



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

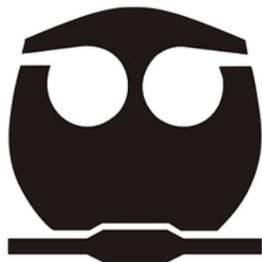
TESIS

**“EFECTO DE LA MEDROXIPROGESTERONA,
ESTRADIOL Y AMP_c EN LOS NIVELES DE LA
MARCA DE HISTONA H3K4me3 EN CULTIVOS
PRIMARIOS DE CÉLULAS ESTROMALES DE
PACIENTES CON ENDOMETRIOSIS”**

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

PRESENTA

ALEJANDRA MONSERRAT RETIS RESENDIZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURDADO ASIGNADOS:

PRESIDENTE: **Profesor:** LÓPEZ LÓPEZ MARISOL

VOCAL: **Profesor:** CAMACHO ARROYO IGNACIO

SECRETARIO: **Profesor:** VÁZQUEZ MARTÍNEZ EDGAR RICARDO

1er SUPLENTE: **Profesor:** ORTEGA VÁZQUEZ ALBERTO

2° SUPLENTE: **Profesor:** AXOSCO MARÍN JAVIER

SITIOS DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología
"Isidro Espinosa de los Reyes"-Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. en C. Edgar Ricardo Vázquez Martínez

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. En C. Elizabeth García Gómez

SUSTENTANTE:

Alejandra Monserrat Retis Resendiz

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 (517) 3000-20109-01-01-571-17, el cual fue aprobado por los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad del Instituto Nacional de Perinatología.

Agradecemos al apoyo del “FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN PARA LA EDUCACIÓN” de CONACyT por el financiamiento otorgado a dicho proyecto con clave A1-S-26749.

Agradecemos al Sistema Nacional de investigadores de CONACYT por apoyo otorgado como ayudante de investigador del Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

Índice

Índice de figuras	i
Índice de tablas	ii
1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. Sistema reproductor femenino	2
2.2. El endometrio	2
2.3. Ciclo menstrual	4
2.3.1. Cambios cíclicos en el endometrio	4
2.3.2. Acción de hormonas esteroides en el útero	6
2.3.3. Estrógenos.....	6
2.3.4. Progesterona	7
2.4. Decidualización	8
2.5. Endometriosis	12
2.5.1. Definición	12
2.5.2. Epidemiología	12
2.5.3. Patogénesis	12
2.5.4. Clasificación.....	15
2.5.5. Síntomas y signos.....	16
2.5.7. Tratamiento.....	16
2.6. Epigenética	18
2.6.1. Modificaciones post-traduccionales de histonas	19
2.6.2. Metilación de histonas	20
2.7. Trimetilación de la lisina 4 en la histona 3 (H3K4me3)	22
2.7.1. H3K4me3 metiltransferasas.....	22
2.7.2. H3K4me3 desmetilasa.....	23
2.7.3. Proteínas que se unen a H3K4me3	23
2.8. Relación de la decidualización con marcas epigenéticas	24
2.9. Epigenética en endometriosis	25
3. Planteamiento del problema	28
4. Hipótesis.....	28
5. Objetivos.....	28

5.1. Objetivo general	28
5.2. Objetivos particulares.....	29
6. Metodología	29
7. Resultados.....	34
8. Discusión	39
9. Conclusiones	45
10. Referencias	46
11. Cartas de consentimiento informado pacientes y controles	53

Índice de figuras

Figura 1. Sistema reproductor femenino.....	3
Figura 2. Ciclo de la ovulación y ciclo endometrial	6
Figura 3. Decidualización de las células del estroma endometrial (ESC) <i>in vivo e in vitro</i>	9
Figura 4. Decidualización del endometrio.....	11
Figura 5. Teoría de implantación.....	13
Figura 6. Clasificación de la endometriosis de acuerdo con la Sociedad Americana de Fertilidad	17
Figura 7. Modificaciones post-traduccionales de histonas.....	19
Figura 8. Metiltransferasas y desmetilasas de la H3K4.....	21
Figura 9. Posicionamiento de la RNA Pol II y H3K4me3 en el genoma.	22
Figura 10. Fotomicrografía de contraste de fases de cultivos primarios de células estromales endometriales humanas cultivadas (10x)	34
Figura 11. Curva de expresión de genes implicados en la decidualización de células estromales provenientes de una mujer control	35
Figura 12. Efecto de tratamientos hormonales en la expresión de genes implicados en la decidualización en células estromales provenientes de tejido eutópico de mujeres control y pacientes con endometriosis.....	36
Figura 13. Niveles de trimetilación de la H3K4 en células estromales provenientes de una mujer control en respuesta al tratamiento de decidualización.....	37
Figura 14. Efecto de la decidualización en los niveles de trimetilación de la H3K4 en células estromales decidualizadas provenientes de mujeres control y mujeres con endometriosis.....	38

Índice de tablas

Tabla 1. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación de los grupos de estudio.....30

Tabla 2. Secuencias de primers utilizados para los experimentos de RT-qPCR....32

1. Resumen

La endometriosis es una enfermedad que se caracteriza por la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina. Una de las características más importantes de la enfermedad es la decidualización deficiente de las células estromales, lo cual ha sido relacionado con la resistencia a la progesterona. Aunque actualmente no se conocen por completo los mecanismos moleculares que están involucrados en la patogénesis de la endometriosis, existen evidencias que sugieren que se trata de una enfermedad con un componente epigenético, en la cual existen alteraciones en los niveles de metilación de la lisina 4 en la histona 3 (H3K4me) en el endometrio de las pacientes con esta enfermedad respecto al endometrio de mujeres sin la enfermedad. Hasta el momento, no se ha determinado cuál es el efecto de las hormonas que inducen la decidualización en los niveles de trimetilación de la H3K4 (H3K4me3) en la endometriosis. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue analizar los niveles totales de la H3K4me3 en cultivos primarios de pacientes con endometriosis con respecto a los de mujeres control antes y después de un estímulo de decidualización *in vitro*.

En este estudio se caracterizaron los niveles totales de H3K4me3 en cultivos primarios de células estromales de endometrio (ESC) de pacientes con endometriosis y de mujeres control en un ambiente de decidualización con estradiol (E2), medroxiprogesterona (MPA) y 8-bromo-adenosín monofosfato cíclico (8-bromo- AMPc). Se validó que las ESC obtenidas responden al estímulo hormonal, a través de la inducción de la expresión de los genes que codifican a la prolactina (*PRL*) y la proteína 1 de unión a factor de crecimiento celular tipo insulina (*IGFBP-1*). Posteriormente, por medio de la técnica de Western blot, se observó que los niveles de la H3K4me3 en ESC decidualizadas de mujeres con endometriosis son mayores que en ESC decidualizadas de mujeres control, lo que nos sugiere que las ESC de mujeres con endometriosis responden de manera diferencial al tratamiento hormonal activando mecanismos epigenéticos que no se presentan en ESC provenientes de mujeres control.

2. Introducción

2.1. Sistema reproductor femenino

La función de los sistemas reproductores es la producción de descendencia. La mujer produce gametos femeninos, llamados óvulos; el óvulo es fecundado por el espermatozoide produciendo un cigoto, el cual es la primera célula de un nuevo individuo. Una vez que la fertilización ha tenido lugar, el útero proporciona un entorno protector en el que el blastocisto, más tarde llamado feto, se desarrolla hasta su nacimiento (Marieb, 2008).

Las hormonas sexuales, progesterona y estrógenos, juegan un papel fundamental tanto en el desarrollo y funcionamiento de los órganos reproductores como en el comportamiento e impulsos sexuales. Estas hormonas tienen influencia en el desarrollo y crecimiento de muchos tejidos y órganos del cuerpo, tal es el caso del endometrio, donde estas hormonas inducen cambios morfológicos que se requieren para una implantación exitosa y el embarazo (Marieb, 2008).

El sistema reproductor femenino se divide en externo e interno, de acuerdo con la ubicación de sus órganos. Los órganos externos desempeñan una función importante durante el acto sexual y coito, los cuales son: labios mayores, labios menores y clítoris. Los ovarios, trompas de Falopio, útero y vagina forman parte de los órganos internos, los cuales se alojan en la pelvis y están relacionados con la fecundación y gestación (Figura 1) (Barone, 2007).

2.2. El endometrio

El útero se divide anatómicamente en cuerpo y cérvix. El cuerpo del útero está formado por tres capas: perimetrio, miometrio y endometrio (Figura 1) (Padabiri *et al.*, 2015). El endometrio es una mucosa que cubre la cavidad uterina. Es un tejido dinámico que sufre una serie de modificaciones cíclicas reguladas por las hormonas esteroides circulantes (Simon *et al.*, 2009). Las dos principales funciones del endometrio son proveer un sitio inmunoprivilegiado para la implantación del

blastocisto y proporcionar un entorno de nutrientes para el feto durante el embarazo (Strauss et al., 2014).

Morfológicamente, el endometrio se divide en dos capas: 1) *funcionalis*, la cual se transforma y regenera cada ciclo menstrual y 2) *basalis*, la cual permanece y constituye la base para regenerar cíclicamente al endometrio (Simon et al., 2009).

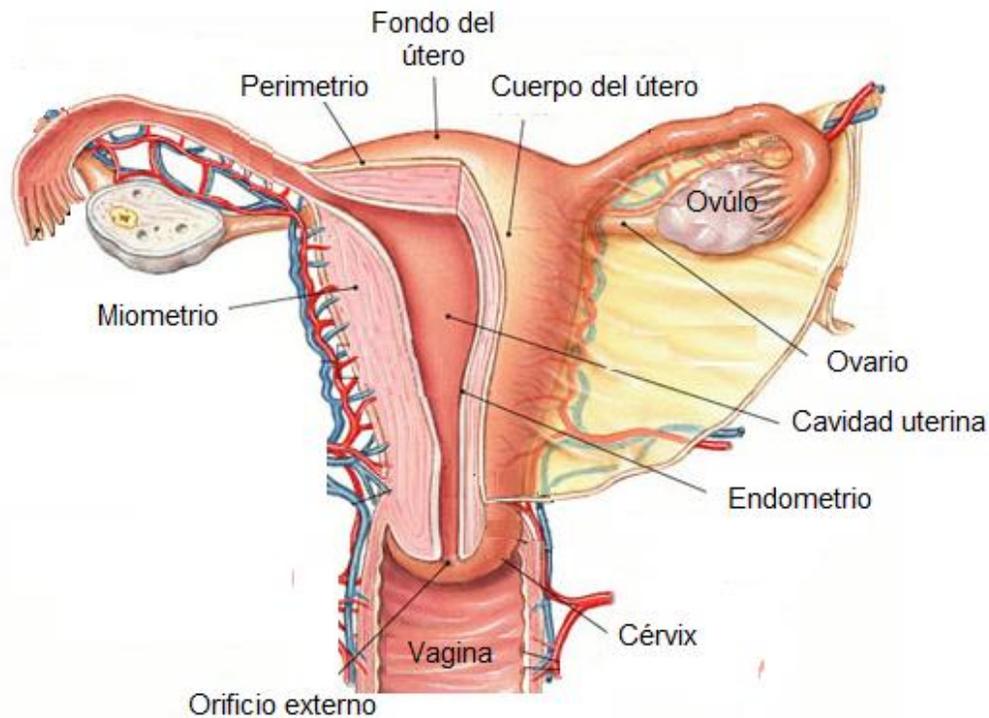


Figura 1. Sistema reproductor femenino. Esquema del útero y algunos órganos del sistema reproductor femenino (Tomada y modificada de HMSA, 2019).

Histológicamente, el endometrio es un tejido muy complejo, formado por estroma y epitelio. El compartimiento estromal está formado por células estromales de endometrio (ESC), principalmente del tipo celular fibroblasto, además de estar conformado por vasos sanguíneos y una variedad de células inmunocompetentes. Su principal función es regular el crecimiento y diferenciación del endometrio en respuesta a los esteroides ováricos. Por otra parte, el epitelio endometrial consiste en una monocapa de células cuboidales polarizadas que tapizan el interior de la cavidad uterina, esa monocapa actúa como barrera protectora contra los patógenos

que acceden a la cavidad endometrial, pero también permite regular la implantación del blastocisto que es la principal función del endometrio. Este epitelio está regulado de manera directa por las hormonas esteroides ováricas, induciendo a las ESC en un fenotipo decidual con el propósito de mantener un microambiente adecuado para la implantación del blastocisto (Simon *et al.*, 2009. Fazleabas *et al.*, 2002).

2.3. Ciclo menstrual

Desde el comienzo de la pubertad y hasta la menopausia, el ovario produce una serie de secreciones hormonales cíclicas que darán lugar al ciclo menstrual. El ciclo menstrual está regulado por interacciones complejas entre el eje hipotálamico-hipofisario-ovárico (HPO) y el útero (Fox, 2014).

El hipotálamo libera a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), esta hormona se encarga regular la secreción de hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) por las células gonadotropas en la hipófisis anterior; estas gonadotropinas activan al ovario para que produzca estrógenos y progesterona y se libere un ovocito con la capacidad de fertilización, lo cual produce efectos en el endometrio durante el ciclo menstrual (Fox, 2014).

2.3.1. Cambios cíclicos en el endometrio

Durante el ciclo menstrual, el endometrio responde a las hormonas que son secretadas por los ovarios. Por lo tanto, las fases del endometrio se coordinan con las fases de la ovulación (Figura 2) (Fox, 2014).

La fase proliferativa se caracteriza por una cantidad creciente de estradiol (E2) y bajos niveles de progesterona. La cantidad creciente de E2 secretado por los folículos ováricos en esta etapa estimula el crecimiento (proliferación) del estrato funcional del endometrio. Además, el E2 induce la expresión del receptor para la progesterona (PR) a través del receptor de estrógenos (ER), el cual se une a regiones reguladoras del gen del PR y recluta la maquinaria de transcripción. Lo anterior permite que el endometrio responda a la progesterona en la siguiente fase del ciclo menstrual, la cual se denomina fase secretora y se caracteriza por niveles

elevados de E2 y progesterona. En esta fase, el incremento en la secreción de la progesterona por el cuerpo lúteo estimula el desarrollo de las glándulas uterinas. Como resultado de las acciones combinadas del E2 y progesterona el endometrio se engrosa, se vasculariza y sufre una serie de transformaciones para llegar a un estado receptivo, el cual permitirá la implantación del blastocisto. Por tanto, se considera que el endometrio está preparado para aceptar y nutrir un embrión en caso de que ocurra la fecundación (Fox, 2014).

La fase menstrual ocurre como resultado del descenso de la secreción de hormonas ováricas durante la fase lútea tardía. Durante la menstruación, se produce la constricción de los vasos sanguíneos generando isquemia, lo cual lleva a la muerte celular del estrato funcional, observando un desprendimiento de fragmentos del tejido endometrial (Lee et al., 2006).

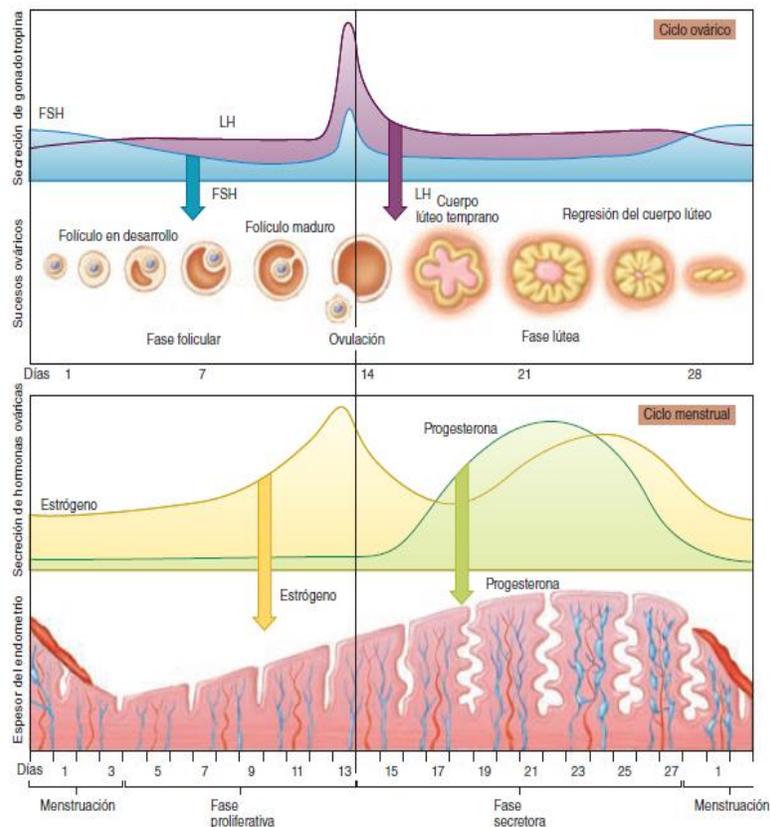


Figura 2. Ciclo de la ovulación y ciclo endometrial. Las flechas hacia abajo indican los efectos de las hormonas (Tomada de Fox, 2014).

