



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TESIS**

**“EFECTO DE LA DECIDUALIZACIÓN *IN VITRO* SOBRE LA EXPRESIÓN DE  
LOS RECEPTORES MEMBRANALES A PROGESTERONA EN CÉLULAS  
ESTROMALES DE TEJIDO CON ENDOMETRIOSIS”**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**IXCHEL NAYELI GONZÁLEZ GARCÍA**



**CIUDAD DE MÉXICO**

**2019**



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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**     **Profesor:** María de los Ángeles Granados Silvestre

**VOCAL:**           **Profesor:** Marco Antonio Cerbón Cervantes

**SECRETARIO:**   **Profesor:** Edgar Ricardo Vázquez Martínez

**1er. SUPLENTE:**   **Profesor:** Alberto Ortega Vázquez

**2° SUPLENTE:**     **Profesor:** Ignacio Camacho Arroyo

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-  
Facultad de Química, UNAM

## **ASESOR DEL TEMA:**

Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez

## **SUPERVISOR TÉCNICO:**

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

## **SUSTENTANTE:**

Ixchel Nayeli González García

## **Agradecimientos**

El presente trabajo forma parte del proyecto “Impacto de la organización tridimensional del genoma en la patogénesis de la endometriosis” con número de registro (571) 3000-20109-01-571-17, el cual fue aprobado por los comités de Investigación, ética y bioseguridad del Instituto Nacional de Perinatología.

Agradecemos al proyecto de CONACyT “Estudio de la expresión y función de los receptores membranales a progesterona en células derivadas de astrocitomas humanos”, con clave de registro 250866, a cargo del Dr. Ignacio Camacho Arroyo por el financiamiento otorgado.

## Índice general

Índice de figuras .....	i
Índice de tablas.....	ii
Abreviaturas.....	iii
1. Resumen .....	1
2. Introducción.....	2
3. Aparato Reproductor Femenino.....	2
3.1. Endometrio.....	3
3.1.1. Ciclo Menstrual.....	4
3.1.1.1. Fase Proliferativa .....	4
3.1.1.2. Fase Secretora.....	5
3.1.1.3. Fase Menstrual.....	6
3.1.2. Decidualización.....	7
4. Endometriosis.....	8
4.1. Etiología .....	9
4.2. Diagnóstico de endometriosis .....	12
4.3. Tratamiento .....	12
5. Desregulación hormonal en endometriosis .....	14
5.1. Estrógenos.....	16
5.1.1. Acción de estrógenos en endometriosis .....	16
5.2. Progesterona.....	17
5.2.1. Receptor intracelular a progesterona.....	17
5.2.2. Receptor membranal de Progesterona.....	19
5.2.3. Acción de la progesterona en endometriosis.....	21
6. Planteamiento del problema .....	22
7. Hipótesis.....	22
8. Objetivos.....	22
8.1. Objetivo General .....	22
8.2. Objetivo Particular.....	22
9. Metodología.....	23
10. Resultados.....	27
10.1. Curvas temporales de expresión génica. ....	27

10.2. Evaluación de la expresión de los marcadores de decidualización y mPRs en pacientes con endometriosis. ....	29
11. Discusión .....	31
12. Conclusión .....	36
13. Referencias.....	37
Anexo I. Carta de Consentimiento Informado (Pacientes) .....	44
Anexo II. Carta de Consentimiento Informado (Controles) .....	47

## Índice de figuras

<b>Fig. 1.</b> Órganos reproductores femeninos internos .....	3
<b>Fig. 2.</b> Ciclo ovulatorio y ciclo endometrial .....	5
<b>Fig. 3.</b> Proceso de decidualización en células estromales endometriales .....	7
<b>Fig. 4.</b> Etapas de endometriosis .....	10
<b>Fig. 5.</b> Teorías de la endometriosis .....	11
<b>Fig. 6.</b> Mecanismo de acción de los estrógenos y la progesterona en células estromales de endometrio .....	15
<b>Fig. 7.</b> Mecanismo de acción clásico de la progesterona .....	18
<b>Fig. 8.</b> Mecanismo de acción no clásico de la progesterona a través de los mPRS.....	20
<b>Fig. 9.</b> Curva temporal de expresión de marcadores de decidualización en células estromales de endometrio sometidas a tratamientos con MPA (1µM), E2 (10nM) y AMPc (0.5mM).....	27
<b>Fig. 10.</b> Curva temporal de expresión de genes que codifican para mPRs en células estromales de endometrio sometidas a tratamientos con MPA (1µM), E2 (10nM) y AMPc (0.5mM).....	28
<b>Fig. 11.</b> Regulación de la expresión de marcadores de decidualización en células estromales endometriales de mujeres con y sin endometriosis .....	29
<b>Fig. 12.</b> Regulación de la expresión de los genes que codifican para mPRs en células estromales endometriales de mujeres con y sin endometriosis .....	30

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Criterios de selección para mujeres del grupo control .....	23
<b>Tabla 2.</b> Criterios de selección para pacientes con endometriosis .....	24
<b>Tabla 3.</b> Secuencias de primers utilizados para los experimentos de qPCR .....	26



## Abreviaturas

<b>AMPc</b>	8-Bromoadenosín monofosfato cíclico
<b>E2</b>	Estradiol
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Receptor a estrógenos alfa
<b>ER<math>\beta</math></b>	Receptor a estrógenos beta
<b>GnRH</b>	Hormona liberadora de gonadotropina
<b>HSD17B2</b>	17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa 2
<b>IGFBP1</b>	Proteína 1 de unión a factor de crecimiento similar a insulina
<b>MPA</b>	Medroxiprogesterona
<b>mPR</b>	Receptor membranal a progesterona
<b>PKA</b>	Proteína cinasa A
<b>PR</b>	Receptor intracelular a progesterona
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>RT-qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real acoplada a transcripción reversa

## 1. Resumen

La resistencia a la progesterona es una de las características moleculares principales en la patología de endometriosis. La progesterona ejerce sus efectos genómicos mediante su receptor intracelular, sin embargo, se ha descrito que también puede tener efectos rápidos y no genómicos a través de los receptores membranales (mPRs). Hay pocos estudios sobre la expresión de los mPRs en tejido de endometrio en mujeres sanas y con patologías, como la endometriosis. En este trabajo se realizó la estandarización de los cultivos primarios de células estromales de endometrio a partir de biopsias de endometrio, además de implementar el método de decidualización en dichas células. Se caracterizó la expresión del mPR $\alpha$ , mPR $\beta$  y mPR $\gamma$  en células estromales de endometrio sano y endometrio eutópico en un ambiente de decidualización, generado por estradiol (E2), medroxiprogesterona (MPA) y 8-Bromo-AMPc (AMPc). Se evaluó la expresión de los marcadores de decidualización prolactina (PRL) y proteína 1 de unión a factor de crecimiento similar a insulina (IGFBP1), y de los genes que codifican para mPR $\alpha$ , mPR $\beta$  y mPR $\gamma$ . Finalmente, se encontró una disminución en la expresión de mPR $\gamma$  en células estromales de endometrio sano bajo tratamiento hormonal, sin embargo, esta disminución no fue detectada en las células estromales de endometrio eutópico, lo que sugiere una respuesta diferencial al estradiol, la progesterona y el AMPc en las células estromales de pacientes con endometriosis.

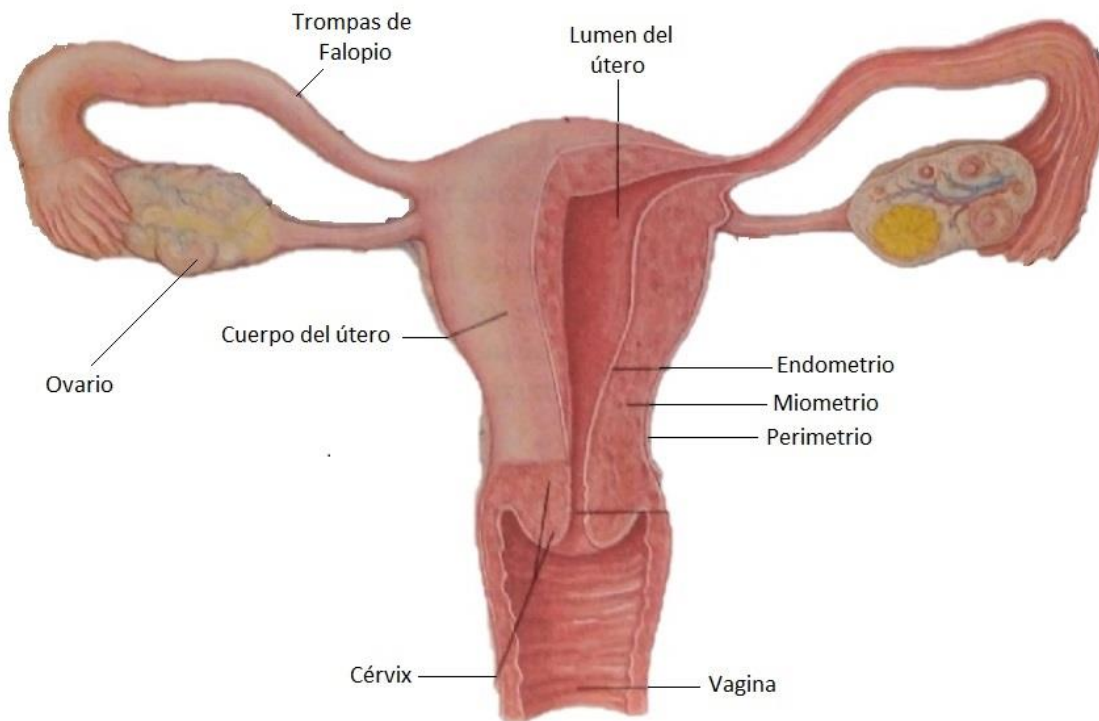
## 2. Introducción

La endometriosis es una enfermedad ginecológica cuya característica principal es el crecimiento de células estromales y glándulas epiteliales fuera de la cavidad uterina. Algunos de sus síntomas incluyen cólicos menstruales muy dolorosos, dolor pélvico, anovulación, infertilidad, entre otros. La endometriosis se presenta principalmente en mujeres en edad reproductiva, sin embargo, diversos estudios han demostrado presencia de tejido ectópico en niñas antes de tener menarca y en mujeres después de la menopausia. Los mecanismos moleculares por los cuales se desarrolla y prevalece la enfermedad aún se encuentran en estudio. Se ha demostrado que las hormonas sexuales ováricas, estrógenos y progesterona, desempeñan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. Las pacientes con endometriosis presentan resistencia a la progesterona, hormona encargada de contrarrestar los efectos proliferativos de los estrógenos e inducir la decidualización. La progesterona ejerce su acción principalmente a través de su receptor intracelular que actúa como factor de transcripción favoreciendo o disminuyendo la expresión de genes dependientes de progesterona. En años recientes se ha establecido que la progesterona activa vías de señalización, rápidas y no genómicas, a través de los receptores membranales de progesterona (mPR), los cuales se encuentran acoplados a proteínas G. Los niveles de expresión de los mPRs en el aparato reproductor femenino dependen del órgano o tejido en el que se encuentren expresados, ya que, pueden estar cumpliendo diferentes funciones. En la actualidad el estudio de la expresión de los mPRs en el endometrio y sus patologías es un campo abierto de estudio.

## 3. Aparato Reproductor Femenino

El sistema reproductor femenino se encuentra en la parte inferior del abdomen rodeado por los huesos de la pelvis y está compuesto por órganos internos y externos. Los órganos externos lo componen: el monte de Venus, clítoris, labios genitales, orificio uretral y vaginal; mientras que los órganos internos son: ovarios, trompas de Falopio, el útero y vagina (**Fig. 1**) (Marieb, 2008). Las funciones principales del aparato reproductor femenino son la producción de gametos

femeninos y proveer el ambiente necesario para el desarrollo del embrión después de la fecundación. Los ovarios producen los gametos femeninos, óvulos, y son órganos secretores de hormonas sexuales, estrógenos y progesterona, que tendrán actividad en otros órganos del aparato reproductor femenino, como el útero (Barret et al. 2010). El útero tiene como función recibir, retener y proveer el ambiente adecuado al óvulo fertilizado. La pared del útero está compuesta por tres capas: 1) la capa más externa, el perimetrio, 2) el miometrio formado principalmente por músculo liso y 3) el endometrio, capa interna, donde se llevará a cabo la implantación del óvulo fecundado (Marieb, 2008).



**Fig. 1. Órganos reproductores femeninos internos.** Vista externa e interna de los órganos que componen el aparato reproductor femenino. *Modificado de Marieb 2008.*

### 3.1. Endometrio

El endometrio es un tejido altamente vascularizado y se encuentra constituido por células epiteliales, estromales, del sistema inmune y glándulas. De forma general, el endometrio se divide en dos capas: la capa basal y la capa funcional. La capa basal, adyacente al miometrio, normalmente no presenta respuesta al estímulo hormonal, permanece constante durante el ciclo menstrual y constituye la base para

la regeneración cíclica del endometrio. La capa funcional es más activa en términos de división celular, se descama durante la fase menstrual y se regenera cada mes a lo largo del ciclo menstrual (Simón, 2009).

La funcionalidad, proliferación y diferenciación de las células epiteliales y estromales de la capa funcional es regulada por las hormonas esteroideas ováricas, progesterona y estrógenos, desencadenando cambios cíclicos que favorecen la receptividad del endometrio para la implantación embrionaria y contribuir al desarrollo de la gestación. De las tres capas que componen el útero, el endometrio posee mayor cantidad de receptores a estrógenos y progesterona (Bieber, 2010).

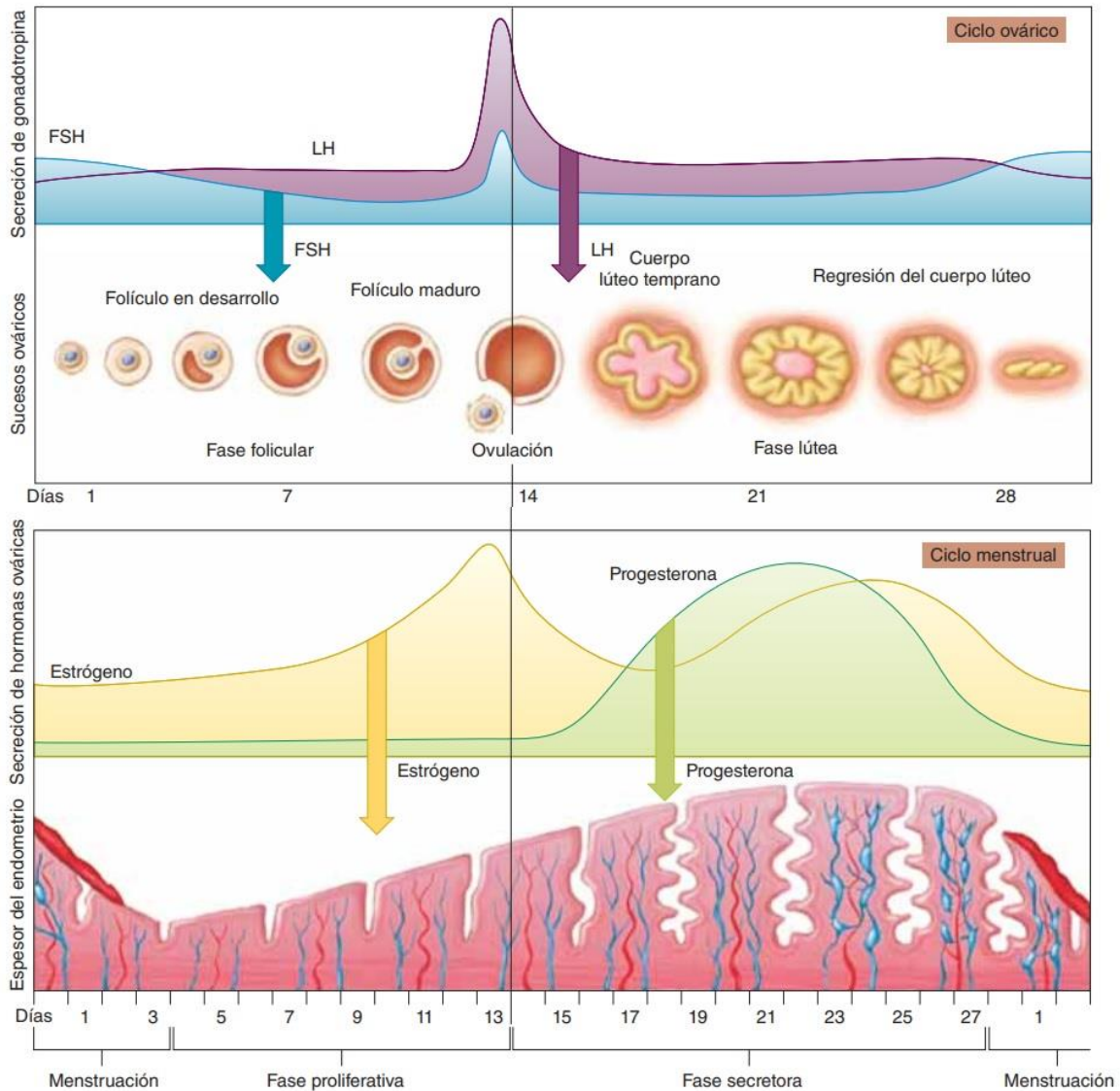
### 3.1.1. Ciclo Menstrual

El ciclo menstrual comprende una serie de cambios que se llevan a cabo en los ovarios y el endometrio de mujeres en edad reproductiva. El ciclo menstrual se presenta en respuesta al estímulo hormonal de estrógenos y progesterona con una duración promedio de 28 días, sin embargo, la duración del ciclo varía entre mujeres e incluso los ciclos pueden variar en una misma mujer (Ramírez y Lawrence, 2010). Dependiendo del órgano de estudio el ciclo menstrual se divide en diferentes fases, en los ovarios se producen la fase folicular, la ovulación y la fase luteinizante, las cuales son necesarias para la producción de un óvulo maduro que viajará hacia el útero para la fertilización (Marieb, 2008). En el endometrio, la acción hormonal deriva a cambios morfológicos que son divididos en tres fases: fase proliferativa (preovulatoria), fase secretora (postovulatoria) y fase menstrual (Esponera Sanz, 1997) **(Fig 2.)**.

