentes grupos (Figura 15).

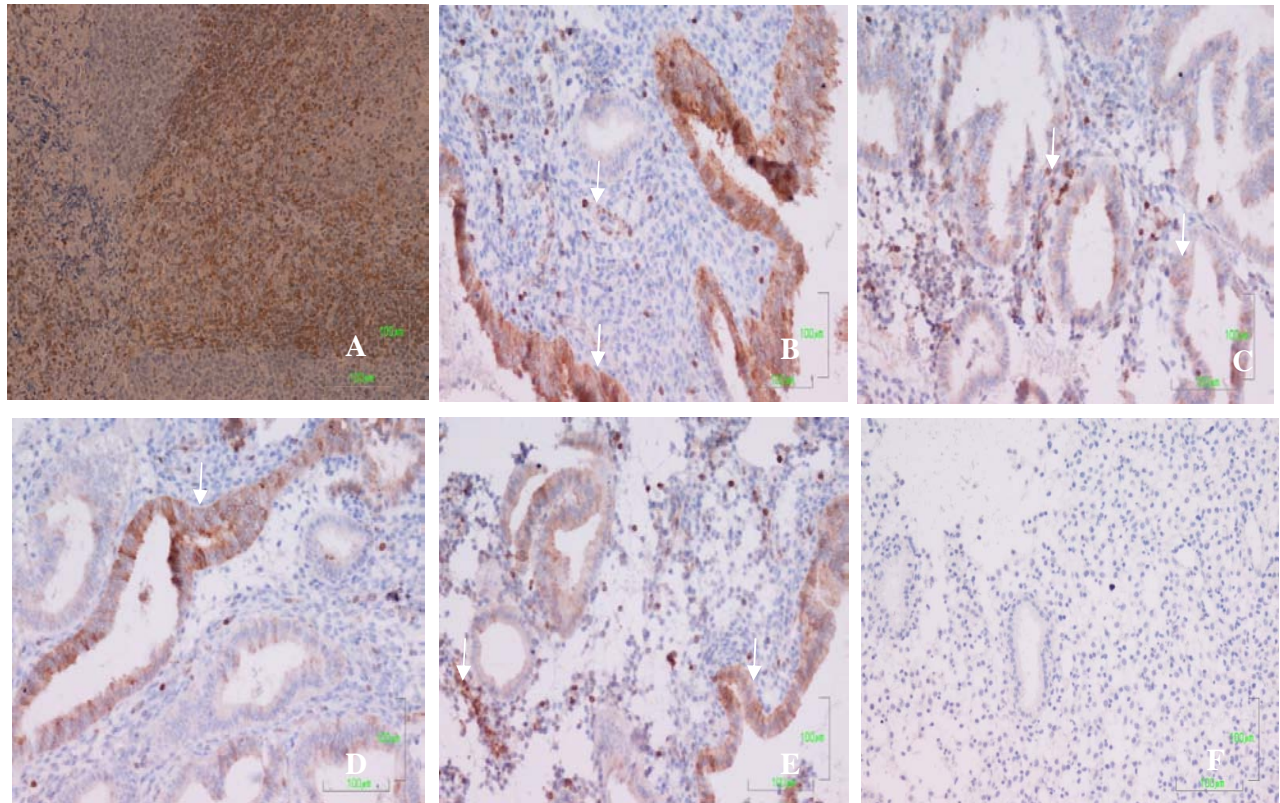
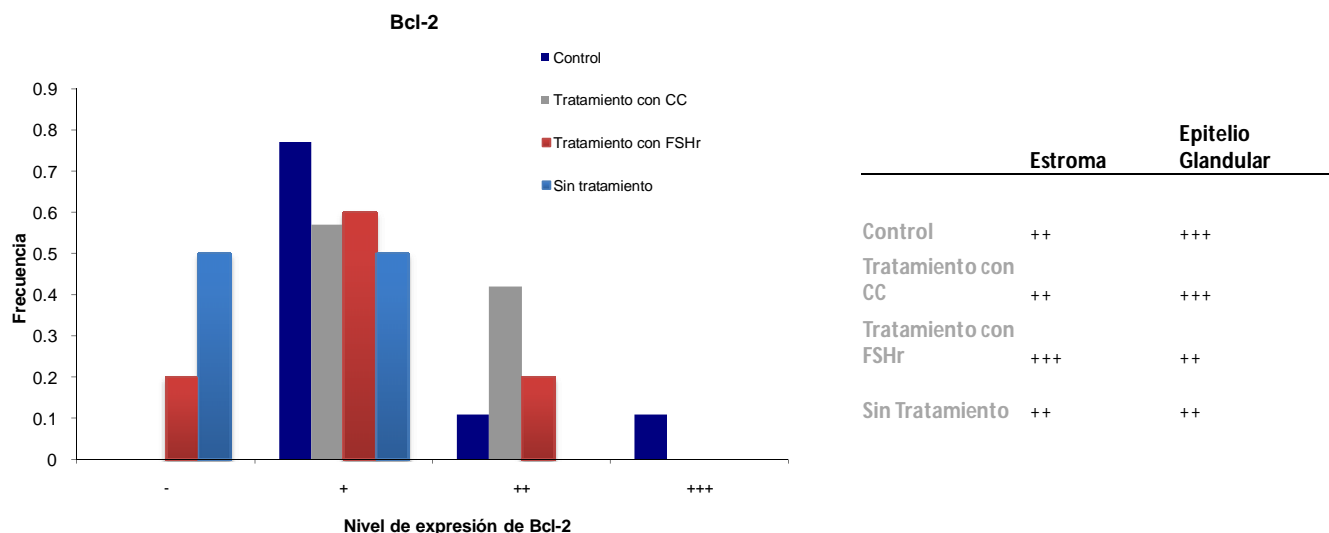


Figura 14. (arriba) Inmunohistoquímica para Bcl-2. A) Control Positivo (Amígdala de humano) B) Paciente con adecuada función ovulatoria o del grupo control C) Paciente con disfunción ovulatoria tratada con CC. D) Paciente infértil tratada con FSHr. E) Paciente infértil sin tratamiento F) Control negativo. Las flechas indican marca positiva en el citoplasma.