2.3.2. Acción de hormonas esteroides en el útero

Parte de las respuestas uterinas a las hormonas esteroides son mediadas por receptores intracelulares específicos. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares y funcionan como factores de transcripción que regulan la expresión de sus genes blanco a través de modificaciones en el estado de la cromatina (Gardner *et al.*, 2012. Press *et al.*, 1988). La respuesta endometrial hacia las hormonas esteroides está determinada por la biodisponibilidad de estas hormonas, la cual es influenciada por los rangos de producción, por el metabolismo esteroideo, por la cantidad de diferentes receptores esteroideos, coactivadores y correceptores expresados, por la acción de factores de crecimiento y citocinas que modulan la acción de los receptores esteroideos (Gregory *et al.*, 2002).

2.3.3. Estrógenos

Los estrógenos tienen una importante participación en la regeneración y crecimiento del endometrio, además de preparar a este tejido para responder a la progesterona (Groothuis *et al.*, 2007).

El principal mecanismo de acción de los estrógenos está dado por su receptor intracelular específico ER, el cual se une a los estrógenos y actúa como factor de transcripción. Existen dos tipos principales de ER, ER α y ER β , los cuales son codificados por diferentes genes en loci distintos (Teppa *et al.*, 2005).

Los estrógenos atraviesan la membrana de su célula blanco por difusión y se internalizan en el citoplasma para interactuar con su receptor intracelular específico, el cual se encuentra dentro del núcleo. El complejo nuclear ER-estrógeno puede regular la expresión de genes de manera positiva o negativa, a través de una unión directa con secuencias únicas de DNA, conocidas como elementos de respuesta a estrógenos (ERE). Los genes regulados por el E2 contienen un ERE en la región promotora lo cual le permite al E2 regular su expresión. Una vez que se forma el complejo ER-estrógenos se reclutan proteínas co-reguladoras (coactivadores o correpresores), los cuales se asocian directamente en la región promotora del gen

blanco, generando un complejo de transcripción, produciendo un incremento en los niveles de mRNA y posteriormente en la traducción a proteína (Teppa *et al.*, 2005).

Existe un mecanismo de acción alternativo donde el ER no se une directamente al DNA, en el cual éste interactúa directamente con factores de transcripción (Findlay *et al.*, 2010).

2.3.4. Progesterona

La progesterona es una hormona esteroide sintetizada en las gónadas, placenta y otros tejidos. Esta hormona tiene un rol importante en el desarrollo y diferenciación de sus órganos blanco, y diversas funciones reproductivas y no reproductivas. En el endometrio, la progesterona induce la diferenciación de las células estromales y epiteliales del endometrio, regula la receptividad del endometrio para la implantación del blastocisto y coordina las interacciones útero-embrión a nivel molecular (Lee *et al.* 2006).

Las acciones de la progesterona se llevan a cabo principalmente por su receptor intracelular específico (PR). Los efectos fisiológicos de la progesterona están mediados por la interacción de la hormona con dos isoformas de su receptor intracelular específico (PR-A y PR-B). Ambas isoformas son codificadas a partir del mismo gen (11 q22-239) y son producto de promotores alternativos y diferentes sitios para el inicio de la transcripción. El PR pertenece a la superfamilia de receptores intracelulares que principalmente actúan como factores de transcripción activados por ligando (Gardner *et al.*, 2012).

La progesterona difunde libremente a través de la membrana plasmática de sus células blanco y se internaliza en el citoplasma para interactuar con el PR a través de su dominio de unión al ligando, induciendo un cambio conformacional, que promueve la fosforilación del PR, lo que permite que se disocie de las chaperonas, se dimerice y se transloque al núcleo. El receptor activo se une a los elementos de respuesta a progesterona específicos, ubicados dentro de las regiones reguladoras de sus genes blancos. La transcripción inicia a través del reclutamiento de

coactivadores y complejos remodeladores de cromatina, los cuales potencian la unión del complejo basal de transcripción (Barrera *et al.*, 2007).

Existen otros mecanismos a través de los cuales actúa la progesterona, como la activación de vías de señalización a través de receptores membranales específicos para dicha hormona (Lee *et al.* 2006).

La progesterona se encuentra involucrada en la ovulación, implantación y embarazo a través de la regulación de la función uterina durante el ciclo menstrual, principalmente a través del control de los cambios cíclicos en la proliferación y decidualización (Al-Asmakh, 2007).

2.4. Decidualización

Como se mencionó anteriormente, durante la decidualización el endometrio se transforma en un tejido receptivo en el cual puede implantarse el blastocisto. Dicha transformación consiste en una remodelación dinámica para establecer un microambiente adecuado para que se lleve a cabo un embarazo (Dunn *et al.*, 2003).

La decidualización es un proceso coordinado principalmente por los esteroides ováricos, E2 y progesterona, los cuales permiten la comunicación entre el endometrio y el embrión por medio de la activación de vías de señalización específicas (Okada *et al.*, 2018). En la decidualización están involucrados cambios morfológicos drásticos y diferenciación funcional de ESC (Figura 3) (Okada *et al.*, 2018). Los cambios morfológicos en las células estromales uterinas durante la decidualización consisten en el paso de una forma alargada (similar a las células mesenquimales tipo fibroblasto) a una forma redondeada similar a células de tipo epitelial (Figura 3). Este cambio de morfología se inicia durante la mitad de la fase secretora del ciclo menstrual, aproximadamente seis días después de la ovulación, como resultado de los elevados niveles de progesterona. Dichos cambios comienzan en las células estromales y posteriormente continúan con la transformación de las glándulas uterinas, aumento de células especializadas Natural Killers y la remodelación vascular para apoyar el suministro de sangre durante la maternidad (Gellersen *et al.*, 2003).

Los cambios hormonales cíclicos son necesarios para establecer los cambios fenotípicos que ocurren durante la implantación y el ciclo menstrual. El E2 juega un papel importante en la inducción de la expresión del PR, el cual a su vez permite al endometrio responder a la progesterona en la fase secretora. La progesterona es un factor clave en el establecimiento y mantenimiento del embarazo. La progesterona circulante aumenta durante la fase secretora del ciclo menstrual y permanece elevada durante el embarazo (Okada *et al.*, 2018).

La progesterona actúa mediante la unión y activación de su receptor intracelular, PR, el cual juega un papel importante durante la preparación del endometrio para el embarazo. En humanos, el PR se encuentra altamente expresado en células del estroma endometrial durante la fase secretora y el embarazo, mientras que su expresión en las células epiteliales disminuye después de la ovulación (Okada *et al.*, 2018).

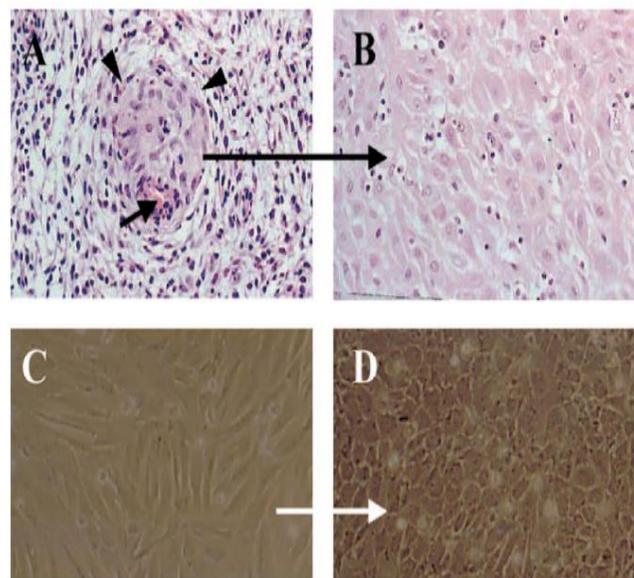


Figura 3. Decidualización de las células del estroma endometrial (ESC) *in vivo* e *in vitro*. (A) Inicio de la respuesta decidual en células estromales (señalada con punta de flecha), porción terminal de un vaso sanguíneo (flecha). (B) Decidualización del compartimento estromal del endometrio. (C) Visualización de ESC sin decidualizar con morfología tipo fibroblasto. (D) ESC decidualizadas (ESCd) tratadas con 8-bromo-adenosín monofosfato cíclico (8-bromo-AMPC) en combinación con medroxiprogesterona (MPA) durante 48 horas, las células presentan núcleos más grandes y abundante citoplasma (Tomada y modificada de Gellersen *et al.*, 2003).

El segundo mensajero AMPc es necesario para la señalización de la progesterona, ya que se integra a las vías hormonales y confiere especificidad celular a la acción de progesterona a través de la inducción de diversos factores de transcripción capaces de modular la función del PR (Gellersen *et al.*, 2003).

Durante la decidualización las ESC se caracterizan por la expresión de genes y respectivamente, secreción de diferentes proteínas, incluidos la prolactina (PRL) y la proteína 1 de unión a factor de crecimiento celular tipo insulina (IGFBP-1) (Figura 4) (Okada *et al.*, 2018).

La PRL es secretada por el endometrio decidualizado y el aumento en sus niveles séricos está asociado con embarazo. La expresión y la secreción de PRL en el endometrio persisten hasta el término del embarazo. Los niveles de PRL durante el embarazo son necesarios para su mantenimiento, ya que esta hormona estimula al cuerpo lúteo para producir progesterona, además de que estimula la implantación del blastocisto para mantener el embarazo y formar la placenta (Tenorio *et al.*, 2015). Se ha demostrado en modelos *in vitro* que el tratamiento con progesterona tiene un efecto inductor del fenotipo ESCd y la producción de PRL. Sin embargo, dicho efecto es menor al observado con altas concentraciones de AMPc intracelular combinado con progesterona, lo cual permitió establecer que el AMPc es requerido para sensibilizar a las células a las acciones de los progestágenos proporcionando la expresión máxima de PRL.

Existen seis tipos de IGFBP solubles (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 y -6), las cuales se unen a factores de crecimiento similares a insulina (IGF) con la misma afinidad que los receptores a IGF. La expresión y regulación de los IGFBP es tejido específico, en el caso del endometrio humano la más abundante es IGFBP-1, el cual es secretado por las ESC predecidualizadas y decidualizadas en la fase secretora tardía y el embarazo, por lo tanto, su expresión depende de la acción de la progesterona (Rutanen *et al.*, 1998). A nivel celular, los IGFBP regulan las acciones mitogénicas y metabólicas de los IGF mediante la inhibición o, en algunos casos, la unión del receptor (Dunn *et al.*, 2003).

Existen estudios han demostrado que la inducción de *IGFBP-1* en las células estromales del endometrio y decidua endometrial es dependiente de progestinas, y mediada a través del PR (Gao *et al.*, 2014).

La capacidad de respuesta de las células estromales a las señales hormonales se considera potenciada por la remodelación de la cromatina en todo el genoma. En particular, la inducción de la expresión de *PRL* e *IGFBP-1* se asocia con cambios epigenéticos en sus regiones promotoras, tales como modificaciones post-traduccionales de histonas (Apartado 2.8) (Katoh *et al.*, 2018).

La decidualización defectuosa se ha relacionado con abortos espontáneos, preeclampsia y endometriosis. Es importante conocer los mecanismos moleculares que regulan la decidualización para desarrollar metodologías terapéuticas para el tratamiento de estas condiciones patológicas como la endometriosis (Katoh *et al.*, 2018).

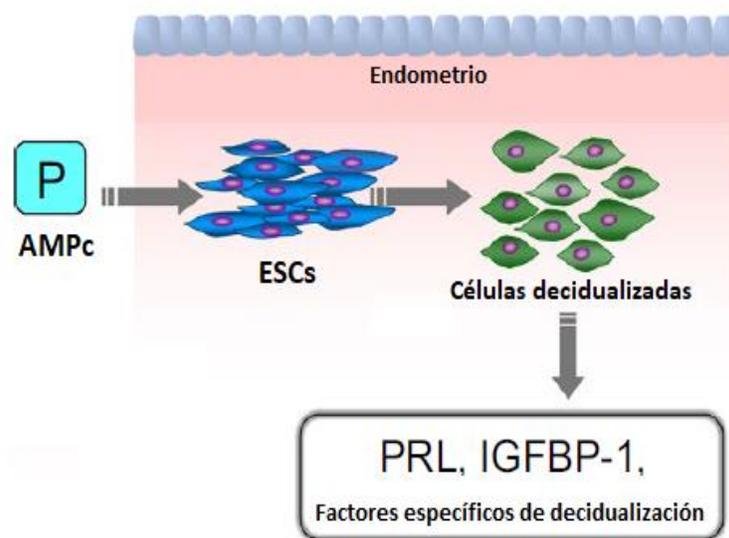


Figura 4. Decidualización del endometrio. La progesterona (P), en conjunto con el AMPc, induce la decidualización de las ESC. La decidualización implica una diferenciación morfológica y funcional, y se caracteriza por la inducción de la expresión de factores deciduales específicos y marcadores deciduales, como PRL e IGFBP-1 (Tomada y modificada de (Okada *et al.*, 2018)).

2.5. Endometriosis

2.5.1. Definición

La endometriosis es una enfermedad que se caracteriza por la presencia de glándulas y estroma endometrial fuera de la cavidad uterina (tejido ectópico), el cual se sitúa principalmente en órganos de la cavidad pélvica incluidos los ovarios, ligamentos y área peritoneal, así como el intestino y vejiga. Como el tejido endometrial ectópico tiene receptores para estrógenos, progestágenos y andrógenos, responde de manera similar, aunque no idéntica, a las influencias hormonales endógenas y exógenas al tejido eutópico (endometrio intrauterino). Por lo tanto, dicho tejido ectópico sufre una proliferación y destrucción cíclica similar a la del endometrio (Klemmt *et al.*, 2018).

2.5.2. Epidemiología

La frecuencia con que se presenta la endometriosis ha sido difícil de establecer ya que el diagnóstico definitivo requiere visualización directa de las lesiones a través de un procedimiento quirúrgico llamado laparoscopia. En consecuencia, la frecuencia varía ampliamente dependiendo del tipo de población y métodos de diagnóstico. A pesar de esta limitación, se ha demostrado que la endometriosis es un problema global común y se considera que afecta a una de cada diez mujeres en edad reproductiva, es decir entre los 15 y 49 años, las cuales son aproximadamente 176 millones de mujeres en el mundo (Obtenido de <http://endometriosis.org/> , 2017).

2.5.3. Patogénesis

La patogénesis de la endometriosis no está elucidada por completo a pesar de que ha sido estudiada durante décadas. Sin embargo, se han propuesto diferentes teorías por las cuales se origina esta enfermedad, entre las principales se encuentran: teoría de implantación, teoría de metaplasia y teoría de inducción (Klemmt *et al.*, 2018).

