



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

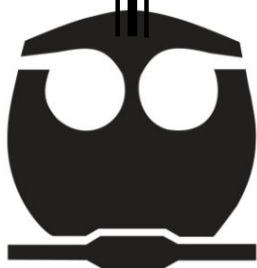
---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EXPRESIÓN DEL RECEPTOR A ANDRÓGENOS Y  
DEL RECEPTOR MEMBRANAL A ESTRÓGENOS  
GPR30, EN EL OVARIO HUMANO”**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA**

**PRESENTA  
DIANA ROSA GÓMORA HERRERA**



**México, D.F.**

**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

**VOCAL:** Profesor: Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre

**SECRETARIO:** Profesor: Dra. María del Carmen Méndez Herrera

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta

**2° SUPLENTE:** Profesor: Dr. Luis Tonatihut Sánchez Linares

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: DEPARTAMENTO DE EMBRIOLOGÍA,  
FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**ASESOR DEL TEMA: DRA. MARÍA DEL CARMEN MÉNDEZ HERRERA**

**SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. VERÓNICA DÍAZ HERNÁNDEZ**

**SUSTENTANTE: DIANA ROSA GÓMORA HERRERA**

Este trabajo de investigación se realizó bajo la dirección de la Dra. María. del Carmen Méndez Herrera, en el Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, UNAM.

Este trabajo de investigación se realizó bajo la coasesoría de la Dra. en C. Verónica Díaz Hernández, Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, UNAM.

## **AGRADECIMIENTOS**

La presente tesis se realizó con el apoyo financiero DGAPA/UNAM con No. de proyecto IN206810, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) No. 60346, IACOD/UNAM No. IB200111.

Este trabajo es parte del proyecto aprobado por el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) con el proyecto 080340MI.

Gracias a la beca brindada por DGAPA a la estudiante Diana Rosa Gómora Herrera durante la realización de este proyecto.

A Dra. María del Carmen Méndez Herrera por su apoyo académico, sus invaluable consejos y su dirección en este proyecto.

A Dra. Verónica Díaz Hernández por su tutoría, apoyo y consejos académicos en el desarrollo de este trabajo.

Dr. Enrique Antonio Pedernera Astegiano Jefe del Departamento de Embriología de la UNAM por todo su apoyo académico.

Dra. Delia Pérez Montiel por su asesoría en el área patológica.

Dra. Flavia Morales Vázquez por su apoyo para la obtención de muestras.

## **AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS**

A las pacientes por la donación de su tejido.

A la Tec. Académico Verónica Rodríguez Mata y C.D. María José Gómora Herrera por su apoyo en el procesamiento histológico de las muestras.

C.D. Dulce Dinora Uribe por su apoyo en el manejo de las imágenes para este proyecto.

Médico Cirujano Eliza Carlón Zarate y Dolores Medina Méndez por el apoyo brindado en la asociación de los resultados con la historia clínica de las pacientes.

## DEDICATORIAS

A mis padres Rosa María Herrera Centeno y Jesús Gómora Contreras por enseñarme que todo lo que vale la pena cuesta trabajo, por regresarme al camino cada vez que me desviaba, gracias a eso estoy escribiéndoles esta dedicatoria.

A mi hermana María José Gómora Herrera por ser mi guía y un ejemplo.

A mi hermano Francisco Gómora Herrera por ser un motivo para seguir superándome.

A mis abuelos Elvira Centeno y José María Herrera no tengo palabras para decirles lo importante que son para mi, nunca dejaré de darles satisfacciones.

A Adolfo García Hernández por sus palabras de aliento, por todos sus consejos, por cada sonrisa, pero sobre todo por compartir su vida conmigo.

A mis amigos Daniela Amaral, Brenda Sánchez, Francisco Alonso, Rodolfo Muñoz, Marco Santaella, Alberto Soto por todos estos años de amistad y por ser una parte muy importante en mi vida.

A mis amigos Citlaly Hernández, Mayeli Mosqueda, Giovanna Guerrero, Roxana Osnaya, Claudian Peregrina, Carolina Torres, Hugo Rico, Kipsain Barranco, Gregorio Rodríguez, Jorge Zavala, Alejandro Cárdenas, Emmanuel Bastida por todos los momentos compartidos, los cuales espero no sean los únicos.



## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	II
ABREVIATURAS.....	III
RESUMEN.....	IV
INTRODUCCIÓN.....	1
El ovario.....	1
Desarrollo del ovario.....	1
Síntesis de hormonas esteroides sexuales en el ovario.....	3
Receptores a hormonas esteroides.....	6
Receptor a andrógenos.....	7
Receptor a estrógenos alfa ER $\alpha$ y beta ER $\beta$ .....	8
Receptor transmembranal a estrógenos GPR30.....	9
ANTECEDENTES.....	10
Hormonas esteroides y su relación con el desarrollo neoplásico del ovario.....	10
Ovario y menopausia.....	11
Quistes de inclusión.....	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVOS.....	14
METODOLOGÍA.....	14
RESULTADOS.....	15
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	24
RESUMEN DE RESULTADOS.....	27
CONCLUSIONES.....	28
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	29
APÉNDICE 1.....	38
APÉNDICE 2.....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de los esteroides.....	5
Figura 2. Esquema de la biosíntesis de hormonas esteroides.....	6
Figura 3. Diagrama topológico de los receptores a estrógenos $\alpha$ y $\beta$ .....	8
Figura 4. Gráfico de la distribución etaria y distribución por patología asociada.....	16
Figura 5. Corte histológico del ovario de una mujer postmenopáusica de 59 años de edad.....	17
Figura 6. Corte histológico del ovario de mujeres de 32 y 41 años de edad.....	18
Figura 7. Corte histológico del ovario de una mujer postmenopáusica de 63 años de edad.....	19
Figura 8. Gráfico de la expresión global de GPR30 y AR en las estructuras epiteliales.....	20
Figura 9. Gráfico de la expresión global de GPR30 y AR en las estructuras epiteliales asociadas a su patología.....	21
Figura 10. Gráfico de comparación de la expresión de GPR30 en muestras de neoplasias dependientes de estrógenos y cáncer cervical que no tiene asociación con hormonas esteroides.....	22
Figura 11. Gráfico de comparación de la expresión de AR en muestras de neoplasias dependientes de estrógenos y cáncer cervical que no tiene asociación con hormonas esteroides.....	22
Figura 12. Inmunofluorescencia de AR en estructuras epiteliales de ovario humano.....	23
Figura 13. Inmunofluorescencia de GPR30 en estructuras epiteliales de ovario humano.....	23

## ABREVIATURAS

3- $\beta$ HSD	3- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
AMH	Hormona antimülleriana
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
AR	Receptor de andrógenos
ARE	Elemento de respuesta a andrógenos
CEO	Cáncer epitelial de ovario
CK	Citoqueratinas
CO	Cáncer de ovario
DAPI	4,6-Diamidino-2-fenilindol doclorhidrato
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ER	Receptor a estrógenos
ER $\alpha$	Receptor de estrógenos alfa
ER $\beta$	Receptor de estrógenos beta
ES	Epitelio superficial
FSH	Hormona folículo estimulante
GPR30	Receptor transmembranal acoplado a proteína G30
HER	Elemento de respuesta hormonal
IEC	Invaginaciones epiteliales corticales
LH	Hormona Luteinizante
$\mu$ L	Microlitros
$\mu$ m	Micrometros (micras)
OSE	Epitelio superficial del ovario
P	Papila
PR	Receptor de progesterona
QI	Quistes de inclusión
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
TCF	Tejido conectivo fibroso
VS	Vasos sanguíneos

## RESUMEN

Este trabajo tiene el propósito de evaluar la presencia del receptor a andrógenos (AR) y de la proteína GPR30 en estructuras epiteliales del ovario humano. El interés por conocer la presencia de estos receptores en el ovario normal reside en que la actividad del AR ha sido implicada en la carcinogénesis del ovario. Por otra parte, GPR30 se expresa en tumores de cáncer de mama y de endometrio, y se asocia a un pobre pronóstico de supervivencia de las pacientes. Los resultados obtenidos en este trabajo determinan que la inmunoreactividad de AR y la proteína GPR30 (propuesta por algunos autores como receptor transmembranal a estrógenos acoplado a proteína G) se observa en las células epiteliales ováricas, tanto en el epitelio superficial y sus invaginaciones epiteliales, así como en los quistes de inclusión. La presencia de AR y GPR30 no se observa en todas las pacientes; el porcentaje de positividad en el ovario de las mujeres estudiadas para AR es del 47% y para GPR30 del 70.5%. Si analizamos los casos positivos discriminando de acuerdo a la patología asociada que fue motivo de la ooforectomía, observamos que en los ovarios de pacientes con carcinoma cérvico-uterino tipo epidermoide el 66.7% es positivo para AR, mientras que en pacientes con leiomiomatosis y carcinoma endometriode los ovarios fueron positivos en un 20%. La diferencia en la expresión de AR es estadísticamente significativa ( $P < 0.01$ ) en las estructuras epiteliales del ovario de mujeres postmenopáusicas. Los resultados obtenidos con este trabajo sugieren una disminución en la expresión del AR en el ovario asociada con patologías dependientes de estrógenos que pudiera estar implicada en el inicio del cáncer epitelial del ovario.

## **INTRODUCCIÓN**

### **El ovario**

Es un órgano endocrino con función reproductiva que produce ovocitos capaces de ser fecundados y secreta hormonas esteroides sexuales. Son órganos pares que se localizan uno a cada lado cerca de la pared lateral de la pelvis menor en la fosa ovárica). Tiene forma ovalada parecida a una almendra y miden aproximadamente 3cm de largo, 1.5cm de ancho y 1cm de grosor. En el ovario, se distinguen tres compartimentos histológicos: epitelio superficial, corteza y médula (revisado en Moore et al. 2002).

El epitelio superficial recubre la superficie del ovario y se continúa con el mesotelio de la cavidad peritoneal, su estructura histológica varía de un epitelio plano a cúbico simple y subyacente a este hay una capa de tejido conjuntivo denso, la túnica albugínea, que lo separa de la corteza ovárica (revisado en: Auersperg y Woo, 2004). La corteza contiene folículos ováricos en diversos estadios de maduración incluidos en un tejido conectivo celular con fibras musculares dispersas; la porción central del ovario del ovario está ocupada por la médula que se compone de tejido conjuntivo laxo, abundantes vasos sanguíneos (venas principalmente), vasos linfáticos y terminaciones nerviosas.

Durante toda la vida reproductiva de la mujer el ovario presenta procesos de apoptosis y proliferación para permitir la ovulación y reparar la ruptura del epitelio superficial que ocurre en cada ovulación. La superficie de los ovarios es lisa antes de la pubertad, pero luego se va arrugando progresivamente y distorsionando debido a las repetidas ovulaciones.