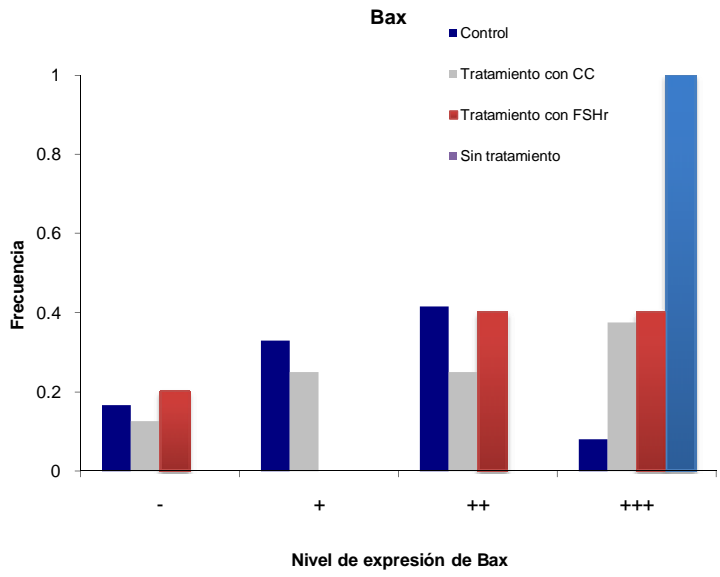
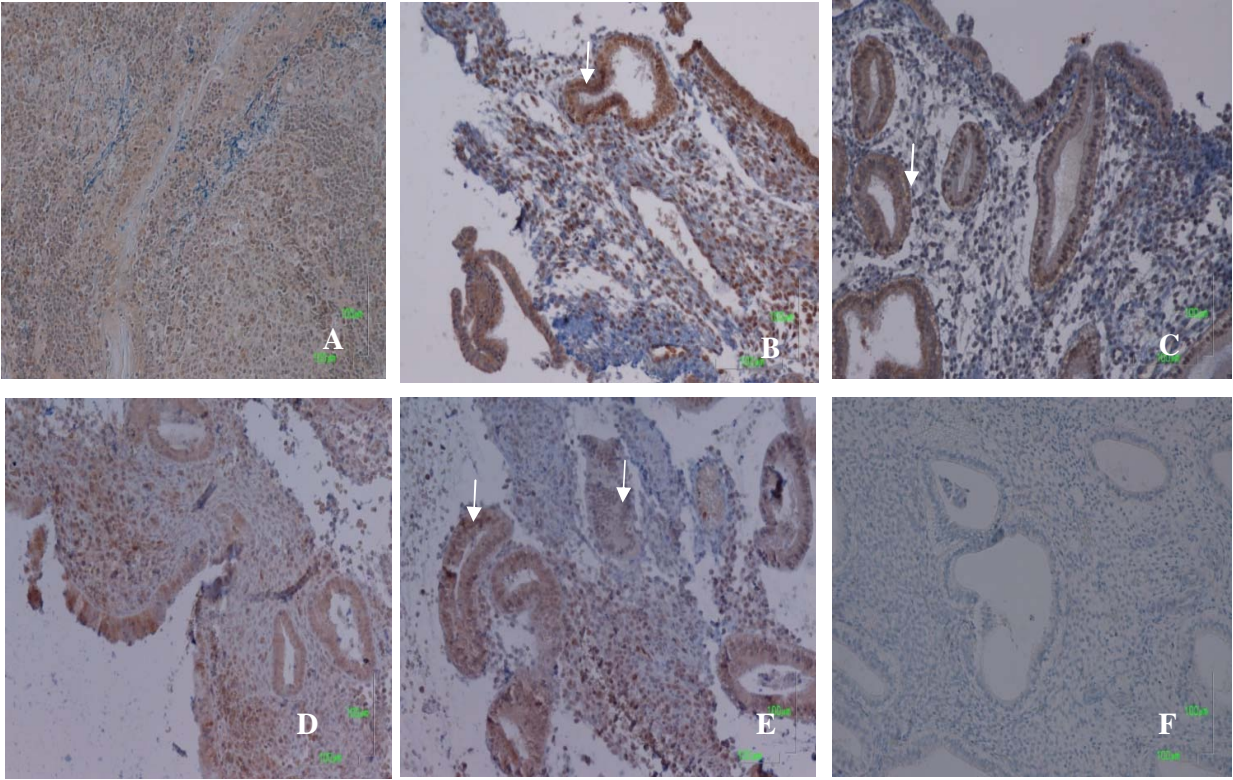
Figura 15. (Página siguiente) Frecuencia de pacientes de acuerdo al nivel de expresión de Bcl-2 y su expresión en dos regiones del endometrio en fase secretora media. De acuerdo al nivel de inmunoreactividad de Bcl-2 que presenta el endometrio en fase secretora media: (-) sin marca positiva; (+) poca marca positiva; (++) marca positiva moderada; (+++) marca positiva abundante.



B) EXPRESIÓN ENDOMETRIAL DE Bax

La expresión de Bax se evaluó por inmunohistoquímica y se observó marca citoplásmica en las células inmunopositivas a este marcador (Figura 16). El 30% de las pacientes del grupo control presentan poca marca positiva para Bax, 40% de pacientes presentaron marca moderada en y el grupo tratado con CC el 60% presenta marca moderada y abundante y el grupo tratado con FSHr aproximadamente el 80% de pacientes corresponde a estas categorías, el 100% de pacientes sin tratamiento presenta marca abundante mientras solamente cerca del 10% de las pacientes del grupo control se considero en esta categoría (Figura 17).

Figura 16. (Siguiete página) Inmunohistoquímica para Bax. A) Control Positivo (Amígdala de humano) B) Paciente con adecuada función ovulatoria o del grupo control C) Paciente con disfunción ovulatoria tratada con CC. D) Paciente infértil tratada con FSHr. E) Paciente infértil sin tratamiento F) Control negativo. Las flechas indican marca positiva en el citoplasma.



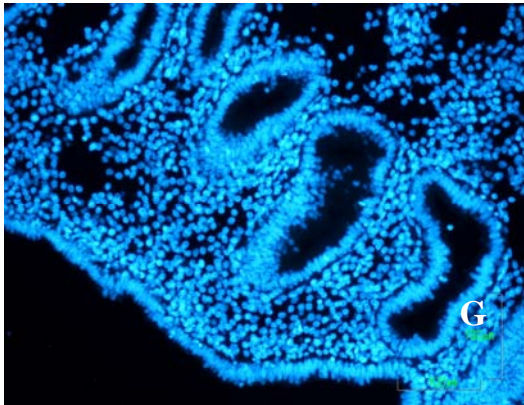
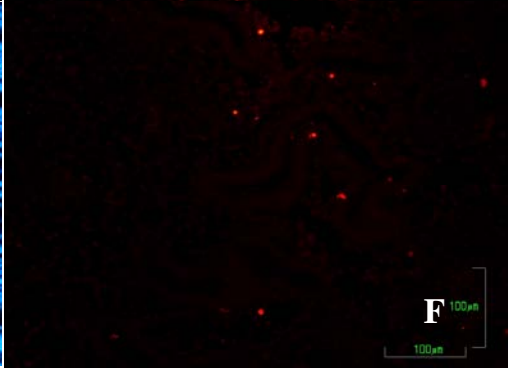
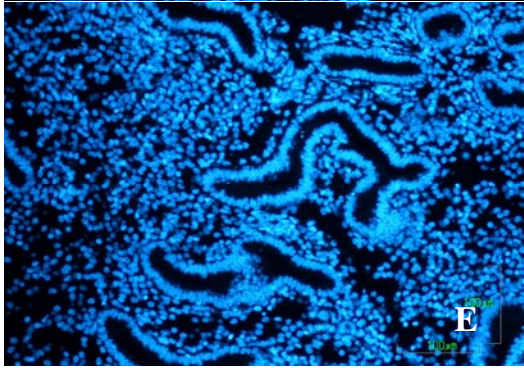
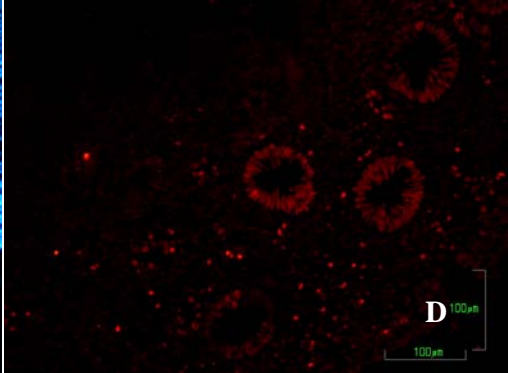
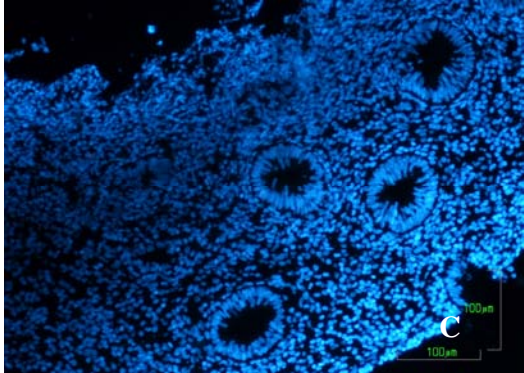
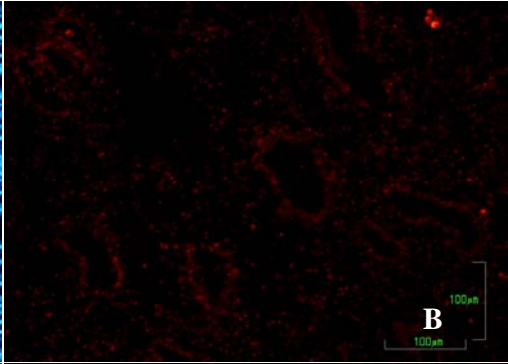
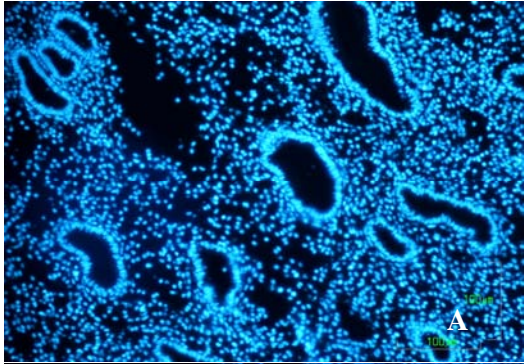
	Estroma	Epitelio Glandular
Control	+	++
Tratamiento con CC	++	+++
Tratamiento con FSHr	+++	+++
Sin Tratamiento	++	++

Figura 17. Frecuencia de pacientes de acuerdo al nivel de expresión de Bax y su expresión en dos regiones del endometrio en fase secretora media. De acuerdo al nivel de inmunoreactividad de Bax que presenta el endometrio en fase secretora media: (-) sin marca positiva; (+) poca marca positiva; (++) marca positiva moderada; (+++) marca positiva abundante.