#### 3.1.1.1. Fase Proliferativa

La fase proliferativa se presenta después del sangrado menstrual. Durante esta etapa el endometrio responde a los estímulos hormonales de los estrógenos desencadenando proliferación en células estromales, glándulas y células endoteliales de los vasos sanguíneos. Al inicio de esta fase las células estromales son pequeñas y densas, mientras que las glándulas comienzan a elongarse y

dividirse. El engrosamiento del endometrio es la característica principal de la fase proliferativa (Esponera Sanz, 1997).



**Fig. 2. Ciclo ovulatorio y ciclo endometrial.** Se indica el efecto que tienen las hormonas sexuales en sus diferentes órganos blanco, ovario y endometrio respectivamente. FSH, hormona folículo estimulante; LH, hormona luteinizante. Tomado de Fox 2014.

### 3.1.1.2. Fase Secretora

Una vez que se ha producido la ovulación, el endometrio tiene una rápida diferenciación a un fenotipo secretor. A diferencia de la fase proliferativa, durante la fase secretora se observan cambios morfológicos en los diferentes tipos celulares

que componen el endometrio. En los primeros días de la fase secretora, se producen principalmente cambios morfológicos glandulares, mientras que en la fase secretora media y avanzada los cambios predominantes se observan en las células estromales, en un proceso conocido como deciduación. Por otro lado, las glándulas presentan mayor actividad secretora y presentan modificaciones morfológicas (Esponera Sanz, 1997).

Los cambios morfológicos producidos por la acción de la progesterona comienzan entre 36 y 48 horas después de la ovulación. En la fase secretora avanzada, entre los días 23-28 del ciclo, se observan los cambios morfológicos predeciduales en células estromales (Mazor y Kurman, 2007). Estos cambios favorecen la implantación del blastocisto en el endometrio.

La mitosis celular, inducida durante la fase proliferativa, se inhibe por la elevación postovulatoria de la progesterona, la cual impide el inicio de la fase premitótica (G1-S). Además, la progesterona contrarresta las acciones del estradiol al favorecer la síntesis de la enzima  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa 2 (HSD17B2), cuya acción es convertir el estradiol en una forma menos potente, la estrona (Huhtinen et al. 2012).

#### 3.1.1.3. Fase Menstrual

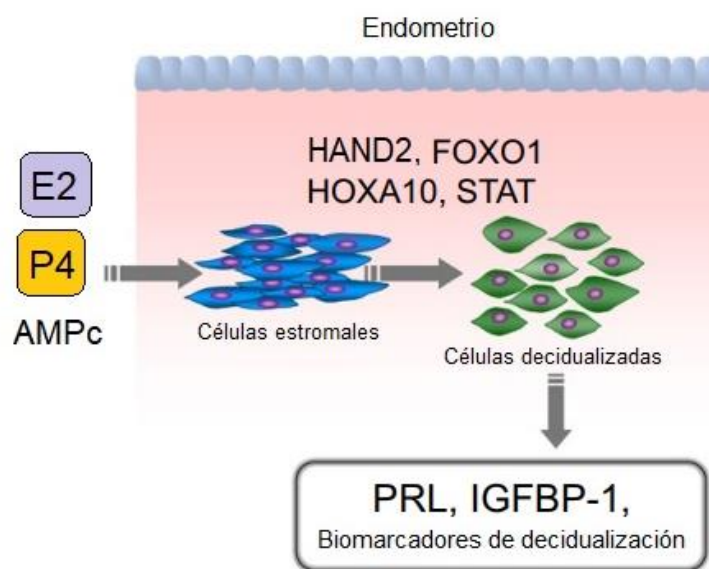
Alrededor del día 27 del ciclo menstrual, se considera que el endometrio ya es premenstrual, en el cual las células y glándulas comienzan a presentar apoptosis (Mazor y Kurman 2007). Posteriormente, se lleva a cabo la formación de trombos de fibrina en los vasos sanguíneos, que conllevan a la hemorragia debido a la extravasación de eritrocitos al estroma (Esponera Sanz, 1997).

La descamación de la capa funcional del endometrio es más marcada durante los dos primeros días de menstruación, el resto de los días de esta etapa predominan los procesos proliferativos a partir de la capa basal, originando un nuevo epitelio superficial alrededor del día 5 del ciclo menstrual (Esponera Sanz, 1997).

### 3.1.2. Decidualización

La decidualización comienza aproximadamente 6 días después de la ovulación y comprende cambios morfológicos y bioquímicos de las células estromales y glándulas epiteliales, hay una afluencia de células natural killer uterinas (uNK) especializadas y una remodelación de los vasos sanguíneos. En la decidualización, las células estromales pasan de una morfología elongada de tipo fibroblastoide a una forma circular de tipo epitelial (Okada et al. 2018). Este proceso ocurre en respuesta a las hormonas ováricas, progesterona y estradiol, siendo la progesterona el principal agente decidualizante (Gúrpede, E., 1997).

La secreción de proteínas como la prolactina (PRL) y la proteína 1 de unión a factor de crecimiento similar a insulina (IGFBP1) por las células estromales es un indicador de que se está llevando a cabo el proceso de decidualización (Ramathal et al. 2010). Se ha sugerido que estas proteínas están implicadas en la invasión y crecimiento de los trofoblastos, en la prevención del rechazo del embrión por parte del sistema inmunológico materno, en la regulación de las células uNK y fomentando la angiogénesis (Okada et al. 2018) **(Fig 3)**.



**Fig. 3 Proceso de decidualización en células estromales endometriales.** Las hormonas sexuales, estradiol (E2) y progesterona (P4) junto con AMPc desencadenan la decidualización. La P4 induce la expresión de diversos genes como *HAND2*, *FOXO1*, *HOXA10* y *STAT* que son necesarios para el cambio morfológico y bioquímico de células estromales, que expresan diversos factores de decidualización como PRL e IGFBP1. *HAND2*, heart and neural crest derivatives expressed transcript 2; *FOXO1*, forkhead box O1; *HOXA10*, homeobox A10; *STAT*, signal transducer and activators of transcription. *Modificado de Okada et al. 2018.*



En estudios *in vitro*, han demostrado que la deciduación puede inducirse en presencia de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) en células estromales de endometrio (Aghajanova et al. 2009; Klemmt et al. 2006). La deciduación inducida por AMPc se debe a la activación de la vía de señalización de la proteína cinasa A, sin embargo, la deciduación *in vitro* se alcanza de forma más rápida al añadir AMPc, progesterona y estradiol al cultivo (Gúrpide, E. 1997). No obstante existen diversos genes en las células estromales endometriales que se encuentran regulados específicamente por progesterona y no por AMPc (Okada et al. 2018), esto sugiere diferentes acciones por parte de ambas moléculas para desencadenar la deciduación adecuadamente.

La inducción a la deciduación en células estromales ha sido utilizada para un mejor entendimiento molecular de enfermedades que afectan en el endometrio, como la endometriosis, donde las hormonas desempeñan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (L. Aghajanova et al. 2009; Klemmt et al. 2006).

#### 4. Endometriosis

La endometriosis es un desorden ginecológico caracterizado por la presencia de glándulas endometriales y células estromales fuera de la cavidad uterina, principalmente, en peritoneo y ovarios, también puede encontrarse en septum recto-vaginal y rara vez en pericardio, pleura e incluso en cerebro (Giudice and Kao 2004). Los principales síntomas de la enfermedad son: dolor pélvico, dismenorrea, relaciones sexuales dolorosas e infertilidad (ASRM, 2013). Se ha reportado que la endometriosis afecta del 10-15% de mujeres en edad reproductiva y al 30% de mujeres que presentan infertilidad (Asghari et al. 2018). La endometriosis es similar a las enfermedades malignas en diversos aspectos, ya que, presenta crecimiento celular invasivo y progresivo, dependiente de hormonas y tendencia a desarrollar metástasis (Mehedintu et al. 2014).

La Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM, por sus siglas en inglés) ha clasificado a la endometriosis en 4 etapas dependiendo de la severidad, cantidad de lesiones, localización, profundidad y tamaño del tejido ectópico (tejido endometrial fuera del endometrio): etapa I (mínima), etapa II (leve), etapa III

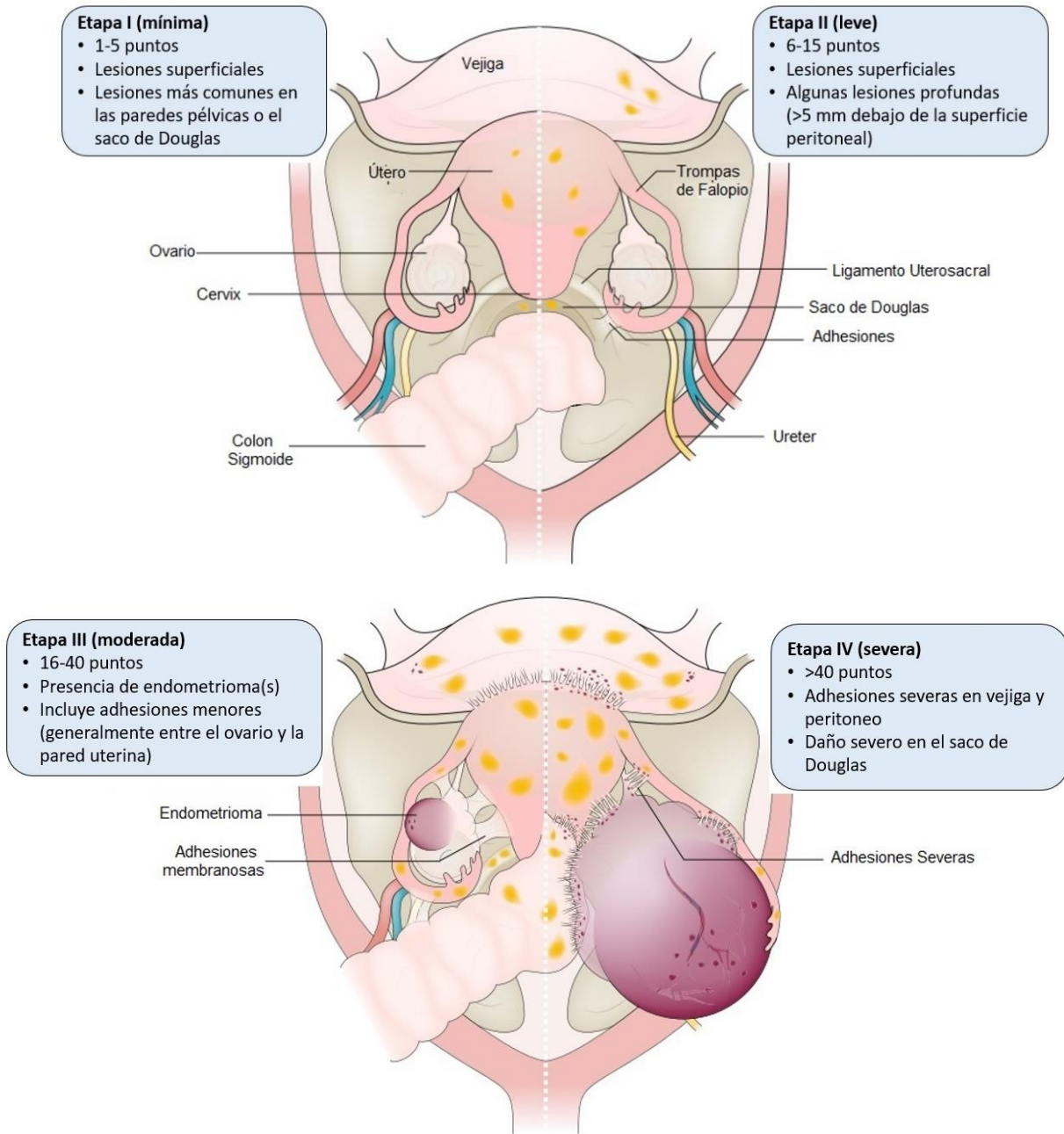
(moderada), etapa IV (severa). Sin embargo, esta clasificación no considera la presencia o gravedad de los síntomas que cada individuo pueda presentar en las diferentes etapas (ASRM, 2013) **(Fig 4)**.

En el ámbito clínico existen, principalmente, tres formas distintas de endometriosis: 1) Endometriosis peritoneal, que comprende implantes endometrióticos en la superficie del peritoneo pélvico y ovarios; 2) Endometriomas, quistes en el ovario revestidos por mucosa endometrial; y 3) Nódulos recto-vaginales, que consisten en una masa sólida, localizada entre el recto y la vagina, compuesta de tejido de endometrio en conjunto con tejido adiposo y fibromuscular (Kim, Kurita, and Bulun 2013).