La teoría más aceptada es la de la implantación, la cual se basa en la suposición de que pequeñas lesiones se establecen, proliferan e invaden los tejidos mientras la enfermedad progresa (Figura 5). En esta teoría, el origen del tejido ectópico en la cavidad pélvica es por el transporte retrógrado de las células viables del endometrio. La menstruación retrógrada es un proceso fisiológico común que ocurre en más del 90% de las mujeres en edad reproductiva. Cuando se presenta menstruación retrógrada, las células del endometrio tienen la capacidad de adherirse al peritoneo o tejido cercano, proliferar, diferenciarse, adquirir suplemento y nutrientes a través de la sangre, lo que resulta en endometriosis. La dispersión adicional de las células del endometrio se da por sistemas linfáticos, por lo cual se pueden originar lesiones endometriales localizadas distalmente, como en la cavidad torácica o a nivel cerebral (Zondervan *et al.*, 2018. Vercellini *et al.*, 2014).

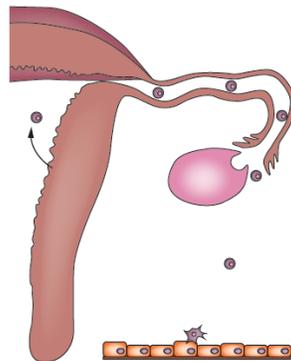


Figura 5. Teoría de implantación. Los fragmentos de ESC viables son conducidos a través de las trompas de Falopio por menstruación retrógrada por gradiente de presión originado posiblemente por contracciones uterinas. Una vez que llegan a la cavidad peritoneal, pueden implantarse, crecer e invadir las estructuras pélvicas (Tomada y modificada de Vercellini *et al.*, 2014).

Se han determinado una serie de requisitos que deben existir para poder aceptar la teoría de implantación: la existencia de menstruación retrógrada, presencia de células endometriales viables en el flujo de la menstruación retrógrada, capacidad de adhesión de las células, así como que se lleve a cabo la implantación y proliferación en la cavidad peritoneal. Esta hipótesis se apoya por evidencia epidemiológica, la cual demuestra un aumento del riesgo a desarrollar

endometriosis en mujeres que presentan aumento del sangrado menstrual y ciclos más cortos, así como una obstrucción del flujo de salida del tracto Müller (Zondervan *et al.*, 2018. Vercellini *et al.*, 2014. Klemmt *et al.*, 2018).

La hipótesis de la metaplasia explica el origen de la endometriosis en lugares poco frecuentes, es decir fuera de la cavidad pélvica, incluyendo los nódulos linfáticos abdominales, pulmones, cerebro, la cavidad nasal, etc. Esta hipótesis sugiere que se lleva a cabo una reprogramación de las células madre mesenquimales multipotentes derivadas de médula ósea o de un nicho dentro del propio endometrio. Se ha sugerido que factores hormonales e inmunológicos estimulan la transformación de tejido no endometrial en células epiteliales y estromales endometriales en sitios ectópicos (Sourial *et al.*, 2014).

La hipótesis de la metástasis sugiere que las células endometriales y los fragmentos de tejido viajan desde la cavidad uterina a través de los canales linfáticos y colonizan sitios ectópicos distantes. Esta hipótesis describe mejor la rara aparición de endometriosis extra-pélvica en mujeres y está respaldada por la evidencia de émbolos o células endometriales en los ganglios linfáticos (Zondervan *et al.*, 2018).

El endometrio eutópico en pacientes con endometriosis es diferente en muchos aspectos al endometrio sano, este tejido muestra mayor capacidad de proliferación, adhesión y angiogénesis. La principal diferencia en expresión génica de genes blanco de la progesterona del endometrio normal con respecto al endometrio de mujeres con endometriosis se observa en la fase secretora temprana, lo que sugiere que la transición de la fase proliferativa a la secretora se altera en mujeres con endometriosis (Mckinnon *et al.*, 2018).

La enfermedad se caracteriza porque el tejido ectópico es resistente a la progesterona. En tejido eutópico existen resultados contradictorios en la diferencia en la expresión del PR a nivel de mRNA y de proteína en el endometrio eutópico entre mujeres con y sin endometriosis. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que existe una disminución de en los niveles proteicos del PR y

alteración en la expresión génica en el tejido ectópico en comparación con el endometrio eutópico (Mckinnon *et al.*, 2018).

La endometriosis se considera una enfermedad estrógeno dependiente, en la cual los estrógenos estimulan el crecimiento del endometrio ectópico y existen alteraciones en las vías de señalización activadas por los estrógenos (Zondervan *et al.*, 2018. Vercellini *et al.*, 2014).

El E2 está disponible para promover el crecimiento del tejido ectópico a través de dos vías, el que proviene de la circulación (producido a partir de los órganos esteroideogénicos) y el que es producido localmente en los implantes endometriales (probablemente por un incremento en la expresión de la aromatasa). El tejido ectópico presenta niveles más elevados de ER β con respecto al tejido eutópico (Bulun *et al.* 2012). Esto se debe a una metilación deficiente del promotor del gen que codifica ER β , lo cual sugiere que se produce una sobreexpresión patológica de ER β en la endometriosis, que a su vez suprime la expresión de ER α y disminuye la inducción del PR mediada por E2 en las células endometrióticas, mecanismo por el cual se piensa que se da la resistencia a la progesterona en estas células (Xue *et al.*, 2007). Se sabe que la progesterona desencadena una serie de respuestas, entre las cuales se encuentra la inhibición de la proliferación de células epiteliales dependientes de estrógenos, la maduración de glándulas secretoras y la transformación de ESC en células decidualizadas para la implantación del embrión. En consecuencia, la resistencia a la progesterona tanto en ESC de tejido eutópico y ectópico producen defectos en la decidualización e implantación del tejido eutópico (Vercellini *et al.*, 2014. Lessey *et al.*, 2017).

2.5.4. Clasificación

De acuerdo con la literatura existen tres maneras en que la endometriosis puede ocurrir en la cavidad pélvica: peritoneal, ovárica y de infiltración de lesiones profundas. La morfología y apariencia de los implantes en el peritoneo se describen como blancas (color blanco, amarillo-café y defectos peritoneales similares a ampollas), rojas (color rojo, rojo-rosa y lesiones claras) y negras (lesiones negras y

azules). Las lesiones rojas son altamente vascularizadas. Mientras que las lesiones blancas, opacas o amarillas-café, estas lesiones indican la presencia de colágeno y ausencia de vascularización indicando estados latentes de la endometriosis resultado de una fibrosis y como consecuencia de un proceso inflamatorio. Las lesiones negras parecen rodear el implante con restos formados por la ruptura y cicatrización de tejido durante la escarificación de las lesiones rojas (Klemmt *et al.*, 2018).

La Sociedad Americana de Medicina Reproductiva y la Sociedad Americana de Fertilidad clasifican la endometriosis de acuerdo con la gravedad de la enfermedad, la afectación de los ovarios y con formación de adherencias, así como con el número, tamaño y ubicación de los implantes de endometrio peritoneal (Figura 6) (Klemmt *et al.*, 2018).

2.5.5. Síntomas y signos

En la endometriosis no existen síntomas específicos relacionados con la enfermedad, ya que pueden existir mujeres asintomáticas o mujeres que presentan una combinación de síntomas diversos como dolor abdominal y pélvico cíclico y no cíclico, dolor durante o después del acto sexual (profunda dispareunia), disquecia, disuria y macrohematuria, los cuales pueden ser causados por cistitis intersticial y/o síndrome de dolor vesical, que afectan la calidad de vida de las mujeres que padecen esta enfermedad (Klemmt *et al.*, 2018).

Una serie de estudios indican que no existe una correlación entre la intensidad del dolor, la extensión y ubicación de las lesiones endometrióticas. Se ha propuesto que el dolor esta asociado con una secreción de sustancias proinflamatorio por parte del tejido ectópico (Vercellini *et al.*, 2014).

2.5.7. Tratamiento

El dolor que presentan las pacientes se puede tratar por medio de cirugía extirpando los implantes peritoneales, los nódulos profundos y los quistes ováricos, sin embargo, se ha reportado que la mayoría de las pacientes que se someten a cirugía

presentan altas tasas de recurrencia. La terapia médica es sintomática, no citorreductora y se centra en establecer un entorno bajo en los niveles de estrógenos o incrementado en los niveles de progesterona.

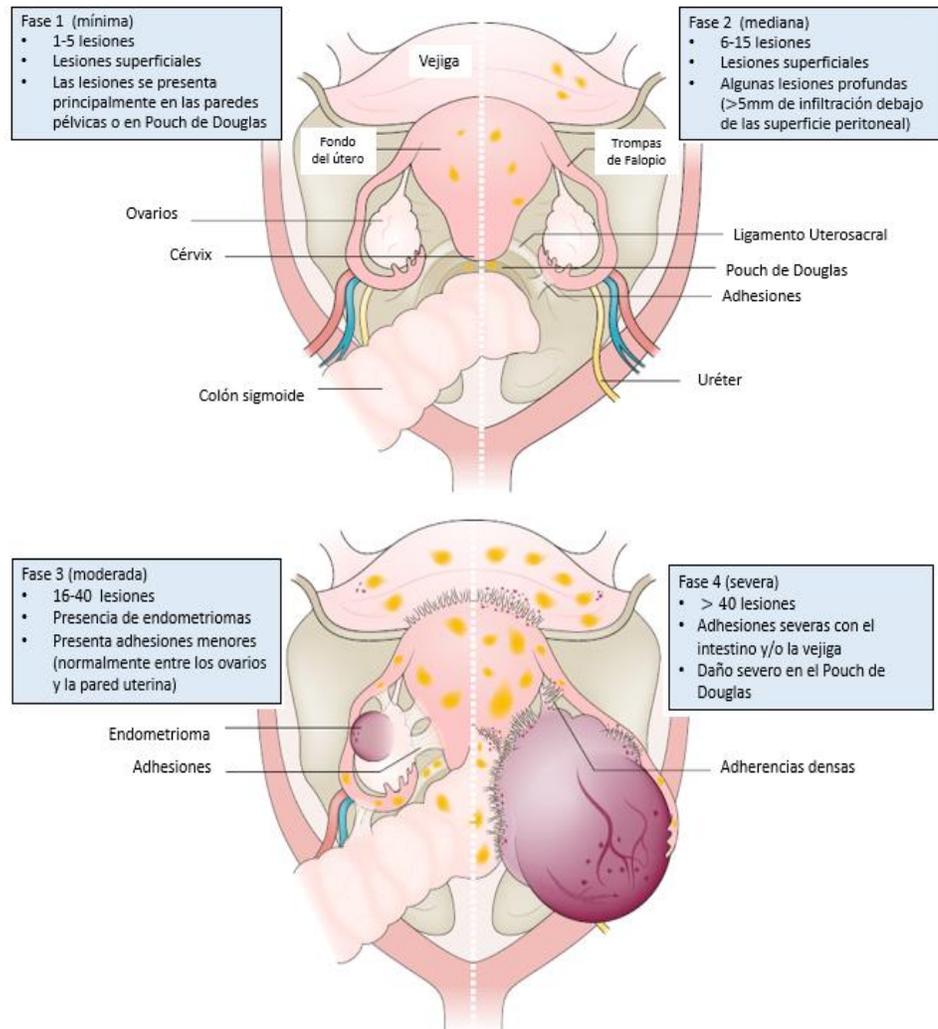


Figura 6. Clasificación de la endometriosis de acuerdo con la Sociedad Americana de Fertilidad. La clasificación se realiza de acuerdo con la severidad, ubicación, y tamaño de las lesiones. El tamaño de la lesión puede variar desde 313 μm a 5 cm de diámetro. La etapa I o mínima, presenta de 1–5 lesiones superficiales y/ o adherencias. La etapa II o leve, presenta de 6 a 15 lesiones, algunas pueden ser profundas, pueden existir lesiones superficiales y adherencias. La etapa III o moderado, presenta de 16–40 lesiones, a menudo incluyen un endometrioma y se puede presentar endometriosis superficial o profunda y / o adherencias densas. La etapa IV o severa, presenta > 40 lesiones y se caracteriza por presentar todo lo anterior (Tomada y modificada de Zondervan *et al.*, 2018).

Utilizando este abordaje, se induce la eliminación de la lesión a través de la supresión de la ovulación y la menstruación utilizando progestágenos, anticonceptivos orales y agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina. Aunque la erradicación de la lesión se considera un procedimiento para mejorar la fertilidad, el beneficio sobre la capacidad reproductiva es moderado (Vercellini *et al.*, 2014. Zondervan *et al.* 2018).

Hasta el momento no se tienen tratamientos definitivos para la enfermedad debido a que su origen es multifactorial, en la cual se han descrito factores genéticos, ambientales, inflamatorios y recientemente epigenéticos que se ven envueltos en el desarrollo de la enfermedad (Zondervan *et al.*, 2018).

2.6. Epigenética

El término de epigenética se usó originalmente para definir el estudio de los procesos poco conocidos por los cuales un cigoto se desarrolla en un organismo maduro y complejo (Waddington, 1942). Actualmente, se define epigenética como el estudio de los cambios en la función de los genes que no dependen de modificaciones en la secuencia de DNA, que son heredables por mitosis o meiosis, y que pueden ser reversibles (Holliday, 2002). Entre los principales mecanismos epigenéticos que controlan la expresión genética, se encuentran la metilación de citosina en contexto CpG, modificaciones post-traduccionales de histonas, remodelación de cromatina y RNAs no codificantes (Bedregal *et al.*, 2007).

Las modificaciones epigenéticas regulan la expresión genética alterando la estructura de la cromatina, por lo tanto, estos procesos son esenciales para el desarrollo y diferenciación de distintos linajes celulares que forman al organismo adulto. Dichas modificaciones pueden llevarse a cabo por fuentes exógenas, las cuales a su vez generan cambios en el fenotipo, o bien generan fenotipos patológicos como resultado de alteraciones en el ambiente (Handy *et al.*, 2011).

2.6.1. Modificaciones post-traduccionales de histonas

Las células mantienen la información genética almacenada en el DNA, que se organiza en una estructura de cromatina. Las unidades básicas de la cromatina son los nucleosomas, los cuales están compuestos por un octámero de histonas en el cual se enrolla el DNA; las histonas que conforman cada nucleosoma consisten en dímeros de las siguientes histonas: H2A, H2B, H3 y H4 (Krebs *et al.*, 2014). Los aminoácidos de los extremos N-terminal de las histonas son blanco de modificaciones post-traduccionales entre las cuales se encuentran la metilación, acetilación, fosforilación y ubiquitinación, entre otras (Figura 7) (Bernstein *et al.*, 2007). Estas modificaciones post-traduccionales de histonas afectan la estructura de la cromatina y permiten la unión de diferentes factores de transcripción, remodeladores de cromatina y chaperonas de histonas, por lo tanto, estas modificaciones tienen un rol importante en la expresión genética, replicación del DNA, reparación del DNA, compactación de la cromatina y en el control del ciclo celular (Kouzarides *et al.*, 2007).

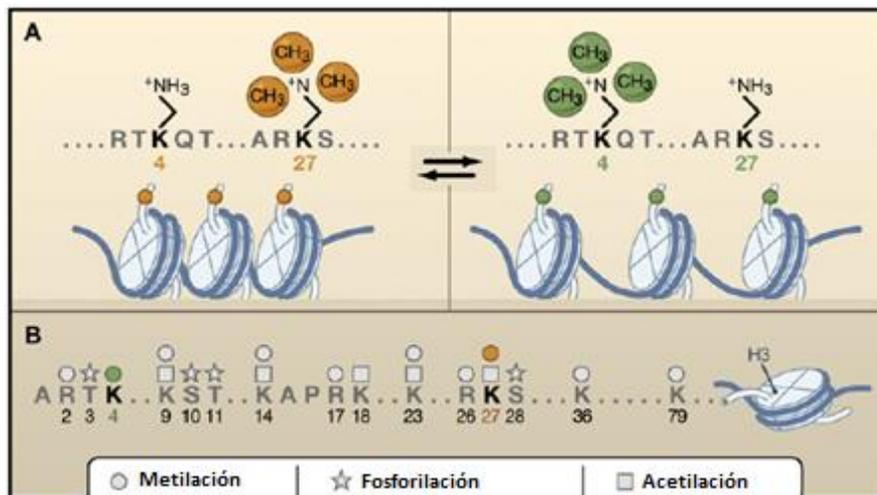


Figura 7. Modificaciones post-traduccionales de histonas. Las histonas están sujetas a cientos de modificaciones, incluyendo acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación. (A) Ilustra las estructuras y los efectos de la metilación de las histonas en la cromatina (compactación de color naranja y relajación/ verde). (B) Ilustra la diversidad de las modificaciones de la histona H3 (Tomada y modificada Bernstein *et al.*, 2007).