### **Desarrollo embrionario del ovario**

En los mamíferos, incluido el hombre el sexo se determina genéticamente, siendo las hembras XX y los machos XY. En el embrión humano, los primordios gonadales se forman durante la cuarta semana de gestación (s.g.) a partir del mesodermo; en su parte ventral están cubiertos por el epitelio celómico que

recubre la cresta genital. Durante el estadio indiferenciado, el epitelio de la cresta genital prolifera y se extiende hacia el tejido conectivo laxo mesenquimático formando los cordones sexuales primarios los cuales degeneran en las hembras. Sin embargo, el epitelio celómico prolifera y forma un nuevo grupo de cordones sexuales cerca de la superficie externa del ovario (futura corteza). Las células germinales migran hacia la gónada durante la sexta semana y son rodeadas por los cordones corticales para formar los cordones ovígeros. Las células epiteliales son precursoras de las células foliculares y se conocen como células pre-granulosas. La mayor parte del volumen de los cordones ovígeros es ocupado por las células germinales que ahora se conocen como ovogonias y proliferan por mitosis; luego los cordones corticales se fragmentan y una sola célula germinal queda rodeada por varias células somáticas (octavas.g.). Las células germinales formarán los gametos femeninos maduros (ovocitos secundarios) y las células epiteliales de los cordones sexuales corticales formarán células de la granulosa. El mesénquima del estroma ovárico formará células de la teca (revisado en Gilbert, 2006).

Conforme la gónada se va desarrollando se forma también un sistema de conductos sexuales constituido por los conductos mesonéfricos o de Wolff y los conductos paramesonéfricos de Müller. En el varón sólo permanecen los conductos de Wolff que se mantienen por efecto de la testosterona testicular y posteriormente se integran al aparato reproductor masculino. Bajo la influencia de la hormona antimülleriana (AMH, por sus siglas en inglés) secretada por las células de Sertoli, el conducto paramesonéfrico degenera, dejando sólo restos en sus extremos craneal y caudal. Ante la influencia de la testosterona, que es secretada por las células de Leydig, los conductos mesonéfricos se siguen desarrollando, dichos conductos mesonéfricos se diferencian en el par de conductos deferentes.

En la mujer, en ausencia de testosterona, se produce la degeneración de los conductos mesonéfricos, que dejan sólo estructuras vestigiales (quistes de Gartner y apéndice del ovario). La ausencia de hormona antimülleriana permite que los

Conductos paramesonéfricos se sigan desarrollando. Las regiones craneales de los conductos paramesonéfricos se convierten en los oviductos. Hacia el extremo caudal, los conductos paramesonéfricos comienzan a aproximarse a la línea media. Esta fusión dará lugar al útero y el tejido de la cresta arrastrado con los conductos será el ligamento ancho del útero (revisado en Carlson, 2009).

### **Síntesis de hormonas esteroides sexuales en el ovario**

A partir del colesterol se sintetizan los glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos, estrógenos y progestágenos. Los tres últimos son indispensables para la reproducción y se producen en el ovario durante el ciclo sexual.

De acuerdo a la teoría de dos células dos gonadotropinas, la síntesis de  $17\beta$ -estradiol requiere de la cooperación de las células de la teca y de la granulosa que forman parte de los folículos ováricos en crecimiento; las primeras tienen receptores a hormona luteinizante (LH) y en respuesta a esta gonadotropina producen androstenediona que difunde a la capa de células granulosa donde es convertido a estradiol por citocromo P450 aromatasa (Cyp19) que se produce en respuesta a la hormona folículo estimulante. Después de la ovulación, las células remanentes del folículo dominante forman el cuerpo lúteo que produce progesterona en la segunda mitad del ciclo sexual.

Tienen todos los sistemas enzimáticos para la síntesis de múltiples esteroides, las células de la granulosa secretan principalmente estrógenos, las células de la teca y del estroma secretan principalmente andrógenos y las células del cuerpo lúteo secretan progesterona.

El  $17\beta$ -estradiol es el estrógeno biológicamente activo, su acción es fundamental para la adquisición de los caracteres sexuales secundarios en la mujer, promueve la proliferación celular y participan en múltiples funciones como el metabolismo óseo neuroprotectores y cardioprotectores.

Esta hormona actúa en las glándulas mamarias estimulando el crecimiento de los conductos epiteliales, el estroma y la acumulación de tejido adiposo. El estradiol, también actúa en el ovario sobre las células granulosas de los folículos en maduración favoreciendo su crecimiento, incrementan la expresión de su receptor alfa e inclusive actúan de manera sinérgica con las gonadotropinas hipofisarias LH y FSH para aumentar la actividad de la P450 aromataasa y así incrementar sus niveles circulantes.

Los estrógenos, como el 17- $\beta$ -estradiol, se sintetizan en el folículo ovárico y el cuerpo lúteo, su secreción se estimula por la hormona estimulante del folículo (FSH) producida en la adenohipófisis. En las mujeres, el 17- $\beta$ estradiol regula negativamente la síntesis y secreción de las gonadotropinas hipofisarias excepto cuando se acumula previo a la ovulación y dispara la secreción abrupta de LH y en menor grado la de FSH.

Los progestágenos promueven cambios secretores en el endometrio uterino preparándolo para la implantación y la gestación del embrión. Los andrógenos, como la testosterona, se sintetizan en las células de Leydig de los testículos y, en menor medida en el ovario. Se secretan en respuesta a la hormona luteinizante (LH). Los andrógenos incluyen a la testosterona y la dihidrotestosterona; intervienen en el establecimiento del fenotipo masculino, las características sexuales secundarias del varón y la espermatogénesis. En el ovario, los andrógenos son la fuente para la producción de estrógenos usando el complejo enzimático P450 aromataasa, su receptor se encuentra en las células del estroma del ovario y en las células de la teca.

Las hormonas esteroides se transportan a través del torrente circulatorio desde sus lugares de síntesis a sus órganos diana, en donde, debido a su característica hidrofóbica, atraviesan la membrana plasmática y se unen a sus receptores específicos en el citoplasma o en el núcleo.



El colesterol es un intermediario obligado en la biosíntesis de hormonas esteroides que se caracterizan por un sistema anular tetracíclico (figura 1).

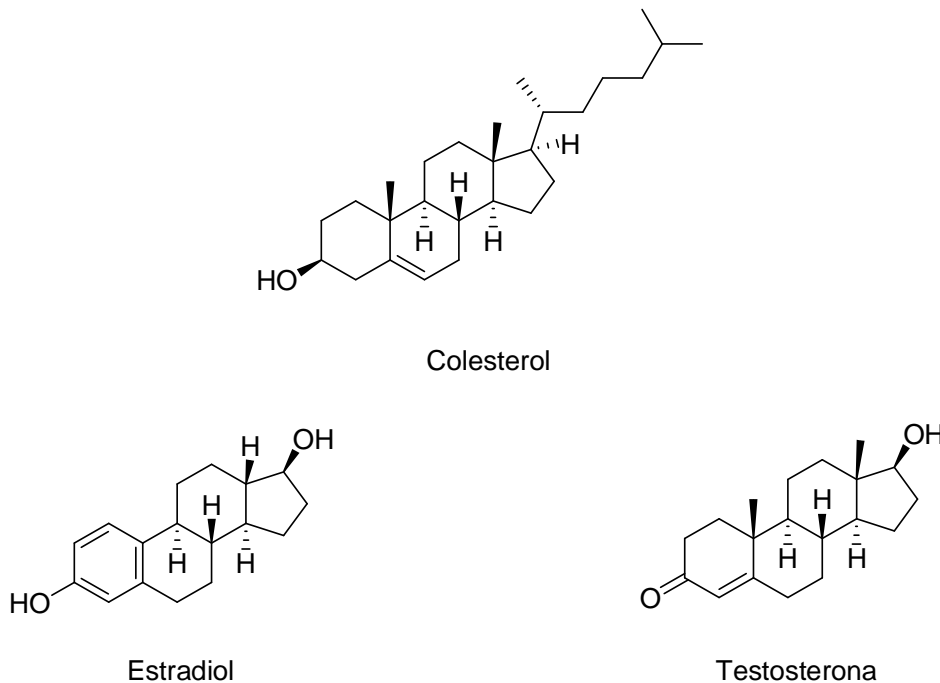


Figura 1. Estructura química de los esteroides

El colesterol se convierte en pregnenolona, la enzima de escisión de la cadena lateral perteneciente al citocromo P450 se localiza en la membrana mitocondrial interna y elimina seis carbonos de la cadena lateral del colesterol, formando la pregnenolona. La conversión de pregnenolona en progesterona, está catalizado por la 3- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3- $\beta$ HSD).

La biosíntesis de esteroides en el humano se realiza a través de la pregnenolona a la 17- $\alpha$ -hidroxipregnenolona. Esta reacción es catalizada por P450<sub>C17</sub>. Posteriormente; la síntesis de andrógenos comienza con la escisión de la cadena lateral de 2 carbonos en C17 de la 17- $\alpha$ -hidroxipregnenolona a la dehidroepiandrosterona (DHEA) catalizada mediante la enzima P450<sub>C17</sub>. La androstenodiona se forma debido a la acción de 3- $\beta$ HSD. La reducción del grupo ceto del C-17 de la androstenodiona por acción de la 17- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa transforma este andrógeno a testosterona.

La testosterona se transforma en estradiol, por acción de la aromatasa, en la que el anillo A se aromatiza para producir el estradiol (revisado en Karp, 2007).

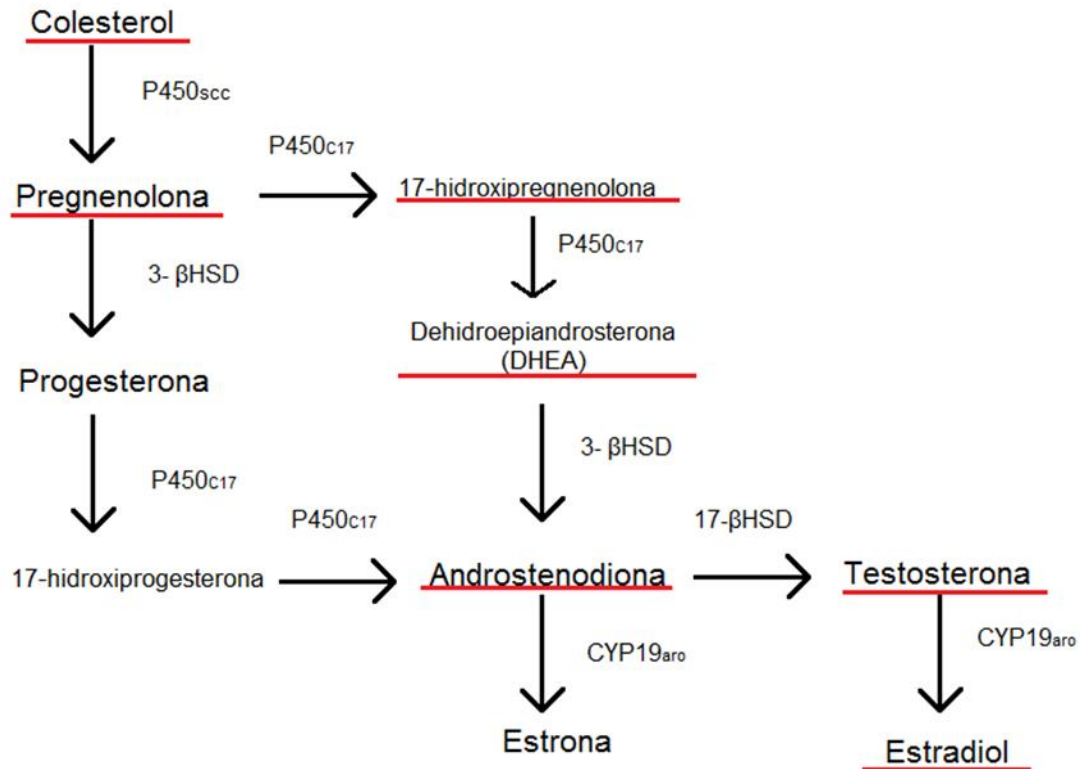


Figura 2. Esquema de la biosíntesis de hormonas esteroides.