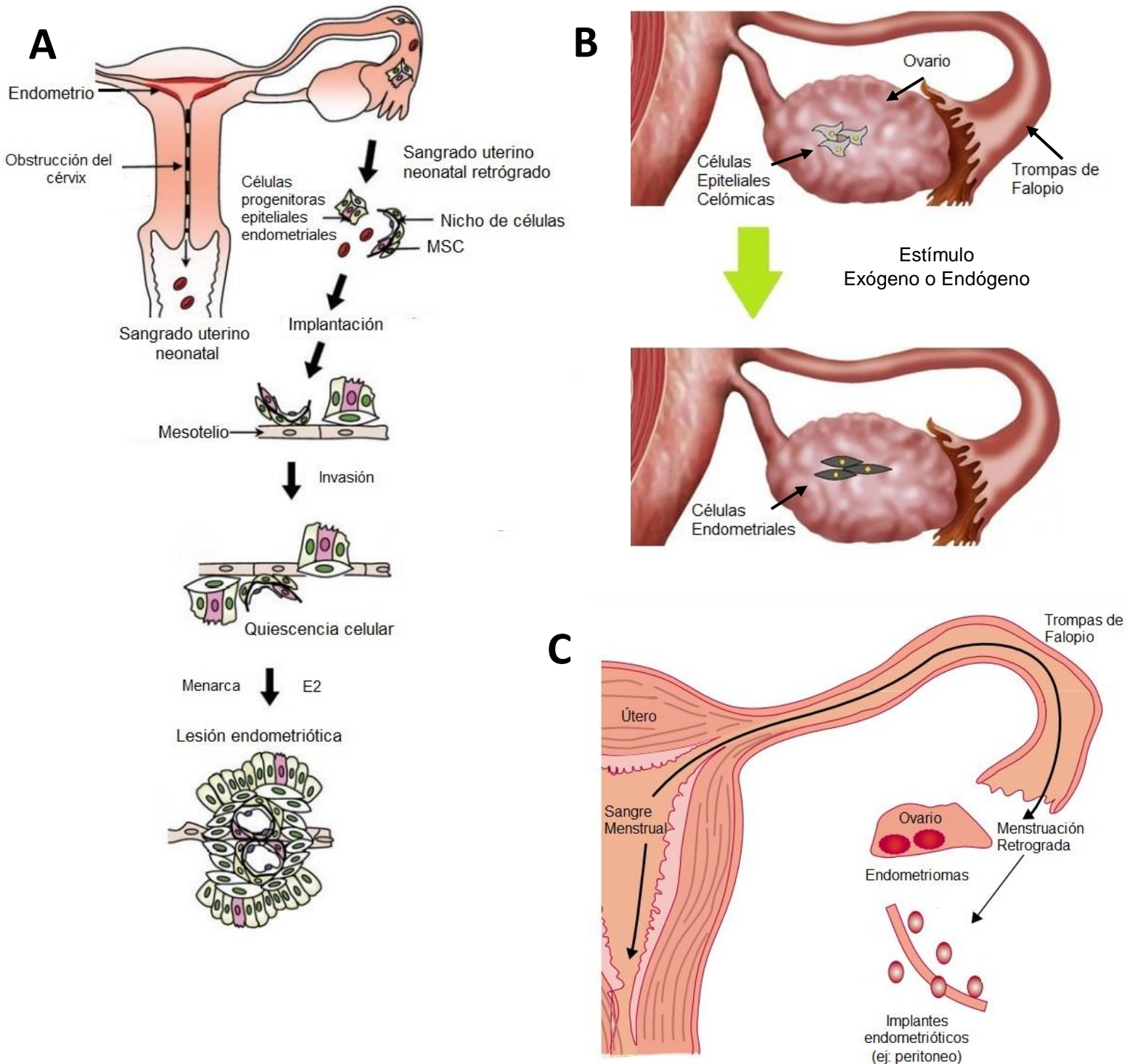
#### 4.1. Etiología

Existen diversas teorías que tratan de explicar el origen de la enfermedad, ya que, diversos factores se hallan implicados. Dentro de las principales teorías se encuentran: la menstruación retrógrada, metaplasia celómica y el sangrado uterino neonatal (Asghari et al. 2018). La menstruación retrógrada, propuesta por Sampson, establece que durante la menstruación existe reflujo del tejido endometrial a través de las trompas de Falopio hacia la cavidad abdominal, propiciando la implantación de células endometriales en órganos fuera del útero (Sampson, 1927). En la teoría de la metaplasia celómica se plantea la transformación del epitelio germinal de los ovarios a tejido endometrial. Esta teoría parte de que el epitelio celómico es el origen común de los ovarios, la teoría también se ha extendido al peritoneo, ya que al igual que los ovarios su epitelio deriva del epitelio celómico y posee potencial para la proliferación y diferenciación (Vinatier et al. 2001). Otro tipo de metaplasia se puede presentar debido a los conductos de Müller, predecesores del aparato reproductor femenino, remanentes de estas células pueden dar origen a células del endometrio (Vercellini et al. 2014). Finalmente, una teoría más reciente ha propuesto al sangrado uterino neonatal como posible etiología, ya que, se ha detectado sangrado uterino en bebés recién nacidos y endometriosis en niñas que aún no han presentado la menarca (Brosens et al. 2013). En esta teoría se sugiere la diseminación de las células troncales del endometrio como resultado de la

exposición al estímulo de hormonas sexuales al momento de retirar la placenta después del parto (Brosens et al. 2013; Gargett et al. 2014) (**Fig 5**).



**Fig. 4 Etapas de endometriosis.** Clasificación de la endometriosis siguiendo los parámetros postulados por la ASRM, a través de un sistema de puntos en los que se toman en cuenta severidad de la lesión, localización, profundidad y tamaño del tejido ectópico. *Modificado de Zondervan et al. 2018.*



**Fig 5. Teorías de la endometriosis.** A) Sangrado uterino neonatal. Esta teoría sugiere que existe sangrado uterino en neonatos debido a una obstrucción cervical, lo que favorece que células madres endometriales y células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés) presenten un trayecto retrógrado. El conjunto de células se adhiere al mesotelio neonatal donde invadirán y permanecerán quiescentes hasta recibir los estímulos del estradiol (E2) en la aparición de la menarca (Modificado de Gargett et al. 2014). B) Metaplasia celómica. En el epitelio ovárico pueden quedar remanentes del epitelio celómico, el cual da origen a varios órganos del aparato reproductor femenino. En esta teoría se ha postulado que el epitelio ovárico se transforma a tejido de endometrio por metaplasia. C) Menstruación retrógrada. Fragmentos del endometrio son conducidos a través de las trompas de Falopio, invadiendo la cavidad pélvica (Modificado de Giudice y Kao 2004).

## 4.2. Diagnóstico de endometriosis

El diagnóstico de la enfermedad es complicado, ya que, los signos y síntomas no son exclusivos de endometriosis. Se pueden tener sospechas de endometriosis por síntomas como cólicos menstruales intensos, problemas de fertilidad, dolor durante las relaciones sexuales, etc., sin embargo, muchas mujeres con endometriosis son asintomáticas y por ello únicamente se puede establecer el diagnóstico a través de la visualización quirúrgica de las lesiones (ASRM, 2013). La exploración de la pelvis durante un examen vaginal o rectal pueden ayudar a detectar indicios de endometriosis, mientras que la ecografía transvaginal también es adecuada para la detección de posibles endometriomas, lesiones profundas e implantes ectópicos en la vejiga (Vercellini et al. 2014). La intervención laparoscópica junto con una verificación histológica del tejido, son los procedimientos médicos más confiables para el diagnóstico de endometriosis, así como, para la determinación de la extensión y profundidad de los implantes ectópicos (ASRM, 2013).

En diversas circunstancias, el método quirúrgico se considera como última opción y para ello deben tomarse en cuenta los diversos signos y síntomas de la enfermedad junto con los resultados de los métodos no invasivos para el diagnóstico de endometriosis (ASRM, 2013).

## 4.3. Tratamiento

La elección del tratamiento para la endometriosis dependerá de cada paciente, tipo de endometriosis, signos, síntomas y plan de vida. Existen diversos tratamientos farmacológicos y quirúrgicos para el tratamiento de la enfermedad. El tratamiento farmacológico consiste principalmente en: anticonceptivos orales, agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y antiinflamatorios no esteroideos (ASRM, 2013). El tratamiento con fármacos no erradica la enfermedad, ni las lesiones ectópicas, y si el tratamiento llega a discontinuarse, los implantes responderán nuevamente al estímulo hormonal del ciclo menstrual propiciando la reaparición de los síntomas (Vercellini et al. 2014; Zondervan et al. 2018).

Los anticonceptivos orales inducen un ambiente hiper-progestogénico, favoreciendo la decidualización del endometrio eutópico (intra uterino) y ectópico, atrofiando y disminuyendo la capacidad proliferativa de dichos tejidos (Zondervan et al. 2018). Este tratamiento farmacológico es el de primera línea y es utilizado para disminuir el dolor y sangrado menstrual, además de que está asociado a un menor número de efectos adversos respecto a los otros tratamientos farmacológicos, favoreciendo su uso a largo plazo. (Vercellini et al. 2014; Zondervan et al. 2018). De manera general, el tratamiento con anticonceptivos orales consiste en una combinación de estrógenos y progestinas, en el que los estrógenos actúan inhibiendo la secreción de gonadotropina que a su vez inhibirá el proceso ovulatorio; por otro lado, el acetato de noretisterona es la progestina más utilizada, por ser parcialmente metabolizada a etinilestradiol, de esta forma se evita el uso de estrógenos y a su vez se limitan las consecuencias de la disminución de los niveles de estrógenos en el endometrio (Vercellini et al. 2014; Zondervan et al. 2018). Los dispositivos intrauterinos liberadores de levonorgestrel son otro tratamiento utilizado, actúan inhibiendo la menstruación en una de cada tres usuarias y disminuyen el sangrado menstrual en otro tercio (Vercellini et al. 2014).

Los agonistas de GnRH tienen un efecto supresor a largo plazo, disminuyendo los niveles de la hormona luteinizante y la hormona folículo estimulante produciendo un ambiente hipo-estrogénico, sin embargo, los efectos adversos asociados a estos medicamentos incluyen pérdida de la densidad ósea, bochornos, sudoración nocturna, etc. (Zondervan et al. 2018).

Los antiinflamatorios no esteroideos disminuyen de manera momentánea los síntomas de dolor y son utilizados principalmente para el tratamiento de la dismenorrea, a pesar de ello, se debe tener en cuenta otros tratamientos para el dolor provocado por endometriosis (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2014).

Uno de los principales síntomas a tratar en la endometriosis es la infertilidad. En general, los tratamientos farmacológicos no son recomendados en mujeres que intentan concebir, dado que, estos métodos interfieren con la ovulación y

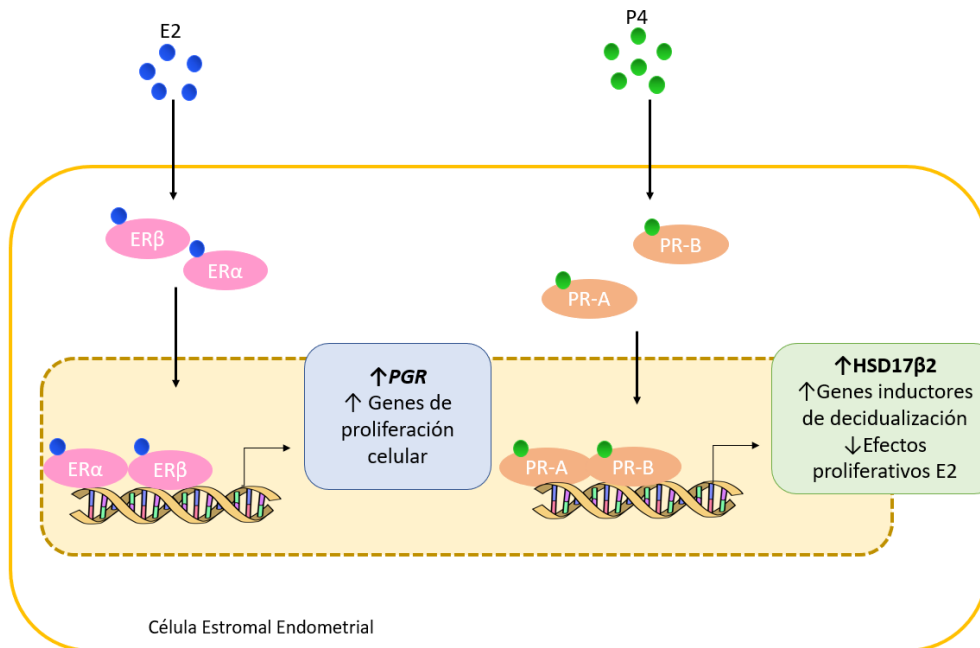
receptividad del endometrio. La cirugía mediante laparoscopia es recomendada para las pacientes con deseos de conseguir el embarazo. En este procedimiento, las lesiones ectópicas son removidas a través de vaporización con láser; si además hay presencia de endometrioma (lesión ectópica en ovarios), la pared del endometrioma es escindida. Este método ayuda al tratamiento del dolor y puede incrementar la posibilidad de tener un embarazo exitoso (Vercellini et al. 2014; Zondervan et al. 2018). Si la paciente no desea concebir después de la cirugía, se recomienda realizar un tratamiento farmacológico para el control de los síntomas (ASRM, 2013). La histerectomía (extirpación del útero) con extirpación de ovarios es un método eficaz para tratar definitivamente la endometriosis si la mujer ha decidido no tener hijos; si se conservan uno o ambos ovarios, hay mayor probabilidad de que los síntomas aparezcan de nuevo y se requiera una cirugía adicional (ASRM, 2013).

##### 5. Desregulación hormonal en endometriosis

El ciclo endometrial se encuentra regulado por el eje hormonal hipotálamo-hipófisis-ovario, donde las hormonas sexuales secretadas por el ovario regulan la proliferación celular y funcionalidad del endometrio, por ello alteraciones en dicho eje pueden aumentar el riesgo de desarrollar endometriosis (Upson et al. 2015).

Los estrógenos estimulan la proliferación celular e inducen la síntesis de los receptores de progesterona (PR) en el endometrio, la progesterona a su vez contrarresta los efectos de los estrógenos y regula a la baja la síntesis del PR y el receptor a estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) (Valbuena et al. 2009; Young, 2013). La regulación de los niveles de ambas hormonas es esencial para las funciones cíclicas del endometrio, la alteración de este equilibrio es un factor de riesgo para la patogénesis de diferentes problemas clínicos como la endometriosis (Young and Lessey 2010). En la endometriosis existe una alteración en la respuesta a progesterona y estradiol. El tejido ectópico de las pacientes con endometriosis es receptivo a estrógenos y por lo tanto se induce su proliferación, mientras que dicho tejido presenta resistencia las acciones de la progesterona, por lo que los efectos proliferativos de estrógenos no pueden ser contrarrestados. (Al-Sabbagh et al. 2012) **(Fig 6)**.





**Fig. 6. Mecanismo de acción de los estrógenos y la progesterona en células estromales de endometrio.**

El estradiol (E2) se une a sus receptores intracelulares (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ), éstos actúan como factores de transcripción para inducir la activación de diversos genes, entre ellos *PGR*, que codifica para los receptores intracelulares a progesterona (PR-A y PR-B). La progesterona (P4) se une a sus receptores intracelulares que de igual forma actúan como factores de transcripción. El PR regula diferentes acciones anti-proliferativas en el endometrio, como el metabolismo de E2 a una forma menos potente de estrógenos, la estrona, a través de la inducción de la expresión de la enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD17B2). El PR también favorece el cambio de las células estromales hacia la decidualización.

Estudios *in vitro* (Klemmt et al. 2006) han demostrado que las células estromales de tejido eutópico y ectópico de pacientes con endometriosis presentan una capacidad de diferenciación reducida hacia la decidualización al comparar con células estromales de mujeres sin endometriosis. Con estos hallazgos, se sugiere que existe una respuesta diferencial a los estímulos hormonales de las células estromales de pacientes con endometriosis respecto a las mujeres sin endometriosis.

El estudio del endometrio eutópico es de gran relevancia considerando que la infertilidad es una de las principales características de la enfermedad, la cual está asociada a una decidualización inadecuada (Lessey et al.2017). La progesterona es la hormona encargada del cambio morfológico y bioquímico del endometrio hacia la decidualización. Actualmente existe controversia sobre los niveles de expresión



de los receptores intracelulares de progesterona en endometrio eutópico, ya que la expresión de diversos genes blanco de la progesterona se encuentra alterada (McKinnon et al. 2018).

### 5.1. Estrógenos

Los estrógenos son hormonas esteroides de dieciocho carbonos, sintetizadas principalmente en los ovarios (Barret et al. 2010; Vrtačnik et al. 2014). Los estrógenos endógenos más importantes son el  $17\beta$ -estradiol (o estradiol), la estrona y el estriol (Barret et al. 2010). El endometrio es uno de los blancos principales de los estrógenos en el sistema reproductor femenino. Su función primordial en el endometrio es inducir la proliferación celular de glándulas y células estromales durante la fase proliferativa, favoreciendo la síntesis de factores de crecimiento (Valbuena et al. 2009; Vrtačnik et al. 2014). Los estrógenos también son importantes durante la implantación del embrión, dado que este evento solo se llevará a cabo cuando el endometrio haya tenido una exposición suficiente a estrógenos para aumentar la sensibilidad del tejido a progesterona (Young 2013). Los estrógenos ejercen su acción principalmente a través de la vía genómica en la que se encuentran involucrados los receptores  $ER\alpha$  y  $ER\beta$ , actuando como factores de transcripción; la vía no genómica incluye acciones rápidas de la hormona a través de la activación de vías de señalización ligando dependiente mediante segundos mensajeros (Hapangama et al. 2015). En endometrio sano  $ER\alpha$  y  $ER\beta$  están expresados, sin embargo, su expresión fluctúa dependiendo la fase del ciclo menstrual (Matsuzaki et al. 2001).

#### 5.1.1. Acción de estrógenos en endometriosis

El estradiol, estrógeno más potente, promueve el crecimiento celular, la actividad mitótica y estimula la formación de diversos organelos celulares, como ribosomas y mitocondrias, necesarios para el funcionamiento celular (Esponera Sanz 1997).

Los estrógenos son un ejemplo de hormonas desreguladas y con mayor impacto en la endometriosis. Los estrógenos son los encargados de la proliferación celular en el endometrio, sin embargo, las pacientes con endometriosis no pueden frenar los

efectos del estradiol sobre el endometrio. La falta de efectos anti proliferativos, puede estar dada por un ratio alterado en la expresión de ER $\alpha$  y ER $\beta$  (Kim et al. 2013). El aumento en la expresión de ER $\beta$  se debe, principalmente, a la hipometilación del promotor del gen que codifica para ER $\beta$  (Xue et al. 2007).

Por otro lado, la falta de respuesta a la progesterona en pacientes con endometriosis, impide el metabolismo de estradiol y por lo tanto sus efectos proliferativos no pueden ser contrarrestados (Cheng et al. 2008).