2.6.2. Metilación de histonas

La metilación de histonas se produce en los siguientes aminoácidos básicos: arginina y lisina (Greer *et al.* 2012). Existen tres estados de metilación (mono-, di- y trimetilación) de las lisinas, la cuales generan un cambio en la carga eléctrica de los aminoácidos. Esta marca post-traducciona es catalizada por metiltransferasas de histonas, las cuales contienen un sitio catalítico SET (acrónimo de Su (var) 3-9, Enhancer de zeste y Trithorax). La metiltransferasas de histonas catalizan la adición de los grupos metilo a usando como cofactor al S-adenosil metionina (SAM) como donador del grupo metilo a través de una complejo enzima-cofactor-SAM (Qian *et al.*, 2006).

Todos los sitios catalíticos de SET tienen un canal hidrofóbico que permite la unión de la lisina con el grupo metilo proveniente del SAM (Qian *et al.*, 2006). Los sitios de unión para el sustrato de histona y SAM están situados en caras opuestas del dominio SET; por lo tanto, la hendidura de unión de la lisina se conecta a través de un canal profundo que atraviesa el núcleo del dominio SET y permite la transferencia del grupo metilo de SAM al grupo ϵ -amino del sustrato de lisina. Esta disposición inusual de los sitios de unión al sustrato se propuso originalmente para permitir múltiples rondas de metilación de lisina sin disociación del sustrato de proteína del dominio SET (Dillon *et al.*, 2005).

La especificidad de las metiltransferasas de lisinas es probablemente determinada por los residuos de aminoácidos adyacentes a la lisina sustrato. Ejemplos de metiltransferasas se muestran en la Figura 8 (Qian *et al.*, 2006).

A pesar de su estabilidad, la metilación de la lisina es un proceso reversible y puede eliminarse mediante desmetilasas de histonas (Figura 8). Las desmetilasas de histonas pueden clasificarse en dos familias, la primera incluye las desmetilasas específicas de lisina (LSD), la cuales consisten en FAD aminooxidasas que pueden eliminar la mono- y dimetilación, sin embargo, son incapaces de desmetilar los residuos trimetilados (Tu *et al.*, 2007). En la segunda familia de las desmetilasas se encuentran las proteínas que contienen el dominio Jumonji C (JmjC) que emplean

un mecanismo de oxidación para desmetilar los tres estados de metilación de la lisina. La reacción enzimática del dominio JmjC utiliza como cofactores el α -acetoglutarato, Fe (II) y O_2 . El dominio JmjC se encuentra en conjunto con dominios de dedos de zinc, homeodominio de planta (PHD), dominio de interacción rico en A-T (ARID) o Tudor, los cuales son dominios de unión a DNA (Tu *et al.*, 2007).

El efecto de la metilación de histonas en la expresión génica se debe a las moléculas efectoras que reconocen el sitio metilado, las cuales son conocidas como “lectores” ya que contienen motivos de unión a lisinas metiladas. Entre los lectores de residuos de histonas se encuentran las proteínas que pertenecen a la súper familia Royal, que incluye Tudor, dominio de unión a cromatina (Chromo), dominio de tumor cerebral maligno (MBT) y aquellas con dominios PWWP (denominado PWWP por su núcleo central Pro-Trp-Trp-Pro) (Maurer-Stroh *et al.*, 2003).

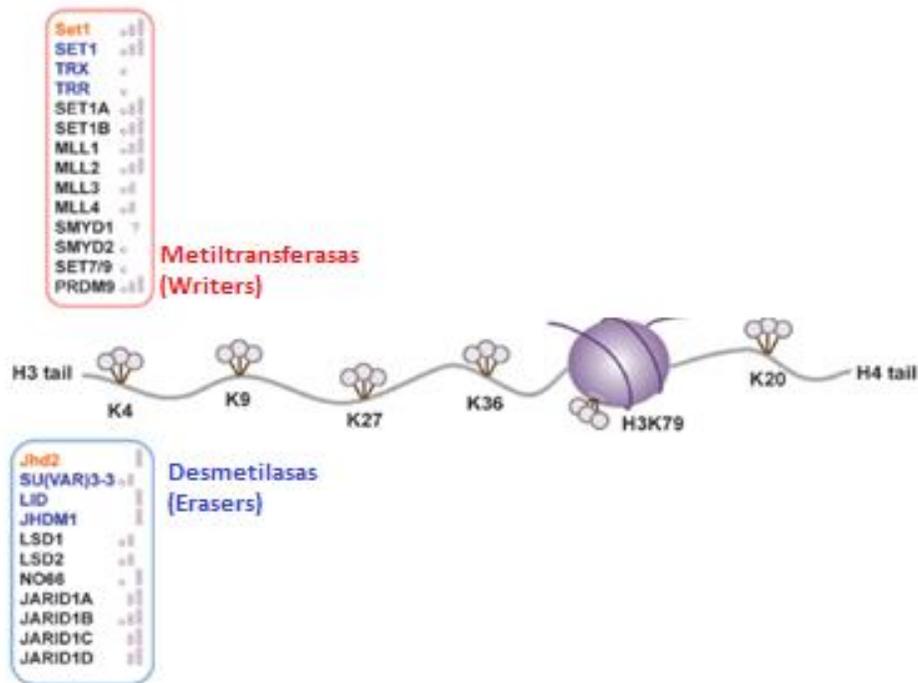


Figura 8. Metiltransferasas y desmetilasas de la H3K4. Se muestran los principales sitios de metilación de lisina en las histonas H3 y H4. Las metiltransferasas y las desmetilasas para H3K4me, también se representan con sus especificidades de estado de metilación: un solo círculo me1; doble círculo me2; triple círculo me3 (Tomada y modificada de Hyun *et al.*, 2017).

2.7. Trimetilación de la lisina 4 en la histona 3 (H3K4me3)

La lisina 4 de la histona 3 *in vivo* se puede mono-, di- y trimetilar. Esta modificación post-traduccional se encuentra en regiones activas de eucromatina, pero no en heterocromatina. Generalmente, la región promotora de genes activos tiene niveles altos de acetilación de histonas y metilación en H3K4, en particular por la presencia de niveles elevados de H3K4me3 alrededor de los sitios de inicio de transcripción (Howe *et al.*, 2017).

La H3K4me3 es una de las modificaciones de histonas más conservadas evolutivamente como una marca de transcripción activa. En particular, se ha demostrado que la trimetilación de la H3K4 está enriquecida en la región promotora y sitio de inicio de la transcripción en genes transcripcionalmente activos (Tianyi *et al.*, 2015). Barski y su grupo de estudio demostraron una correlación positiva entre la H3K4me3, la expresión de genes y el posicionamiento de la RNA polimerasa II (RNA Pol II) (Figura 9) (Barski *et al.*, 2007).

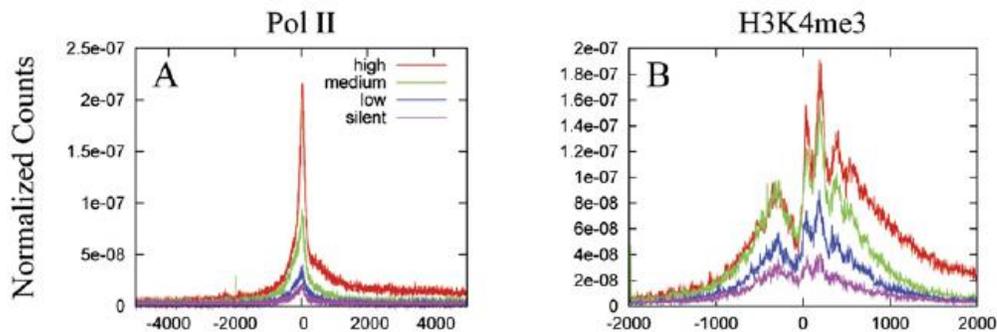


Figura 9. Posicionamiento de la RNA Pol II y H3K4me3 en el genoma. Se muestra el posicionamiento de la RNA Pol II y el enriquecimiento de la H3K4me3 cercanas a sitios de inicio de transcripción. A) Posicionamiento de la RNA Pol II y B) enriquecimiento de la H3K4me3 a 4000 pares de bases río abajo y arriba a sitios de inicio de transcripción. Posicionamiento de RNA Pol II y H3K4me3 en sitios de inicio de transcripción de genes altamente activos (rojo), intermedios (verde), bajos (azul) y silenciosos (púrpura) (Barski *et al.* 2007).

2.7.1. H3K4me3 metiltransferasas

En mamíferos, hay seis complejos muy conservados que catalizan la trimetilación de la H3K4, los cuales difieren en su subunidad catalítica que son SET1A/B y MLL1-

4; cada homólogo de SET1, que funciona como una proteína de andamiaje dentro del complejo, al cual se le asocian cuatro subunidades WRAD, WRR5 (Dominio repetido WD 5), RbBP5 (proteína de unión 5 a retinoblastoma) y ASH2L (de las siglas en inglés absent, small or homeotic-2 like) (Shilatifard, 2012).

2.7.2. H3K4me3 desmetilasa

La metilación de histonas se puede revertir mediante desmetilasas de histonas. De manera específica para la trimetilación de la H3K4 se han descubierto muchas desmetilasas de histonas que contienen dominio JmjC. En particular, la familia de histonas desmetilasas con dominio 1 interactivo JmjC rico en AT (JARID1) catalizan la desmetilación de la di- y trimetilación de la H3K4 dependiente de Fe (II) y α -cetoglutarato (Cloos *et al.* 2008). Se demostró que las proteínas JARID1, desmetilasa 5A específica de lisina (RBP2), desmetilasa 5B específica de lisina (PLU1) y desmetilasa 5C específica de lisina (SMCX) son específicas para remover la di- y trimetilación de la H3K4 (Christensen *et al.*, 2007).

2.7.3. Proteínas que se unen a H3K4me3

Se sabe que diversos remodeladores de cromatina tienen dominios de reconocimiento o lectura de la H3K4me3 y estos participan en la regulación de la expresión genética. Un ejemplo de estos remodeladores es la proteína 1 de unión a cromatina y a la DNA-helicasa (CHD1), una enzima con actividad de remodelador de cromatina dependiente de ATP, la cual reconoce la di- y trimetilación de H3K4 a través de sus dos cromodominios N- terminal. Otro ejemplo, es el factor de transcripción con bromodominio y dominio PHD (BPTF), el cual es una subunidad del complejo remodelador de nucleosoma dependiente de ATP (NURF), el cual se demostró que interactúa con la H3K4me3 a través de sus dominios PHD. Además, la H3K4me3 recluta factores generales de transcripción, tal es el caso del factor de transcripción IID, que se une a H3K4me3 a través del factor de transcripción 3 (TAF3) que contiene el dominio PHD, lo que resulta en la formación de un complejo de preiniciación más estable (Shilatifard, 2012).

Se sabe que la H3K4me3 y la acetilación de la H3/H4 coexisten en el promotor y en los sitios de inicio de transcripción de genes activos, por lo que diversos estudios sugieren que los promotores con H3K4me3 promueven la acetilación H3 / H4 a través del reclutamiento de las acetiltransferasas de histonas (HAT). Entre los lectores de H3K4me3 se han identificado diversos complejos HAT (Tianyi *et al.*, 2015).

2.8. Relación de la decidualización con marcas epigenéticas

La capacidad de respuesta de las ESC a los estímulos hormonales se ha visto potenciada por la remodelación de la cromatina de todo el genoma seguida de la acción coordinada de las redes transcripcionales específicas de la decidualización, por lo cual se considera que la regulación epigenética juega un papel esencial en la expresión génica para el desarrollo y la diferenciación de estas células (Katoh *et al.*, 2018).

Tres grupos de investigación analizaron los patrones comunes de modificaciones de histonas de las ESC y las ESC decidualizadas. Grimaldi y su grupo de investigación demostraron que la inducción dependiente de hormonas de los biomarcadores de decidualización *IGFBP-1* y *PRL*, está asociada con cambios epigenéticos en sus regiones promotoras, tales como el aumento de H3K27ac (marca de cromatina activa) y con la disminución de los niveles de H3K27me3 (marca represiva de cromatina) (Grimaldi *et al.*, 2011).

Tamura y colaboradores observaron que los principales cambios en las modificaciones de histonas asociadas con la decidualización son el aumento de los niveles de H3K27ac y H3K4me3 en las regiones promotoras proximal y distal de genes importantes para la decidualización, como *IRS1*, *IRS2*, *INSR* y *FOXO1* (Tamura *et al.*, 2014).

Por otro lado, Katoh observó cambios en los patrones de H3K27ac posterior al estímulo de decidualización, con una correlación moderada con la expresión génica. Encontraron 90 genes con un aumento de H3K27ac y H3K27me3 en la región

promotora, de los cuales 4 son genes esenciales para la deciduación, *NT4*, *ZBTB16*, *PROK1* y *GREB1* (Kato *et al.*, 2018).

2.9. Epigenética en endometriosis

Se ha propuesto que el crecimiento de ECS fuera de la cavidad uterina está relacionado con una regulación diferencial en la expresión genética respecto al endometrio eutópico. Por otro lado, se ha demostrado que alteraciones en la expresión genética se dan por mecanismos epigenéticos, lo cual podría explicar las alteraciones en el perfil de la expresión genética que se dan en las lesiones endometrióticas y en el endometrio de pacientes con endometriosis (Kao *et al.* 2003).

La primera evidencia de que la endometriosis tiene un componente epigenético es que el promotor del gen *HOXA10*, el cual tiene una función importante en la regulación del desarrollo del endometrio durante el ciclo menstrual, se encuentra hipermetilado en tejido eutópico de mujeres con endometriosis comparado con el de mujeres sin endometriosis, por lo tanto, hay una disminución en la expresión de *HOXA10*, lo que produce defectos en la receptividad uterina. Además, se ha demostrado que el promotor de *PR-B* está hipermetilado, lo cual ha sido asociado con la expresión reducida del PR-B a nivel de proteína y a su vez con la resistencia a la progesterona (Guo, 2009).

A partir de estos hallazgos diferentes grupos de investigadores han estudiado el papel de las modificaciones post-traduccionales de histonas en la endometriosis. Se han reportado alteraciones en la acetilación y metilación global de histonas en mujeres con endometriosis. En particular, se han reportado alteraciones en la acetilación de la H4 y la metilación de histona H3K4 y H3K9 tanto en endometrio ectópico como eutópico respecto a endometrio de mujeres control. Además, se ha reportado que la expresión de genes que codifican proteínas que regulan el estado de la cromatina se encuentra alterada, como es el caso de sirtuina 1 (*SIRT-1*), la cual puede modular la función de la cromatina a través de la desacetilación directa de histonas y que se encuentra reducida significativamente en el endometrio

eutópico de pacientes en comparación con endometrio sano, mientras que el nivel de mRNA de *HDAC2* aumentó significativamente en el endometrio eutópico respecto al endometrio de mujeres con endometriosis (He *et al.*, 2018. Tong *et al.*, 2010).

Xiaomeng y colaboradores encontraron niveles bajos de H3K4me en tejido proveniente de mujeres con endometrios (eutópico y ectópico) con respecto al tejido endometrial de mujeres sin endometriosis (Xiaomeng *et al.*, 2012).

Por el contrario, Monteiro y colaboradores reportaron niveles elevados de H3K4me en tejido eutópico y ectópico respecto a las provenientes del grupo control. Además, encontraron niveles bajos de acetilación de las histonas H3 y H4 dentro de las regiones promotoras de los genes que están regulados a la baja en la endometriosis (por ejemplo, *HOXA10*, *ESR1*, *CDH1* y *p21^{WAF1/Cip1}*) en lesiones respecto al endometrio de control. La región promotora del gen que codifica al factor esteroideogénico 1 (*SF1*) se enriqueció para la acetilación de la H3 y H4 en las lesiones respecto a los tejidos de control, correlacionando con su alta expresión reportada en las lesiones (Monteiro *et al.*, 2014).