8.5 DETERMINACIÓN DE LA MUERTE CELULAR POR EL MÉTODO DE TUNEL

Para determinar el porcentaje de células endometriales muertas se realizó la técnica de TUNEL, la cual marca los extremos 3'-OH de la hebra de DNA que se encuentra fragmentada. Así, la marca positiva se observa como un núcleo fluorescente (Figura 18). Se cuantificaron porcentajes muy bajos de células con el DNA fragmentado, en todos los grupos y no se encontraron diferencias entre cada uno de ellos (Figura 19).

Figura 18. (Siguiete página) Muerte celular en el endometrio en fase secretora media determinada por el método de TUNEL. Se muestra una imagen representativa de cada grupo. A y B) Endometrio de paciente con adecuada función ovulatoria o grupo control y contratinción con Hoechst (en color azul) para determinar el número total de núcleos. C y D) Paciente con disfunción ovulatoria tratada con CC y contratinción con Hoechst respectivamente. E y F) Paciente infértil sometida a inducción de ovulación con FSHr y su respectiva contratinción con Hoechst. G y H) Paciente infértil sin tratamiento y contratinción con Hoechst. Las marcas fluorescentes rojas representan las células que tienen el DNA fragmentado. Las flechas indican marca positiva.



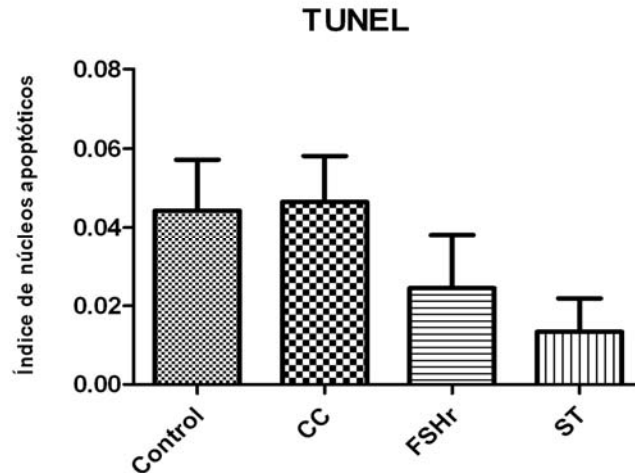


Figura 19. Índice de muerte celular en el endometrio en fase secretora media. Se llevó a cabo la reacción de TUNEL en pacientes con adecuada función ovulatoria (Control) y de pacientes con disfunción hipotálamo hipofisiaria sometidas a tratamiento con CC, de pacientes infértiles sometidas a inducción de ovulación con FSHr y de pacientes infértiles con disfunción hipotálamo hipofisiaria sin tratamiento (ST). Los resultados se expresan como la media. Los resultados se expresan como la media \pm DE.

8.6 EXPRESIÓN DE MARCADORES DE CÉLULAS TRONCALES EN EL ENDOMETRIO HUMANO

Diversos estudios (Chan y Garget, 2004, Garget *et al.*, 2008) han propuesto la existencia de poblaciones de células troncales en el endometrio las cuales sirven como origen de las células que se diferencian para formar los elementos de este tejido participando así en la regeneración del mismo en cada ciclo. Existen algunas proteínas que son utilizadas como marcadores de células troncales tales como Oct4, Nanog y Sox2.

A) EXPRESIÓN DE Oct-4 y Nanog EN EL ENDOMETRIO HUMANO

Se evaluó la expresión de Oct-4 y Nanog por inmunohistoquímica en el endometrio de pacientes ovulatorias o del grupo control y pacientes infértiles sometidas a inducción de ovulación con CC, FSHr y sin tratamiento. Oct-4 y Nanog no se expresaron en el endometrio de pacientes ovulatorias, ni en pacientes infértiles tratadas con los dos inductores de ovulación y en pacientes sin tratamiento (Figura 20).

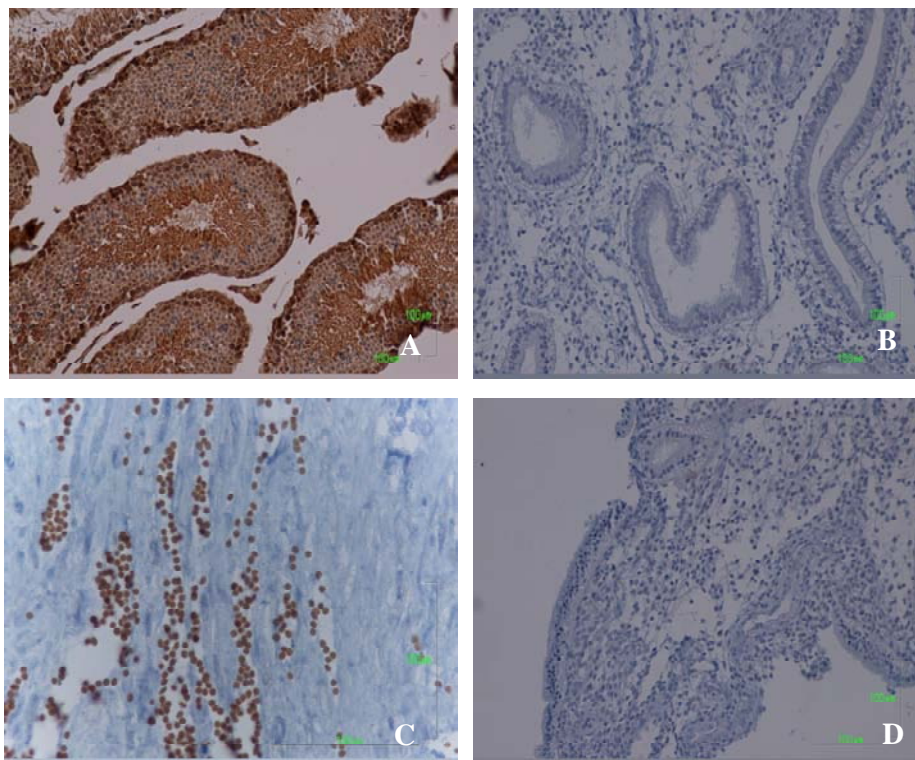


Figura 20. Expresión de marcadores de células troncales en el endometrio. Se determinó por inmunohistoquímica la expresión de Oct-4 y Nanog en A) Control Positivo utilizado para Oct-4; testículo de rata. B) Ausencia de la expresión de Oct-4 en el endometrio de una paciente del grupo control. C) Control positivo (teratocarcinoma) para Nanog. D) Ausencia de la expresión de Nanog en el endometrio de una paciente infértil sometida a inducción de ovulación con CC.

B) EXPRESIÓN DE Sox-2 EN EL ENDOMETRIO HUMANO

Sox-2 es un marcador relacionado con la pluripotencia celular, por lo que puede sugerirse que las células positivas a este son posibles células troncales/progenitoras. Se detectó por inmunofluorescencia la expresión de Sox-2 y las células positivas a este marcador presentaron marca fluorescente en el núcleo de las células del endometrio (Figura 22). El número de células positivas para Sox-2 en el endometrio es muy bajo en todos los grupos y el índice de marca positiva para Sox-2 no mostró diferencias intergrupales significativas en su expresión (Figura 21).