### Receptores a hormonas esteroides

Las actividades de muchos factores de transcripción nuclear están reguladas por hormonas, que en los organismos multicelulares funcionan como señales extracelulares. Las hormonas esteroides son pequeñas moléculas liposolubles, que pueden difundirse a través de las membranas plasmática y nuclear. Las hormonas esteroides se unen a factores de transcripción específicos, pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares y regulan la expresión génica. Este tipo de receptores reside fundamentalmente en el núcleo, aunque algunos se pueden encontrar en el citoplasma.

Todos los receptores nucleares poseen una región N-terminal, con regiones que funcionan como dominios de activación de la transcripción. El dominio de fijación al DNA está ubicado cerca del centro de la secuencia primaria y presenta el

motivo en dedos de zinc C<sub>4</sub>. El dominio de fijación a la hormona está cerca del extremo C-terminal de estos receptores y contiene un dominio de activación hormono dependiente (revisado en Lodish, 2002).

El estrógeno es un esteroide fundamental en la fisiología humana que ejerce su efecto tanto al nivel de la transcripción, así como a nivel de señalización intracelular a través de segundos mensajeros.

### **Receptor de andrógenos (AR)**

La acción de los andrógenos es mediada por el receptor a andrógenos (AR) que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares (Evans, 1988; Carson-Jurica et al., 1990). En estudios previos se encontró que AR se expresa en una variedad de tejidos, incluyendo los órganos reproductivos de macho y hembra ( Ruizeveld de Winter et al., 1991; Kimura et al., 1993; Tetsuka et al., 1995; Adesanya-Famuyiwa et al., 1999; Pelletier, 2000; Pelletier et al. 2004).

El receptor a andrógenos (AR) se encuentra codificado en el cromosoma Xq11.2-q12. Se encuentra organizado en 8 exones. En humano se han identificado dos isoformas del receptor AR-A de 87 KDa y AR-B de 110KDa. La isoforma A no posee los primeros 187 aminoácidos de la región N-terminal con respecto a la isoforma B.

El AR es una proteína intracelular que se encuentra en el citosol y reconoce las diferencias estereoquímicas de la hormona. Al igual que los receptores a estrógenos (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) tiene cuatro dominios funcionales; un dominio de unión al DNA, un dominio de unión al ligando, una región bisagra y un dominio amino terminal.

Cuando la hormona atraviesa la membrana se une al receptor, que en ausencia de su ligando está unido a proteínas de choque térmico, una vez que el andrógeno se une al receptor hay un cambio conformacional. El complejo hormona-receptor se

transloca al núcleo en donde se une a una porción del DNA llamada elemento de respuesta a andrógenos ARE (por sus siglas en inglés).

### Receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) y estrógenos beta (ER $\beta$ )

En la actualidad sólo se conocen dos receptores nucleares a estrógenos ER $\alpha$  y ER $\beta$ , los cuales están presentes en el ovario. Cuando la hormona se une al receptor, éste experimenta una modificación conformacional y se disocia de las proteínas de choque térmico, exponiendo entonces una señal de translocación nuclear. Los receptores se dimerizan y el complejo se transporta al núcleo, en donde se une a una porción del DNA llamada elemento de respuesta hormonal (HER) (Kurman et al., 2010). Los receptores nucleares muestran diferentes dominios funcionales.

Las regiones A/B están involucradas en las interacciones proteína-proteína. El dominio C desempeña un papel fundamental en la dimerización del receptor y en la unión de secuencias específicas de DNA; es el dominio de unión al DNA. La región bisagra se encuentra en el dominio D; existe muy poca información sobre la relación función-estructura de este dominio. La región E/F se encuentra en el Carboxilo terminal y determina al dominio de unión al ligando (LBD); (Ascenzi y Bocedi 2006).

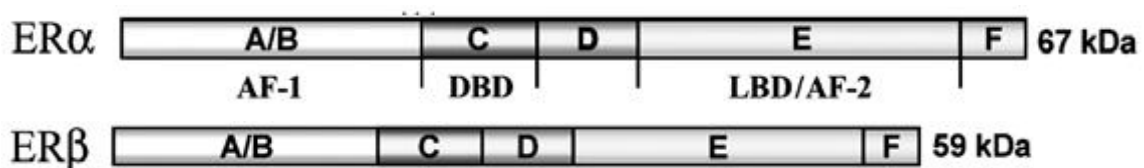


Figura 3. Diagrama topológico de los receptores a esteroides, en el que se muestran diferentes dominios funcionales.

### **Receptor transmembranal de estrógenos GPR30**

Los efectos de los estrógenos están muy extendidos por todo el cuerpo. Aunque los receptores nucleares clásicos de estrógenos se conocen bien desde hace décadas, hay aspectos de la biología de los estrógenos que siguen siendo incompatibles con los mecanismos de acción de sus receptores nucleares. Recientemente, se ha sugerido la existencia de un receptor transmembranal acoplado a proteína G30 que podría contribuir a algunos efectos celulares y fisiológicos de los estrógenos, el cual activa una vía de señalización rápida no genómica de forma independiente a los receptores a estrógenos tradicionales (Prossnitz y Maggiolini., 2009).

El descubrimiento de GPR30 como un receptor a estrógenos deriva de que los estrógenos pueden estimular la actividad de adenilatociclasa y la producción de AMPc (Aronica et al., 1994).

Los receptores unidos a proteína G (GPCR) se llaman así porque interactúan con las proteínas G. Los miembros de la familia GPCR también se conocen como receptores de siete dominios transmembranales (7TM) porque contienen siete  $\alpha$ -hélices transmembranales. Su terminación amino se encuentra en el exterior de la célula, las siete hélices alfa que atraviesan la membrana plasmática se conectan con asas de longitud variable y el dominio carboxilo es intracelular. Hay tres asas presentes en el exterior de la célula y juntas forman el sitio de unión con el ligando. Las tres asas presentes en el lado citoplasmático proporcionan sitios de unión para las proteínas G heterotriméricas, las cuales se unirán en la tercera asa intracelular. La subunidad  $G\alpha$  activa al adenilatociclasa que produce AMPc (revisado en Karp, 2007).

Se ha identificado la localización de GPR30 en las membranas intracelulares del retículo endoplásmico y su ausencia en la membrana plasmática (Prossnitz y Magglioni, 2009).

## **ANTECEDENTES**

### **Hormonas esteroides y su relación con el desarrollo neoplásico del ovario**

El epitelio superficial del ovario expresa receptores a estrógenos (ER), progesterona (PR) (Starczewskiet al., 2008) y andrógenos (AR) que le permiten responder a estímulos hormonales. Las hormonas esteroides son reguladores de la proliferación celular en los ovarios y pueden tener un papel importante en la progresión del cáncer epitelial del ovario. Estudios *in vitro* utilizando líneas celulares apoyan la hipótesis de la participación de los estrógenos en el desarrollo del cáncer epitelial del ovario. Aunado a ello un estudio *in vitro* demostró que el 17- beta estradiol induce la transformación epitelio-mesénquima en células epiteliales de cáncer ovárico asociadas con la disminución de la expresión de E-cadherina, evento relacionado con el proceso de metástasis (Park et al., 2008). Se han identificado los tres tipos de receptores en las células tumorales del ovario. Particularmente, el receptor AR es detectado en un 90% de los tumores. Mientras que la expresión del ER se encuentra aumentada hasta un 60% con respecto a tumores benignos (Hillieret al., 1998; Pujol et al., 1998; Lauet al., 1999; Vierikkoet al., 1983; Willcockset al., 1983; Rao and Slotman, 1991; Risch, 1998).

Estudios epidemiológicos en mujeres posmenopáusicas con terapia de reemplazo hormonal, proponen que los estrógenos incrementan la incidencia del desarrollo de CEO (Rodriguez et al., 2001), lo cual es posible ya que otros autores han reportado la expresión de ER $\alpha$ , ER $\beta$ , PR y AR en el ES y QI de ovarios de mujeres pre y posmenopáusicas (Brodowskaet al., 2007; Starczewskiet al., 2008; Brodowskaet al., 2010). Como se ha demostrado en los cánceres de mama, endometrial y epitelial del ovario, el mecanismo de acción de los estrógenos en el desarrollo carcinogénico ocurre a través de su unión a receptores que se translocan al núcleo y regulan la transcripción de genes blanco involucrados en el control del ciclo celular (revisado en Albanito et al., 2007). Recientemente, se ha propuesto que la acción no genómica de los estrógenos se da a través del receptor membranal GPR30, el cual activa la vía ERK cinasa induciendo la

expresión de factores importantes para el progreso del ciclo celular (Albanito et al., 2007). Un estudio retrospectivo mostró que la expresión de GPR30 es abundante en los tumores de cáncer epitelial de alto riesgo y se asocia con un pobre pronóstico de supervivencia de las pacientes (Smith et al., 2009).

### **Ovario y menopausia**

La transición a la etapa postreproductiva inicia antes de la menopausia (la cual se define como el año que transcurre después de la fecha de la última menstruación). La pérdida de la fertilidad es gradual y se manifiesta por la elevación progresiva de los niveles de FSH, la disminución en los niveles de inhibina y progesterona así como por ciclos menstruales irregulares. El ovario cambia su morfología, su superficie rosada y lisa durante la edad reproductiva se vuelve grisácea e irregular. En tamaño disminuye a casi la mitad y su aspecto se torna fibroso. Al microscopio se observan escasos folículos ováricos con características atrésicas que nos indican el agotamiento de la reserva folicular con frecuencia se forman invaginaciones corticales y quistes de inclusión. El ovario, anteriormente productor de estrógenos y progesterona, se vuelve una glándula secretora de andrógenos producidos principalmente por las células hiliares y las células estromales.

### **Quistes de inclusión**

Los QI son definidos como quistes en la corteza del ovario que son delimitados por una capa de células parecidas al epitelio superficial del ovario (Gusberg, Deligdisch, 1984). El origen de los quistes resulta del atrapamiento del epitelio superficial durante la ovulación (Okamura et al. 2006, Scully. 1995).

Varios autores proponen que los QI podrían ser precursores del cáncer epitelial del ovario bajo la hipótesis de que al estar expuestos a un ambiente hormonal diferente podrían malignizarse (Radisavljevic, 1977). Se ha observado que cambios hiperplásicos y metaplásicos en QI y ES son más frecuentes en los ovarios contralaterales de tumores de cáncer epitelial del ovario (92%), endocarcinoma endometrial (68%) y ovario poliquístico (68%) comparado con los

ovarios de pacientes sin enfermedad neoplásica (22%); (Resta et al., 1993; Mitta *et al.*, 1993; Tresserra et al., 1998).

Estudios inmunohistoquímicos han confirmado la expresión generalizada de AR en tumores de cáncer epitelial ovárico; sin embargo, un estudio que revisó 322 casos no encontró relación entre la expresión de AR y la evolución clínica de las pacientes.