Estos estudios sugieren que el código de histonas de las lesiones y el endometrio de pacientes con endometriosis es diferente al endometrio de mujeres control, lo cual sugiere un papel importante de las modificaciones de las histonas en la modulación de la expresión de genes en la endometriosis.

Existen reportes que indican que la desmetilasa 1 específica de lisinas (LSD1), la cual se encarga de desmetilar la mono- y dimetilación de las lisinas, se sobreexpresa en tejido ectópico con respecto a tejido eutópico de mujeres con endometriosis y de mujeres sin la enfermedad. En un estudio se realizaron tratamientos con tranilcipromina (TC), un inhibidor de la LSD1, y se observó una reducción significativa de la proliferación celular y progresión del ciclo celular. Además, el tratamiento de las lesiones con TC dio como resultado una reducción en los biomarcadores de proliferación y angiogénesis, así como en los niveles de metilación de H3K4me1 y H3K4me2 con respecto a las lesiones sin tratamiento.

Esto sugiere que los mecanismos epigenéticos que se encuentran desregulados en la endometriosis, podrían ser blancos terapéuticos para tratar la endometriosis (Sun *et al.*, 2016).

En 2018, Samadieh y col. identificaron una correlación entre la inducción del gen *HOXA10* (indispensable en el endometrio para que se lleve a cabo la transformación decidual del estroma y se lleve a cabo la implantación del embrión) y niveles más altos de H3K4me3 en lesiones endometriales ectópicas en la fase secretora con respecto a tejido control. Durante la fase proliferativa el grupo control tiene una regulación positiva de *HOXA10* con respecto al tejido ectópico y niveles más altos de H3K4me3 en la región promotora. Dado que hay una expresión aberrante de *HOXA10* y está involucrada en la patogenia del endometrio, estos datos enfatizaron el papel de las modificaciones epigenéticas en la alteración de la expresión genética y su relación con la fisiopatología clínica de la endometriosis (Samadieh *et al.*, 2019).

Diversos estudios han establecido que existen alteraciones epigenéticas principalmente en células de tejido ectópico de mujeres con endometriosis. Sin embargo, se desconoce si dichas alteraciones también pudieran presentarse en el endometrio eutópico de las pacientes, lo cual es de gran relevancia considerando que se ha propuesto que el tejido eutópico pudiera presentar alteraciones que llevan a la enfermedad. Actualmente se sabe que existen cambios en los niveles totales de H3K4me en tejido eutópico de mujeres con endometriosis con respecto al endometrio de mujeres sin la enfermedad. Sin embargo, desconoce si los niveles totales de la H3K4me3 se encuentran alterados en ESC obtenidas de pacientes con endometriosis.

3. Planteamiento del problema

La endometriosis es una patología que afecta a una de cada diez mujeres en edad reproductiva, las cuales son aproximadamente 176 millones en el mundo. Una de las características moleculares más importantes de la endometriosis es la resistencia a la progesterona, la cual tiene un papel importante en la decidualización y por lo tanto con el éxito del embarazo, por lo que esta enfermedad está asociada con infertilidad. En estudios previos se ha asociado la decidualización *in vitro* con un aumento en los niveles de H3K27ac y H3K4me3 en regiones promotoras distales y proximales de genes importantes para este evento biológico.

Actualmente no se conocen por completo los mecanismos moleculares que están involucrados en la patogénesis de la endometriosis, existen evidencias que sugieren que se trata de una enfermedad con un componente epigenético, en la cual existen alteraciones en los niveles de H3K4me en el endometrio de las pacientes con esta enfermedad respecto al endometrio de mujeres sin la enfermedad. Hasta el momento, no se ha caracterizado cuál es el efecto de las hormonas que inducen la decidualización en los niveles de H3K4me3 en la endometriosis, lo cual es de gran relevancia considerando que dicha marca está relacionada con la activación de la expresión génica.

4. Hipótesis

La decidualización *in vitro* con E2, MPA y AMPc generará una disminución en los niveles totales de H3K4me3 en cultivos primarios de ESC provenientes de pacientes con endometriosis con respecto a las mujeres control.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Caracterizar los niveles de H3K4me3 bajo el efecto de la decidualización *in vitro* con E2, MPA y AMPc en cultivos primarios de células estromales de mujeres control y de pacientes con endometriosis.

5.2. Objetivos particulares

1. Realizar cultivos primarios de ESC de pacientes con endometriosis y mujeres control.
2. Inducir la decidualización *in vitro* de ESC aisladas de pacientes con endometriosis y mujeres control con E2, MPA y AMPc.
3. Evaluar los niveles de expresión de los genes *IGFBP-1* y *PRL* a partir de los cultivos primarios que fueron tratados con E2, MPA y AMPc.
4. Analizar mediante la técnica de Western Blot el contenido de H3K4me3 en los cultivos primarios de ESC de cada uno de los grupos de estudio.

6. Metodología

Población de estudio

La selección fue llevada a cabo por medio de los colaboradores clínicos del Departamento de Ginecología del INPer, quienes seleccionaron a mujeres diagnosticadas con endometriosis y mujeres control, de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión conforme a lo establecido en el Proyecto (571) 3000-20109-01-571-17: "Impacto de la organización tridimensional del genoma en la patogénesis de la endometriosis" (Tabla 1). Mediante una carta de consentimiento informado fue solicitado a las pacientes y controles la donación de una biopsia de endometrio (tejido eutópico) posterior a la obtención de su firma y autorización.

Cultivo primario

Se obtuvieron biopsias de 5 mujeres control y 9 mujeres con endometriosis. Las biopsias de tejido endometrial fueron obtenidas durante la fase proliferativa, usando una cánula de Pipelle (Laboratoire CCD, Francia). Las muestras fueron tomadas del fondo uterino y fueron colocadas en solución Hanks (5.4 mM KCl, 0.3 mM Na₂HPO₄, 0.4 mM KH₂PO₄, 4.2 mM NaHCO₃, 1.3 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 0.6 mM MgSO₄ y 137 mM NaCl a pH=7.13) con antibiótico/antimicótico 1x (Gibco, UK) a 4°C. El aislamiento de las ESC fue realizado a menos de 2 horas de haber obtenido la biopsia de tejido endometrial. El tejido fue lavado con PBS 1X (137 mM NaCl,

2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄ a pH=7.4) con antibiótico/antimicótico 1x para eliminar los restos de sangre del tejido, posteriormente el tejido fue macerado y fue realizada una digestión enzimática con 1mg/mL de DNAsa (SIGMA, EUA) y 10 mg/mL de colagenasa (Gibco, UK) a 37 °C durante 2 h. Posteriormente, el producto de la digestión fue centrifugado a 8, 000 rpm por 5 min, el sobrenadante fue desechado y el precipitado fue resuspendido en medio DMEM-F12 con rojo fenol + L- Glutamina + 15 mM Hepes (Gibco, UK) adicionado con aminoácidos no esenciales 1x, suero fetal bovino al 10% (Biowest, México) y antibiótico/antimicótico 1x (Gibco, UK). Las células fueron separadas por filtración a través de una malla de nylon de 40 µm. El filtrado fue sembrado en cajas Petri de 6 cm con medio DMEM/F12 a 37 °C, 95% de aire y 5% CO₂.

Las ESC fueron creciendo en cajas de 10 cm hasta alcanzar una confluencia ≥80%. Posteriormente, fue cambiado el medio cada 48 horas.

Tratamiento de decidualización

Fueron utilizados cultivos primarios de ESC con una confluencia ≥80% y fueron incubadas por 48 horas con medio **DMEM/F12 sin hormonas**: medio DMEM/F12 sin rojo de fenol, adicionado con SFB sin hormonas al 10% (ThermoFisher Scientific, EUA), L- Glutamina, 15mM Hepes, aminoácidos no esenciales 1x, y antibiótico/antimicótico 1x a 37°C y 5% CO₂ por 48 horas. Posterior a las 48 horas fue cambiado el medio anterior por medio **DMEM/F12 sin SFB**: DMEM/F12, sin rojo fenol + L- Glutamina + 15 mM Hepes (Gibco, UK) adicionado con MEN-aminoácidos no esenciales 1x y antibiótico/antimicótico 1x a 37°C y 5% CO₂ por 18 horas.

Para el tratamiento hormonal fueron utilizadas las siguientes condiciones: 10 nM E2, 1 µM MPA y 0.5 mM AMPc en medio DMEM/F12 sin SFB a 37°C y 5% CO₂ a diferentes tiempos de incubación. Los experimentos fueron realizados 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 *IGFBP-1*.

Tabla 1. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación del grupo de estudio.

Grupo control		
<p>Criterios de inclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pacientes fértiles. - Mujeres que acudan a histerectomía por indicación de los colaboradores clínicos del proyecto. - Edad de 18 a 45 años. - Sin prueba laparoscópica de endometriosis. - Sin evidencia clínica o paraclínica de endometriosis. - Sin hábitos de fumar y consumo de alcohol. - Mujeres que acepten participar en el estudio y firmen hoja de consentimiento informado. 	<p>Criterios de exclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mujeres con evidencia laparoscópica de endometriosis. - Con tratamientos hormonales o de agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina. - Mujeres con cáncer o, que reciban quimioterapia o radioterapia. - Antecedentes de autoinmunidad o diabetes. - Antecedente de aborto habitual. - Trastorno neurológico en tratamiento. - Obesidad y/o diabetes. 	<p>Criterios de eliminación:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aquellas pacientes que durante el proceso de estudio ya no deseen participar. - Pérdida de las condiciones adecuadas de almacenamiento de las muestras. - Se haya realizado diagnóstico, durante el estudio, de alguna de las enfermedades de los criterios de exclusión. - Pacientes cuyo material genético o proteínas no pudieron ser analizados por dificultades técnicas.
Grupo de pacientes con endometriosis		
<p>Criterios de inclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mujeres con diagnóstico de endometriosis confirmado mediante laparoscopia y análisis histológico. - Candidatas a cirugía para la remoción de endometrioma ovárico. - Edad entre 18 y 45 años. - Pacientes que acepten participar en el estudio y firmen la hoja de consentimiento informado. 	<p>Criterios de exclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pacientes con enfermedad pélvica inflamatoria aguda al momento de realizar la laparoscopia. - Con tratamientos hormonales o de agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina. - Mujeres con cáncer o, que reciban quimioterapia o radioterapia. - Antecedentes de autoinmunidad o diabetes. - Trastorno neurológico en tratamiento. 	<p>Criterios de eliminación:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aquellos pacientes que durante el proceso de estudio no deseen participar. - Pérdida de las condiciones adecuadas de almacenamiento de las muestras. - Se haya realizado diagnóstico, durante el estudio, de alguna de las enfermedades de los criterios de exclusión. - Pacientes cuyo material genético no pudo ser analizado por dificultades técnicas. - Pacientes en las que se haya descartado la endometriosis por análisis histológico.

Extracción de RNA total y RT-qPCR

Para la extracción de RNA fueron utilizadas aproximadamente 270, 000 células. La extracción de RNA fue llevada a cabo mediante el reactivo QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN, EUA) siguiendo el protocolo del fabricante. El RNA total obtenido fue resuspendido en agua libre de nucleasas y cuantificado por espectrofotometría. La integridad del RNA aislado fue evaluada por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Posteriormente, fue usado 1 µg de RNA total para generar cDNA mediante la

técnica de RT-PCR utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen EUA) y 10 mM de cada uno de los desoxinucleótidos (Invitrogen, EUA), siguiendo el protocolo del fabricante.

El ensayo de qPCR fue llevado a cabo utilizando el sistema de detección SYBR Green (Applied Biosystems, EUA) en el equipo StepOnePlus (Applied Biosystems, EUA), siguiendo el siguiente programa: 95°C para la activación de la enzima y posteriormente 40 ciclos de 95°C por 15 seg y 60°C por 1 min. Los resultados fueron analizados mediante el método comparativo de doble delta C_T ($\Delta\Delta C_T$)- Fue utilizado el *rRNA 18S* y *ACT-B* como controles de expresión constitutiva para la evaluación de la expresión de los genes de decidualización *PRL* e *IGFBP-1*. En la Tabla 2 se muestran los primers utilizados.

Tabla 2. Secuencias de primers utilizados para los experimentos de RT-qPCR

Gen	Primer sentido 5'-3'	Primer anti sentido 5'-3'
<i>18S</i> ^a	5'-CGCGGTTCTATTTTGTGGT-3'	5'-AGTCGGCATCGTTTATGGTC-3'
<i>ACT-B</i> ^b	5'-CTTCCTGGGCATGGAGTC-3'	5'-CGTACAGGTCTTTGCCGATG-3'
<i>PRL</i> ^c	5'-CATATTGCGATCCTGGAATGAGC-3'	5'-TCCTCAATCTCTACAGCTTTGGA-3'
<i>IGFBP-1</i> ^c	5'-TCCTTTGGGACGCCATCAGTAC-3'	5'-GATGTCTCCTGTGCCTTGGCTA-3'

a. Tomado de Valadez-Cosmes et al., 2015

b. Tomado de Gómez-Viais, 2019

c. Tomado de Jividen et al., 2014

Extracción de proteínas totales

Para extracción la extracción de proteínas totales fueron utilizadas aproximadamente 400, 000 células. Las ESC fueron lavadas con PBS 1X a 4°C, fueron agregados 100 µL del amortiguador de lisis (25mM Tris-HCl, 1% SDS, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1x inhibidor de proteasas (Roche, Alemania), fueron centrifugadas a 14, 000 rpm a 4°C por 10 min y el sobrenadante fue colocado en un

tubo de 1.5mL. La concentración de proteínas totales fue determinado a través del ensayo de Lowry (Biorad, EUA), siguiendo el protocolo el fabricante.

Western Blot

El Western Blot fue realizado de acuerdo con los protocolos estándar. En resumen, las muestras a analizarse fueron resuspendidas en amortiguador de carga (Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, DTT 100 mM, SDS al 2%, azul de bromofenol al 0.1%, 10% glicerol), fueron desnaturalizadas durante 10 min y fueron corridas en un gel SDS-PAGE al 15% a 90 V por 90 min en amortiguador de corrida (25 mM Tris, 190 mM Glicina, 0.1% SDS). Las muestras fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa con un poro de 22 μ m (Biorad, Alemania) en amortiguador de transferencia (25 mM Tris, 190 mM Glicina, 20% Metanol) y con agitación a 4°C, a 90 V por 90 min. Posteriormente, la membrana fue incubada con los siguientes anticuerpos primarios: 1:2000 anti-H3K4me3 (ab8580, Abcam, UK), 1:1000 Anti-H3 (ab18521, Abcam, UK) y 1:3000 anti-GAPDH (sc-47724, Santacruz, EUA). Los siguientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano fueron utilizados para reconocer el anticuerpo contra H3K4me3 y H3, utilizando un anticuerpo anti-conejo (ab6721, Abcam, UK), mientras que para el anti-GAPDH fue usado el anticuerpo anti-ratón (sc-516102, Santacruz, EUA). Las proteínas fueron visualizadas mediante quimioluminiscencia con el kit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ThermoScientific, EUA), fue seguido el protocolo del fabricante. Las densidades ópticas fueron determinadas haciendo uso el programa ImageJ.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con el software GraphPad Prism 5 para Windows, mediante las pruebas estadísticas t- de Student para comparar dos grupos y análisis de varianza de una vía (ANOVA) para comparar 3 o más grupos de estudio, seguida de la prueba post hoc de Tuckey. Fueron considerados significativos los valores con una $p < 0.05$.