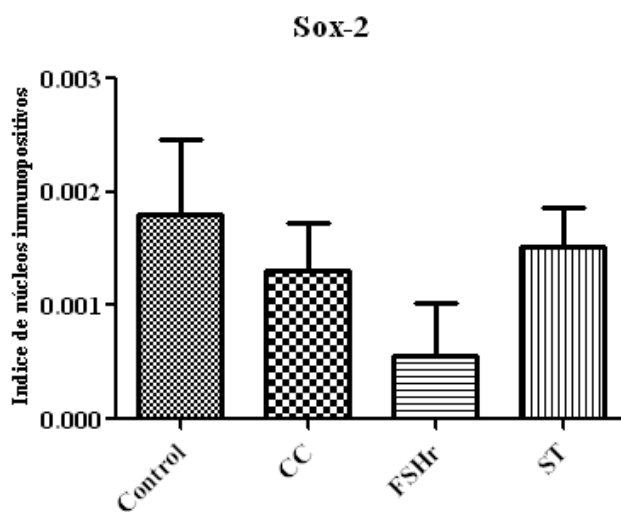


Figura 21. Índice de expresión de Sox-2 en el endometrio. Se determinó por inmunofluorescencia la expresión de Sox-2 en pacientes con adecuada función ovulatoria (Control) y de pacientes con disfunción hipotálamo hipofisiaria sometidas a tratamiento con CC, de pacientes infértiles sometidas a inducción de ovulación con FSHr y de pacientes infértiles con disfunción hipotálamo hipofisiaria sin tratamiento (ST). Los resultados se expresan como la media \pm DE.

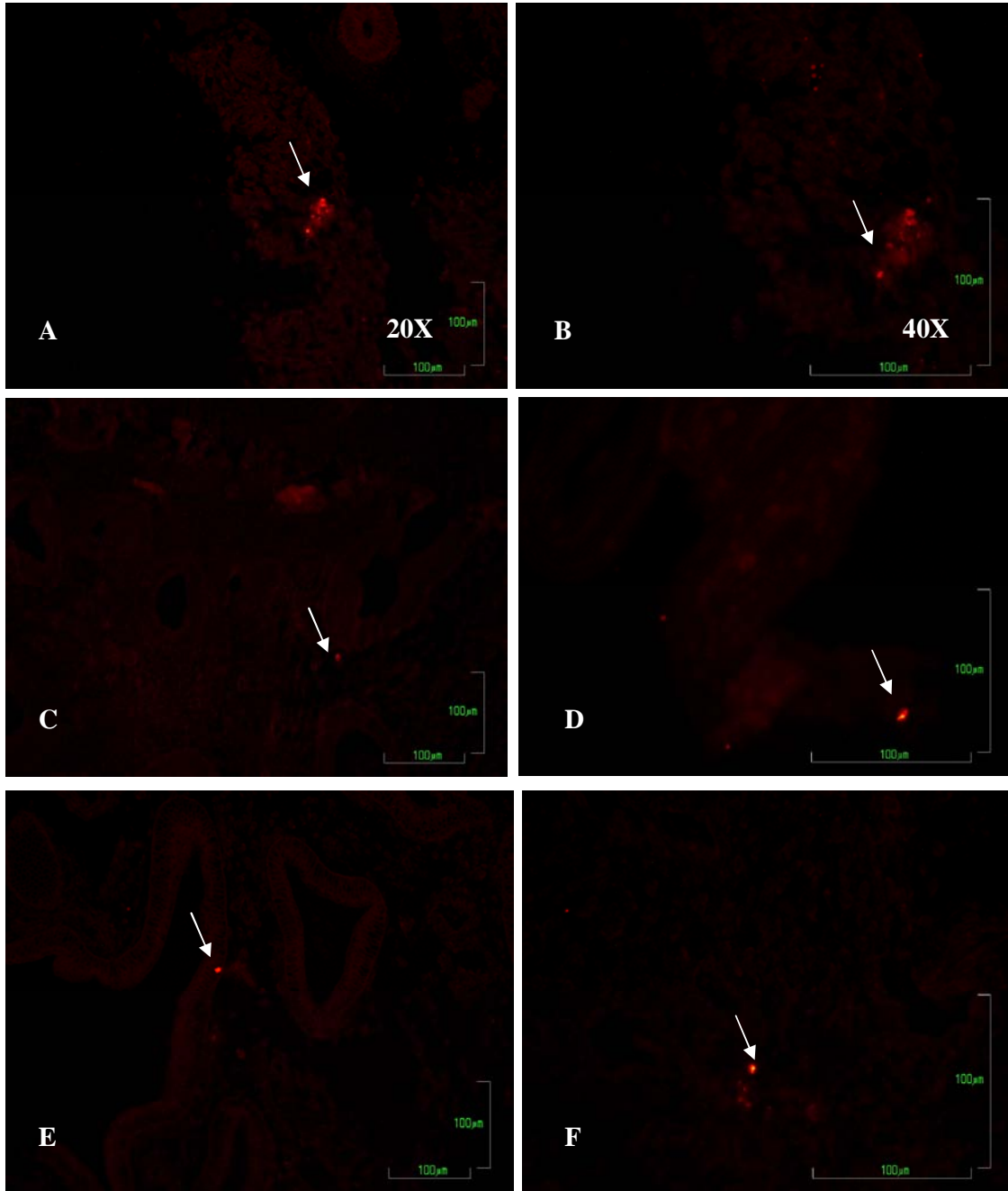


Figura 22. Expresión de Sox-2 en el endometrio humano. Se determinó la expresión de Sox-2 por inmunofluorescencia en A) paciente del grupo control. C y D) Paciente infértil sometida a inducción de ovulación con citrato de clomifeno y FSHr respectivamente. E y F) Paciente infértil sin tratamiento. Las flechas indican las células positivas a Sox-2.

9. DISCUSIÓN

9.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL ENDOMETRIO

Desde hace varias décadas varios experimentos en modelos animales han demostrado que en ausencia de la función hipofisiaria, el ovario no alcanza las fases más avanzadas de desarrollo folicular; en los humanos esta característica está asociada a la disfunción hipotálamo hipofisiaria y a la infertilidad.

Se han llevado a cabo diversos estudios para evaluar el efecto del citrato de clomifeno en el endometrio de mujeres infértiles, pero estos se han centrado únicamente en el análisis de características morfológicas del tejido. Sereepapong *et al.*, 2000 y Triwitayakorn, *et al.*, 2002 demostraron que algunas características histológicas, tales como la apariencia ultrasonográfica y el grosor endometrial fueron similares en el grupo tratado con CC y en el grupo control, mientras que el número de glándulas/mm² y el diámetro de éstas fueron menores en el grupo tratado con CC respecto al grupo control, pero el número de células vacuoladas fue mayor en el grupo control. Esto indica que es insuficiente el análisis de características histológicas para establecer diferencias producidas por los tratamientos. En nuestros grupos de estudio mediante la tinción Hematoxilina-Eosina de igual forma realizamos una descripción histológica del tejido endometrial y observamos en que las características morfológicas del endometrio muestran una gran diversidad histológica, lo cual no permite realizar un diagnóstico basados en estas datos y tampoco es posible establecer que alteraciones son debidas a los tratamientos y cuales corresponden a características individuales de cada paciente o particulares a la infertilidad por disfunción hipotálamo hipofisiaria, lo cual dificulta el análisis y diagnóstico patológico.

Existen muy pocos trabajos que estudien los efectos a nivel endometrial de la administración de FSHr. Bromer *et al.*, 2009 realizaron un estudio en mujeres infértiles y observaron que los ciclos estimulados con FSHr mostraron un incremento significativo en el grosor endometrial comparado con los ciclos estimulados con CC. Sugerimos que es probable que la diversidad de características morfológicas del endometrio están relacionadas con la edad, el índice de masa corporal y la presencia de otro tipo de patología reproductiva y no es posible establecer una conclusión tomando en cuenta únicamente estas características. Esto indica que es muy importante realizar una caracterización a nivel molecular del tejido endometrial para poder detectar que cambios son debidos a los tratamientos.