Se ha descrito que los niveles de mRNA de AR son mayores en las células del epitelio superficial del ovario normal en comparación con las células de cáncer de ovario derivados de los tumores serosos (Lauet al., 2001). Trabajos recientes sugieren que el CEO subtipo seroso, podría tener su origen en células del epitelio de la fimbria que se implantan y originan los quistes de inclusión epitelial (Dubeau, 2008). En relación a esta propuesta, Nodin et al. (2010) sugieren que la transformación maligna de las células epiteliales que originan el CEO subtipo seroso, podría implicar una regulación negativa de AR, ya que la expresión de esta proteína fue menor en tumores primarios (30% positividad) y metastásicos (33% positividad) comparada con la expresión observada en tuba (75% de positividad).



## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las hormonas esteroideas están involucradas en el inicio y la progresión de diferentes tipos de cáncer. Existen evidencias epidemiológicas y experimentales que asocian la expresión de GPR30 con cáncer de mamá y de endometrio. En la menopausia, con el cese de la función reproductiva el ovario se vuelve una glándula productora de andrógenos que a su vez son sustrato de estrógenos; esto coincide con la edad en la que la mujer tiene mayor riesgo de padecer cáncer epitelial del ovario.

Por otra parte, los QI son frecuentes en las mujeres postmenopáusicas y se consideran lesiones precursoras del cáncer epitelial de ovario por lo tanto las células epiteliales que cubren la superficie ovárica, sus IEC y los QI están expuestas no sólo a los andrógenos circulantes, sino también a los producidos dentro del ovario. Hasta el momento, no se cuenta con trabajos que estudien la expresión del receptor transmembranal a estrógenos GPR30 y del receptor a andrógenos en el ovario de mujeres con patologías ginecológicas dependientes de estrógenos en las estructuras epiteliales del ovario que sugieren son precursoras del cáncer epitelial del ovario. El objetivo de este trabajo es determinar la expresión del receptor transmembranal a estrógenos GPR30 y del receptor a andrógenos AR, en las células epiteliales ováricas de pacientes con leiomiomas, adenocarcinoma endometriode y cáncer cérvico-uterino.

## **HIPÓTESIS**

Las células del epitelio superficial, de sus invaginaciones corticales y de los quistes de inclusión, presentan el receptor transmembranal a estrógenos GPR30 y el receptor a andrógenos.

## **OBJETIVOS**

- Describir la histología de las estructuras epiteliales en los ovarios de mujeres con patología ginecológica previa.
- Determinar por inmunofluorescencia la expresión del receptor transmembranal a estrógenos GPR30 y del receptor a andrógenos (AR) en ovarios sanos de pacientes con patología ginecológica previa.
- Determinar la frecuencia de expresión de GPR30 y AR en las estructuras epiteliales.

## **METODOLOGÍA**

Material Biológico: Este estudio se realizó con muestras de ovarios morfológicamente normales de mujeres con patología ginecológica asociada de pacientes del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) en las que su manejo clínico incluía la extirpación de la gónada. Las piezas quirúrgicas fueron proporcionadas por el Departamento de Anatomía Patológica del Instituto Nacional de Cancerología y manejadas siempre de la misma manera de acuerdo a su protocolo de trabajo hasta la fijación en formalina amortiguada al 10%. A partir de este punto las muestras se procesaron para técnica histológica de rutina como se describe en el apéndice I.

Se obtuvieron un total de 50 muestras de las cuales se reportaron 37 ya que el resto o no tenía estructuras epiteliales o había dudas en cuanto a su diagnóstico clínico. Las muestras se manejaron en forma anónima según las normas éticas establecidas para los bancos de tumores internacionales (revisado en

Guadarrama, 2010) y de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

El análisis histológico se realizó en cortes teñidos con hematoxilina-eosina, se seleccionaron para inmunofluorescencia las muestras que conservaban el epitelio superficial y/o que tienen invaginaciones o quistes epiteliales.

La detección de GPR30 y del receptor a andrógenos se hizo por inmunofluorescencia y se corroboró el origen epitelial de las estructuras observadas haciendo una doble detección con un anticuerpo anticitoqueratinas como se describe en el apéndice II. La observación de las muestras se hizo en un microscopio confocal Leica TCS-SP5, se fotografiaron de 4-6 campos de cada ovario y se procedió a su análisis.

## **RESULTADOS**

Se estudiaron un total de 37 ovarios aparentemente sanos. La edad de las pacientes se muestra en la figura 4A, la mayoría se encuentran en un intervalo de edad de 41-60 años y sólo dos pacientes son menores de 40 años. La ooforectomía estuvo indicada por patologías ginecológicas; 21 muestras fueron de mujeres con cáncer cérvico-uterino de tipo epidermoide, 7 con adenocarcinoma endometrioide y 9 con leiomiomatosis, figura 4B.

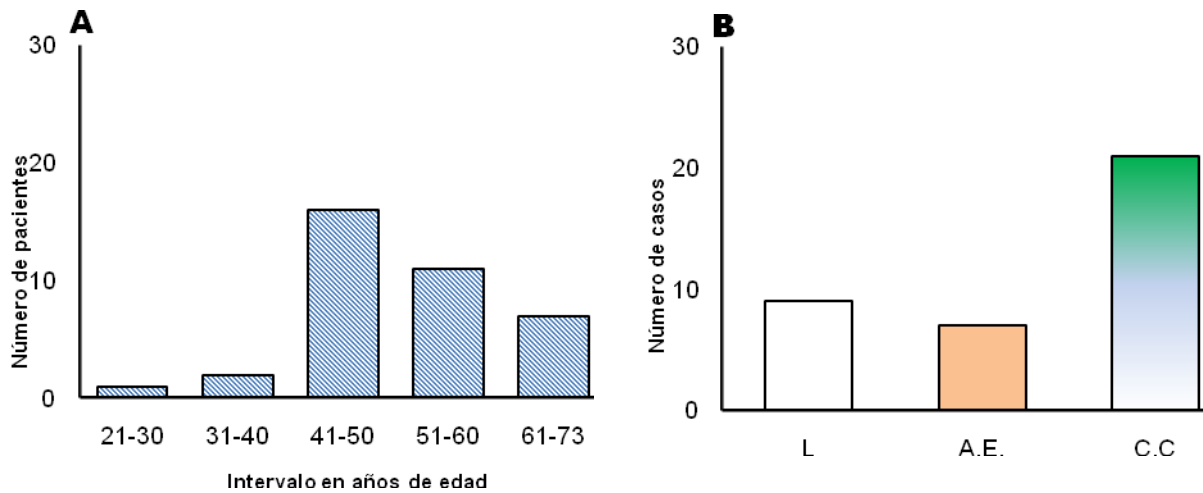


Fig. 4. La distribución etaria de las pacientes (A) muestra que la mayor parte de nuestra población está entre los 41-50 años (n=16), seguida por la de 51-60 años (n=11). El mayor número de pacientes tiene como patología asociada cáncer cérvico-uterino (n=21), mientras que adenocarcinoma endometriode y leiomiomatosis tienen un n=7 y 9 casos respectivamente (B).

El estudio histológico de las muestras de ovario mostró que los ovarios estaban casi en su totalidad desprovistos de folículos, el estroma era abundante y formado principalmente por tejido conectivo laxo. El epitelio superficial se observa interrumpido por zonas. En cambio las células epiteliales en las invaginaciones corticales están mejor preservadas. El epitelio que recubre la superficie del ovario y el de las invaginaciones es, en el 50% de los casos, monoestratificado cúbico o cilíndrico. El estroma subyacente es de tipo conectivo laxo con vasos sanguíneos en diferente densidad.

En los QI su tamaño era variable en la mayoría su diámetro era menor a 5mm y se observaron cerca de la superficie ovárica. Su revestimiento interior tiene un epitelio simple con características similares al epitelio superficial y a las invaginaciones corticales. En algunos casos las células epiteliales tenían aspecto pseudoestratificado.

En el corte histológico del ovario de la figura 5, se observan estructuras quísticas revestidas por epitelio cúbico simple, que en algunas regiones se vuelve estratificado y con células epiteliales que penetran en el estroma.

Los quistes están rodeados por tejido conectivo fibroso altamente vascularizado. En la figura 5A, el epitelio superficial es cúbico simple y muestra imágenes cupulares que sugieren la secreción de vacuolas, el estroma tiene tejido conectivo fibroso de apariencia normal. En 5B, otra zona del mismo ovario en la que se observa una invaginación revestida por epitelio cúbico. En la fotomicrografía 5C se observan estructuras papilares cubiertas por epitelio cúbico simple, que en algunas zonas se vuelve cilíndrico. El núcleo de las papilas está formado por tejido conectivo laxo y presentan abundantes vasos sanguíneos. En la fotomicrografía 5D se observan dos invaginaciones epiteliales; una de mayor tamaño que sugiere el inicio de la formación de un quiste de inclusión. Como se muestra en el recuadro, en una zona dentro del quiste este epitelio se vuelve estratificado. Tinción hematoxilina/eosina. ES = epitelio superficial, P = papila, VS = vasos sanguíneos, TCF = tejido conectivo fibroso, QI = quistes de inclusión epitelial.