7. Resultados

Aislamiento y cultivo celular de células estromales

A partir de las biopsias obtenidas de mujeres controles y pacientes con endometriosis se realizaron cultivos primarios de ESC (tejido eutópico). Se consideró un cultivo exitoso de células estromales a aquel en el que las células se establecieron en monocapa con una morfología de tipo fibroblasto (Figura 10), con confluencia cercana al 80% y que respondieron a los tratamientos de decidualización. De las 14 muestras obtenidas sólo 6 cultivos se consideraron exitosos, provenientes de 3 mujeres control y 3 pacientes con endometriosis, y a partir de ellos se realizaron los experimentos de decidualización, RT-qPCR y Western Blot.

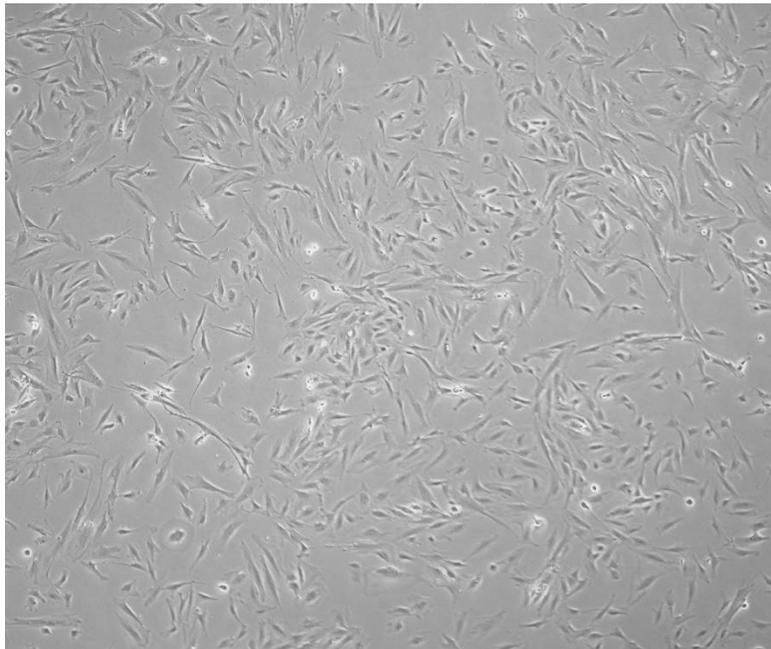


Figura 10. Fotografía de microscopía de contraste de fases de cultivos primarios de células estromales endometriales humanas cultivadas (10x). Se observa el crecimiento de células estromales de endometrio proveniente de una mujer control.

Curva temporal de expresión de biomarcadores de decidualización

Se ha establecido que las ESCd se caracterizan por la secreción de PRL e IGFBP-1 (Dunn et al., 2003), los cuales se inducen a nivel de mRNA y proteína. Por ello, se realizó la evaluación, por triplicado, de estos biomarcadores de decidualización a nivel

de mRNA en ESC provenientes de una mujer control a 1, 6, 12, 24 y 48 horas, para establecer la cinética de inducción de dichos biomarcadores en respuesta al tratamiento con E2, MPA y AMPc (Figura 11). La expresión de ambos genes presentó un incremento directamente proporcional al tiempo de incubación con el tratamiento mencionado. A partir de las 6 horas de tratamiento, se observa un aumento en la expresión de ambos marcadores. En general, la inducción de *IGFBP-1* es mayor con respecto a *PRL*. A las 48 horas se observa una máxima inducción de *PRL* e *IGFBP-1*, por ello los experimentos de decidualización *in vitro* se realizaron a 48h.

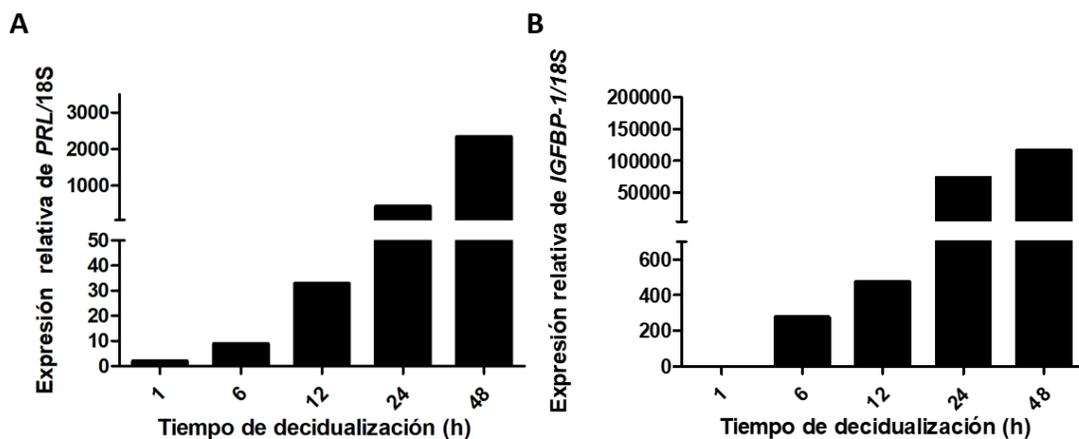


Figura 11. Curva de expresión de genes implicados en la decidualización de células estromales provenientes de una mujer control. Los tratamientos se realizaron con E2 (10nM), MPA (1µM) y AMPc (0.5mM) durante 1, 6, 12, 24 y 48 horas. Cambios en la expresión de *PRL* (A) e *IGFBP-1* (B), utilizando los niveles de expresión del gen *18S* para normalizar. Los valores que se muestran en las figuras son promedios.

Evaluación de expresión de biomarcadores de decidualización en pacientes con endometriosis y mujeres sin la enfermedad

De acuerdo con la curva de decidualización obtenida en el experimento anterior, se evaluó la expresión de *PRL* e *IGFBP-1* a las 48 horas de tratamiento hormonal con E2, MPA y AMPc en cultivos primarios de ESC provenientes de 3 mujeres control y 3 pacientes con endometriosis. Las ESC provenientes de mujeres control y pacientes con endometriosis bajo tratamiento de decidualización mostraron un aumento significativo en la inducción de la expresión de *PRL* e *IGFBP-1* ($p < 0.05$) a las 48 horas con tratamiento hormonal en comparación con las mismas células sin

tratamiento (Figura 12). Sin embargo, no hay cambios significativos en los niveles de expresión de *PRL* e *IGFBP-1* al comparar las ESCd de ambos grupos de estudio.

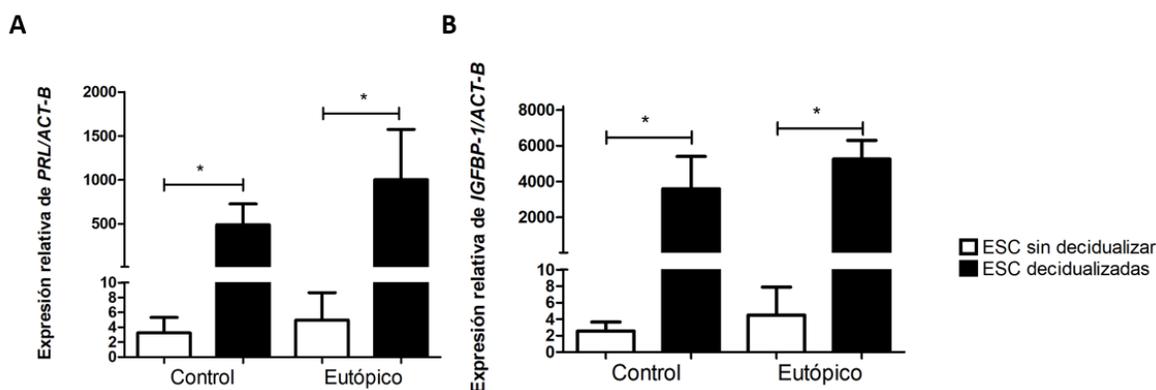


Figura 12. Efecto de tratamientos hormonales en la expresión de genes implicados en la decidualización en células estromales provenientes de tejido eutópico de mujeres control y pacientes con endometriosis. Los tratamientos se realizaron con E2 (10nM), MPA (1 μ M) y AMPc (0.5mM) durante 48h. Cambios en la expresión de *PRL* (A) e *IGFBP-1* (B), utilizando los niveles de expresión del gen *ACT-B* para normalizar. Los valores que se muestran en las figuras son promedios y EEM. *Diferencia significativa para $P < 0.05$. Prueba ANOVA de una vía; prueba post hoc Tukey.

Curva temporal de los niveles de H3K4me3 en la decidualización

Estudios previos han demostrado la capacidad de respuesta de las ESC a los estímulos hormonales, los cuales generan la remodelación de la cromatina de todo el genoma. Por ello, se realizó la evaluación de los niveles de la H3K4me3 en ESC provenientes de una mujer control a 1, 6, 12, 24 y 48 horas (Figura 13) con tratamiento hormonal. Los niveles de la H3K4me3 y H3 presentaron una disminución directamente proporcional al tiempo de incubación con el tratamiento mencionado (Figura 13A). A partir de una hora de tratamiento, se observa la disminución de la H3K4me3 con respecto a la H3 (Figura 13), con una disminución máxima a las 48h de tratamiento hormonal.

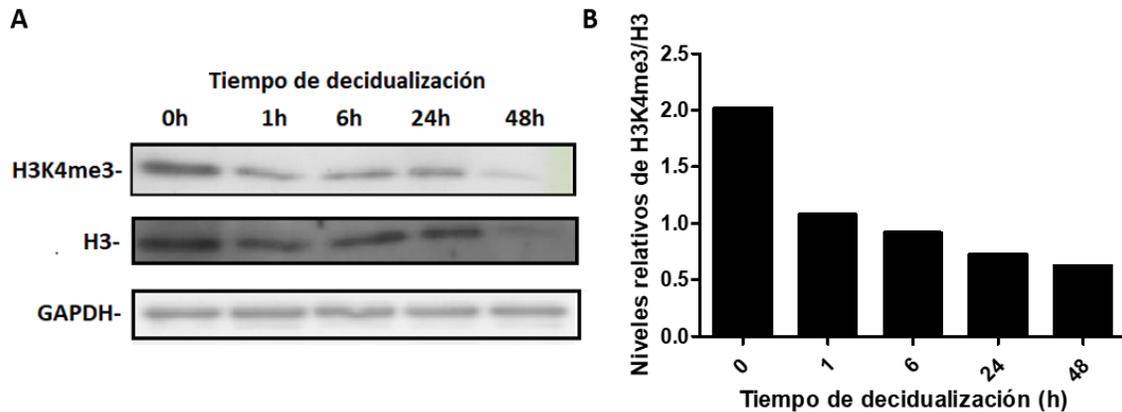


Figura 13. Niveles de trimetilación de la H3K4 en células estromales provenientes de una mujer control en respuesta al tratamiento de decidualización. Los tratamientos se realizaron con E2 (10nM), MPA (1 μ M) y AMPc (0.5mM) a 1, 6, 24 y 48h. A) Western blot representativo de los niveles de la H3K4me3, H3 (total) y GAPDH a 1, 6, 24 y 48 horas de tratamiento hormonal y B) Curva de cambios en los niveles de H3K4me3 normalizado con H3 (total). Los valores que se muestran en las figuras son promedios.

Estudio de los niveles de H3K4me3 en cultivos primarios de ESCs de pacientes con endometriosis y mujeres sin la enfermedad

Se evaluaron los niveles de H3K4me3, H3 y GAPDH en ESC provenientes de endometrio eutópico de 3 mujeres control y 3 pacientes con endometriosis con el tratamiento hormonal de E2 (10nM), MPA (1 μ M), y AMPc (0.5mM) durante 48 horas (Figura 14A), de las cuales previamente se había evaluado por RT-qPCR su capacidad de respuesta al tratamiento hormonal.

Para las ESCd provenientes de las mujeres control se observa que los niveles de la H3K4me3 no presentan un cambio significativo ($P < 0.05$) con respecto a las ESC sin tratamiento de decidualización. Se observa una tendencia a la disminución de los niveles de H3K4me3 a las 48 horas de tratamiento, sin embargo, no presentan un cambio significativo ($P < 0.05$).

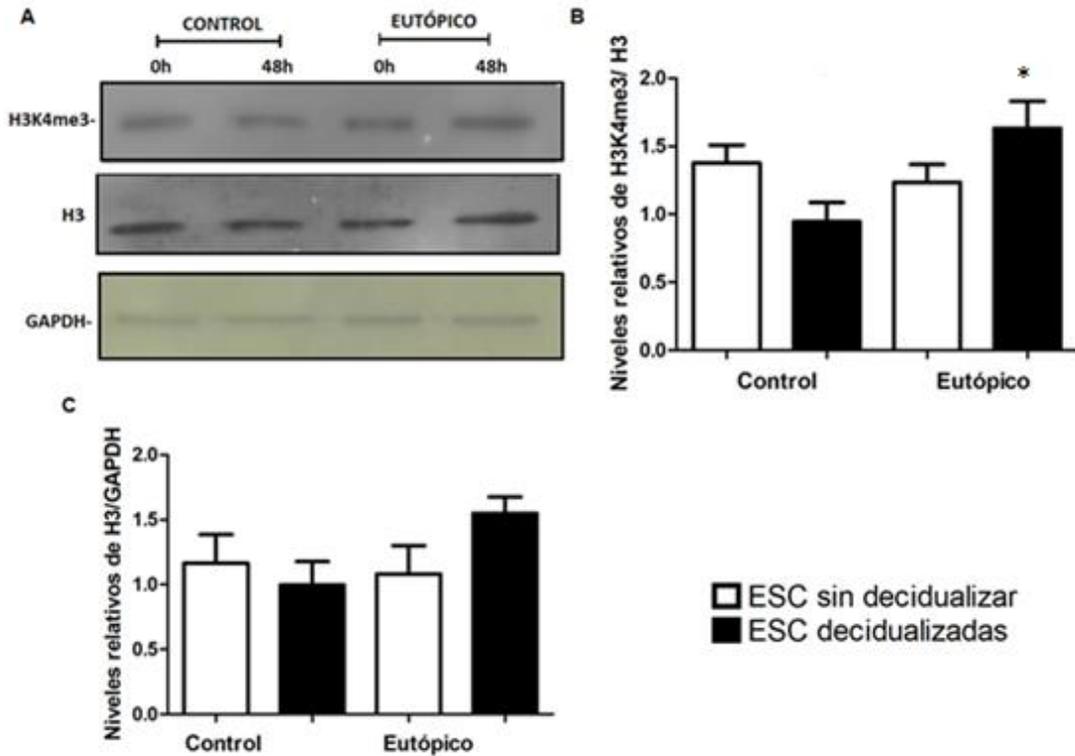


Figura 14. Efecto de la decidualización en los niveles de trimetilación de la H3K4 en células estromales decidualizadas provenientes de mujeres control y mujeres con endometriosis. Los tratamientos se realizaron con MPA (1µM), E2 (10nM) y AMPc (0.5mM) a 48h. A) Western blot representativo de los niveles de la H3K4me3, H3 (total) y GAPDH en ambos grupos de estudio. B) Niveles de H3K4me3 normalizado con H3 (total) a las 48 horas de tratamiento hormonal. C) Niveles de H3 (total) normalizado con GAPDH a las 48 horas de tratamiento hormonal. Los valores que se muestran en las figuras son promedios y EEM. *Diferencias significativas para P<0.05 contra ESCd control. Prueba ANOVA de una vía; prueba post hoc de Tukey.

De la misma manera, se observa que las ESCd de pacientes con endometriosis no presentan un cambio significativo (P<0.05) en los niveles de H3K4me3 con respecto a las ESC en un estado basal, en este caso se observa una tendencia a aumentar, a pesar de ello no hay diferencia significativa (P<0.05) los niveles de esta marca postranscripcional a las 48 horas de tratamiento (Figura 14B). Se observa un aumento significativo (P<0.05) de los niveles de H3K4me3 en ESCd provenientes de pacientes con endometriosis respecto a las ESCd de mujeres control.

En las ESC sin decidularizar se observa que se mantienen los niveles de la H3 de ambos grupos de estudio con respecto a GAPDH. Sin embargo, en las ESC provenientes de pacientes con endometriosis se observa un aumento en los niveles totales de la H3 respecto a GAPDH con el tratamiento hormonal de, 10 nM E2, 1 μ M MPA y 0.5 mM AMPc durante 48 horas, sin embargo, dicho aumento no es estadísticamente significativo (Figura 14C).