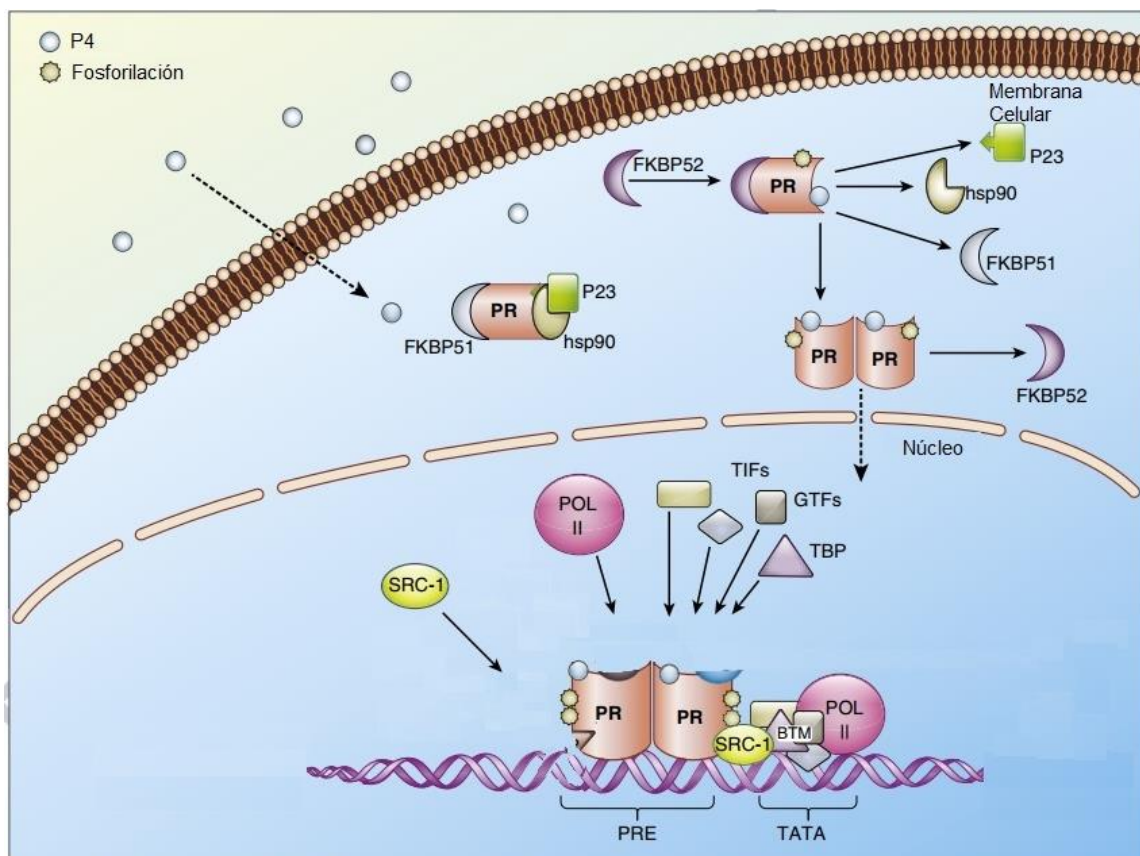
## 5.2. Progesterona

La progesterona es un catabolito natural de veintiún carbonos del colesterol, cuya acción desencadena diferentes respuestas en el aparato reproductor femenino y en otros tejidos, por ejemplo: sistema nervioso, huesos, tejido cardiovascular y sistema respiratorio (Al-Sabbagh et al. 2012). Esta hormona es sintetizada en gónadas, placenta, glándulas adrenales y sistema nervioso central (Camacho-Arroyo et al. 2017), sin embargo, el ovario es la principal glándula secretora de progesterona. Durante el ciclo menstrual, su síntesis y secreción son reguladas por la hormona luteinizante, mientras que en el embarazo dicha la regulación es mediada por la gonadotropina coriónica humana (Graham y Clarke 1997). En el aparato reproductor femenino sus funciones son diversas, pero se encuentra principalmente asociada a la implantación del embrión en el útero y mantenimiento del embarazo (Patel et al. 2017). En el endometrio, durante la fase post ovulatoria la progesterona lleva a cabo respuestas secuenciales y altamente coordinadas, comenzando con el arresto de la proliferación de células epiteliales dependiente de estrógenos, seguido de la inducción de la actividad secretora de las glándulas, diferenciación celular, reclutamiento de células inmunes y angiogénesis en un proceso conocido como decidualización (Al-Sabbagh et al. 2012).

### 5.2.1. Receptor intracelular a progesterona

El principal mecanismo de acción por el cual la progesterona ejerce su acción es el mecanismo genómico, a través del PR (Camacho-Arroyo et al. 2017). El PR pertenece a la superfamilia de receptores nucleares que actúan como factores de

transcripción para regular la expresión de diversos genes según el tipo y el ambiente celular (Kim et al. 2013). En ausencia de la hormona el PR se encuentra asociado a chaperonas y co-chaperonas, una vez que la progesterona ha entrado a la célula e interactúa con PR, se produce un cambio conformacional que promueve la fosforilación de PR y su disociación del complejo de chaperonas, dimerización y translocación nuclear (Camacho-Arroyo et al. 2017). Dentro del núcleo, el PR se une a los elementos de respuesta a progesterona en el DNA y recluta diversos co-reguladores que activarán o reprimirán la transcripción del gen blanco (Kim et al. 2013) (**Fig. 7**).



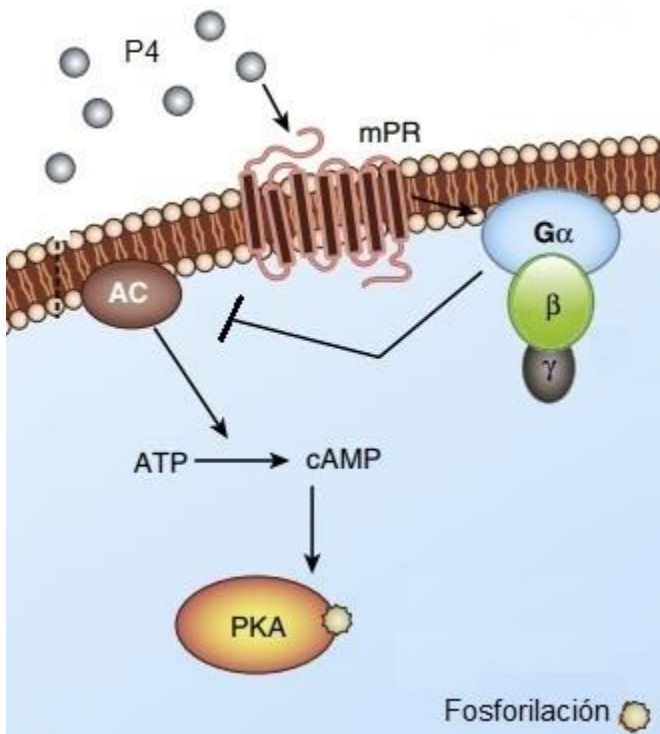
**Fig. 7. Mecanismo de acción clásico de la progesterona.** El mecanismo clásico comprende la acción del receptor nuclear (PR) que en ausencia de la hormona interactúa con la chaperona Hsp90 y las co-chaperonas FKBP51 y p23. Una vez que la hormona se internaliza en la célula e interactúa con su receptor, se produce un cambio conformacional que induce la fosforilación del receptor. El receptor se disocia de las chaperonas y co-chaperonas para dimerizarse y translocarse al núcleo. El receptor activo se une a secuencias específicas de progesterona (PRE) en los genes blanco para favorecer la transcripción de dichos genes a través de diferentes mecanismos, por ejemplo, el reclutamiento del co-activador SRC-1. TIF, transcription initiation factor; GTF, general transcription factor; TBP, TATA binding protein; PolII, RNA polimerasa II; BTM, basal transcription machinery. *Modificado de Camacho-Arroyo et. al. 2017*

El PR posee dos isoformas PR-A y PR-B, ambos receptores se encuentran codificados por el mismo gen, *PGR*, a través de promotores alternativos (Aghajanova et al. 2010; Camacho-Arroyo et al. 2017). La isoforma PR-B contiene 164 aminoácidos más respecto a PR-A, ya que contiene un dominio con función activadora (AF3) o segmento B en la región amino terminal, lo que le confiere una región activadora adicional que interactuará con otras regiones activadoras del receptor (Camacho-Arroyo et al. 2017). La expresión de PR es comúnmente inducida por estradiol a través de las secuencias conocidas como elementos de respuesta a estrógenos que se encuentran en la región regulatoria del *PGR* (Camacho-Arroyo et al. 2017). Ambas isoformas se expresan en las células estromales y epiteliales del endometrio.

### 5.2.2. Receptor membranal de Progesterona

Dentro de los mecanismos de acción no genómicos de progesterona, se encuentran aquellos que son activados por los receptores membranales a dicha hormona (mPRs). Los mPRs pertenecen a la clase II de la familia de receptores de progesterona y adipo Q (PAQR, por sus siglas en inglés) (Valadez-Cosmes et al. 2016). En vertebrados, los PAQR clase II están compuestos por cinco miembros: PAQR7 (mPR $\alpha$ ), PAQR8 (mPR $\beta$ ), PAQR5 (mPR $\gamma$ ), PAQR6 (mPR $\delta$ ) y PAQR9 (mPR $\epsilon$ ) (Smith et al. 2008). Aunque su estructura tridimensional aún se desconoce, a través de análisis bioinformáticos se ha establecido que los mPRs se encuentran formados por siete dominios transmembranales, un dominio amino-terminal extracelular y un dominio carboxilo-terminal intracelular (Valadez-Cosmes et al. 2016). Los mPRs en el aparato reproductor femenino presentan características similares a receptores acoplados a proteínas G inhibitorias. Cuando la progesterona se ha unido al receptor, se bloquea la actividad de la adenilato ciclasa, enzima que cataliza la conversión de ATP a AMPc, de esta forma el AMPc no podrá actuar como segundo mensajero y con ello las fosforilaciones mediadas por la proteína cinasa A (PKA) se encuentran inhibidas (Maller 2003). Al impedir la actividad de PKA, otras

vías de señalización son activadas, como las vías de las MAP (del inglés, Mitogen-Activated Protein) cinasas o proteína cinasas C (Camacho-Arroyo et al. 2017) (**Fig. 8**).



**Fig. 8 Mecanismo de acción no clásico de la progesterona a través de los mPRs.** Los mPRs, en endometrio, se encuentran acoplados a una proteína G. En el aparato reproductor femenino se ha postulado que se encuentran acoplados a proteínas  $G_i$ , inhibiendo la actividad de la enzima adenilato ciclasa (AC), encargada de la conversión de ATP a AMPc, que a su vez está implicada en la vía de proteína cinasa A (PKA). Modificado de Camacho-Arroyo et al. 2017.

La expresión de los mPRs varía dependiendo del tejido en el que se encuentren. En endometrio, la expresión de mPR $\alpha$ , mPR $\gamma$  y mPR $\epsilon$  depende de la fase del ciclo endometrial; mPR $\gamma$  y mPR $\epsilon$  presentan una mayor expresión en la fase proliferativa que en la fase secretora, mientras que mPR $\alpha$  se encuentra mayormente expresado en la fase secretora respecto a la proliferativa (Fernandes et al. 2005). En el miometrio de mujeres embarazadas predomina la isoforma mPR $\alpha$ , aunque mPR $\beta$  también se encuentra expresado. Los receptores mPR $\alpha$  y mPR $\beta$  se encuentran regulados por distintas hormonas en miometrio: mPR $\alpha$  es inducido por progesterona y estradiol, mientras que, mPR $\beta$  se encuentra únicamente regulado por estradiol (Karteris et al. 2006). En otros tejidos gestacionales, como placenta, mPR $\beta$  y mPR $\epsilon$  están altamente expresados y su expresión es inversa a la reportada del receptor intracelular PR (Fernandes et al. 2005). En otros mamíferos como ovejas, cerdos y ratas se han encontrados diversos niveles de expresión de las cinco subtipos en

otros órganos del aparato reproductor femenino como folículos ováricos, cuerpo lúteo y trompas de Falopio (Dressing et al. 2011).

### 5.2.3. Acción de la progesterona en endometriosis

Attia *et al.* demostraron que la expresión de la enzima HSD17B2 es dependiente de la progesterona a través de PR-B, estableciendo una relación entre las lesiones endometrióticas y la resistencia a la progesterona, considerando que el receptor PR-B se encuentra expresado en endometrio eutópico, pero no ectópico durante la fase secretora del ciclo menstrual (Attia et al. 2000). La función de la enzima HSD17B2 es oxidar al estradiol para convertirlo en su forma menos potente, estrona, disminuyendo así los niveles de proliferación celular en el endometrio (Cheng et al. 2008; Huhtinen et al. 2012). Este estudio dio pauta para establecer que existen diferencias en los niveles de expresión de los receptores intracelulares a progesterona y las consecuencias que pueden tener en las vías de señalización en las cuales se encuentran involucrados.

En otros estudios se ha demostrado que el endometrio eutópico presenta expresión anormal de genes regulados por hormonas esteroideas, por ejemplo, una sobreexpresión de genes involucrados en el ciclo celular y genes anti apoptóticos (Patel et al. 2017). La disparidad de la expresión génica, tomando en cuenta a controles sanos, se presenta sobre todo en la fase secretora, ya que, no existe una transición completa de la fase proliferativa a la secretora (Burney et al. 2007).

El término “resistencia a la progesterona” se ha utilizado para describir diversas patologías incluyendo la endometriosis. Esta descripción se ha acuñado al encontrar diversos genes desregulados dependientes de progesterona, así como una disminución de las acciones de la progesterona en el endometrio. El rol de la progesterona en el desarrollo y mantenimiento de la enfermedad aún se desconoce; existen diversos factores paradójicos en endometriosis en la síntesis y respuesta a la progesterona, al igual que la respuesta del tejido al tratamiento farmacológico con progestinas (Kim et al. 2013).

## 6. Planteamiento del problema

La endometriosis es una enfermedad ginecológica que afecta a diversas mujeres que se encuentran, principalmente, en edad reproductiva. Una de sus características moleculares más importantes es la falta de acción de la progesterona para contrarrestar los efectos proliferativos del estradiol. La progesterona ejerce su acción principalmente mediante PR, sin embargo, recientemente se ha descubierto que la progesterona también ejerce su acción a través de los mPRs. Poco se ha estudiado sobre la expresión de mPR en endometrio y en especial en endometriosis, por ello es importante su caracterización en células del endometrio al ser estimuladas con hormonas sexuales, para inducir la decidualización.

## 7. Hipótesis

El estímulo de decidualización en cultivos primarios de células estromales de endometrio de mujeres con endometriosis disminuirá la expresión de los receptores mPR $\alpha$  y mPR $\beta$ , e inducirá la expresión de mPR $\gamma$ .

## 8. Objetivos

### 8.1. Objetivo General

Caracterizar el patrón de expresión de los receptores membranales de progesterona bajo el efecto de la decidualización *in vitro* en cultivo primario de células estromales de endometrio de mujeres sanas y pacientes con endometriosis.

### 8.2. Objetivo Particular

-Evaluar los niveles de expresión de los genes que codifican IGFBP1 y PRL a partir de los cultivos primarios tratados con acetato de medroxiprogesterona (MPA), estradiol (E2) y 8-bromoadenosín monofosfato cíclico 3':5' (AMPc).

-Evaluar los niveles de expresión de los genes que codifican mPR $\alpha$ , mPR $\beta$  y mPR $\gamma$  en células estromales de endometrio de mujeres con y sin endometriosis.

## 9. Metodología

- Población de estudio

El grupo de estudio está conformado por pacientes mexicanas adscritas al Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” (INPer) diagnosticadas con endometriosis y mujeres sin diagnóstico de la enfermedad que acudan a histerectomía por razones descritas en los criterios de inclusión. Las pacientes participaron de forma voluntaria y fueron informadas del procedimiento a través del consentimiento informado de acuerdo con lo estipulado en el proyecto (571) 3000-20109-01-571-17 “Impacto de la organización tridimensional del genoma en la patogénesis de la endometriosis”, el cual fue aprobado por los comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad del INPer (**Anexo I y II**).

- Criterios de inclusión, exclusión y de eliminación

Los criterios de inclusión, exclusión y de eliminación para las mujeres participantes de este estudio, tanto para las mujeres control como pacientes con endometriosis, se encuentran en las **tablas 1 y 2** respectivamente.

**Tabla 1.** Criterios de selección para mujeres del grupo control.

<b>Criterios de Inclusión</b>	<b>Criterios de Exclusión</b>	<b>Criterios de Eliminación</b>
Pacientes sanas fértiles.	Mujeres con evidencia laparoscópica de endometriosis.	Pacientes que durante el estudio no deseen participar.
Mujeres que acudan a histerectomía por razones benignas.	Con tratamientos hormonales o agonistas a GnRH.	Pérdida de las condiciones adecuadas de las muestras.
Edad 18-45 años.	Mujeres con cáncer o que reciban quimioterapia o radio terapia.	Se haya realizado diagnóstico, durante el estudio, de alguna de las enfermedades de los criterios de exclusión.
Sin prueba laparoscópica de endometriosis.	Antecedentes de enfermedades autoinmunes.	Pacientes cuyo material genético no pudieron ser analizados por dificultades técnicas.
Sin evidencia clínica o paraclínica de endometriosis.	Trastornos neurológicos en tratamiento.	
Sin hábitos de fumar y consumo de alcohol.	Obesidad y/o diabetes.	