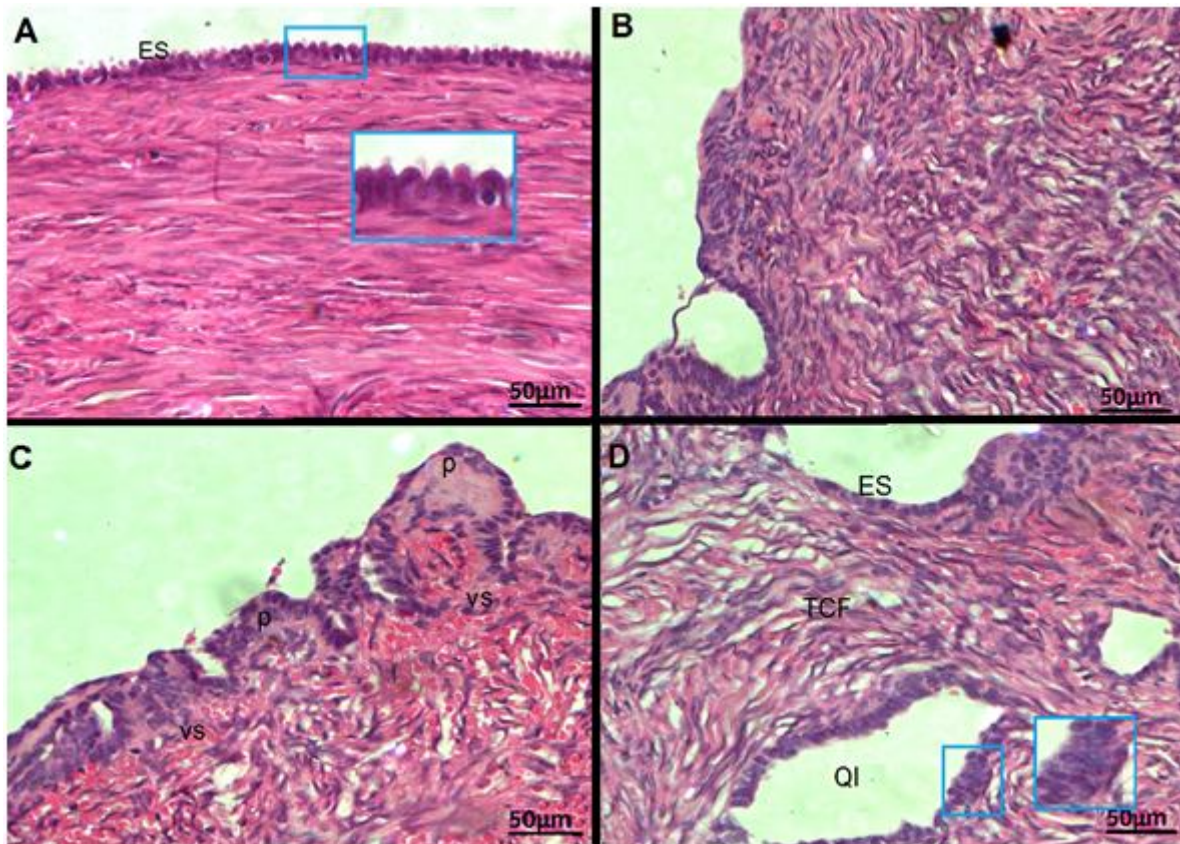


Fig. 5. Fotomicrografía del ovario de una mujer postmenopáusica. (A) El epitelio superficial que cubre el ovario y las invaginaciones son de tipo cúbico simple. (B) La invaginación hacia el estroma revestida por epitelio cúbico simple. (C) Formación de estructuras papilares cubiertas por tejido epitelial. (D) Se observan dos invaginaciones epiteliales; una de mayor tamaño que sugiere el inicio de la formación de un quiste de inclusión. Como se muestra en el recuadro, en una zona dentro del quiste este epitelio se vuelve estratificado. Tinción hematoxilina/eosina. ES = epitelio superficial, P = papila, VS = vasos sanguíneos, TCF = tejido conectivo fibroso, QI = quistes de inclusión epitelial.

En la figura 6 el epitelio que recubre la invaginación en A cambia de plano a cúbico simple; el tejido conectivo subyacente se vuelve denso. En la figura 6B, el epitelio que recubre la Invaginación epitelial pasa de ser cúbico simple a estratificado. En la figura 6C, se muestra un QI rodeado de tejido conectivo laxo y en D el epitelio que recubre otro quiste es de tipo cilíndrico pseudoestratificado. La patología asociada en estos casos fue cáncer cérvico-uterino diagnosticado histopatológicamente como carcinoma epidermoide.

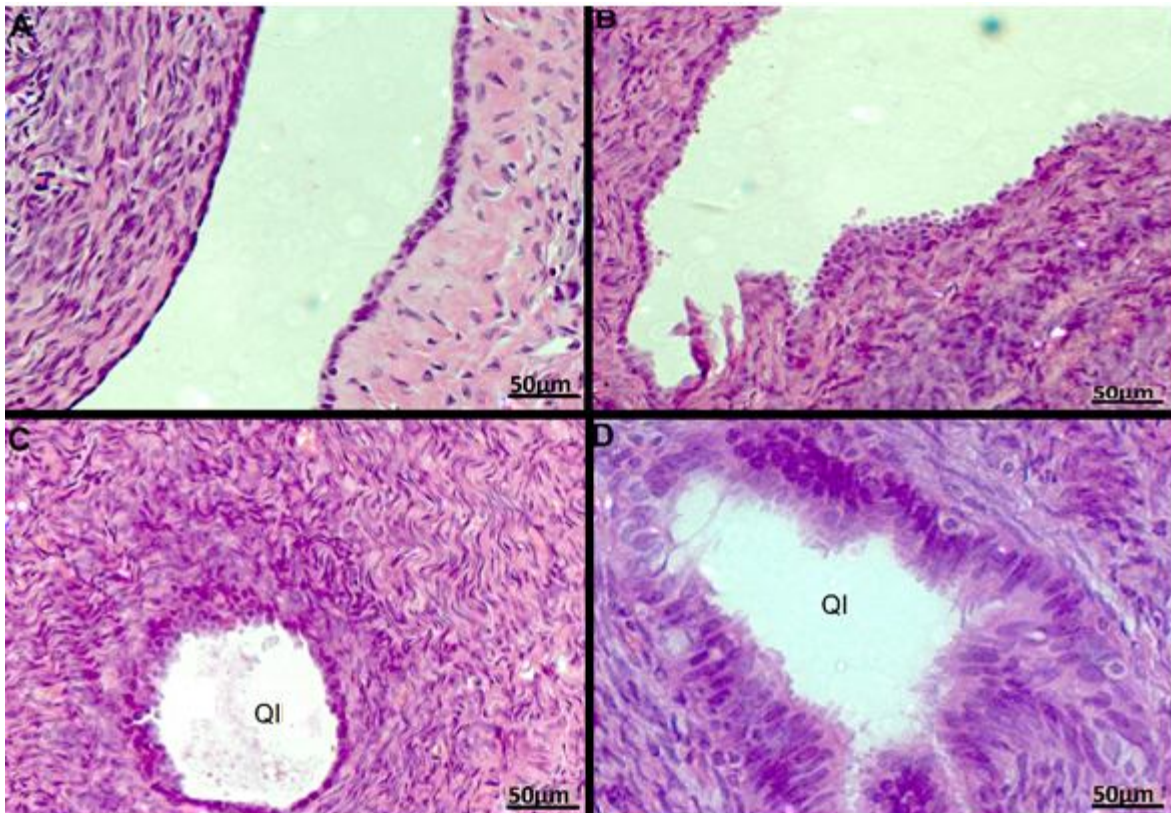


Fig. 6. Fotomicrografía (A) muestra una invaginación epitelial recubierta por células que cambian su forma de epitelio plano a cúbico simple. (B) Invaginación epitelial con formación de papilas y secreción de vacuolas apicales, está revestida por un epitelio cúbico que en algunas zonas se vuelve estratificado. (C) Se muestra una estructura quística con revestimiento cúbico simple de aproximadamente 125µm de diámetro, no se observan estructuras ciliadas, ni fenómenos de secreción importante. (D) Se muestra otra estructura quística, el epitelio que recubre su cavidad es cilíndrico pseudoestratificado. La patología asociada en ambos casos fue cáncer cérvicouterino. Tinción Hematoxilina/Eosina.

En la figura 7A se describe el corte histológico que muestra estructuras pseudo papilares, la superficie del ovario está cubierta por epitelio cilíndrico y en algunas zonas las células tienen vacuolas. En la figura 7B se observa formación incipiente de papilas bien vascularizadas cubiertas por epitelio que va de cilíndrico simple a pseudo estratificado. El epitelio que cubre al ovario es de tipo cilíndrico simple con actividad secretora y estroma fibroso. En contraste las papilas están revestidas de epitelio cúbico con un núcleo de tejido conectivo laxo en la figura 7C. Imagen histológica del ovario de una paciente de 63 años de edad con cáncer cérvico-uterino diagnosticado histopatológicamente como carcinoma epidermoide.

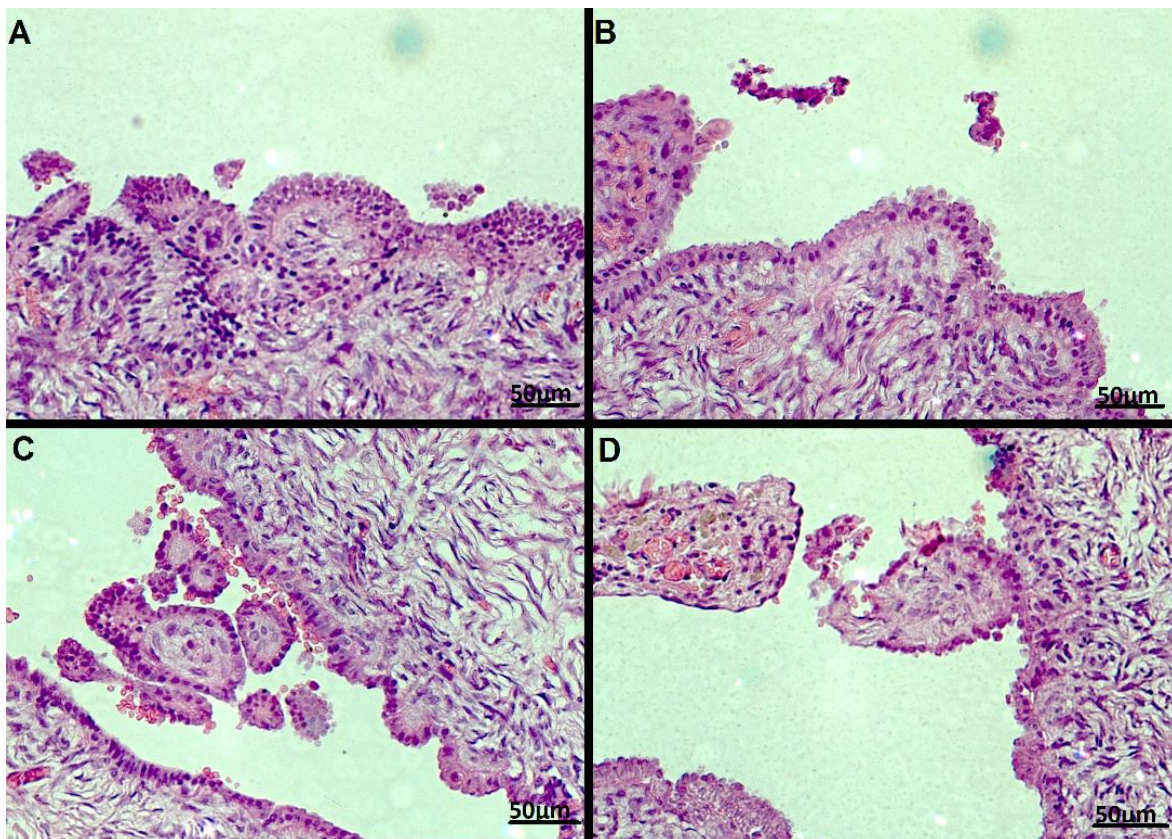


Fig. 7. Fotomicrografía (A) corte histológico de ovario en estructuras pseudo papilares e invaginaciones con epitelio cilíndrico alto. (B) Estructuras papilares bien definidas, tejido conectivo laxo en contacto con el epitelio. Formación de papilas incipiente con buena vascularización. (C) Epitelio cúbico simple con actividad secretora, estructuras papilares revestidas con epitelio cúbico y plano, estroma laxo. (D) El epitelio superficial del ovario es de tipo estratificado. Papila cubierta con epitelio plano con estroma laxo muy vascularizado. Tinción Hematoxilina/Eosina.

Por inmunofluorescencia se observa que el 70.5% de los ovarios de las pacientes incluidas en este estudio expresan la proteína GPR30 en las estructuras epiteliales. Mientras que la inmunoreactividad para el AR está presente en el 47.2% de los mismos.