8. Discusión

La H3K4me3 es una modificación de histonas conservada evolutivamente como marca de activación transcripcional y está altamente enriquecida en la región promotora de genes transcripcionalmente activos (Hyun *et al.*, 2017). Actualmente se sabe que la aberración de marcas epigenéticas es un factor biológico importante que resulta en la desregulación de la expresión de genes y por lo tanto enfermedades.

Los cambios en la expresión genética durante la diferenciación celular están mediados por mecanismos epigenéticos. Las ESC son capaces de responder ante estímulos hormonales, esta respuesta es potenciada por la remodelación de la cromatina en todo el genoma y es coordinada a través de redes transcripcionales específicas de decidualización (Kato *et al.*, 2018). Entre las modificaciones post-traduccionales que se han visto modificadas por los estímulos hormonales en ECS *in vitro* se encuentran las H3K4me3, H3K27me3 y H3K27ac (Tamura *et al.*, 2014) (Grimaldi *et al.*, 2011). Diversos estudios han demostrado que los defectos en la decidualización están asociados a patologías como la endometriosis y que los mecanismos epigenéticos están involucrados en la fisiopatología de esta enfermedad.

En el presente estudio se evaluaron los niveles totales de la H3K4me3 ante un estímulo hormonal con una mezcla de MPA, E2 y AMPc en ESC provenientes de mujeres control y pacientes con endometriosis.

Los cultivos primarios de ESC se consideraron exitosos cuando presentaron la morfología descrita en la literatura y alcanzaron una confluencia del 80%. Las ECS

obtenidas de pacientes con endometriosis fueron indistinguibles de aquellas de endometrio de mujeres control, lo que nos indica que nuestros cultivos primarios no difieren en morfología microscópica, lo que concuerda con lo reportado en la literatura (Ryan *et al.*, 1994).

Se sabe que, en presencia de una mezcla de las hormonas ováricas progesterona y E2, las ESC experimentan cambios morfológicos y bioquímicos, adquiriendo características de las células estromales decidualizadas (Tabanelli *et al.*, 1992). La adición de AMPc a células ESC tratadas con progesterona tiene un efecto sinérgico para la inducción de la decidualización, en la cual se observa una respuesta a tiempos más cortos respecto a los tratamientos solo con progesterona, debido a que regula positivamente la expresión de genes que contienen regiones promotoras de elementos sensibles a AMPc, como el gen que codifica a PRL (Michalski *et al.*, 2018).

En este trabajo se realizó una curva temporal en ESC tratadas con E2, MPA y AMPc para evaluar la expresión de los genes *PRL* e *IGFBP-1*, los cuales se inducen en respuesta al estímulo de decidualización a partir de una hora (Figura 1), misma respuesta que se observa en trabajos previos (Michalski *et al.*, 2018). En diversos estudios, como el de Beato *et al.*, en 2011, se ha reportado que el efecto hormonal dependiente del PR requiere de varios niveles de organización de la cromatina como prerrequisito para la regulación de la expresión de sus genes blanco. Esta remodelación de la cromatina se da a través de dos ciclos consecutivos esenciales para la activación transcripcional, los cuales se dan en menos de 10 min y se asocian con un aumento en la expresión de los genes blanco de progesterona a partir de 1 hora de tratamiento con dicha hormona (Beato *et al.*, 2011). Por otro lado, la respuesta transcripcional del estímulo con E2 en células MCF-7 se observa a partir de los 40 min, en la cual se recluta la RNA Pol II y cofactores necesarios para la activación transcripcional (Métivier *et al.*, 2003). Por lo tanto, en el presente trabajo se realizaron tratamientos a partir de una hora para evaluar la cinética de inducción de la expresión genética de los marcadores de decidualización. La curva también se realizó a 24 y 48 horas, ya que los estudios *in vitro* en los que se ha

evaluado el efecto de la deciduización sobre las marcas post-traduccionales de histonas han reportado tiempos de exposición hormonal a partir del primer día hasta 14 días de estímulo hormonal (Kato *et al.*, 2018. Tamura *et al.*, 2014).

A pesar de que en esta curva solo se usaron ESC provenientes de una mujer control, se observa que la expresión de *PRL* e *IGFBP-1* se induce desde las 6 horas y se identificó una máxima inducción a las 48 horas. Otros estudios han demostrado una inducción de *PRL* e *IGFBP-1* a partir de las 24 horas con el mismo estímulo (Michalski *et al.*, 2018). Los tratamientos para los posteriores experimentos se realizaron a las 48 horas.

Los tratamientos de E2, MPA y AMPc durante 48 horas mostraron que existe un aumento estadísticamente significativo en la expresión de *PRL* e *IGFBP-1* en las ESCd con respecto a las ESC sin deciduizar, tanto en células obtenidas de endometrio de mujeres control como de pacientes con endometriosis. La inducción de estos genes, *PRL* e *IGFBP-1*, en células aisladas de pacientes con endometriosis no se esperaba, ya que se ha propuesto que la infertilidad en pacientes con endometriosis está asociada con defectos en la deciduización en el endometrio eutópico (Lessey *et al.*, 2011), lo cual a su vez está estrechamente relacionado con la resistencia a la progesterona que está dada por una disminución en el PR en tejido ectópico de mujeres con endometriosis. Sin embargo, se ha reportado en otros estudios que la expresión del PR en el tejido eutópico de pacientes con endometriosis no presenta una reducción tan drástica comparada con la expresión observada en el endometrio ectópico (McKinnon *et al.*, 2018), el cual presenta niveles disminuidos del PR en comparación con el endometrio de mujeres sin la enfermedad, llegando incluso a ser indetectable a nivel de proteína (Bulun *et al.*, 2006). Nuestro resultado concuerda con lo reportado por Tsuno y colaboradores, en el cual no se observaron cambios significativos en los niveles de expresión de *PRL* e *IGFBP-1* en ECS de pacientes con endometriosis con respecto a endometrio de mujeres control, tanto en condiciones basales como después del estímulo de deciduización con MPA y AMPc (Tsuno *et al.* 2009).

A pesar de que no se encontraron cambios en la expresión de *PRL* e *IGFBP-1* después del estímulo de decidualización *in vitro* en las ESC de mujeres con endometriosis con respecto a las ESC de mujeres control, nos sugiere que la respuesta diferencial de las ESC de mujeres con endometriosis podrían estar relacionadas con aberraciones relacionados con las de vías oncogénicas o casadas biosintéticas que favorecen una mayor producción de estrógenos, citocinas, prostaglandinas y metaloproteinasas previamente reportados (Bulun *et al.*, 2019), sin embargo, se requieren de más estudios para confirmar esta observación.

Posteriormente, se realizó una curva temporal de los niveles de H3K4me3 total con un estímulo E2, MPA y AMPc en ESC provenientes de una mujer control, en la cual se observó una disminución en los niveles de esta marca post-traducciona de histona en una forma dependiente del tiempo.

De acuerdo con lo descrito por Tamura y colaboradores, esperábamos un aumento en los niveles de H3K4me3 en ESCd con respecto a las ESC sin decidualizarse, ya que ellos encontraron que el principal cambio en las modificaciones de histonas tras la decidualización es un incremento en los niveles de H3K27ac y H3K4me3 en regiones promotoras proximales y distales de genes relacionados con la decidualización (Tamura *et al.*, 2014). Por el contrario, nuestros resultados muestran una disminución en los niveles totales de H3K4me3, lo cual puede atribuirse a que el proceso de decidualización es un proceso donde se lleva a cabo la diferenciación de las ESC en el que probablemente se reprima la expresión de otros genes que no se requieren durante este proceso (por ejemplo, genes relacionados con la proliferación celular). Considerando que en el estudio mencionado anteriormente donde se encontró un aumento significativo en los niveles de H3K4me3 en genes esenciales para la decidualización, nos sugiere que hay un enriquecimiento de la marca en genes específicos, sin embargo, puede ser que los niveles globales están disminuidos (Tamura *et al.*, 2014). Se ha reportado previamente que después de la inducción de la diferenciación, genes específicos pierden marcas de cromatina bivalente (regiones de cromatina que presentan las marcas H3K4me3/H3K27me3), lo cual depende de que dichos genes se activen durante un proceso específico de

determinación del linaje (Kazakevych *et al.*, 2017). Esto nos sugiere que durante la decidualización se pierde la marca H3K4me3 en estos genes relacionados con diferenciación, y éstos posiblemente se suprimen por el enriquecimiento de la marca de histona H3K27me3. A pesar de que no existen estudios que hayan demostrado esta relación, Grimaldi y col. detectaron miles de regiones en el genoma que presentaron un aumento en los niveles de la H3K27me3 tras la decidualización (Grimaldi *et al.*, 2011). Esta disminución en los niveles de H3K4me3 nos sugiere que la activación de la expresión genética en ESCd está principalmente mediada por otros mecanismos epigenéticos como la modificación post-traduccional H3K27ac o el posicionamiento de la variante H2A.Z, las cuales se ha visto que modulan la diferenciación en otros tipos celulares (Benayoun *et al.*, 2014).

El análisis por Western Blot para los niveles totales de H3K4me3 en ESC tratadas durante 48 horas con E2, MPA y AMPc mostró que en estado basal (sin decidualizar) no existen diferencias significativas en los niveles de H3K4me3 entre las células estromales aisladas de pacientes con endometriosis y aquellas aisladas de mujeres control. Estudios previos han mostrado que existe una disminución en los niveles totales de metilación de la H3K4 en tejido eutópico de pacientes con endometriosis respecto a los niveles en tejido sano (Xiaomeng *et al.*, 2013), por lo que se esperaba que esta marca disminuyera de manera significativa. Probablemente, dicha disminución en los niveles totales de la metilación de H3K4 pudiera deberse principalmente a la mono y dimetilación de la H3K4. Cabe mencionar que los estudios previos donde se han evaluado los niveles totales se realizaron a partir de biopsias de tejido y no en cultivos celulares como en el presente estudio.

Al evaluar los niveles de H3K4me3 en ESCd con respecto a las ESC no decidualizadas de mujeres control, esperábamos que mostrarán una disminución significativa de los niveles de la H3K4me3, tal y como se observó en la figura 13. Aunque se observa una tendencia a que los niveles de esta marca disminuyan después del tratamiento hormonal, no fue comparable con lo obtenido en la figura 14. Lo anterior, pudo deberse a la variabilidad entre las muestras biológicas, por lo

tanto, es necesario ampliar la población de estudio para poder establecer el efecto de la deciduización en nuestro modelo de estudio. Mientras que las ESCd provenientes mujeres con endometriosis se observa una tendencia al enriquecimiento en los niveles de H3K4me3 con respecto a las ESC no deciduizadas.

Contrario a lo esperado, nuestros resultados muestran un aumento en los niveles de la H3K4me3 en ESCd de pacientes con endometriosis con respecto a las ESCd de mujeres control, ya que, de acuerdo con los antecedentes, se esperaba observar una disminución en los niveles totales de H3K4me3 en cultivos primarios de ESC provenientes de pacientes con endometriosis con respecto a mujeres control. Estos hallazgos podrían ser consecuencia de que en la endometriosis existen aberraciones en las enzimas metiltransferasas de lisina (asociadas a un aumento en su actividad y/o expresión) o en las desmetilasas de lisina (asociadas a una disminución en su actividad y/o expresión) que afectan el estado de trimetilación de la H3K4. A pesar de que estas enzimas no han sido estudiadas previamente en endometrio eutópico o ectópico de pacientes con endometriosis, existen reportes de que enzimas encargadas de desmetilar la mono- y dimetilación de la H3K4 se encuentran alteradas en la endometriosis (Sun *et al.*, 2016). Este resultado sugiere que las ESC de pacientes con endometriosis responden de manera diferente a nivel epigenético a los estímulos hormonales que se dan durante la deciduización, respecto a aquellas ESC de mujeres sin la enfermedad. Dicha respuesta diferencial podría explicar en parte las alteraciones que se observan en el desarrollo de la endometriosis, como la expresión aberrante de genes que contribuyen para la invasión, adhesión, proliferación, diferenciación de ESC, supervivencia de la lesión, la producción de sustancias inflamatorias, factores de crecimiento y angiogénesis, los cuales desempeñan un papel importante en la patogénesis de esta enfermedad. Sin embargo, se requiere realizar más estudios del enriquecimiento de la H3K4me3 a nivel gen específico para poder confirmar nuestros hallazgos.

De manera interesante, en nuestro estudio también se observa una disminución de los niveles totales de la H3 en controles posterior al estímulo hormonal.

Considerando que el anticuerpo empleado para reconocer los niveles totales de la H3 utilizado en el presente trabajo no reconoce variantes de la histona H3, dicha disminución podría deberse a que la histona H3 canónica es intercambiada por alguna de sus tres variantes. Diversos estudios en modelos murinos y en humanos han demostrado que la síntesis de la H3.3 se da durante las fases S, G1, G2 y G0; además, esta variante se mantiene durante el proceso de diferenciación en diversos tejidos, lo cual podría explicar la pérdida de la H3 canónica en los cultivos primarios de ESC. Sin embargo, para confirmar estos hallazgos se tendría que realizar un Western Blot usando un anticuerpo específico dirigido contra la H3.3 (Tagami *et al.*, 2004. Schlesinger *et al.*, 2017. Arney, 2004).

Nuestros resultados sugieren que en la transición a la fase secretora podría existir una programación epigenética diferente en las ESC de pacientes con endometriosis debido al aumento en los niveles de H3K4me3 en ESCd de pacientes con endometriosis con respecto a las ESCd de mujeres control, sin embargo, es necesario incrementar la población de estudio para confirmar dichos resultados. También es necesario evaluar el efecto por separado de E2, MPA y AMPc sobre los niveles de la H3K4me3 en ESC de mujeres control y de pacientes con endometriosis para conocer el efecto de cada componente en los niveles totales de dicha modificación post-traducciona, así como conocer los genes enriquecidos con esta marca de activación transcripcional a través de ChIP-seq en el estado fisiológico y patológico.

9. Conclusiones

Los niveles de la H3K4me3 en ESC decidualizadas de mujeres con endometriosis son mayores que en ECS decidualizadas de mujeres control, lo que nos sugiere que las ESC de mujeres con endometriosis responden de manera diferencial al tratamiento hormonal activando mecanismos epigenéticos que no se presentan en ESC provenientes de mujeres control.

10. Referencias

- Al-Asmakh M., 2007. "Reproductive functions of progesterone". *Middle East Fertility Society Journal*, 12, 147-152.
- Arney K., 2004. "Epigenetic aspects of differentiation". *Journal of Cell Science*, 117(19), 4355–4363.
- Barone L., 2007. *Anatomía y fisiología del cuerpo humano*. Argentina: Cultura Librera América, pp 158-62.
- Barrera D., Avila E., Díaz L., 2007. "Immunological role of progesterone in the maintenance of pregnancy". *Revista de investigación clínica*, 59(2), 139-145.
- Barski A., Cuddapah S., Cui K., Roh T., Schonnes D., Wang Z. Wei G., Chepelev I., Zhao K., 2007. "High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome." *Cell*. 129(4), 823-37.
- Beato M., Vicent G., 2012. "Impact of chromatin structure and dynamics on PR signaling. The initial steps in hormonal gene regulation". *Molecular and Cellular Endocrinology*, 357(1-2), 37–42.
- Bebregal P., Sombra B., Santos M., Ventura P., 2010. "Contribution of Epigenetics to Understand Human Development." *Revista Médica Chile*; 138 (1), 366-372.
- Benayoun B., Pollina E., Ucar D., Mahmoudi S., Karra K., Wong E., Bruner E 2014. "H3K4me3 Breadth Is Linked to Cell Identity and Transcriptional Consistency". *Cell*, 158 (1), 673–688.
- Bernstein B., Meissner A., Lander E., 2007. "The Mammalian Epigenome." *Cell*. 128(4), 69-81.
- Bulun S., Chen Y., Yin P., Imir G., Utsunomiya H., Attar E., 2006. "Progesterone resistance in endometriosis: Link to failure to metabolize estradiol." *Molecular and Cellular Endocrinology*, 248(1-2), 94–103
- Bulun S., Monsavais D., Pavone M., Dyson M., Xue Q., Attar E., 2012. "Role of Estrogen Receptor- β , Estrogen Receptor- α , and Progesterone Resistance in Endometriosis." *Seminars in Reproductive Medicine*. 30 (1), 39-45.
- Bulun S., Yilmaz B., Sison C., Miyazaki K., Bernardi L., Lui S., Wei J., 2019. "Endometriosis". *Endocrine Reviews*, 40(4), 1048–1079.
- Costa F., 2008 "Non-coding RNAs, epigenetics and complexity". *Gene*. 410 (1), 9–17.