**Tabla 2.** Criterios de selección para pacientes con endometriosis.

<b>Criterios de Inclusión</b>	<b>Criterios de Exclusión</b>	<b>Criterios de Eliminación</b>
Mujeres con diagnóstico de endometriosis confirmado mediante laparoscopia y análisis histológico.	Pacientes con enfermedad pélvica inflamatoria aguda al momento de realizar la laparoscopia.	Pacientes que durante el estudio no deseen participar.
Candidatas a cirugía para la remoción de endometrioma ovárico.	Con tratamientos hormonales o de agonistas GnRH.	Pérdida de las condiciones adecuadas de las muestras.
Candidatas a cirugía para remoción de lesiones ectópicas en el área abdominal.	Mujeres con cáncer o que reciban quimioterapia o radio terapia.	Se haya realizado diagnóstico, durante el estudio, de alguna de las enfermedades de los criterios de exclusión.
Edad 18-45 años.	Antecedentes de enfermedades autoinmunes.	Pacientes cuyo material genético no pudieron ser analizados por dificultades - técnicas.
	Trastornos neurológicos en tratamiento. Obesidad y/o diabetes.	Pacientes en las que se haya descartado endometriosis por análisis histológico.

- Obtención de muestras de endometrio

Se tomaron muestras de 22 mujeres de las cuales n=7 fueron controles y n=15 con endometriosis. Las muestras se obtuvieron a partir de histerectomías o laparoscopías según fuera el caso, se recolectaron a temperatura ambiente y fueron transportadas en solución de Hanks hasta el laboratorio para continuar con el procedimiento a continuación descrito.

- Cultivo Celular Primario

El tejido obtenido se lavó con PBS (NaCl, 0.137M; KCl, 0.0027M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.01M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.0018; pH=7.4) estéril para separar el tejido endometrial de coágulos sanguíneos, posteriormente el tejido fue macerado e incubado con colagenasa (2mg/mL) y desoxirribonucleasa (0.1mg/mL) durante 2 h a 37°C. Posteriormente se centrifugó a 800 revoluciones por minuto, durante 5 minutos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en medio DMEM/F-12 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino, antibiótico/ antimicótico (anfotericina B, penicilina y estreptomycin, 1X) (Gibco) y aminoácidos

no esenciales (1X) (Gibco). Las glándulas epiteliales fueron removidas a través de filtración con una malla con poros de 40  $\mu\text{m}$  de diámetro. Finalmente, las células obtenidas fueron incubadas en el medio DMEM/F-12 enriquecido en una atmósfera con 5%  $\text{CO}_2$  a 37°C por 1 h, los restos celulares de células no adheridas y células sanguíneas fueron removidos con lavados de PBS.

- Protocolo de Decidualización

Al llegar al tercer pase, las células fueron sembradas en placas de 6 pozos, colocando 270,000 células en cada pozo. Los tratamientos hormonales se realizaron hasta que los pozos alcanzaron una confluencia del 80%. Para los tratamientos hormonales, las células se incubaron 48h en medio DMEM/F-12 sin rojo de fenol (Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino sin hormonas, antibiótico/antimicótico (1X) (Gibco) y aminoácidos no esenciales (1X) (Gibco) en una atmósfera con 5%  $\text{CO}_2$  a 37°C. Posteriormente se incubaron 16 h en el mismo medio sin suero fetal bovino para después comenzar con el tratamiento hormonal.

Para el tratamiento hormonal se utilizaron las siguientes condiciones: E2 (10nM), MPA (1 $\mu\text{M}$ ) y AMPc (0.5mM) (Michalski et al. 2018) a diferentes tiempos de incubación. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada tiempo. La respuesta celular ante el estímulo hormonal fue medida de acuerdo con la expresión de los biomarcadores de decidualización *PRL* e *IGFBP1*.

- Extracción de RNA total y RT-qPCR

La extracción del RNA se llevó a cabo mediante la técnica de Qiazol (QIAGEN) y mediante el kit "RNeasy Plus Mini Kit" (QIAGEN) siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras de RNA total fueron almacenadas en agua libre de RNAsas y cuantificadas por espectrofotometría. Una vez aislado el RNA total, la evaluación de la integridad de las muestras se realizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. En el análisis semicuantitativo de RT-qPCR, se utilizó 1  $\mu\text{g}$  de RNA total para generar cDNA utilizando la enzima M-MLV transcriptasa reversa (Invitrogen).

El ensayo de qPCR se llevó a cabo utilizando el sistema de detección SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) en el equipo StepOnePlus™ (Applied

Biosystems) siguiendo el siguiente programa: 95°C para la activación de la enzima y posteriormente durante 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por un 1 minuto. Los resultados fueron analizados mediante el método comparativo de doble delta  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ). Se utilizó el rRNA 18S como control de expresión constitutiva para la evaluación de la expresión de los genes de decidualización *PRL* e *IGFBP1*, así como para los genes problemas de los mPR $\alpha$ , mPR $\beta$  y mPR $\gamma$ . En la **tabla 3** se muestran los primers utilizados.

**Tabla 3.** Secuencias de primers utilizados para los experimentos de qPCR

Gen	Primer sentido 5'-3'	Primer antisentido 5'-3'
<b>18 S<sup>b</sup></b>	CGCGGTTCTATTTTGTGGT	AGTCGGCATCGTTTATGGTC
<b><i>PRL</i><sup>a</sup></b>	CATATTGCGATCCTGGAATGAGC	TCCTCAATCTCTACAGCTTTGGA
<b><i>IGFBP1</i><sup>a</sup></b>	TCCTTTGGGACGCCATCAGTAC	GATGTCTCCTGTGCCTTGGCTA
<b><i>PAQR 7</i><sup>b</sup></b>	AACTGTCAAGGGAGGTGCTG	ATTGCATCCAGGCCATAATC
<b><i>PAQR 8</i><sup>b</sup></b>	AGGACACAGCAAACAGGACA	GGCAACACAGGCAGGAATAA
<b><i>PAQR 5</i><sup>c</sup></b>	CAGCTGTTTCACGTGTGTGTGATCCTG	GGACAGAAGTATGGCTCCAGCTATCTGAG

<sup>a</sup> Tomado de (Jividen et al. 2014)

<sup>b</sup> Tomado de (Valadez-Cosmes et al. 2015)

<sup>c</sup> Tomado de (Sinreih et al. 2018)

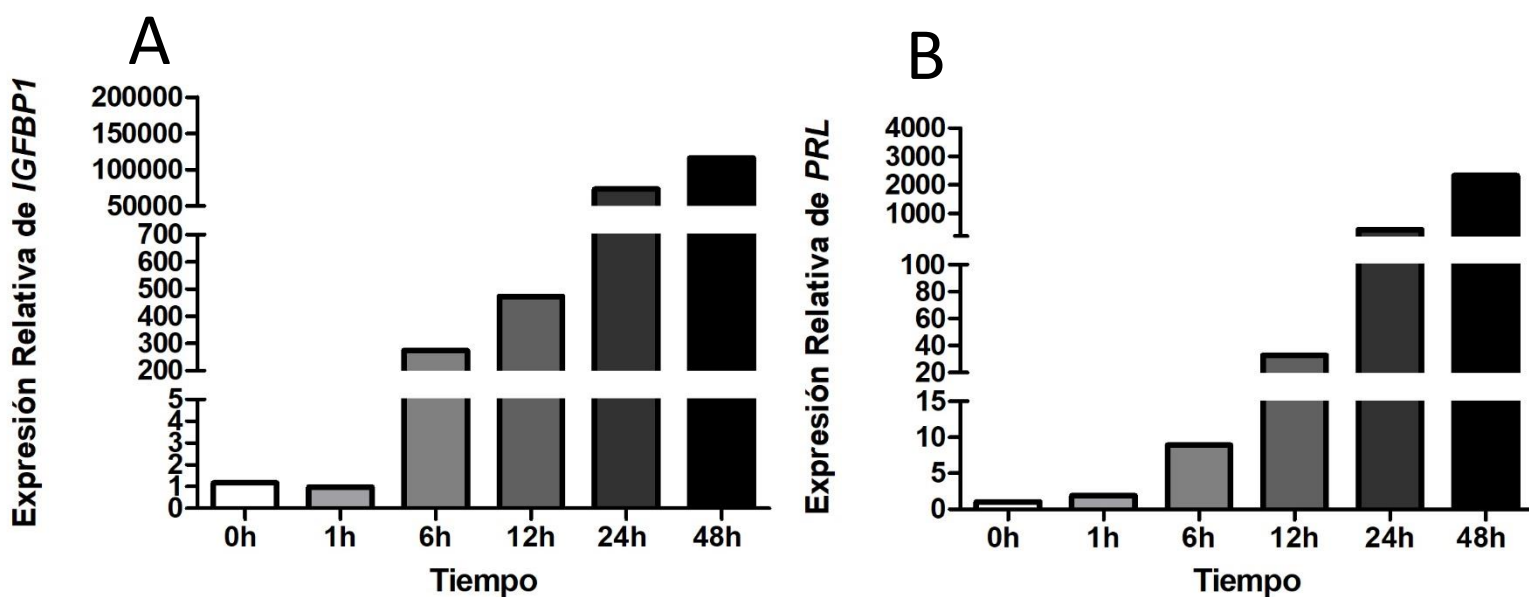
- Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados y graficados utilizando el software GraphPad Prism. Los resultados se muestran como el promedio de expresión relativa  $\pm$  el error estándar. La prueba estadística t de student fue utilizada para analizar los grupos de estudio, considerando un valor  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo.

## 10. Resultados

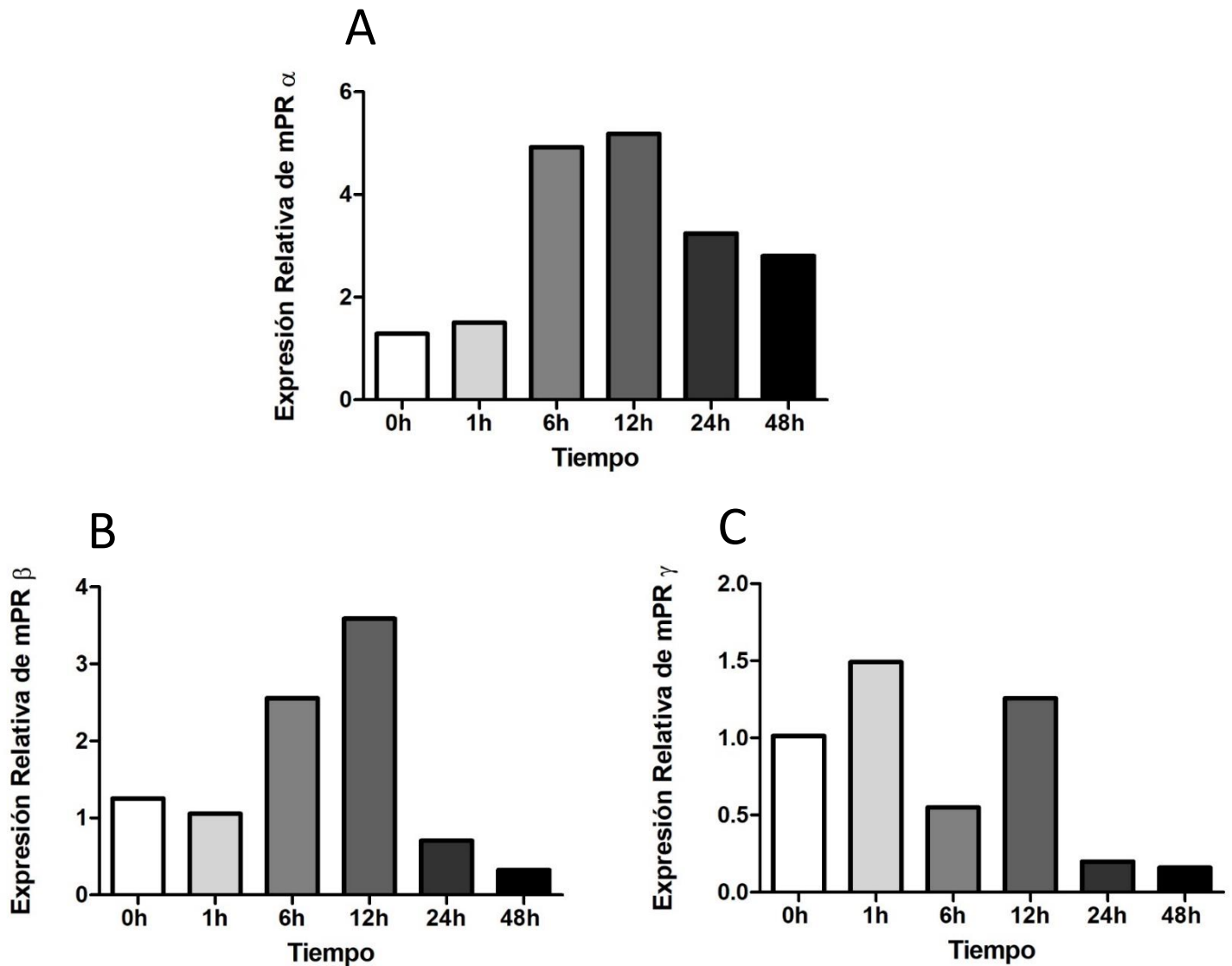
### 10.1. Curvas temporales de expresión génica.

Diferentes estudios han establecido la capacidad de células estromales endometriales para presentar un cambio morfológico bajo el estímulo hormonal de estradiol y progesterona. Por ello, se realizó la evaluación, por triplicado, de los marcadores clásicos de decidualización *PRL* e *IGFBP1*, a nivel de mRNA, en células estromales endometriales de una mujer sin endometriosis con tratamientos de MPA, E2 y AMPc a 1 h, 6 h, 12 h, 24 h y 48 h (**Fig. 9**). La expresión de ambos genes presentó un incremento directamente proporcional al tiempo de incubación con el tratamiento mencionado. A partir de las 6 h de tratamiento, se observa un aumento en la expresión de ambos marcadores, sin embargo, la inducción de *IGFBP1* a las 6 h es mayor respecto a *PRL*.



**Fig. 9. Curva temporal de expresión de marcadores de decidualización en células estromales de endometrio sometidas a tratamientos con MPA (1 $\mu$ M), E2 (10nM) y AMPc (0.5mM).** Se realizó la evaluación de la expresión de los genes *IGFBP1* (A) y *PRL* (B) a través de RT-qPCR, normalizados con la expresión del rRNA 18S, a diferentes tiempos de incubación con los tratamientos de decidualización. Los resultados presentados se realizaron por triplicado en un cultivo celular de una mujer control.

De igual forma, se evaluó la expresión de los genes que codifican para los receptores membranales mPR $\alpha$ , mPR $\beta$ , mPR $\gamma$  bajo las mismas condiciones (**Fig 10**). La expresión de cada uno de los receptores presenta diferentes fluctuaciones en los niveles de expresión respecto al tiempo. A las 6 h de tratamiento se observa un aumento en la expresión de mPR $\alpha$  y mPR $\beta$ , mientras que, la expresión de mPR $\gamma$  se encuentra disminuida.