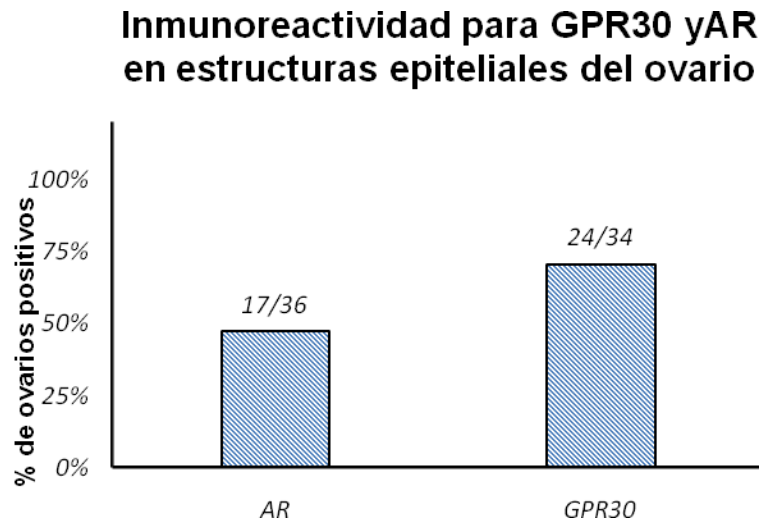


Fig. 8. Porcentaje de expresión de GPR30 y AR en las estructuras epiteliales estudiadas.

En la figura 9, se observa que en los leiomiomas el 88% expresan GPR30 y el 25% expresan AR, para cáncer endometrioide el 50% expresa GPR30 y el 14.3% expresa AR y para cáncer cérvico-uterino el 70% expresa GPR30 y 67% expresan AR en los ovarios de estas mujeres.



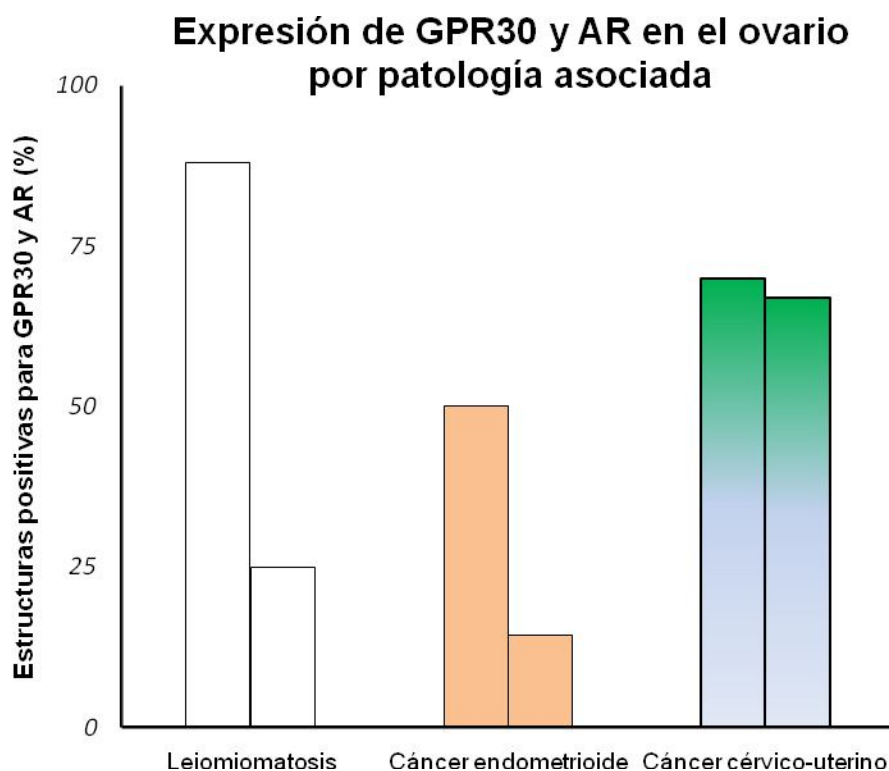


Fig. 9. El porcentaje de estructuras positivas para GPR30 es mayor en comparación con AR, en los ovarios con patología ginecológica dependiente de estrógenos.

Cuando agrupamos a las pacientes en relación a su inmunoreactividad y patología asociada con estos receptores, observamos que la frecuencia con que se presenta el AR en las estructuras epiteliales del ovario es distinta comparando el grupo de pacientes con cáncer cérvico-uterino (epidermoide) versus las pacientes con cáncer endometrioide y leiomiomas, como se muestra en las figuras 10 y 11. La frecuencia en el primer grupo es mayor (67%) versus el segundo (20 %); ( $p < 001$ ) como se observa en la figura 11. En el caso de la presencia de GPR30 entre ambas agrupaciones de casos no se observa diferencia en su frecuencia (cáncer cérvico-uterino 70% versus leiomioma y cáncer endometrioide 65%), figura 10.

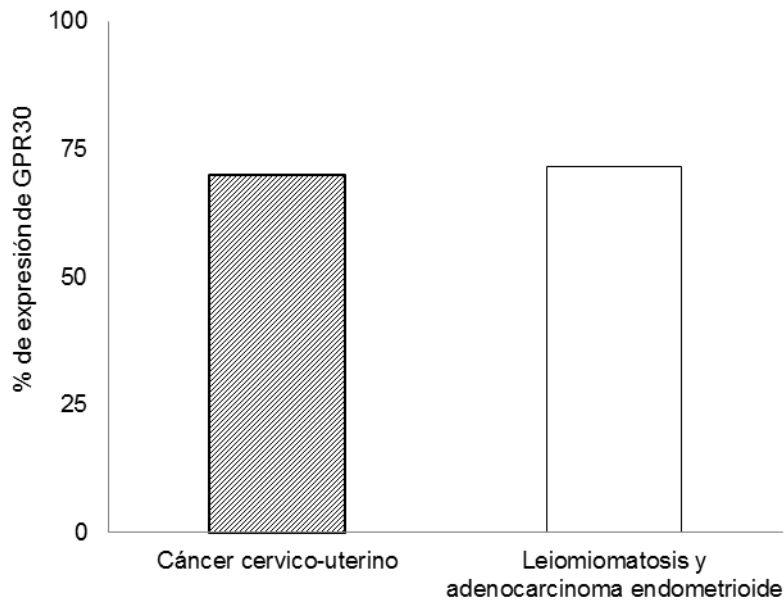


Fig. 10. Comparación de la expresión de GPR30 en el ovario con patología dependiente de estrógenos y la ocasionada por la infección del virus del papiloma humano. No se observa diferencia significativa para la expresión de GPR30 entre ambos grupos.

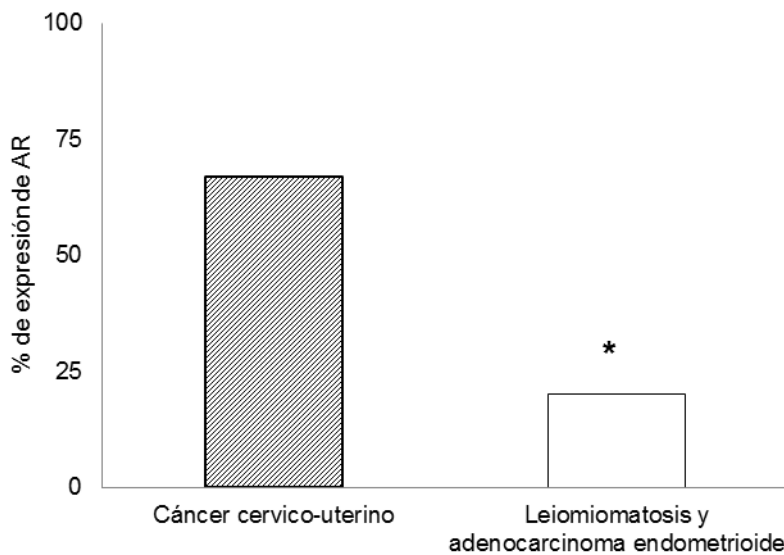


Fig. 11. Comparación de la expresión de AR en el ovario con patología dependiente de estrógenos y la ocasionada por la infección del virus del papiloma humano. La expresión de AR en el grupo de ovarios de pacientes con patología dependiente de estrógenos disminuye cuando se compara con el ovario de mujeres que padecen cáncer cérvico-uterino. ( $P < 0.01$ ).

Inmunofluorescencia de un quiste de inclusión epitelial que muestra inmunoreactividad para AR en verde, el origen epitelial es evidente por la señal positiva de citoqueratinas en rojo. Los núcleos se tiñen en azul con DAPI.

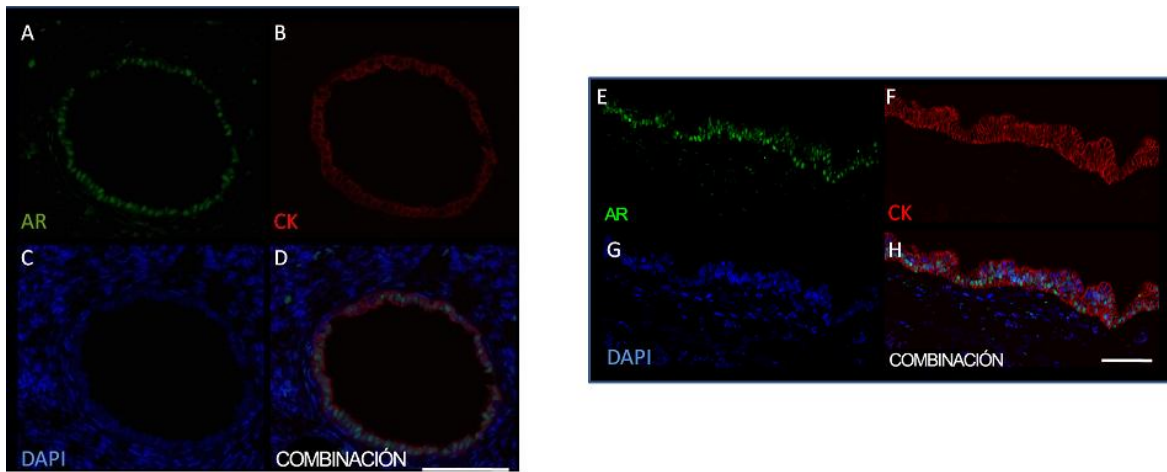


Fig12. Inmunofluorescencia de la expresión de AR. A y E, en verde tenemos la expresión del receptor a andrógenos. B y F, citoqueratinas en el citoplasma de las células en rojo. C y G, núcleos teñidos con DAPI en azul. D y H, muestran la sobre posición de las tres marcas en la muestra.

Quiste de inclusión que muestra la inmunoreactividad para la proteína GPR30 en verde, el origen epitelial de las células es evidente por la señal positiva de citoqueratinas en rojo, los núcleos se tiñen con DAPI en azul.

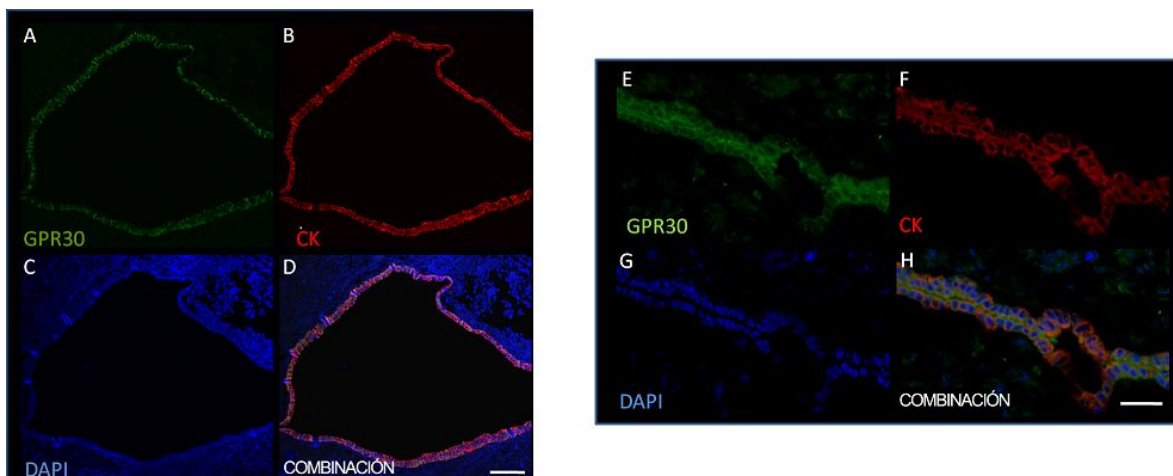


Fig13. Inmunofluorescencia de la expresión de GPR30 se observa en verde en A y E. B y F, las citoqueratinas (CK) en el citoplasma de las células están en rojo. C y G, los núcleos teñidos con DAPI se observan en azul. D y H, muestran la sobre posición de las tres marcas.