Por otra parte también ha sido controversial si el día de inicio de administración del citrato de clomifeno tiene un efecto en las características histológicas, que de alguna forma son utilizados en la práctica clínica para establecer un diagnostico de probabilidad de embarazo. Cheung *et al.*, 2002 han demostrado que no existen diferencias comparando parámetros morfológicos en el endometrio de mujeres que comenzaron a tomar citrato los días 2 a 6 y el 5 a 9 del ciclo menstrual tales como el perfil hormonal, el número de folículos dominantes, el grado de vascularización folicular, el grosor endometrial y los índices del flujo Doppler de las arterias uterinas/subendometriales en mujeres que comienzan el tratamiento de CC en el día 2 o en el día 5, por lo que la diversidad de características histológicas observadas en nuestros grupos de estudio no se deben únicamente a la administración de los tratamientos de inducción de ovulación.

9.2 PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR DEL ENDOMETRIO

Una de las propiedades del endometrio humano es su capacidad de crecimiento y regeneración cíclica dependiente del ambiente hormonal predominante en el útero, por lo que estudiar los procesos de proliferación y muerte es de suma importancia, ya que se encuentran altamente regulados. Dahmoun *et al.*, 1999 caracterizaron la expresión de Ki67 como marcador de proliferación celular ya que la inmunoreactividad para Ki-67 es solo expresada en células que se están dividiendo. Reportaron que Ki-67 está presente en las glándulas y estroma endometriales durante la fase proliferativa y también durante la primera mitad de la fase secretora pero disminuye durante la segunda mitad de esta fase. Diversos autores (Shiozawa *et al.* 1996, Vaskivuo, *et al.*, 2000, Mertens *et al.* 2002 y Bessmertnaia *et al.*, 2008) demostraron que Ki67 se expresa en la fase proliferativa y disminuye marcadamente en la fase secretora principalmente en las glándulas. Nuestros resultados demuestran que la expresión de Ki67 es afectada en mujeres sometidas a inducción de ovulación con CC y FSHr, disminuyendo significativamente respecto a pacientes ovulatorias y pacientes infértiles sin tratamiento y estas diferencias también son observadas entre el epitelio glandular y el estroma, siendo el epitelio glandular el que muestra una expresión disminuida del marcador. Esto correlaciona con reportes previos que concluyen que el grosor endometrial es menor en mujeres sometidas a inducción de ovulación con CC (Sereepapong *et al.*, 2000 y Triwitayakorn, *et al.*, 2002) y da una explicación a nivel molecular de esta alteración que no se ha descrito previamente.

Evaluamos también la expresión de PCNA (Antígeno de proliferación celular nuclear) pero no encontramos diferencias en su expresión entre los diferentes grupos. Sugerimos que PCNA no es un marcador ideal para proliferación celular ya que este se

localiza en el núcleo y favorece la síntesis de ADN, pero también es un cofactor de la DNA polimerasa delta, por lo tanto está involucrado en procesos como reparación del DNA y su presencia no implica precisamente que las células se estén dividiendo (Zhang, *et al.*, 1999).

Otras proteínas que están relacionadas con la proliferación y muerte celular son Bcl-2 que tiene actividad antiapoptótica y Bax que es proapoptótica, las cuales son pertenecientes a la familia de proteínas Bcl-2 que son reguladoras de la muerte celular. Siendo Bcl-2 la que prolonga la sobrevivencia de células sanas y patológicas bloqueando la vía de muerte celular iniciada por Bax. Esta proteína tiene la habilidad de interacción proteína-proteína y de formar heterodímeros que favorecen la creación de un canal transmembranal mitocondrial que permite el flujo de moléculas que causan la activación de las caspasas. Por otro lado, Bcl-2 cuando está anclada a la membrana mitocondrial mantiene su homeostasis evitando la salida de citocromo C y por consiguiente, la muerte celular vía caspasas. Se ha demostrado que el endometrio es inmunoreactivo para Bcl-2 en la fase proliferativa y su aparición cíclica estricta sugiere que está bajo control hormonal. Kokawa *et al.*, 1996, Jones *et al.*, 1998 y Vaskivuo *et al.*, 2000 han reportado que Bcl-2 incrementa su expresión en la etapa proliferativa, disminuye en la fase secretora principalmente en las glándulas y desaparece en la fase secretora tardía. Por otro lado la expresión de Bax aumenta en las últimas etapas de la fase secretora y su expresión es principalmente vista en las glándulas. Nuestros resultados demuestran que en mujeres con infertilidad y sometidas a los tratamientos de inducción de ovulación, la expresión de Bax es mayor, lo cual es particularmente notable en el epitelio glandular, lo cual tampoco ha sido reportado previamente.

Respecto al índice de muerte celular nuestros resultados no muestran diferencias significativas entre los grupos, esto probablemente es debido a que en la fase secretora

media la cantidad de células apoptóticas es aún muy baja. Por lo que no es detectable si en esta fase existen alteraciones respecto a la muerte celular debidas a los tratamientos, ni a la infertilidad por disfunción hipotálamo hipofisiaria. Otros estudios realizados por Kokawa *et al.*, 1996, Dahmoun *et al.*, 1999, Vaskivuo *et al.*, 2000 determinaron también el índice de muerte celular del endometrio mediante TUNEL y detectaron que las primeras células apoptóticas son observadas en la fase secretora media en un número muy bajo y a partir de la fase secretora tardía el índice de muerte celular aumenta considerablemente, sobre todo en el epitelio glandular. Con las diferencias observadas en nuestros grupos de estudio en la expresión de Bax es altamente probable que en las fases sucesivas del desarrollo endometrial se presente la muerte celular.

Dahmoun *et al.* 1999 correlacionaron el índice apoptótico con los cambios en los niveles séricos de 17β -estradiol y progesterona, los niveles del receptor de estrógenos y progesterona y la proliferación de células epiteliales y estromales en el endometrio superficial humano durante el periodo perimenstrual con el objetivo de correlacionar los cambios en las concentraciones hormonales con los indicadores de proliferación y apoptosis en el ciclo y encontraron que la proliferación celular cuantificada con la expresión de Ki 67 es observada posteriormente al estímulo del 17β -estradiol en la fase proliferativa y la muerte celular comienza con la disminución de las concentraciones séricas de progesterona y 17β -estradiol. Lo cual indica que estos procesos están fuertemente regulados por el ambiente hormonal predominante en el endometrio.

9.3 EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDES

La actividad biológica de las hormonas esteroideas se lleva a cabo cuando estas se unen a su receptor nuclear en las células blanco que únicamente es activado con la unión de su ligando, regulando así la transcripción de genes específicos. Los receptores del estradiol son el ER α y ER β que son codificados por genes diferentes y el de progesterona es PR con dos isoformas PAR-A PR-B (Edwards, 2005). En este estudio evaluamos la expresión de ER α , que es el subtipo predominante en el útero y PR. Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con CC no altera la expresión de ER α , mientras que el tratamiento con FSHr disminuye su expresión significativamente. Estas diferencias también fueron observadas entre el estroma y el epitelio glandular donde se observó una inmunoreactividad muy baja en el grupo tratado con FSHr. Respecto a la expresión de PR no encontramos diferencias significativas en el grupo tratado con CC pero la expresión fue significativamente mayor en el grupo tratado con FSHr, este hallazgo es interesante porque se sabe que la expresión de PR está regulada por estrógenos a través de la unión a su receptor (Edwards, 2005, Ellmann, *et al.*, 2009), lo cual indica que en este caso, la expresión de PR es independiente de la regulación por estrógenos. En el análisis realizado entre el estroma y el epitelio glandular se observaron diferencias en la expresión de PR en el grupo tratado con FSHr respecto a los grupos sin tratamiento, ya que en el estroma se observó un nivel de expresión abundante mientras que en el epitelio glandular fue menor. Esto indica que la expresión disminuida de PR en el epitelio glandular puede estar relacionada con un estado de maduración endometrial insuficiente estimulado por el tratamiento con FSHr.