Chehna-Patel N., Sacdeva G., Gajbhiye R., Warty N., Khole V., 2010. Spot"-ting differences between the ectopic and eutopic endometrium of endometriosis patients". *Fertility and Sterility*, 94(6), 1964–1971.

Christensen J., Agger K., Cloos P., Rose S., Sennels L., ., Hansen K., Salcini A., 2007. "RBP2 Belongs to a Family of Demethylases, Specific for Tri-and Dimethylated Lysine 4 on Histone 3." *Cell*. 128(6),1063-73.

Cloos P., Christensen J., Agger K., Helin K., 2008. "Erasing the Methyl Mark: Histone Demethylases at the Center of Cellular Differentiation and Disease." *Genes and Development*. 22(9), 1115–1140.

Dhamad E., Zhou Z., Zhou J., Du Y., 2016. "Systematic Proteomic Identification of the Heat Shock Proteins (Hsp) That Interact with Estrogen Receptor Alpha (ER α) and Biochemical Characterization of the ER α -Hsp70 Interaction". *PLOS ONE*, 11(8), 160-169.

Dillon S., Xing Z., Cheng X., 2005. "The SET-Domain Protein Superfamily: Protein Lysine Methyltransferases." *Genome Biology*, 6(8), 227-240.

Dunn C., Rodney K., Critchley H., 2003. "Decidualization of the Human Endometrial Stromal Cell: An Enigmatic Transformation." *Reproductive BioMedicine Online*. 7(2), 151–61.

Fazleabas A., Strakova Z., 2002. "Función endometrial: cambios específicos de células en el ambiente uterino". *Endocrinología molecular y celular*, 186 (2), 143–147.

Fox, S. I. (2014). *Fisiología Humana* (14° edición). México: Mc Graw Hill, pp 716-727.

Findlay J., Liew L., Simpson E., Korach K., 2010. "Estrogen Signaling in the Regulation of Female Reproductive Functions." *Handbook of experimental pharmacology* (198), 29–35.

Freeman M., Kanvicska B., Lerant A., Nagy G., 2000. "Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion". *Physiological Reviews*, 80(4), 1523–1631.

Gao J., Mazella J., Tang M., Tseng L., 2014. "Ligand-Activated Progesterone Receptor Isoform HPR-A Is a Stronger Transactivator Than HPR-B for the Expression of IGFBP-1 (Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1) in Human Endometrial Stromal Cells." *Molecular Endocrinology*. 14(12), 1954–61.

Gardener D., Shoback D., 2012. *GREENSPAN Endocrinología básica y clínica* (9° edición). Estados Unidos: Mc Graw Hill, pp. 3-471.

Gellersen B., Brosens J., 2003. "Cyclic AMP and Progesterone Receptor Cross-Talk in Human Endometrium: A Decidualizing Affair." *The Journal of endocrinology*. 178(3), 357–72

Gómez-Vias Y., 2019 "Efecto de la intervención metabólica con metformina sobre la metilación del DNA en el endometrio de mujeres con síndrome de ovario poliquístico" (Tesis de maestría), *Instituto Politécnico Nacional*.

Greer E., Shi Y., 2012. "Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance". *Nature Reviews Genetics*, 13(5), 343–357.

Gregory C., Wilson E., Apparao K., Lininger R., Meyer W., Kowalik A., Fritz M., Lessey B., 2002. "Steroid Receptor Coactivator Expression throughout the Menstrual Cycle in Normal and Abnormal Endometrium." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 87(6), 2960–66.

Grimaldi G., Christian M., Steel J., 2011. "Down-Regulation of the Histone Methyltransferase EZH2 Contributes to the Epigenetic Programming of Decidualizing Human Endometrial Stromal Cells." *Molecular endocrinology*. 25(11), 1892–1903.

Groothuis, P., Dassen H., Romano A., Punyadeera C., 2007. "Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human" *Human Reproduction Update*, 13(4), 405–417.

Handy D., Castro R., Loscalzo J., 2011. "Epigenetic Modifications: Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease." *Circulation*. 123(19),2145-56.

Hayashi A., Tanabe A., Kawabe S., Hayashi M., Yuguchi H., Yamashita Y., Ohmichi M., 2012. "Dienogest increases the progesterone receptor isoform B/A ratio in patients with ovarian endometriosis". *Journal of Ovarian Research*, 5(1), 31.

He J., 2018. "Endometriosis Malignant Transformation: Epigenetics as a Probable Mechanism in Ovarian Tumorigenesis." *International Journal of Genomics*. 134 (1) 1-13.

Holliday R., 2002. "Epigenetics Comes of Age in the Twentyfirst Century." *Journal of Genetics*. 81(1), 1.4.

Howe F., Fischl H., Murray S., Mellor J 2017. "Is H3K4me3 Instructive for Transcription Activation?" *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 39(1), 1–12.

<http://endometriosis.org/>. (2017). *Facts about endometriosis*. Recuperado el 13 de junio de 2019, de <http://endometriosis.org/resources/articles/facts-about-endometriosis/>.

Hyun K., Jeon J., Park J., Kim J., 2017. "Writing, Erasing and Reading Histone Lysine Methylations." *Experimental and Molecular Medicine*. 49(1), e324.

Jividen K., Movassahg M., Jazaeri A., Li H., 2014 "Two Methodos for Establishing Primary Human Endometrial Stromal Cell for HysterectomySpecimens". *Journal of Visualized Experiments*. 87(1), 51513.

Kao L., Germeyer A., ., Yang J., Taylor R., Osteen K., Lessey B. , Giudice L., 2003. "Expression Profiling of Endometrium from Women with Endometriosis Reveals Candidate Genes for Disease. Based Implantation Failure and Infertility." *Endocrinology*. 144(7), 2870-81.

Katoh N., Kuroda K. , Tomikawa J . , Ogata-Kawata H .,2018. "Reciprocal Changes of H3K27ac and H3K27me3 at the Promoter Regions of the Critical Genes for Endometrial Decidualization." *Epigenomics*. 10(9),1-16.

Kazakevych J., Savols S., Messner B., Krienke C., Soshnikova N., 2017. "Dynamic changes in chromatin states during specification and differentiation of adult intestinal stem cells". *Nucleic Acids Research*, 45(10), 5770–5784.

Klemmt P., Carver J., Kennedy., Koninckx L., Mardon H., 2006. "Stromal cells from endometriotic lesions and endometrium from women with endometriosis have reduced decidualization capacity". *Fertility and Sterility*, 85(3), 564–572.

Klemmt P., Starzinski A.. 2018. "Molecular and Cellular Pathogenesis of Endometriosis." *Current women's health reviews*. 14(2), 106–16

Kouzarides T., 2007. "Chromatin Modifications and Their Function." *Cell*. 128(4), 693-705.

Krebs J., Goldstein E., Kilpatrick S.,2014). *Lewin's GENES XI* (11° edición). Estados Unidos de América: JONES & BARTLETT Learning.

Kulp, J., Ramanaiah M., Huhg S., 2016. "Aberrant HOXA10 Methylation in Patients with Common Gynecologic Disorders: Implications for Reproductive Outcomes." *Reproductive sciences*, 23(4), 455–463.

Lee, K., ,Jeong J., Tsai S., Lydon J., DeMayo FJ., 2006. "Molecular Mechanisms Involved in Progesterone Receptor Regulation of Uterine Function." *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 102(1–5), 41–50.

Lessey B., Kin 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.

Marieb E., 2008. *Anatomía y fisiología humana* (9° edición). Estados Unidos: Pearson, pp. 545-547.

Maurer-Stroh S., 2003. "The Tudor Domain 'Royal Family': Tudor, Plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT Domains." *Trends in Biochemical Sciences*. 28(29), 69-74.

McKinnon B., Mueller M., Montgomery G., 2018. "Progesterone Resistance in Endometriosis: an Acquired Property?" *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 29(8), 535–548.

Métivier R., Penot G., Hübner M., Reid G., Brand H., Koš M., Gannon F., 2003. "Estrogen Receptor- α Directs Ordered, Cyclical, and Combinatorial Recruitment of Cofactors on a Natural Target Promoter". *Cell*, 115(6), 751–763.

Michalski S., Chadchan S., Jungheim E., Kommagani R., 2018. "Isolation of Human Endometrial Stromal Cells for In Vitro Decidualization". *Journal of Visualized Experiments*, 139(1), 2-10.

Monteiro J., Colón C., García M., Gutierrez S., Seto E., Flores I., 2014. "Endometriosis Is Characterized by a Distinct Pattern of Histone 3 and Histone 4 Lysine Modifications." *Reproductive sciences*. 21(3), 305–18.

Okada H., Tsuzuki T, Murata H., 2018. "Decidualization of the Human Endometrium." *Reproductive Medicine and Biology*., 17(3), 220–227.

Padabidri V., Daftary S., 2015. *Howking & Bocrin Shaw's Textbook of Gynaecology* (16° edición). India: EL SEVIER. pp 6-10.

Parasa P., Ozcan P., Terry K., 2017. "Endometriosis: Epidemiology, Diagnosis and Clinical Management." *Current obstetrics and gynecology reports*. 6(1), 34–41.

Press F., Udove J., Greene G., 1988. "Progesterone Receptor Distribution in the Human Endometrium. Analysis Using Monoclonal Antibodies to the Human Progesterone Receptor." *The American journal of pathology*. 131(1), 112–24.

Quian C., Zhou M., 2006. "SET Domain Protein Lysine Methyltransferases: Structure, Specificity and Catalysis." *Cellular and Molecular Life Sciences*. 63(23), 2755-63.

Rutanen E., 1998. "Insulin like Growth Factors in Endometrial Function." *Gynecological Endocrinology*. 12(6), 399-406.

Ryan I., Schriock E., Taylor R., 1994. Isolation, characterization, and comparison of human endometrial and endometriosis cells in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 78(3), 642–649.

- Samadieh Y ., Favaedi R ., Ramezanali F ., Afsharian P ., Aflatoonian R ., Shahhoseini M., 2019. "Epigenetic Dynamics of HOXA10 Gene in Infertile Women with Endometriosis." *Reproductive Sciences*. 26(1), 88-96.
- Schlesinger S., Kaffe B., Melcer S., Aguilera J., Sivaraman D., Kaplan T., Meshorer E., 2017. "A hyperdynamic H3.3 nucleosome marks promoter regions in pluripotent embryonic stem cells". *Nucleic Acids Research*, 45(21), 12181–12194.
- Simón C., Horcajadas J., García-Velasco J., Pellicer Martínez A., 2009. *El Endometrio Humano*. España: Editorial Médica Panamericana, pp. 2-5.
- Shilatifard A., 2012. "The COMPASS Family of Histone H3K4 Methylases: Mechanisms of Regulation in Development and Disease Pathogenesis." *Annual review of biochemistry*. 81(1), 65–95.
- Sourial S., Tempest N., Hapangama D., 2014. "Theories on the Pathogenesis of Endometriosis". *International Journal of Reproductica Medicine*, 1-9.
- Strauss J., Barbieri R., 2014. *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology* (7° edición). EL SEVIER.
- Sun Q., Xishi L., Guo S., 2016. "Tranylcypromine, a Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1) Inhibitor, Suppresses Lesion Growth and Improves Generalized Hyperalgesia in Mouse with Induced Endometriosis." *Reproductive biology and endocrinology*:14-17
- Tabanelli S., Tang B., Gurpide E., 1992. "In vitro decidualization of human endometrial stromal cells. J. Steroid" *Biochemistry Molecular Biology* 42(3-4),337–344.
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., Nakatani Y., 2004. "Histone H3.1 and H3.3 Complexes Mediate Nucleosome Assembly Pathways Dependent or Independent of DNA Synthesis". *Cell*, 116(1), 51–61.
- Tamura I., Ohkawa Y., Sato T., 2014. Genome-wide analysis of histone modifications in human endometrial stromal cells. *Molecular Endocrinology* . 28(10), 1656–1669.
- Tenorio F., Simoes M., Teixeira V., Teixeira A., 2015. "Effects of melatonin and prolactin in reproduction: review of literature". *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 61(3), 269–274.
- Teppa A., Dávila J., 2005. "Nuevos aspectos bioquímicos y moleculares de la acción de los estrógenos". *Ginecología Obstetricia México*, 73 (1), 436-42.
- Tsuno A., Nasu K., Yuge A., Matsumoto H., Nishida M., Narahara H. 2009. "Decidualization Attenuates the Contractility of Eutopic and Ectopic Endometrial

Stromal Cells: Implications for Hormone Therapy of Endometriosis". *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(7), 2516–2523.

Tu S., Bulloch E., Yang L., Ren C., Huang W., Hsu P., Tsai M., 2007. "Identification of Histone Demethylases in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Biological Chemistry*. 282 (1), 14262-71.

Valadez-Cosmes P., Germán L., González A., Velasco M. Hansberg V., Camacho-Arroyo I. 2015 "Expresión and Hormonal Regulation of Membrane Progesterone Receptors in Human Astrocytoma Cells". *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 154(1),176-85.

Vercellini, P., Viganò, P., Somigliana, E., Fedele, L., 2013." Endometriosis: pathogenesis and treatment". *Nature Reviews Endocrinology*, 10(5), 261–275.

Verdone L., Agricola E., Caserta M., Di Mauro E., 2006 "Histone acetylation," *Breve Funct Genómica Proteómica*. 5 (3), 209-21

Xiaomeng X., Ming Z., Jiezhi M., Xiaoling F., 2012. "Aberrant histone acetylation and methylation levels in woman with endometriosis." *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 287(3), 487–494.

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

Waddington C., 1942. "The Pupal Contraction as an Epigenetic Crisis in *Drosophila*". *Proceedings of the Zoological Society of London*. A111(3-4).

Zhang T. , Cooper S ., Brockdorff N., 2015. "The Interplay of Histone Modifications - Writers That Read." *EMBO reports*. 16(11), 1467–81.

Zhang T., Kraus W., 2010. "SIRT1-Dependent Regulation of Chromatin and Transcription: Linking NAD⁺ Metabolism and Signaling to the Control of Cellular Functions." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 1804(8),1666–1675.

Zondervan K., 2018. "Endometriosis." *Nature Reviews Disease Primers*. 4(1), 9-25.

11. Cartas de consentimiento informado pacientes y controles

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. 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 58 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 de la lesión producto de la endometriosis que le remuevan por indicaciones del médico. El fragmento tendrá que ser tomado, aproximadamente, entre el día 7 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.

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.

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: Este estudio no tiene ningún costo para usted.

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. 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. Debido al tipo de estudios que se realizarán no será posible recuperar ninguna parte de la muestra. 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 no serán utilizadas para ninguna otra investigación.

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



México, D.F. a ____ de _____ de _____

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (CONTROLES)

TEXTO INFORMATIVO

Nombre del proyecto de investigación: Impacto de la organización tridimensional del genoma en la patogénesis de la endometriosis.

Num. Registro: 300020209-03-16

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. 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 58 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 7 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 a esta información. Los resultados derivados del estudio podrán ser presentados en congresos científicos, informes y/o publicaciones nacionales y/o internacionales.

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: Este estudio no tiene ningún costo para usted.

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. Debido al tipo de estudios que se realizarán no será posible recuperar ninguna parte de la muestra. 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 no serán utilizadas para ninguna otra investigación.

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