## **ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

En este estudio la población está integrada principalmente por mujeres que se encuentran en la perimenopausia; esto se corrobora con las imágenes histológicas, las cuales mostraron ovarios de apariencia fibrosa desprovisto de folículos primordiales sin evidencias de maduración folicular, restos de cuerpo lúteo y estroma abundante. En el epitelio superficial predomina el tipo histológico cúbico simple y su altura varía en un mismo ovario. Se observan zonas con mayor crecimiento que le dan apariencia pseudoestratificada. Esto nos dice que la morfología de este tejido no es regular y va cambiando por regiones; sin embargo, no pudimos detectar un patrón característico para ello. Por ejemplo, en una misma invaginación una cara se reviste de epitelio cúbico alto y la otra de cúbico bajo. Con respecto al tejido conectivo, éste también cambia. Se observan algunas regiones muy vascularizadas, que en algunos casos corresponden con la formación de estructuras papilares y que podrían estar apoyando el crecimiento de éstas. En los quistes de inclusión, el revestimiento epitelial varía en altura componiéndose de una o varias capas de células. Algunas capas sólo parecían de revestimiento y en otros casos mostraban evidencias de actividad secretora. Esto indica que el epitelio que reviste los QI puede sufrir cambios no sólo morfológicos, sino también funcionales, que podrían estar implicados en el inicio de la transformación celular.

Los anticuerpos utilizados para la inmunodetección de GPR30 y AR son específicos y han sido reportados previamente en la literatura. En cada experimento se realizaron controles negativos y positivos simultáneos; a los primeros sólo se les añadió el anticuerpo secundario correspondiente y como control positivo se utilizó testículo para AR y cerebro para GPR30, ambos en ratón. La inmunoreactividad se evaluó por inmunofluorescencia, una célula se consideró positiva cuando la marca para GPR30 se encontraba circunscrita en el citoplasma y para AR en el núcleo. El ovario fue clasificado como positivo para la expresión de estos receptores cuando estaba presente en las células del epitelio superficial, o bien, en el de los QI.

Por otra parte, tanto el cáncer de mama como el de ovario son dependientes de hormonas. En el de mama el receptor a esteroides que se expresa con mayor frecuencia es AR. Dicho receptor se ha reportado en más del 70% de cáncer de mama (Agrawal et al., 2008; Nahleh, 2008), incluyendo los tumores negativos a ER, donde se expresa en un 50% de los casos. Además, hay reportes que un aumento en la expresión de AR se asocia a mayor edad en la mujer (Nahleh, 2008; Agoff y Swanson, 2003). En tumores mamarios Yu et al. (2011). Encontraron que la pérdida de la expresión de AR podría estar relacionada con un mal pronóstico, hallazgo semejante reportado en de cáncer de vejiga (Boorjian et al. 2004). Aún hay controversia en el papel de los andrógenos sobre la malignidad en los tumores mencionados; sin embargo no puede descartarse que pudieran estar participando en el comportamiento de estos tumores. Además, es conocido que las pacientes con historia de cáncer de mama tienen mayor riesgo de padecer cáncer de ovario (Hartmann et al. 2005).

En un trabajo reciente, Brodowska et al. (2010) reportan que el AR está en el epitelio superficial del ovario de mujeres postmenopáusicas que son la población de mayor riesgo de padecer cáncer epitelial del ovario. Hay consenso en la literatura en que el AR es el receptor que se expresa con mayor frecuencia en estas neoplasias. En más del 90 % de los casos AR se puede detectar por inmunohistoquímica, sin embargo, se desconoce cómo actúa en estos tumores y, hasta donde nosotros hemos revisado, no hay estudios que lo relacionen con el inicio de la carcinogénesis del ovario.

En este estudio encontramos que en el 47% y 70% de la población estudiada los ovarios de mujeres postmenopáusicas expresan AR y GPR30, respectivamente. Pero al separarlos por patología ginecológica asociada, la expresión de AR disminuye, significativamente en los ovarios con patología dependiente de estrógenos. Esta pérdida de la expresión de AR podría estar implicada en la transformación de las células epiteliales, que después deriva en cáncer epitelial del ovario. Thompson y Adelson., (1993) sugirieron que la malignización podría facilitarse cuando no hay una producción adecuada de andrógenos en los ovarios, durante los años post-reproductivos.

Por otro lado, hay un gran número de informes que describen receptores a estrógenos asociados a membrana distintos a los receptores de estrógenos tradicionales (Acconcia et al. 2004; Li et al. 2003; Razandi et al. 2003; Toran-Allerand et al. 2002). Se ha demostrado que mRNA de GPR30 se expresa en numerosos tejidos (Prossnitz et al. 2007). Estudios recientes sugieren que la expresión de GPR30 está vinculada a las tasas de supervivencia más baja de cáncer de mama y endometrio. Los estrógenos juegan un papel importante en la fisiología de mama, endometrio y ovario. Aunque la carcinogénesis del ovario es desconocido, es claro que está muy relacionado a eventos hormonales (Smith et al. 2009).

Es importante estudiar la expresión y la localización histológica de los receptores a hormonas esteroides en mujeres postmenopausicas asociado al análisis histológico de las estructuras .epiteliales ya que nos podría dar información sobre cambios tisulares inducidos por esteroides sexuales.(Brodowska et al. 2010).

Probablemente, los cambios de estructura y función del ovario después de la menopausia están relacionados con cambios de localización y expresión de receptores a hormonas esteroides.

Más del 90% del cáncer de ovario (CO) se desarrolla desde las células del epitelio superficial y quistes de inclusión epitelial (Scully. 1995, Aoki et al. 2000, Heller et al. 2003). La frecuente ovulación, el trauma epitelial y reepitelización, la exposición del epitelio superficial al fluido folicular rico en estrógenos puede contribuir a la carcinogénesis (Fathalla, 1971).

La comprensión de la etiología del CO es limitada y a pesar de los numerosos esfuerzos, las lesiones precursoras aún no se han encontrado.

## **RESUMEN DE RESULTADOS**

Las proteínas para el receptor a andrógenos y GPR30 se expresan en las células del epitelio superficial, sus invaginaciones y los quistes de inclusión en el ovario de la mujer en edad postreproductiva.

En la población estudiada no todos los ovarios expresan AR y GPR30 en las estructuras epiteliales descritas.

La frecuencia de expresión de GPR30 no difiere en el ovario de las mujeres con patología ginecológica estudiadas

El receptor a andrógenos se encuentra con menor frecuencia en los ovarios de las mujeres con patología asociada dependiente de estrógenos.

## **Conclusiones**

Los andrógenos a través de su receptor podrían estar involucrados en la fisiopatología del ovario de las mujeres con patología ginecológica asociada a estrógenos.

Se requieren más estudios sobre el significado que podría tener la expresión del AR sobre la transformación maligna de las células epiteliales del ovario.



## REFERENCIAS

- Acconcia F, Ascenzi P, Fabozzi G, Visca P, Marino M. S-palmitoylation modulates human estrogen receptor- $\alpha$  functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. 16:878-883.
- Adesanya-Famuyiwa O, Zhou J, Wu G, Bondy C. Localization and sex steroid regulation of androgen receptor gene expression in Rhesus monkey uterus. *Obstet. Gynecol.* 1999. 93:265-270.
- Agoff S., Swanson P., Linden H. Androgen receptor expression in estrogen receptor-negative breast cancer. Immunohistochemical, clinical, and prognostic associations. *Am. J. Clin. Pathol.* 2003. 120:725-731.
- Agrawal AK, Jeleń M, Grzebieniak Z, Zukrowski P, Rudnicki J, Nienartowicz E. Androgen receptors as a prognostic and predictive factor in breast cancer. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2008;46:269-276.
- Albanito L, Madeo A, Lappano R, Vivacqua A, Rago V, Carpino A, Oprea TI, Prossnitz ER, Musti AM, Andò S, Maggiolini M. G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17 $\beta$ -estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2007. 67:1859-1866.
- Aoki Y, Kawada N, Tanaka K. Early form of ovarian cancer originating in inclusion cysts. A case report. *J. Reprod. Med.* 2000. 45:159-161.
- Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994. 91:8517-21.

-Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol. Aspects.Med.* 2006.27:299-402.

-Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium:biology, endocrinology, and pathology. *Endocr.Rev.* 2001.22:255-88.

-Auersperg N and Woo MM. Developmental and Differentiation of Ovarian Surface Epithelium: Cues the Basis of its malignant potential. Chapter 35.The Ovary. Ed. Elsevier Academic Press. USA. 2<sup>da</sup> Edition. 2004.579-590.

-Bai W, Oliveros-Saunders B, Wang Q, Acevedo-Duncan ME, Nicosia SV. Estrogen stimulation of ovarian surface epithelial cell proliferation.In. *Vitro.Cell.Dev. Biol. Anim.* 2000. 36:657-66.

-Botella , J. El ovario: Fisiología y patología. Ed. Díaz de Santos.1995.

-Boorjian S, Ugras S, Mongan NP, Gudas LJ, You X, Tickoo SK, Scherr DS. Androgen receptor expression is inversely correlated with pathologic tumor stage in bladder cancer. *Urology.* 2004.64:383-388.

-Brodowska A, Laszczyńska M, Starczewski A, Karakiewicz B, Brodowski J. The localization of estrogen receptor alpha and its function in the ovaries of postmenopausal women.*Folia.Histochem.Cytobiol.* 2007. 45:325-330.

-Brodowska A, Laszczyńska M, Starczewski A, Brodowski J, Masiuk M, Domagala W. Immunohistochemical analysis of steroid receptors in ovaries of postmenopausal women--effects of aging and hormone status. *Histol.Histopathol.* 2010. 25:1009-1016.

-Carlson B. Human embryology and Developmental Biology.4<sup>a</sup> Edition. Ed. MOSBY-Elsevier.. 2009.

-Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley BW. Steroid receptor family: structure and functions. Endocr.Rev. 1990. 11:201-20.

-Cramer DW, Welch WR. Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. J. Natl. Cancer.Inst. 1983. 71:717-21.

-Dubeau L. The cell of origin of ovarian epithelial tumours.Lancet.Oncol. 2008. 9:1191-1197.

-Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.Science. 1988. 240:889-895.

-Fathalla MF. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia?Lancet. 1971. 2:163.