Otro estudio ha demostrado por radioinmunoensayo que la influencia de la administración del citrato de clomifeno en la inducción de la expresión del receptor de progesterona mediado por el receptor de estrógenos en mujeres ovulatorias, no producen diferencias en la distribución del receptor, concluyendo que la administración del tratamiento no está relacionada con la deficiencia en la fase lútea endometrial (Fritz *et al.* 1991), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, donde no se encontraron diferencias significativas en la expresión de ER α y PR en mujeres tratadas con CC. Por otro lado recientemente se ha descrito el efecto del tratamiento con CC a nivel molecular en el endometrio y este consiste en la inhibición del reclutamiento de SRC-1 que es un coactivador de ER, ya que la formación de este complejo es esencial para la transcripción dependiente de ER, por lo tanto la disminución en la proliferación celular observada en el tratamiento con CC es debida a que no se forma el complejo activador de la transcripción (Amita, *et al.*, 2010). Esto es de suma importancia porque con anterioridad se había sugerido que el efecto del CC en el endometrio era antiestrogénico, pero no estaban claros los mecanismos por los cuales actuaba (Sereepapong *et al.*, 2000, Triwitayakorn, *et al.*, 2002, Homburg, 2005).

9.4 EXPRESIÓN DE MARCADORES DE CÉLULAS TRONCALES EN EL ENDOMETRIO

Una de las características del endometrio humano es su alta capacidad de regeneración. Se ha sugerido que este proceso comienza a partir de la capa basal y esta región permanece después de la menstruación para dar origen a la nueva capa funcional, así el epitelio de la superficie se desarrolla a partir de los remanentes glandulares. Diversos estudios realizados por Chan *et al.*, 2004, Garget *et al.*, 2008, Meng *et al.*,

2007, Masuda, *et al.*, 2010 han apoyado en gran medida la idea de que la capa basal del endometrio alberga poblaciones de células troncales/progenitoras responsables de la regeneración endometrial después de la menstruación y después del parto, pero es muy probable que estas células también estén presentes en la capa funcional del endometrio (Masuda *et al.*, 2010). Existe una gran controversia sobre que marcadores son ideales para caracterizar células troncales de cualquier tejido. Por ejemplo, en células troncales embrionarias existen marcadores típicos de pluripotencia celular tales como Oct-4, Nanog y Sox-2 (Matthai, *et al.* 2006), aunque algunos de estos también se han detectado en tejidos adultos. Oct-4 es un factor de transcripción crucial para el mantenimiento de la pluripotencia, ya que regula el destino celular, reprimiendo genes relacionados con la diferenciación. Matthai, *et al.*, 2006 detectaron la expresión de Oct-4 y su mensajero en tejido endometrial de pacientes con patologías benignas, pero no demostraron una correlación entre la expresión de Oct-4 y alguna patología. Contrariamente a esto, en nuestros grupos de estudio no detectamos la expresión de Oct-4 (Fig. 20), lo cual probablemente se deba a que en las células somáticas de tejidos adultos no se expresa la isoforma de Oct-4 relacionada con la pluripotencia, como lo reportan Cantz *et al.*, 2007. Por ejemplo Lengner *et al.* 2007, demostraron que la ausencia de Oct-4 no interfiere con la autorenovación de las células troncales somáticas. En nuestros grupos de estudio tampoco observamos la expresión de Nanog, lo cual sugiere que es probable que suceda algo similar que para Oct-4. Por lo tanto el uso de estos marcadores para caracterizar células troncales en el endometrio puede llevar a interpretaciones erróneas de los datos experimentales. El único marcador de pluripotencia detectado fue Sox-2 para el cual, diversos estudios han reportado su expresión en tejidos adultos, por ejemplo en el cerebro (Cardano, *et al.*, 2011), por lo que puede sugerirse que las células positivas a este son posibles células troncales/progenitoras. Nuestros resultados no mostraron

diferencias significativas en la expresión de Sox-2 entre los diferentes grupos, ya que el número de células positivas para este marcador es muy bajo (Fig. 21). Otros autores han reportado que las poblaciones de células troncales/progenitoras tanto estromales como progenitoras son muy pequeñas ya que al aislar células trocales/progenitoras del endometrio el 0.08% corresponde a estromales y 0.02% a epiteliales (Chan et al, 2004 Schwab, *et al.*, 2005, Maruyama *et al.*, 2010), lo cual correlaciona con el bajo índice de células encontradas en nuestros grupos. Sin embargo este hallazgo es importante ya que la capa funcional del endometrio probablemente alberga poblaciones muy pequeñas de células troncales/progenitoras que son capaces de proporcionar los linajes celulares que conforman el endometrio maduro. Por lo anterior sugerimos que es importante caracterizar las células troncales endometriales utilizando otros marcadores utilizados para diferenciar a la población de células troncales/progenitoras epiteliales y estromales.

CONCLUSIONES

1.- El tratamiento con CC disminuye la expresión de marcadores relacionados con la proliferación como Ki67 y muerte celular en el endometrio en fase secretora media en mujeres infértiles por disfunción hipotálamo hipofisiaria y estas diferencias son también observadas entre el estroma y el epitelio glandular.

De igual forma el tratamiento con FSHr disminuye la expresión de Ki67 y esto es observado tanto en el estroma como en el epitelio glandular.

2.- Los tratamientos con CC y FSHr no producen diferencias en el número de células apoptóticas en la fase secretora media, pero el índice de expresión de proteínas relacionadas con la muerte celular si se ve alterado. Así Bax se expresa abundantemente en pacientes sometidas a los tratamientos, mientras Bcl-2 no presenta cambios entre los diferentes grupos.

2.- El tratamiento con CC no produce diferencias en la expresión del ER α , ni en el PR mientras que el tratamiento con FSHr disminuye la expresión del ER α y aumenta la expresión del PR en la fase secretora media de mujeres infértiles con disfunción hipotálamo hipofisiaria y esta expresión diferencial también es observada entre el estroma y el epitelio glandular.

3.- El endometrio funcional expresa marcadores de pluripotencia como Sox-2, pero no existen diferencias en la expresión de este entre los diferentes grupos estudiados, ya que se ha cuantificado un número muy bajo de células positivas.

Este estudio muestra que es necesaria la caracterización a nivel molecular del tejido endometrial de pacientes sometidas a inducción de ovulación debido a que estos inductores pueden modificar significativamente la funcionalidad lo cual participa en la infertilidad.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que es de gran relevancia la evaluación de la funcionalidad del endometrio en dos aéreas importantes: la capacidad de diferenciación de las células troncales endometriales y la receptividad endometrial en mujeres infértiles sometidas a inducción de ovulación. Ya que la capacidad de implantación de un embrión en el epitelio uterino es un proceso complejo que depende de las cualidades del endometrio maduro y se ha evidenciado que existen proteínas que permiten la implantación embrionaria, una de estas es la glicodelina-A que posee un rol importante en la aceptación materna y su expresión es estimulada por progesterona en la fase secretora media (Ben-Nagi, *et al.*, 2010) por lo que esta fase es crítica para evaluar la receptividad endometrial (Remohi, *et al.*, 2002 y Beier *et al.*, 2001). Por ello es importante establecer si los tratamientos afectan la expresión de proteínas como glicodelina-A, moléculas de adhesión celular (cadherinas, integrinas) y el factor inhibidor de la leucemia (LIF), alterando por lo tanto la receptividad endometrial. Tampoco hemos profundizado en la caracterización de las poblaciones de células troncales por lo que realizaremos el estudio de la expresión de otros marcadores de células troncales/progenitoras tales como c-kit y el transportador transmembranal ABCG2, así como CD133, CD146, CD29, CD44, CD105 y PDGFR.

Para determinar si los tratamientos con inductores de ovulación afectan la capacidad de diferenciación de las células troncales endometriales evaluaremos si las células troncales/progenitoras aisladas son capaces de diferenciarse hacia los linajes celulares que conforman el endometrio humano.

REFERENCIAS

Achache H, Revel A. 2006. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update*. 12(6):731-46.