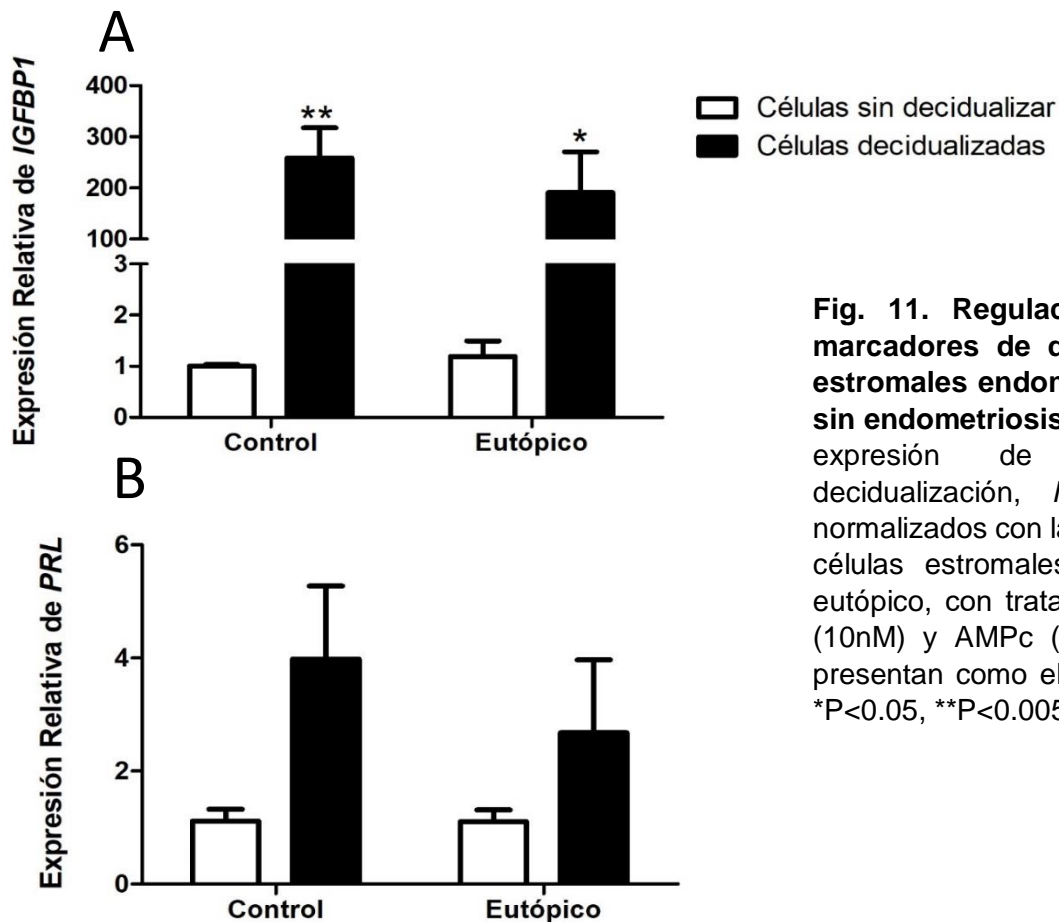


**Fig. 10.** Curva de temporal de expresión de genes que codifican para mPRs en células estromales de endometrio sometidas a tratamientos con MPA (1 $\mu$ M), E2 (10nM) y AMPc (0.5mM). Se muestran los resultados promedio obtenidos al evaluar, por triplicado, la expresión de mPR $\alpha$  (A), mPR $\beta$  (B) y mPR $\gamma$  (C) a través de RT-qPCR, normalizados con la expresión del rRNA 18S en células estromales endometriales de una mujer control.

## 10.2. Evaluación de la expresión de los marcadores de decidualización y mPRs en pacientes con endometriosis.

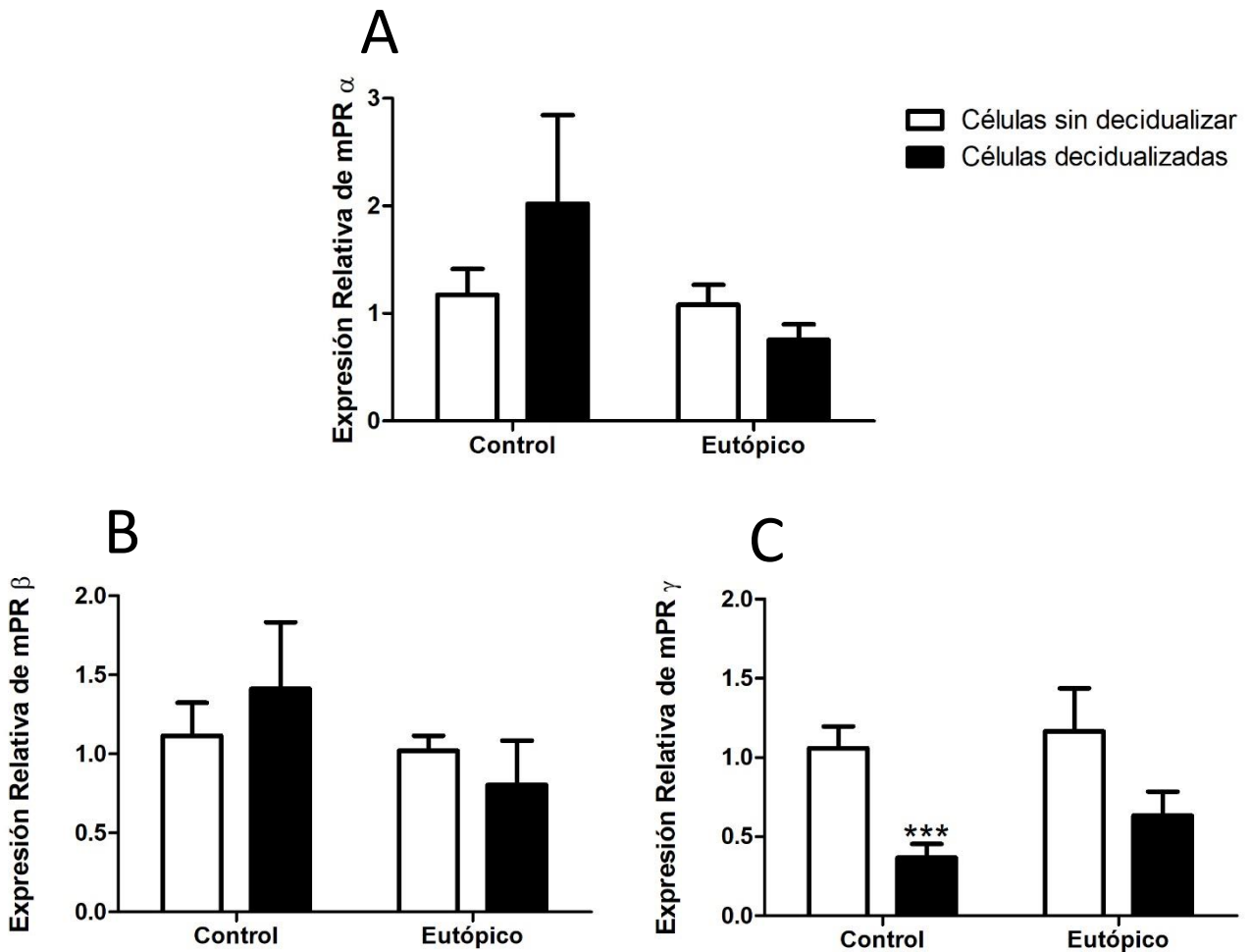
Durante el desarrollo del presente trabajo se recolectaron 22 muestras de endometrio, correspondientes a 7 muestras de mujeres sin endometriosis y 15 tejidos endometriales de pacientes con endometriosis, de las cuales únicamente fueron viables los cultivos obtenidos a partir de 4 muestras de mujeres control y 3 muestras de pacientes con endometriosis. De acuerdo con la curva de decidualización obtenida previamente, se evaluó la expresión de *PRL*, *IGFBP1*, mPR $\alpha$ , mPR $\beta$  y mPR $\gamma$  a las 6 h de tratamiento hormonal con MPA, E2 y AMPc.

En las células estromales bajo tratamiento de decidualización de mujeres control y pacientes con endometriosis se observa un aumento significativo en la inducción de la expresión del *IGFBP1* ( $p < 0.005$  y  $p < 0.05$ , respectivamente) al compararlas con las mismas células sin tratamiento (**Fig. 11A**). Por el contrario, la expresión de *PRL* no mostró cambios significativos en ninguna de las condiciones evaluadas (**Fig. 11B**).



**Fig. 11. Regulación de la expresión de marcadores de decidualización en células estromales endometriales de mujeres con y sin endometriosis.** Se muestran los niveles de expresión de los marcadores de decidualización, *IGFBP1* (A) y *PRL* (B), normalizados con la expresión de rRNA 18S, en células estromales de endometrio control y eutópico, con tratamientos de MPA (1 $\mu$ M), E2 (10nM) y AMPc (0.5mM). Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  error estándar. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ .

Respecto a los genes que codifican para los mPRs, se observó una disminución significativa ( $p < 0.001$ ) en la expresión de mPR $\gamma$  en las células de endometrio de controles bajo tratamiento con MPA, E2 y AMPc respecto al grupo sin tratamiento (**Fig. 12C**). La expresión de los receptores mPR $\alpha$  y mPR $\beta$  no mostraron cambios significativos en las condiciones evaluadas (**Fig. 12A y 12B**).



**Fig. 12. Regulación de la expresión de los genes que codifican para mPRs en células estromales endometriales de pacientes con y sin endometriosis.** Se muestra la expresión de los receptores membranales, normalizados con rRNA 18S, mPR $\alpha$  (A), mPR $\beta$  (B) y mPR $\gamma$  (C) en células estromales de endometrio control y eutópico de pacientes con endometriosis, al inducir decidualización con MPA (1 $\mu$ M), E2 (10nM) y AMPc (0.5mM). Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  error estándar. \*\*\* $P < 0.001$ .

## 11. Discusión

La endometriosis es una enfermedad que afecta del 10-15% de mujeres en edad reproductiva (Asghari et al. 2018), una de las características más importantes de la enfermedad es la alteración en la respuesta a hormonal sexuales, ya que los efectos proliferativos del estradiol no pueden ser contrarrestados por la progesterona. Las mujeres con endometriosis presentan una menor expresión del PR en endometrio eutópico y ectópico, por lo tanto, hay disminución en las acciones de la progesterona. En años recientes se ha establecido que la progesterona también puede actuar a través de mPRs, teniendo acciones rápidas y no genómicas. Pocos estudios se han realizado sobre la expresión de mPRs en el aparato reproductor femenino, en especial en endometrio o en sus patologías como la endometriosis. Por ello, en el presente trabajo se realizó la estandarización de los cultivos primarios de células estromales a partir de biopsias de endometrio y para validar el cultivo de células estromales de endometrio y simular el ambiente uterino de la fase secretora, se estableció la metodología de decidualización con los tres componentes MPA, AMPc y E2. Además, se realizó una primera aproximación al caracterizar los niveles de expresión de mPR $\alpha$ , mPR $\beta$  y mPR $\gamma$  en endometrio de mujeres con y sin endometriosis en un ambiente de decidualización, mostrando que mPR $\gamma$  se regula de manera diferencial en células estromales de endometrio de mujeres sin endometriosis respecto a células de pacientes con endometriosis.

Las células estromales de la capa funcional del endometrio responden al estímulo hormonal desarrollando un cambio morfológico y bioquímico, el cual se puede evidenciar con la inducción de la expresión de los genes *PRL* e *IGFBP1* (Okada et al. 2018; Ramathal et al. 2010; Gúrpide, E., 1997). Diversos estudios han reportado tiempos de exposición hormonal hasta por 15 días para tener un cambio completo de las células estromales a células decidualizadas (Aghajanova et al. 2009a; Aghajanova et al. 2009b; Brar et al. 2001; Klemmt et al. 2006). En este trabajo se observó que, a partir de las 6 h de inducción a la decidualización, se detecta un aumento en la expresión de *PRL* e *IGFBP1*, conservando su tendencia a aumentar en los tiempos subsecuentes. Se ha reportado que en presencia de los tres



componentes inductores de la deciduación, hay un aumento de expresión en los marcadores de deciduación a partir de las 24 h (Michalski et al. 2018). Con el resultado obtenido en el presente trabajo, se pone de manifiesto la posible expresión temprana de los marcadores de deciduación a partir de las 6 h de inducción. Sin embargo, se requiere realizar dicho ensayo en un número mayor de muestras para confirmar este hallazgo.

De igual forma se realizó una curva temporal, en una mujer control, para evaluar los niveles de expresión de los mPR $\alpha$ , mPR $\beta$  y mPR $\gamma$ . Se observa una regulación diferencial de los tres receptores ante los agentes deciduantes, en especial a las 6 h donde mPR $\alpha$  y mPR $\beta$  presentan un aumento en su expresión, mientras que, mPR $\gamma$  se encuentra disminuido. Las distintas respuestas encontradas ante progesterona, estradiol y AMPc pueden dar un indicio sobre las diferentes funciones que llevan a cabo en el endometrio. Al contrario de los marcadores de deciduación, la expresión de los mPRs puede regularse de manera específica por la progesterona, estradiol o el AMPc, además de que su regulación de la expresión puede verse influenciada por el tiempo de exposición a dichos componentes. A partir de las 24 h de tratamiento, la expresión de los tres receptores comienza a disminuir, probablemente por la disminución de disponibilidad de estrógenos, progesterona y AMPc en el medio de cultivo.

El presente trabajo es el primero en caracterizar la expresión de los mPRs en condiciones de deciduación en células estromales de endometrio tanto en mujeres sanas como en pacientes con endometriosis y se requiere un aumento en el número de muestras para obtener resultados concluyentes respecto al patrón de expresión de los mPRs en respuesta a las hormonas responsables de la deciduación.

De acuerdo con lo obtenido en la curva temporal de deciduación donde se observa un aumento en los marcadores de deciduación a partir de las 6 h, se tomó como referencia dicho tiempo para realizar los experimentos de deciduación en células estromales de endometrio sano y endometrio eutópico.

Se ha reportado que las células estromales de pacientes con endometriosis presentan resistencia a la deciduación debido a la disminución de respuesta a la progesterona y sus efectos (Aghajanova et al. 2009a; Aghajanova et al. 2009b; Klemmt et al. 2006). Al evaluar los marcadores de deciduación en células estromales de endometrio de pacientes y controles, bajo el efecto de MPA, E2 y AMPc, se observa un aumento en la expresión del gen *IGFBP1*. El aumento de la expresión en las células estromales deciduadas de las mujeres control es 1.35 veces mayor respecto a las células estromales endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis, lo que concuerda con lo reportado en la literatura (Aghajanova et al. 2009a). Los resultados sugieren que existe una respuesta similar a los agentes deciduantes en células estromales de endometrio control y eutópico, sin embargo, hay que tener en cuenta que la enfermedad es heterogénea y se reporta la respuesta promedio encontrada, lo que no asegura que todas las pacientes presenten la misma capacidad para deciduarse. Dentro de las muestras de endometrio de mujeres con endometriosis, una de las pacientes presenta una respuesta disminuida ( $\Delta\Delta C_T$  promedio=14.63) en la expresión del gen *IGFBP1* respecto al resto a las otras dos pacientes analizadas ( $\Delta\Delta C_T$  promedio=235.17), corroborando que no todas las pacientes presentan la misma respuesta al estímulo hormonal. Para asegurar una deciduación completa por parte de las células estromales debería evaluarse la expresión de genes, y sus productos funcionales, de los marcadores de deciduación, así como, genes y proteínas involucrados en etapas avanzadas de la deciduación, por ejemplo: HAND2, FOXO1, HOXA10 o STAT. De esta forma, se podría hacer una aproximación de la respuesta impar a la deciduación por parte de las mujeres con endometriosis respecto a mujeres sanas.

Actualmente, existen pocos estudios sobre la expresión de los mPRs en endometrio humano. Fernandes *et al.* demostraron que mPR $\alpha$  se sobre-expresa en el endometrio durante la fase secretora tardía, fase en la cual se llevan a cabo los cambios deciduales por efecto de la progesterona en las células estromales de dicho tejido, por otro lado, la expresión de mPR $\gamma$  se encuentra disminuida en la misma fase. En dicho estudio no se observó una diferencia significativa en la

expresión del receptor mPR $\beta$  bajo las mismas condiciones, aunque observaron una tendencia a aumentar su expresión. En el presente trabajo se indujo a la decidualización a las células estromales de endometrio, tal como sucede en la fase secretora tardía. Se observó una disminución en la expresión de mPR $\gamma$  en las células de endometrio control bajo tratamiento de decidualización, sin embargo, para las células de endometrio eutópico de pacientes con endometriosis esta diferencia no fue hallada, lo que sugiere una respuesta diferencial al estradiol, la progesterona y el AMPc en las células estromales de pacientes con endometriosis. Este resultado es similar a lo reportado en tejido de endometrio de mujeres sanas por Fernandes *et al.*, donde mPR $\gamma$  se encuentra regulado a la baja en la fase secretora tardía.

Los estudios que se han llevado a cabo sobre la expresión de los mPRs en el aparato reproductor femenino humano se encuentran enfocados principalmente a los subtipos mPR $\alpha$  y mPR $\beta$  por sus implicaciones en el parto y sus cambios en la expresión a lo largo del ciclo menstrual (Fernandes et al. 2005; Karteris et al. 2006). En trompas de Falopio, la expresión de mPR $\gamma$  se encuentra favorecida en células ciliares donde PR no se encuentra presente, sugiriendo una función celular de la progesterona independiente de PR y probablemente mediada por las vías no genómicas (Nutu et al. 2007). Aún no se ha demostrado qué tipo de proteína G está acoplada al mPR $\gamma$ , por lo tanto, existe la posibilidad de que se encuentre asociada a otro tipo de proteína G distinta a la que está acoplada con mPR $\alpha$  y mPR $\beta$ , y tener una acción inversa a la observada en dichos receptores. La regulación de la expresión de mPR $\gamma$  se ve influenciada por alguno de los agentes decidualizantes, probablemente por la progesterona, ya que en pacientes con endometriosis, donde hay resistencia a la progesterona, no se observa una disminución en su expresión ante el tratamiento hormonal. Al presentar una expresión diferencial respecto a mPR $\alpha$  y mPR $\beta$ , mPR $\gamma$  puede verse implicado en procesos y funciones diferentes en endometrio respecto a los otros dos mPRs estudiados. La disminución en la expresión de mPR $\gamma$  nos lleva a preguntarnos las implicaciones de su regulación de expresión, dado que puede ser necesaria su disminución para que la progesterona

pueda llevar a cabo sus acciones como agente deciduizante o incluso para favorecer la receptividad del endometrio durante la ventana de implantación, probablemente también pueda ejercer un papel importante en la resistencia a la progesterona en mujeres con endometriosis. Este es el primer trabajo en el que se evalúan la expresión de los mPRs en endometrio bajo condiciones de deciduización, es necesario continuar los estudios sobre los mPRs para elucidar sus posibles funciones en el endometrio.