-Gartner L., Hiatt J. Atlas color de histología. 3<sup>a</sup>. Edición.Ed. Mc-GrawHill.. 2008.

-Geneser E. Histología.6<sup>a</sup>. Reimpresión. Ed. Médica Panamericana. 1989.

-Gilbert S. Developmental Biology.8<sup>a</sup>.Edition. Ed. Sinauer Associates, Inc. U. 2006.

-Gusberg S, Deligdisch L. Ovarian dysplasia. A study of identical twins.Cancer. 1984. 54:1-4.

-Hartmann LC. Clínica Mayo. Guías del cáncer en la mujer. Ed. Trillas.2005.

-Heller D, Hameed M, Baergen R. Lack of proliferative activity of surfaceepithelial inclusion cysts the ovary. Int. J. Gynecol.Cancer. 2003. 13:303-307.

-Hillier SG, Anderson RA, Williams AR, Tetsuka M. Expression of oestrogenreceptor alpha and beta in cultured human ovarian surface epithelial cells. Mol.

Hum.Reprod. 1998. 4:811-5.

-Ho S. Estrogen, progesterone and epithelial ovarian cancer. Reprod. Biol. Endocrinol. 2003. 1:73.

-Karp G. Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos.4ªEd.Ed. McGraw Hill. 2005.

-Kawamura H, Kimura M, Ichihara I. The effect of androgen and estrogen on secretory epithelial cells and basal cells of the rat ventral prostate after long-term castration. Ann. Anat. 1993. 175:569-75.

-Kumar R., Litwack G. Structural and functional relationships of the steroid hormone receptors' N-terminal transactivation domain. Steroids. 2009. 74:877-883.

-Kurman RJ, Shih IeM. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. Am. J. Surg. Pathol. 2010. 34:433-43.

-Lau KM, Mok SC, Ho SM, Expression of human estrogen receptor alpha and beta, progesterone receptor and androgen receptor mRNA in normal and malignant ovarian epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. 96:5722-5727.

-Li AJ, Baldwin RL, Karlan BY. Estrogen and progesterone receptor subtype expression in normal and malignant ovarian epithelial cell cultures. Am. J. Obstet. Gynecol. 2003. 189:22-7.

-Lodish H, Berk A, Lawrence Zipursky S, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Biología Celular y Molecular. Ed. Panamericana. 2005.

-Mittal KR, Zeleniuch-Jacquotte A, Cooper JL, Demopoulos RI. Contralateral ovary in unilateral ovarian carcinoma: a search for preneoplastic lesions. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 1993. 12:59-63.

-Moore LK., Dally, Arthur. Anatomía con orientación clínica. Ed. MedicaPanamericana. 2002.

-Nahleh, Z. Androgen receptor as a target for the treatment of hormone receptor negative breast cancer: an uncharted territory. *Future. Oncol.* 2008. 4:15-21.

-Nodin B, Zendehrokh N, Brändstedt J, Nilsson E, Manjer J, Brennan DJ, Jirstrom K. Increased androgen receptor expression in serous carcinoma of the ovary is associated with an improved survival. *J. Ovarian. Res.* 2010. 3:14.

-Okamura H, Katabuchi H, Nitta M, Ohtake H. Structural changes and cell properties of human ovarian surface epithelium in ovarian pathophysiology. *Microsc. Res. Tech.* 2006. 69:469-81.

-Park SH, Cheung LW, Wong AS, Leung PC. Estrogen regulates Snail and Slug in the down-regulation of E-cadherin and induces metastatic potential of ovarian cancer cells through estrogen receptor alpha. *Mol. Endocrinol.* 2008. 22:2085-98.

-Pelletier, G. Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. *Histol. Histopathol.* 2000. 15:1261-1270.

-Pelletier G, Luu-The V, Li S, Labrie F. Localization and estrogenic regulation of androgen receptor mRNA expression in the mouse uterus and vagina. *J. Endocrinol.* 2004. 180:77-85.

-Perniconi SE, SimõesMde J, SimõesRdos S, Haidar MA, Baracat EC, Soares JM Jr. Proliferation of the superficial epithelium of ovaries in senile female rats following oral administration of conjugated equine estrogens. Clinics. 2008. 63:381-8.

-Pujol P, Rey JM, Nirde P, Roger P, Gastaldi M, Laffargue F, Rochefort H, Maudelonde T. Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis. Cancer.Res. 1998. 58:5367-5373.

-ProssnitzER, Arterburn JB, Sklar LA. GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. 2007. Mol. Cell.Endocrinol. 2007. 138-142.

-Prossnitz ER, Maggiolini M. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. Mol. Cell.Endocrinol. 2009.308:32-8.

-Radisavljevic SV. The pathogenesis of ovarian inclusion cysts and cystomas. Obstet. Gynecol. 1977. 49:424-9.

-Rao BR, Slotman BJ. Endocrine factors in common epithelial ovarian cancer. Endocr.Rev. 1991. 12:14-26.

-Razandi M, Alton G, Pedram A, Ghonshani S, Webb P, Levin ER. Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. Mol. Cell. Biol. 2003. 23:1633-1646.

-Resta L, Russo S, Colucci GA. Prat J. Morphologic precursors ovarian tumor. Obstet. Gynecol. 1993. 82:181-191.

-Risch, H. Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. *J.Natl. Cancer. Inst.* 1998. 90:1774-1786.

-Rodriguez C, Patel AV, Calle EE, Jacob EJ, Thun MJ. Estrogen replacement therapy and ovarian cancer mortality in a large prospective study of US women.*J. Am. Med. Assoc.* 2001. 285:3089-3090.

-Ruizeveld de Winter JA, Trapman J, Vermey M, Mulder E, Zegers ND, van derKwast TH. Androgen receptor expression in human tissues: an immunohistochemical study. *J. Histochem. Cytochem.* 1991 Jul;39(7):927-36.

-Scully RE. Pathology of ovarian cancer precursors.*J. Cell.Biochem.Suppl.* 1995. 23:208–218.

-Sharma A, Gentry-Maharaj A, Burnell M, Fourkala EO, Campbell S, Amso N, Seif M, Ryan A, Parmar M, Jacobs I, Menon U; for the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS). Assessing the malignant potential of ovarian inclusion cysts in postmenopausal women within the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a prospective cohort study. *Int. J. Obstet. Gynaecol.* 2011. 1-13.

-Smith, C., Marks, A. *Bioquímica básica de Marks: un enfoque clínico.* 2ª. Edición. Ed. McGrawHill. 2005.

-Smith HO, Arias-PulidoH, Kuo DY, Howard T, Qualls CR, Lee SJ, Verschraegen CF, Hathaway HJ, Joste NE, Prossnitz ER. GPR30 predicts poor survival for ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 2009. 114:465-71.

-Starczewski A, Brodowska A, Laszczyńska M, Piasecka M. The presence and role of progesterone receptor in the ovaries of postmenopausal women who have not applied hormone replacement therapy. *Folia.Histochem.Cytobiol.* 2008. 46:277-82.

-Tetsuka M, Whitelaw P, Bremmer W, Millar M, Smyth C, Hiller J. Developmental regulation of androgen receptor in rat ovary. *J. Endocrinol.* 1995. 145:535-543.

-Thompson, M., Adelson, M. Aging and development of ovarian epithelial carcinoma: the relevance of changes in ovarian stromal androgen production. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1993. 330:155-165.

-Toran-Allerand [CD](#), [Guan X](#), [MacLusky NJ](#), [Horvath TL](#), [Diano S](#), [Singh M](#), [Connolly ES Jr](#), [Nethrapalli IS](#), [Tinnikov AA](#). ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J. Neurosci.* 2002. 22:8391-8401.

-Tresserra, F., Grases, P.J. Histological features of the contralateral ovary in patients with unilateral ovarian cancer: a case control study. *Gynecol. Oncol.* 1998.71:437-441.

-Vierikko P, Kauppila A, Vihko R. Cytosol and nuclear estrogen and progestin receptors and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in non-diseased tissue and in benign and malignant tumors of the human ovary. *Int. J. Cancer.* 1983. 32:413-422.

-Willcocks D, Toppila M, Hudson CN, Tyler JP, Baird PJ, Eastman CJ. Estrogen and progesterone receptors in human ovarian tumors. *Gynecol. Oncol.* 1983 16:246-253.



-Yu Q, Niu Y, Liu N, Zhang JZ, Liu TJ, Zhang RJ, Wang SL, Ding XM, Xiao XQ.  
Expression of androgen receptor in breast cancer and its significance as  
aprognostic factor. *Ann. Oncol.* 2011. 22:1288-94.

## **APENDICE 1**

### Procesamiento histológico

Una vez recibidos los ovarios en formol, se lavan con PBS 5 veces durante 20 min. Se procede a la deshidratación con una serie de alcoholes graduales ascendentes de una hora cada uno. La muestra se aclara con dos cambios de xilol de 1 h c/u.

La preinclusión en parafina se hizo incubando dos veces en paraplast nuevo a 56°C por 1 h. Para la inclusión se coloca la muestra en un casete de plástico especial para este propósito sobre moldes de acero inoxidable. Los bloques se dejan enfriar al menos 30 minutos antes de desmoldarlos y se almacenan a 4°C.

### Tinción en Hematoxilina-Eosina

Las laminillas se desparafinaron en estufa a 56°C por al menos una hora; posteriormente se hicieron dos cambios de xilol, de 10 minutos c/u y se continuó con la rehidratación de los cortes bañando las laminillas 20 veces en alcoholes graduales descendentes (etanol absoluto, etanol al 96 y 20 baños de agua corriente); cada procedimiento se realiza por duplicado.

Las laminillas se tiñen 10 min en hematoxilina de Gill, luego se lavan con agua corriente y se viran con agua amoniacal ó solución Scott. Antes de teñir con eosina se dan 2 baños de agua corriente y luego seis baños de eosina. Se deshidrata en alcohol graduales ascendentes (del 96 y absoluto). Finalmente se aplican 20 baños de xilol y se montan con resina sintética diluida en xilol 60% en (Catálogo número 7987 SIGMA).

## **APENDICE 2**

Inmunofluorescencia.

Las muestras utilizadas para inmunofluorescencia se cortaron de 1-2 días antes de realizar la técnica. Las laminillas se desparafinaron toda la noche a 56°C, luego se pasaron a xilol 15 min y se rehidrataron con alcoholes graduales descendentes (etanol absoluto, etanol al 96 y agua corriente).

La recuperación antigénica se hizo con presión y temperatura en Decloakingchamber y la solución Diva Decloaker (DV2004MX, Biocare Medical) durante 12min.

Para la detección del receptor a andrógenos se utilizó como anticuerpo primario anti- AR de Sta. Cruz (sc-816) dilución 1:50 y para GPR30 el anticuerpo primario fue anti-GPR30 de ABCAM (ab39742) dilución 1:600 ambos cosechados en conejo; las laminillas se mantuvieron a 4°C toda la noche. Posteriormente el exceso de anticuerpo se lavó con PBS se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo durante 1h a temperatura ambiente. Se procedió a incubar con el segundo anticuerpo primario anti-citoqueratinas (AE1/AE3+8/18, Biocare Medical) durante TLN a 4°C, al día siguiente se realizaron lavados con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón. Los núcleos se contra tiñeron con DAPI y las laminillas fueron montadas con Vectashield (Vector Laboratorios, Inc. Burlingame, CA 94010).