Amita M, Takahashi T, Tsutsumi S, Ohta T, Takata K, Henmi N, Hara S, Igarashi H, Takahashi K and Kurachi H. 2010. Molecular Mechanism of the Inhibition of Estradiol-Induced Endometrial Epithelial Cell Proliferation by Clomiphene Citrate *Endocrinology*. 151(1): 394-405.

Aplin JD. 2000. The cell biological basis of human implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 14(5):757-64

Beier HM, Beier-Hellwig K, Sterzik K. 2001. The implantation receptive luteal phase of the endometrium. On the current status of molecular and cell biology research. *Zentralbl Gynakol*. 123(6):319-27.

Bouligand J, Ghervan C, Trabado S, Brailly-Tabard S, Guiochon-Mantel A, Young J. 2010. Genetics defects in GNRH1: a paradigm of hypothalamic congenital gonadotropin deficiency. *Brain Res*.10(1364):3-9.

Ben-Nagi J, Miell J, Mavrelos D, Naftalin J, Lee C, Jurkovic D. 2010. Endometrial implantation factors in women with submucous uterine fibroids. *Reprod Biomed Online*. 21(5):610-5

Boya Vegue J. Atlas de Histología y organografía Microscópica. 2^{da} edición. Panamericana. España, 2004.

Bessmertnaia VS, Samoïlov MV, Serebrennikova KG, Babichenko II. 2008. Endometrial morphological and immunohistochemical features in females with primary and secondary infertility. *Arkh Patol*. 70(4):31-4.

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

Bromer JG, Aldad TS, Taylor HS. 2009. Defining the proliferative phase endometrial defect. *Fertil Steril*. 91(3):698-704.

Bukovsky A, Svetlikova M y Caudle MR. 2005. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol.* 5(3):17

Cantz T, Key G, Bleidiel M, Gentile L, Wook Han D, Brenne A, Schöler H. 2007. Absence of OCT4 Expression in Somatic Tumor Cell Lines. *Cancer Stem Cells.*

Cardano M, Diaferia GR, Cattaneo M, Dessi SS, Long Q, Conti L, Deblasio P, Cattaneo E, Biunno I. 2011. mSEL-1L (suppressor/enhancer LIN12 like) levels influence murine neural stem cell self-renewal and lineage commitment. *J Biol Chem.* 10: 1074

Carr BR, Blackwell RE. Reproductive Medicine. 2da edición. Appleton & Lange, 1998. USA. Pp 790.

Chan RW, Schwab KE y Gargett CE. 2004. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol Reprod* 70:1738-1750.

Christian CA, Moenter SM. 2010. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr Rev.* 31(4):544-77.

Critchley HO, Saunders PT. 2009. Hormone receptor dynamics in a receptive human endometrium. *Reprod Sci.* (2):191-199.

Dahmoun M, Boman K, Cajander S, Westin P, Bäckström T. 1999. Apoptosis, Proliferation, and Sex Hormone Receptors in Superficial Parts of Human Endometrium at the End of the Secretory Phase. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 84(5): 1737-1743.

Demir Weusten AY, Groothuis PG, Dunselman GAJ, de Goeij A, Arends JW y Evers JLH. 2000. Morphological changes in mesothelial cells induced by shed menstrual endometrium in vitro are not primarily due to apoptosis or necrosis *Human Reproduction* 15 (7): 1462–1468.

Denker HW. 1993. Implantation: a cell biological paradox. *J Exp Zool.* 266(6):541-58.

Devoto L, Fuentes A, M.D. Kohen P, Cespedes P, Palomino A, Pommer R, Muñoz A, Strauss J. 2008. The human corpus luteum: life cycle and function in natural cycles. *Fertility and Sterility.* 92(3):1067-79.

Diedrich, Fauser B, Devroey P and Griesinger G. 2007. The role of the endometrium and embryo in human. *Human Reproduction Update.* 13(4):365–377.

Dmowski WP, Ding1 J, Shen J, Rana1 N, Fernandez BB, Braun DP. 2001. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis *Human Reproduction* 16(9): 1802–1808.

Edwards DP. 2005. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol.* 67:335-376.

Ellmann S, Sticht H, Thiel F, Beckmann MW, Strick R, Strissel PL. 2009. Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol Life Sci.* 66(15):2405-26.

Gargett C, Chan R y Shwab K 2008 Hormone and growth factor signaling in endometrial renewal: Role of stem/progenitor cells. *Molecular and cellular Endocrinology.* 288:22-29.

Gargett CE, Chan RW, Schwab KE. 2007. Endometrial stem cells. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 19(4):377-83.

Gargett CE. 2005. Stem cells in gynaecology. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.*44(5):380-386.

Gargett CE. 2007. Review article: stem cells in human reproduction. *Reprod Sci.* 14(5):405-24.

Gargett CE. 2007. Uterine stem cells: what is the evidence?. *Hum Reprod Update.* 13(1):87-101.

Giudice LC. 1995. The insulin-like growth factor system in normal and abnormal human ovarian follicle development. *Am J Med.* 16;98(1A):48S-54S.

Giudice LC, Saleh W. 1995. Growth factors in reproduction. *Trends Endocrinol Metab.* 6(2):60-9.

Hawkins S y Matzuk M. 2008. The menstrual cycle Basic biology. *ann. N.y. acad. Sci.* 1135: 10–18.

Homburg R. 2005. Clomiphene citrate end of an era? A mini-review. *Human Reproduction* 20(8): 2043-2051.

Hopwood D, Levison DA. 1976. Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *J Pathol.* 119(3):159-66.

Hughes E. 1997. The effectiveness of ovulation induction and intrauterine insemination in the treatment of persistent infertility: a meta-analysis. *Human Reproduction*. 12(9): 1865–1872.

Izawa1 M, Harada T, Deura I, Taniguchi F, Iwabe T, Terakawa N. 2006. Drug-induced apoptosis was markedly attenuated in endometriotic stromal cells. *Human Reproduction* 21(3): 600–604.

Jones RK, Searle RG y Bulmer JN. 1998. Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Human Reproduction*. 13(12): 3496-3502.

Kaitu'u-Lino TJ, Morison NB, Salamonsen LA. 2007. Estrogen is not essential for full endometrial restoration after breakdown: lessons from a mouse model. *Endocrinology*. 148(10):5105-11.

Karges B, Karges W y de Roux N. 2003. Clinical and molecular genetics of the human GnRH receptor. *Human Reproduction Update*. 9(6): 523:530.

Karges B, Karges W, de Roux N. 2003. Clinical and molecular genetics of the human GnRH receptor. *Hum Reprod Update*. 9(6):523-30.

Keung Cheng C y Leung P. 2005. Molecular Biology of Gonadotropin-Releasing Hormone(GnRH)-I, GnRH-II, and Their Receptors in Humans. *Endocrine Reviews* 26(2):283–306.

Kokawa K, Shikone T y Nakano R. 1996. Apoptosis in the human uterine endometrium during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 4144–4147.

Koks CAM, Groothuis, PG, Dunselman, GA. 2000. Adhesion of menstrual endometrium to extracellular matrix: the possible role of integrin $\alpha 6 \beta 1$ and laminin interaction. *Mol. Hum. Reprod.* 6:170–177.

Lanišnik Rižner T. 2009. Estrogen metabolism and action in endometriosis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 13(307): 8-18

Lengner C, Camargo F, Hochedlinger K. 2007. Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*. 1(4):403– 415.

Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, Buck CA.1992. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest*. 90(1):188-95.

Levallet J, Pakarinen P and Huhtaniemi IT. 1999. Follicle-Stimulating Hormone Ligand and Receptor Mutations, and Gonadal Dysfunction. *Archives of Medical Research.* 30: 486-494.

Li TC, Warren MA, Murphy C, Sargeant S, Cooke ID. 1992. A prospective, randomised, cross-over study comparing the effects of clomiphene citrate and cyclofenil on endometrial morphology in the luteal phase of normal, fertile women. *Br J Obstet Gynaecol.* 99(12):1008-13.