En la expresión de los receptores mPR $\alpha$  y mPR $\beta$  se observa una tendencia a aumentar su expresión 1.72 y 1.26 veces más, respectivamente, en el tratamiento de deciduización al comparar con células estromales sin deciduizar de endometrio control; sin embargo, esta tendencia no es observada en células de pacientes con endometriosis. Posiblemente al aumentar el número de muestras a estudiar se podrá asociar una diferencia significativa en el aumento de expresión en ambos receptores.

## 12. Conclusión

En este trabajo se realizó la estandarización de cultivos primarios de células estromales endometriales a partir de biopsias de endometrio y se implementó el protocolo de decidualización utilizando MPA, E2 y AMPc. Las células estromales de endometrio eutópico y de mujeres control muestran una inducción de la expresión del gen *IGFBP1* al ser decidualizadas. En células de endometrio control se observó una disminución de la expresión del gen que codifica mPR $\gamma$  con los tratamientos de decidualización, esta disminución no es observada en células estromales de tejido eutópico de pacientes con endometriosis.

### 13. Referencias

- Aghajanova, L., Hamilton, A., Kwintkiewicz, J., Vo, K.C. Giudice, L. 2009a. "Steroidogenic Enzyme and Key Decidualization Marker Dysregulation in Endometrial Stromal Cells from Women with Versus Without Endometriosis." *Biology of Reproduction* 80(1):105–14.
- Aghajanova, L., Velarde, M., Giudice, L. 2009b. "The Progesterone Receptor Coactivator Hic-5 Is Involved in the Pathophysiology of Endometriosis." *Endocrinology* 150(8):3863–70.
- Aghajanova, L., Velarde, M., Giudice, L. 2010. "Altered Gene Expression Profiling in Endometrium: Evidence for Progesterone Resistance." *Seminars in Reproductive Medicine* 28(01):051–058.
- Al-Sabbagh, M., Lam, E.W., Brosens J.J. 2012. "Mechanisms of Endometrial Progesterone Resistance." *Molecular and Cellular Endocrinology* 358(2):208–15.
- American Society for Reproductive Medicine, ASRM. 2013. Endometriosis: Guía para pacientes.
- Asghari, S., Valizadeh, A., Aghebati-Maleki, L., Nouri, M., Yousefi, M. 2018. "Endometriosis: Perspective, Lights, and Shadows of Etiology." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 106:163–74.
- Attia, G.R., Zeitoun, K., Edwards, D., Johns, A., Carr, B.R., Bulun, S.E. 2000. "Progesterone Receptor Isoform A But Not B Is Expressed in Endometriosis." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85(8):2897–2902.
- Barret, KE., Boitano, S., Barman S.M., Brooks, H.L. 2010. Ganong, Fisiología Médica. McGraw Hill. 23a edición. México. Cap. 25 Gónadas: desarrollo y reproducción del aparato reproductor. pp 391-428.
- Bieber, EJ. 2010. Fisiología del útero y del cuello uterino. En: Baggish, M.S., Valle, F.R. y Guedj, H. eds, Histeroscopia: Perspectivas visuales sobre anatomía, fisiología e histopatología uterina. Cap. 3. 3a edición. AMOLCA. México; 27-42

Brar, A.K., Handwerger, S., Kessler, C.A., Aronow, B.J. 2001. "Gene Induction and Categorical Reprogramming during in Vitro Human Endometrial Fibroblast Decidualization." *Physiological Genomics* 7(2):135–48.

Brosens, I., Brosens, J., Benagiano, G. 2013. "Neonatal Uterine Bleeding as Antecedent of Pelvic Endometriosis." *Human Reproduction* 28(11):2893–97.

Burney, R.O., Talbi, S., Hamilton, A.E., Vo, K.C., Nyegaard, M., Nezhat, C.R., Lessey, B.A., Giudice, L. 2007. "Gene Expression Analysis of Endometrium Reveals Progesterone Resistance and Candidate Susceptibility Genes in Women with Endometriosis." *Endocrinology* 148(8):3814–26.

Camacho-Arroyo, I., Hansberg-Pastor, V., Vázquez-Martínez, E.R., Cerbón, M. 2017. Mechanism of Progesterone Action in the Brain. En: Pfaff, D.W y Joëls, M. eds, Hormones, Brain, and Behavior. Cap.3.10. 3a edición, Vol 3. Elsevier Inc.USA; 181–214.

Cheng, Y.H., Yin, P., Xue, Q., Yilmaz, B., Dawson M.I., Bulun, S.E. 2008. "Retinoic Acid (RA) Regulates 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Expression in Endometrium: Interaction of RA Receptors with Specificity Protein (SP) 1/SP3 for Estradiol Metabolism." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93(5):1915–23.

Dressing, G.E., Goldberg, J.E., Charles, N.J., Schwertfeger, K.L., Lange, C.A. 2011. "Membrane Progesterone Receptor Expression in Mammalian Tissues: A Review of Regulation and Physiological Implications." *Steroids* 76(1–2):11–17.

Esponera Sanz, J. 1997. Cambios morfológicos durante el ciclo menstrual. En: Botella Llusia, J. ed. El útero: fisiología y patología. Cap. 4. Editorial Díaz de Santos, S.A. Madrid, España; 53-62

Fernandes, M. S., Pierron, V., Michalovich, D., Astle, S., Thornton, S., Peltoketo, H., Lam, E.W., Gellersen, B., Huhtaniemi, I., Allen, J., Brosens, J.J. 2005. "Regulated Expression of Putative Membrane Progestin Receptor Homologues in Human Endometrium and Gestational Tissues." *The Journal of Endocrinology* 187(1):89–101.

Fox, S.I. 2014. Fisiología Humana. McGraw Hill. 13a edición. México. Cap. 20 Reproducción. pp 701-749.

Gargett, C. E., Schwab K.E., Brosens, J.J., Puttemans, P., Benagiano, G., Brosens, I. 2014. "Potential Role of Endometrial Stem/Progenitor Cells in the Pathogenesis of Early-Onset Endometriosis." *Molecular Human Reproduction* 20(7):591–98.

Giudice, L., Kao, L.C. 2004. "Endometriosis." *The Lancet* 364(9447):1789–99.

Graham, J.D., Clarke, C.L. 1997. "Physiological Action of Progesterone in Target Tissues." *Endocrine Reviews* 18(4):502–19.

Gúrpide, E. 1997. Estudios *in vitro* sobre el endometrio humano: mecanismos de decidualización del estroma endometrial En: Botella Llusia, J. ed. El útero: fisiología y patología. Cap. 9. Editorial Diaz de Santos, S.A. Madrid, España; 133-140

Hapangama, D. K., Kamal, A. M. and Bulmer, J. N. 2015. "Estrogen Receptor  $\beta$ : The Guardian of the Endometrium." *Human Reproduction Update* 21(2):174–93.

Huhtinen, K., Ståhle, M., Perheentupa, A., Poutanen, M. 2012. "Estrogen Biosynthesis and Signaling in Endometriosis." *Molecular and Cellular Endocrinology* 358(2):146–54.

Jividen, K., Movassagh, M.J., Jazaeri, A., Li, H. 2014. "Two Methods for Establishing Primary Human Endometrial Stromal Cells from Hysterectomy Specimens." *Journal of Visualized Experiments : JoVE* (87).

Karteris, E., Zervou, S., Pang, Y., Dong, J., Hillhouse, E.W., Randeva, H.S., Thomas, P. 2006. "Progesterone Signaling in Human Myometrium through Two Novel Membrane G Protein-Coupled Receptors: Potential Role in Functional Progesterone Withdrawal at Term." *Molecular Endocrinology* 20(7):1519–34.

Kim, J.J., Kurita, T., Bulun, S.E. 2013. "Progesterone Action in Endometrial Cancer, Endometriosis, Uterine Fibroids, and Breast Cancer." *Endocrine Reviews* 34(1):130–62.



Klemmt, P.A., Carver, J.G., Kennedy, S.H., Koninckx, P.R., Mardon, H.J. 2006. "Stromal Cells from Endometriotic Lesions and Endometrium from Women with Endometriosis Have Reduced Decidualization Capacity." *Fertility and Sterility* 85(3):564–72.

Lessey, B.A., Kim, J.J. 2017. "Endometrial Receptivity in the Eutopic Endometrium of Women with Endometriosis: It Is Affected, and Let Me Show You Why." *Fertility and Sterility* 108(1):19–27.

Maller, J. L. 2003. "Signal Transduction: Fishing at the Cell Surface." *Science* 300(5619):594–95.

Marieb, E.N. 2008. Anatomía y fisiología humana. Pearson Education. 9ª Ed. Madrid, España. Cap. 16 El Sistema Reproductor. pp 544-570

Matsuzaki, S., Murakami, T, Uehara, S., Canis, M., Sasano, H. and Okamura, K. 2001. "Expression of Estrogen Receptor Alpha and Beta in Peritoneal and Ovarian Endometriosis." *Fertility and Sterility* 75(6):1198–1205.

Mazor, M.T., Kurman, J.R. (2007) Diagnóstico de biopsias y legrados endometriales: un enfoque práctico. Ediciones Journal. Buenos Aires, Argentina. Cap. 2 El endometrio normal y el diagnóstico de esterilidad. pp 7-33

McKinnon, B., Mueller, M., Montgomery, G. 2018. "Progesterone Resistance in Endometriosis: An Acquired Property?" *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 29(8):535–48.

Mehedintu, C., Plotogea, M.N, Ionescu, S., Antonovici, M. 2014. "Endometriosis Still a Challenge." *Journal of Medicine and Life* 7(3):349–57.

Michalski, S.A., Chadchan, S.B., Jungheim, E.S., Kommagani, R. 2018. "Isolation of Human Endometrial Stromal Cells for *In Vitro* Decidualization." *Journal of Visualized Experiments* (139).

Nutu, M., Weijdegard, B., Thomas, P., Bergh, C., Thurin-Kjelberg, A., Pang, Y., Billing, H., Larsson, D.G. 2007. "Membrane Progesterone Receptor Gamma: Tissue Distribution and Expression in Ciliated Cells in the Fallopian Tube." *Molecular Reproduction and Development* 74(7):843–50.

Okada, H, Tsuzuki,T. Murata, H. 2018. "Decidualization of the Human Endometrium." *Reproductive Medicine and Biology* 17(3):220–27.

Patel, B. G., Rudnicki, M., Yu, J., Shu, Y., and Taylor, R.N. 2017. "Progesterone Resistance in Endometriosis: Origins, Consequences and Interventions." *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 96(6):623–32.

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. 2014. "Treatment of Pelvic Pain Associated with Endometriosis: A Committee Opinion." *Fertility and Sterility* 101(4):927–35.

Ramathal, C.Y., Bagchi, I.C., Taylor, R.N., Bagchi, M.K. 2010. "Endometrial Decidualization: Of Mice and Men." *Seminars in Reproductive Medicine* 28(1):17–26.

Ramírez, N.C., Lawrence, D. 2010. Histopatología del útero. En: Baggish, M.S., Valle, F.R. y Guedj, H. eds, Histeroscopia: Perspectivas visuales sobre anatomía, fisiología e histopatología uterina. Cap. 6. 3a edición. AMOLCA. México; 59-75

Sampson J. 1927 "Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity." *Obstetrics & Gynecology* 14:422-69.

Simón, C. (2009) El endometrio humano. En: Simón, C., Horcajadas, J.A., García-Velasco, J.A., Pellicer, A. eds. El Endometrio Humano: Desde la investigación a la clínica. Cap. 1. Editorial Médica Panamericana. España; 2-10

Sinreih, M., Knific, T., Thomas, P., Frković Grazio, S., Rižner, T.L. 2018. "Membrane Progesterone Receptors  $\beta$  and  $\gamma$  Have Potential as Prognostic Biomarkers of Endometrial Cancer." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 178:303–11.

Smith, J. L., Kupchak, B.R., Garitoanandia, I., Hoang, L.K., Maina, A.S., Regalla, L.M., Lyons, T.J. 2008. "Heterologous Expression of Human MPRalpha, MPRbeta and MPRgamma in Yeast Confirms Their Ability to Function as Membrane Progesterone Receptors." *Steroids* 73(11):1160–73.

Upton, K., Sathyanarayana, S., Scholes, D., Holt, V.L. 2015. "Early-Life Factors and Endometriosis Risk." *Fertility and Sterility* 104(4):964–971.e5.

Valadez-Cosmes, P., Germán-Castelán, L., González-Arenas, A., Velasco-Velázquez, M.A., Hansberg-Pastor, V., Camacho-Arroyo, I. 2015. "Expression and Hormonal Regulation of Membrane Progesterone Receptors in Human Astrocytoma Cells." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 154:176–85.

Valadez-Cosmes, P., Vázquez-Martínez, E.R., Cerbón, M., and Camacho-Arroyo, I. 2016. "Membrane Progesterone Receptors in Reproduction and Cancer." *Molecular and Cellular Endocrinology* 434:166–75.

Valbuena, D., Simón, C. (2009) Regulación Hormonal del endometrio humano. En: Simón, C., Horcajadas, J.A., García-Velasco, J.A., Pellicer, A. eds. *El Endometrio Humano: Desde la investigación a la clínica*. Cap. 2. Editorial Médica Panamericana. España; 11-18.

Vercellini, P., Viganò, P., Somigliana, E., Fedele, L. 2014. "Endometriosis: Pathogenesis and Treatment." *Nature Reviews Endocrinology* 10(5):261–75.

Vinatier, D., Orazi, G., Cosson, G., Dufour, P. 2001. "Theories of Endometriosis." *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 96(1):21–34.

Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., Marc, J. 2014. "The Many Faces of Estrogen Signaling." *Biochemia Medica* 24(3):329–42.

Xue, Q., Lin, Z., Cheng, Y.H., Huang, C.C., Marsh, E., Yin, P., Milad, M.P., Confino, E., Reierstad, S., Innes, J., Bulun, S.E. 2007. "Promoter Methylation Regulates Estrogen Receptor 2 in Human Endometrium and Endometriosis." *Biology of Reproduction* 77(4):681–87.

Young, S.L. 2013. "Oestrogen and Progesterone Action on Endometrium: A Translational Approach to Understanding Endometrial Receptivity." *Reproductive BioMedicine Online* 27(5):497–505.

Young, S.L., Lessey, B. 2010. "Progesterone Function in Human Endometrium: Clinical Perspectives." *Seminars in Reproductive Medicine* 28(01):005-016.

Zondervan, K.T., Becker, C.M., Koga, K., Misser, S.A., Taylor, R.N., Viganò, P 2018. "Endometriosis." *Nature Reviews Disease Primers* 4(1):9.

## Anexo I. Carta de Consentimiento Informado (Pacientes)

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA  
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES  
(INPerIER)



México, D.F. a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (PACIENTES)

#### TEXTO INFORMATIVO

Nombres de los proyectos de investigación: Estudio de la expresión y localización de los receptores membranales a progesterona en el endometrio de mujeres con endometriosis.

Número de registro: 3000-20209-03-16

Investigador responsable: Dr. Ignacio Camacho Arroyo, Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología, Tel. 55209900 Ext. 352, email: camachoarroyo@gmail.com

Impacto de la organización tridimensional del genoma en la patogénesis de la endometriosis.

Número de registro: 3000-20209-05-16

Investigador responsable: Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez, Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología, Tel. 55209900 Ext. 513 ó 346, email: vamer@comunidad.unam.mx

Presidente del Comité de ética en Investigación: Dr. Alejandro Martínez Juárez, Tel. 55209900 Ext. 316

Propósito: Por medio de la presente se le invita a participar en este estudio que se realizará en el Instituto Nacional de Perinatología con mujeres que padecen de endometriosis. La endometriosis ocurre cuando las células que forman el revestimiento del útero o matriz (llamado endometrio) crecen en otras áreas del cuerpo, por ejemplo en ovarios, intestinos, recto, vejiga, entre otros. Esto puede causar mucho dolor, sangrado abundante, sangrado anormal entre periodos menstruales y problemas para quedar embarazada (infertilidad). Hasta la fecha, no se conoce cuál es la causa de la endometriosis, sólo se sabe que las hormonas producidas por los ovarios (llamadas estrógenos y progesterona) son las responsables de su crecimiento y que existe un componente genético para su desarrollo.