Maruyama T, Masuda H, Ono M, Kajitani T, Yoshimura Y. 2010. Regeneration of the human endometrium Human uterine stem/progenitor cells: their possible role in uterine physiology and pathology. *Reproduction.* 140(1):11-22.

Masuda H, Matsuzaki Y, Hiratsu E, Ono M, Nagashima T, Kajitani T, Arase T, Oda H, Uchida H, Asada H, Ito M, Yoshimura Y, Maruyama T, Okano H. 2010. Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial regeneration. *PLoS One.* 28; 5(4):10387.

Matthai C, Horvat R, Noe M, Nagele F, Radjabi A, van Trotsenburg M, Huber J, Kolbus A. 2006. Oct-4 expression in human endometrium. *Mol Hum Reprod.* 12(1):7-10.

Matzuk M y Lamb DJ. 2008. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med.* 14(11):1197-213

Mertens H, Heineman M, Evers, J. 2002. The expression of apoptosis-related proteins Bcl-2 and Ki67 in endometrium of ovulatory menstrual cycles. *Gynecol Obstet Invest.* 53: 224-230.

Meng X, Ichim T, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, Wang H, Ge W, Bogin V, Chan K, Thébaud B, Riordan N. 2007. Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population. *Journal of Translational Medicine.* 5(57).

Mills S. Histology for Pathologists. 3^{ra} edición. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia USA. 2007. Pp. 1272.

Mylonas I, Jeschke U, Shabani N, Kuhn C, Kunze S, Dian D, Friedl C, Kupka MS, Friese K. 2007. Steroid receptors ERalpha, ERbeta, PR-A and PR-B are differentially expressed in normal and atrophic human endometrium. *Histol Histopathol.* 22(2):169-76.

Mylonas I, Makovitzky J, Friese K, Jeschke U. 2009. Immunohistochemical labelling of steroid receptors in normal and malignant human endometrium. *Acta Histochem.* 111(4):349-59.

Olijve W, de Boer W, Mulders JM and van Wezenbeek P. 1996. Molecular biology and biochemistry of human recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). *Molecular Human Reproduction*. 2(5):371-382.

Padykula HA, Coles LG, Okulicz WC, Rapaport SI, McCracken JA, King NW Jr, Longcope C, Kaiserman-Abramof IR. 1989. The basalis of the primate endometrium: a bifunctional germinal compartment. *Biol Reprod*. 40(3):681-90.

Padykula HA. 1991. Regeneration in the primate uterus: the role of stem cells. *Ann N Y Acad Sci*.622:47-56.

Ponnampalam AP, Gargett CE, Rogers PA. 2007. Identification and hormonal regulation of a novel form of NKp30 in human endometrial epithelium. *Eur J Immunol*. 38(1):216-26.

Prianishnikov VA. 1978. A functional model of the structure of the epithelium of normal, hyperplastic and malignant human endometrium: a review. *Gynecol Oncol*. 6(5):420-8.

Psychoyos A. 1973. Hormonal control of ovoidimplantation. *Vitam Horm*. 31:201-56.

Remohí J, Pellicer A, Simón C, Navarro J. 2002. Reproducción Humana. 2da edición. McGraw-Hill Interamericana. Madrid. Pp. 635.

Richards JS, Pangas SA. 2010. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest*. 120(4):963-72.

Ross M, Paulina W. Histología de Ross, Texto y Atlas con biología celular y molecular. 5^{ta} edición. Panamericana. Argentina. 2007.

Santoro N, Goldsmith LT, Heller D, Illsley N, McGovern P, Molina C, Peters S, Skurnick JH, Forst C, Weiss G. 2000. Luteal progesterone relates to histological endometrial maturation in fertile women. *J Clin Endocrinol Metab*. 85(11):4207-11.

Schwab KE, Chan RW, Gargett CE. 2005. Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. *Fertil Steril*. 84(2):1124-30.

Sereepapong W, Suwajanakorn S, Triratanachat S, Sampatanukul P, Pruksananonda K, Boonkasemsanti W y Reinprayoon, D. 2000. Effects of clomiphene citrate on the endometrium of regularly cycling women. *Fertility and Sterility* 73(2): 287-291.

Shostak S. 2006. (Re)defining stem cells. *Bioessays*. 28(3):301-8.

Simón C, Martin JC, Meseguer M, Caballero-Campo P, Valbuena D, Pellicer A. 2000. Embryonic regulation of endometrial molecules in human implantation. *J Reprod Fertil.* 55:43-53.

Spencer SJ, Cataldo NA, Jaffe RB. 1996. Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstet Gynecol Surv.* 51(5):314-23.

Stevens A. Histología Humana 2^{da} edición. Harcourt Mosby. México. 1998.

Tabibzadeh S. 1998. Molecular control of the implantation window. *Hum Reprod Update.* 4(5):465-71.

Tanaka M, Kyo S, Kanaya T, Yatabe N, Nakamura M, Maida Y, Okabe M, Inoue M. 2003. Evidence of the monoclonal composition of human endometrial epithelial glands and mosaic pattern of clonal distribution in luminal epithelium. *Am J Pathol.* 163(1):295-301.

Tapia A, Gangi LM, Zegers-Hochschild F, Balmaceda J, Pommer R, Trejo L, Pacheco IM, Salvatierra AM, Henríquez S, Quezada M, Vargas M, Ríos M, Munroe DJ, Croxatto HB, Velasquez L. 2008. Differences in the endometrial transcript profile during the receptive period between women who were refractory to implantation and those who achieved pregnancy. *Hum Reprod.* 23(2):340-51.

Tilly J y Rueda B. 2008. Minireview: Stem Cell Contribution to Ovarian Development, Function, and Disease. *Endocrinology.* 149(9):4307-11.

Triwitayakorn A, Suwajanakorn S, Triratanachat S, Sampatanukul P, Pruksananonda K y Sereepapong W. 2002. Effects of initiation day of clomiphene citrate on the endometrium of women with regular menstrual cycles. *Fertility and Sterility* 78(1): 102-107.

Vanrell JA, Calaf J, Balasch J, Viscasillas P. Fertilidad y Esterilidad Humanas. Salvat. Barcelona. 1992. Pp. 543.

Vaskivuo TE, Stenbäck F, Karhumaa P, Risteli J, Dunkel L y Tapanainen JS. 2000. Apoptosis and apoptosis-related proteins in human endometrium. *Molecular and Cellular Endocrinology* 165: 75-83.

Virant-Klun I, Zech. 2008. Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. *Diferentiation.* 76(8):843-56.

Wada-Hiraike O, Hiraike H, Okinaga H, Imamov O, Barros RP, Morani A, Omoto Y, Warner M, Gustafsson JA. 2006. Role of estrogen receptor beta in uterine stroma and

epithelium: Insights from estrogen receptor beta^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci.* 103(48):18350-5.

Wang L, Chadwick W, Park SS, Zhou Y, Silver N, Martin B, Maudsley S. 2010. Gonadotropin-releasing hormone receptor system: modulatory role in aging and neurodegeneration. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 19(5):651-60.

Young JM, McNeilly AS. 2010. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction.* 140(4):489-504.

Zhang G, Gibbs E, Kelman Z, O'Donnell M, Hurwitz J. 1999. Studies on the interactions between human replication factor C and human proliferating cell nuclear antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (5): 1869–74.

LISTA DE ABREVIATURAS

μm	Micrometro
ABC	Complejo Avidina Biotina Peroxidasa
CC	Citrato de Clomifeno
DAB	Diaminobencidina
E2	Estradiol, estrógenos
ERα	Receptor de estrógenos alfa
FSH	Hormona Folículo Estimulante
FSHr	Hormona Folículo Estimulante de origen recombinante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
HRP	Kit de Peroxidasa (Horse Radish Peroxidase)
LH	Hormona Luteinizante
M	Molar
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
P4	Progesterona
PBS	Buffer de fosfato salino
PR	Receptor de Progesterona
PRL	Prolactina
TGFα	Factor de crecimiento transformante alfa
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
TSH	Hormona estimulante de la tiroides
UI	Unidades Internacionales
US	Ultrasonido
VRDL	Laboratorio de detección de enfermedades venéreas