La mayoría de las células que forman al cuerpo humano contienen una estructura llamada núcleo que contiene al material genético. Hoy en día existen estudios de laboratorio que permiten localizar una región específica del material genético en una parte específica del núcleo, similar a coordenadas geográficas en un mapa. Las células del endometrio tienen núcleo y su material genético también está distribuido de una forma específica. En este trabajo se va a estudiar la diferencia que existe entre la distribución del material genético en el núcleo de células obtenidas del endometrio de mujeres con endometriosis y la distribución del material genético en el núcleo de células obtenidas del endometrio de mujeres sanas. También se estudiará cuál es el efecto de la progesterona en la distribución del material genético en las células obtenidas del endometrio de pacientes con endometriosis y mujeres sanas. Además, existen moléculas llamadas receptores que reconocen de manera específica a la progesterona (llamados receptores membranales a progesterona), los cuales también se estudiarán en el presente proyecto. Esto nos permitirá investigar cuáles podrían ser las causas de la endometriosis y aportar información que en un futuro beneficie a las pacientes que sufren esta enfermedad.

*Selección de participantes:* A lo largo de este estudio se utilizarán las muestras de 30 pacientes con endometriosis. El motivo por el cual Usted fue seleccionada es debido a que tiene diagnóstico probable de endometriosis.

*Procedimiento:* Para realizar esta investigación, necesitamos su autorización para realizar una historia clínica completa y tomar un fragmento del recubrimiento del útero y un fragmento de la lesión producto de la endometriosis que le remuevan por indicaciones del médico. El fragmento tendrá que ser tomado, aproximadamente, entre los días 6 y 13 desde el comienzo de su ciclo menstrual. El procedimiento mediante el cual se obtendrán las muestras es el mismo que se realizará como parte de su tratamiento denominado laparoscopia, el cual consiste (bajo el efecto de la anestesia) en realizar una incisión pequeña debajo del ombligo para introducir una sonda con una videocámara para localizar la lesión producto de la endometriosis, y finalmente, extraer dicha lesión. Normalmente, durante este procedimiento no se toman muestras del útero, sin embargo, si usted acepta participar en esta investigación, se tomará una muestra del recubrimiento del útero mediante una cánula de Pipelle para su estudio.

**Riesgos:** los riesgos para la toma de muestra son los mismos que le indicaron para confirmar el diagnóstico o quitar el tejido enfermo, por lo que no hay riesgos adicionales a los que le indicó su médico. Este procedimiento no le generará dolor durante la toma debido a que se realizará mientras usted continúa con el efecto de la anestesia utilizada para la laparoscopia, una vez que pase el efecto de la anestesia, podría presentar molestias leves por la toma de la muestra del útero.

**Confidencialidad:** Los pacientes sólo serán identificados por una clave asignada durante la toma de muestra, por lo que sus datos y la información obtenida en este estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad. Cualquier información relacionada con usted y derivada del estudio será archivada de manera electrónica en una base de datos y de forma escrita en una bitácora de laboratorio destinada a este protocolo, en la Unidad de Investigación en Reproducción Humana, 3º y 4º piso de la Torre de Investigación. Únicamente el autor principal y los coautores participantes en este estudio tendrán acceso esta información. Los resultados derivados del estudio podrán ser presentados en congresos científicos, informes y/o publicaciones nacionales y/o internaciones.

**Participación voluntaria/retiro:** El aceptar participar en el estudio no implicará la administración de medicinas ni exámenes diferentes a los que recibe actualmente. La decisión de participar implica que tendrá un conocimiento completo de los riesgos y beneficios, los cuales se detallan en esta carta. Cualquier duda adicional, podrá ser aclarada por los investigadores responsables. Si no desea participar en el estudio, su tratamiento y atención no cambiará en calidad y podrá retirarse en el momento que lo desee. Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.

**Procedencia del Financiamiento:** El proyecto será financiado por el Instituto Nacional de Perinatología IER.

**Efectos secundarios:** Ninguno.

**Beneficios:** usted no obtendrá ningún beneficio al participar en el estudio. El presente protocolo sólo persigue fines académicos y de investigación.

**Atención médica:** Si usted decide participar o no en el estudio, no cambiará en nada la atención médica que recibirá en el instituto.

**Costos financieros:** deberá cubrir los costos de la laparoscopia de acuerdo a las indicaciones de su médico.

**Compensación:** Usted no recibirá ningún pago por participar en el estudio ni tampoco recibirá modificación en el pago de los servicios que reciba como parte de su atención médica).

**Destino de las muestras:** las muestras obtenidas consistirán en fragmentos de la lesión producto de la endometriosis y una pequeña parte del recubrimiento del útero. A partir de dichas muestras, se obtendrán RNA mensajero, proteína y DNA para realizar los estudios mencionados. Estos productos de las muestras se conservarán en el laboratorio de Genómica/Unidad de Investigación en Reproducción Humana del INPER y estarán a cargo del Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez. Una vez concluido el presente estudio y únicamente en el caso de los cortes histológicos, será posible recuperar alguna parte de la muestra a solicitud de la paciente. Las muestras se conservarán durante la vigencia de los presentes estudios (un periodo máximo de 3 años a partir del momento de la toma). Una vez concluido este periodo, las muestras se van a desechar en los envases adecuados y serán utilizadas únicamente para los dos proyectos mencionados en el presente documento.

## TEXTO DECLARATORIO

Es de mi conocimiento que los investigadores me han ofrecido aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta, que al momento de firmar el presente, no hubiese expresado o que surja durante el desarrollo de la investigación.

Se me ha informado la justificación y objetivos de la investigación, procedimientos que van a usarse y su propósito con un lenguaje entendible para mí, así como las responsabilidades que adquiero al participar, molestias y riesgos esperados, beneficios que pueden obtenerse, que si existieran gastos adicionales, derivados de este estudio de investigación, estos serán absueltos por el presupuesto de la misma, la seguridad de que no se me identificará y se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con mi privacidad de acuerdo a la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares, Capítulo I De los Principios de Protección de Datos Personales, Artículo 6, 7,8 y 9: Y aviso de privacidad institucional, libertad de retirar mi consentimiento en cualquier momento sin que por ello se creen prejuicios para continuar mi cuidado y tratamientos, que en caso de no aceptar participar en la investigación, no existirá ninguna penalidad, ni se verán afectados los derechos de atención médica presente o futura y la garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta o duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados a la investigación.

Autorizo que los resultados derivados del estudio sean presentados en congresos científicos, informes y/o publicaciones nacionales y/o internaciones y mi nombre no será revelado, ya que solo será identificado por una clave asignada durante la toma de muestra.

Por lo anterior [ **SI** ] ó [ **NO** ] estoy de acuerdo en participar en la investigación arriba señalada firmando la declaración de Consentimiento Informado

**Gracias por su Cooperación**

Yo \_\_\_\_\_  
Nombre y firma del participante

Para los fines que se estime conveniente, firmo la presente junto al investigador que me informó y dos testigos, conservando una copia de a) Consentimiento informado y b) Información proporcionada para obtener mi autorización.

Para dudas y aclaraciones sobre aspectos éticos de investigación deberá dirigirse con el Presidente del Comité de ética en investigación de este Instituto, con el Dr. Alejandro Martínez Juárez (Tel. 55209900 Ext. 316). Para dudas y aclaraciones sobre los proyectos de investigación deberá dirigirse con los investigadores responsables, con el Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez (Tel. 55209900, Ext. 513 ó 346) y con el Dr. Ignacio Camacho Arroyo (Tel. 55209900 Ext. 352).

Responsable o representante

Firma

---

Testigo

---

---

Nombre, dirección y relación

Firma

---

Testigo

---

---

Nombre, dirección y relación

Firma

---

Firma del investigador principal

---

**Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez**

Firma del investigador principal

---

**Dr. Ignacio Camacho Arroyo**

## Anexo II. Carta de Consentimiento Informado (Controles)

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA  
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES  
(INPerIER)



México, D.F. a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (CONTROLES)

#### TEXTO INFORMATIVO

Nombres de los proyectos de investigación: Estudio de la expresión y localización de los receptores membranales a progesterona en el endometrio de mujeres con endometriosis.

Número de registro: 3000-20209-03-16

Investigador responsable: Dr. Ignacio Camacho Arroyo, Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología, Tel. 55209900 Ext. 352, email: camachoarroyo@gmail.com

Impacto de la organización tridimensional del genoma en la patogénesis de la endometriosis.

Número de registro: 3000-20209-05-16

Investigador responsable: Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez, Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología, Tel. 55209900 Ext. 513 ó 346, email: vamer@comunidad.unam.mx

Presidente del Comité de ética en Investigación: Dr. Alejandro Martínez Juárez, Tel. 55209900 Ext. 316

Propósito: Por medio de la presente se le invita a participar en este estudio que se realizará en el Instituto Nacional de Perinatología con mujeres que padecen de endometriosis. La endometriosis ocurre cuando las células que forman el revestimiento del útero o matriz (llamado endometrio) crecen en otras áreas del cuerpo, por ejemplo en ovarios, intestinos, recto, vejiga, entre otros. Esto puede causar mucho dolor, sangrado abundante, sangrado anormal entre periodos menstruales y problemas para quedar embarazada (infertilidad). Hasta la fecha, no se conoce cuál es la causa de la endometriosis, sólo se sabe que las hormonas producidas por los ovarios (llamadas estrógenos y progesterona) son las responsables de su crecimiento y que existe un componente genético para su desarrollo.

La mayoría de las células que forman al cuerpo humano contienen una estructura llamada núcleo que contiene al material genético. Hoy en día existen estudios de laboratorio que permiten localizar una región específica del material genético en una parte específica del núcleo, similar a coordenadas geográficas en un mapa. Las células del endometrio tienen núcleo y su material genético también está distribuido de una forma específica. En este trabajo se va a estudiar la diferencia que existe entre la distribución del material genético en el núcleo de células obtenidas del endometrio de mujeres con endometriosis y la distribución del material genético en el núcleo de células obtenidas del endometrio de mujeres sanas. También se estudiará cuál es el efecto de la progesterona en la distribución del material genético en las células obtenidas del endometrio de pacientes con endometriosis y mujeres sanas. Además, existen moléculas llamadas receptores que reconocen de manera específica a la progesterona (llamados receptores membranales a progesterona), los cuales también se estudiarán en el presente proyecto. Esto nos permitirá investigar cuáles podrían ser las causas de la endometriosis y aportar información que en un futuro beneficie a las pacientes que sufren esta enfermedad.

*Selección de participantes:* A lo largo de este estudio se utilizarán las muestras de 30 pacientes sin endometriosis. El motivo por el cual Usted fue seleccionada es debido a que por indicaciones de su médico se le ha programado una cirugía conocida como histerectomía, la cual consiste en la extracción completa del útero.

*Procedimiento:* para realizar esta investigación, necesitamos su autorización para realizar una historia clínica completa, y tomar un fragmento del recubrimiento del útero que le remuevan por indicaciones del médico. El fragmento tendrá que ser tomado, aproximadamente, entre el día 6 y 13 desde el comienzo de su ciclo menstrual. El procedimiento mediante el cual se obtendrán las muestras es el mismo que se realizará como parte de la histerectomía y una vez que se haya extraído el útero se tomará un fragmento del mismo.

*Riesgos:* los riesgos asociados con los procedimientos de la investigación son los mismos que le indicaron para la histerectomía, por lo que no hay riesgos adicionales a los que le indicó su médico. La obtención de la muestra a partir del útero ya extraído no le generará



ningún riesgo adicional o mayores molestias que las asociadas al procedimiento que se le realizará como tratamiento indicado por su médico.

*Confidencialidad:* Los pacientes sólo serán identificados por una clave asignada durante la toma de muestra, por lo que sus datos y la información obtenida en este estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad. Cualquier información relacionada con usted y derivada del estudio será archivada de manera electrónica en una base de datos y de forma escrita en una bitácora de laboratorio destinada a este protocolo, en la Unidad de Investigación en Reproducción Humana, 3º y 4º piso de la Torre de Investigación. Únicamente el autor principal y los coautores participantes en este estudio tendrán acceso esta información. Los resultados derivados del estudio podrán ser presentados en congresos científicos, informes y/o publicaciones nacionales y/o internaciones.

*Participación voluntaria/retiro:* El aceptar participar en el estudio no implicará la administración de medicinas ni exámenes diferentes a los que recibe actualmente. La decisión de participar implica que tendrá un conocimiento completo de los riesgos y beneficios, los cuales se detallan en esta carta. Cualquier duda adicional, podrá ser aclarada por los investigadores responsables. Si no desea participar en el estudio, su tratamiento y atención no cambiará en calidad y podrá retirarse en el momento que lo desee. Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.

*Procedencia del Financiamiento:* El proyecto será financiado por el Instituto Nacional de Perinatología IER.

*Efectos secundarios:* Ninguno.

*Beneficios:* usted no obtendrá ningún beneficio al participar en el estudio. El presente protocolo sólo persigue fines académicos y de investigación.

*Atención médica:* Si usted decide participar o no en el estudio, no cambiará en nada la atención médica que recibirá en el instituto.

*Costos financieros:* deberá cubrir los costos de la histerectomía de acuerdo a las indicaciones de su médico.

*Compensación:* Usted no recibirá ningún pago por participar en el estudio ni tampoco recibirá modificación en el pago de los servicios que reciba como parte de su atención médica.

*Destino de las muestras:* las muestras obtenidas consistirán en fragmentos del recubrimiento del útero. A partir de dichas muestras, se obtendrán RNA mensajero, proteína y DNA para realizar los estudios mencionados. Estos productos de las muestras se conservarán en el laboratorio de Genómica/Unidad de Investigación en Reproducción Humana del INPER y estarán a cargo del Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez. Una vez concluido el presente estudio y únicamente en el caso de los cortes histológicos, será posible recuperar alguna parte de la muestra a solicitud de la paciente. Las muestras se conservarán durante la vigencia del presente estudio (un periodo máximo de 3 años a partir del momento de la toma). Una vez concluido este periodo, las muestras se van a desechar en los envases adecuados y serán utilizadas únicamente para los dos proyectos mencionados en el presente documento.

## TEXTO DECLARATORIO

Es de mi conocimiento que los investigadores me han ofrecido aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta, que al momento de firmar el presente, no hubiese expresado o que surja durante el desarrollo de la investigación.

Se me ha informado la justificación y objetivos de la investigación, procedimientos que van a usarse y su propósito con un lenguaje entendible para mí, así como las responsabilidades que adquiero al participar, molestias y riesgos esperados, beneficios que pueden obtenerse, que si existieran gastos adicionales, derivados de este estudio de investigación, estos serán absueltos por el presupuesto de la misma, la seguridad de que no se me identificará y se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con mi privacidad de acuerdo a la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares, Capítulo I De los Principios de Protección de Datos Personales, Artículo 6, 7,8 y 9: Y aviso de privacidad institucional, libertad de retirar mi consentimiento en cualquier momento sin que por ello se creen prejuicios para continuar mi cuidado y tratamientos, que en caso de no aceptar participar en la investigación, no existirá ninguna penalidad, ni se verán afectados los derechos de atención médica presente o futura y la garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta o duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados a la investigación.

Autorizo que los resultados derivados del estudio sean presentados en congresos científicos, informes y/o publicaciones nacionales y/o internaciones y mi nombre no será revelado, ya que solo será identificado por una clave asignada durante la toma de muestra.

Por lo anterior [ SI ] ó [ NO ] estoy de acuerdo en participar en la investigación arriba señalada firmando la declaración de Consentimiento Informado

**Gracias por su Cooperación**

Yo \_\_\_\_\_  
**Nombre y firma del participante**

Para los fines que se estime conveniente, firmo la presente junto al investigador que me informó y dos testigos, conservando una copia de a) Consentimiento informado y b) Información proporcionada para obtener mi autorización.

Para dudas y aclaraciones sobre aspectos éticos de investigación deberá dirigirse con el Presidente del Comité de ética en investigación de este Instituto, con el Dr. Alejandro Martínez Juárez (Tel. 55209900 Ext. 316). Para dudas y aclaraciones sobre el

proyecto de investigación deberá dirigirse con el investigador responsable, con el Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez (Tel. 5520900, Ext. 513 ó 346)

Responsable o representante

Firma

---

Testigo

---

Nombre, dirección y relación

Firma

---

Testigo

---

Nombre, dirección y relación

Firma

---

Firma del investigador principal

---

**Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez**

Firma del investigador principal

---

**Dr. Ignacio Camacho Arroyo**