



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA**

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“Expresión proteica y regulación por estradiol y progesterona
de Wnt-7a y Wnt-5a en tres regiones de útero con miomatosis”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA

CELSO DIÓGENES RAMÍREZ PALACIOS

Directoras de Tesis:

**DRA. CLAUDIA CAMELIA CALZADA MENDOZA
DRA. GISELA GUTIERREZ IGLESIAS**

México, D.F., Noviembre de 2011



SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 12:00 horas del día 28 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESM para examinar la tesis titulada:

“Expresión proteica y regulación por estradiol y progesterona de Wnt-7^a y Wnt-5^a en tres regiones de útero con miomatosis”

Presentada por el alumno:

Ramírez

Apellido paterno

Palacios

Apellido materno

Celso Diógenes

Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	2	0	6	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias de la Salud

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

CALZADA MENDOZA
 CLAUDIA CAMELIA

Dra. Claudia Camelia Calzada
 Mendoza

Dra. Gisela Gutiérrez Iglesias

Dra. Rosa Adriana Jarillo Luna

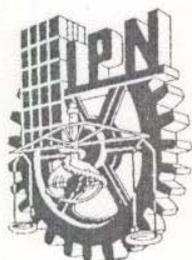
M. en C. María Elena Reyes Gutiérrez

Dr. José Rubén García Sánchez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Eleazar Lara Padilla





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **México** el día **30** del mes **Mayo** del año **2011**, el que suscribe **Celso Diógenes Ramírez Palacios** alumno del Programa de **Maestría en Ciencias de la Salud** con número de registro **B092066** adscrito a **La Escuela Superior De Medicina**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Claudia Camelia Calzada Mendoza y Dra. Gisela Gutiérrez Iglesias** y cede los derechos del trabajo intitulado **“Expresión proteica y regulación por estradiol y progesterona de Wnt-7^a y Wnt-5^a en tres regiones de útero con miomatosis”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección diogenes-onco.gin1@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Celso Diógenes Ramírez Palacios

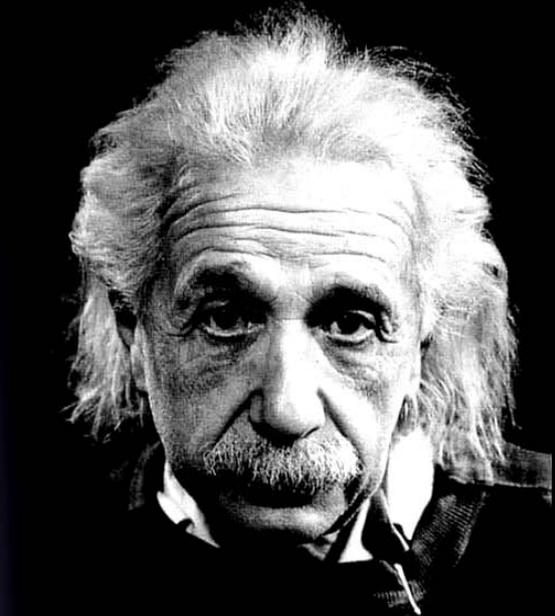
Nombre y Firma

INSTITUCIONES, HOSPITALES Y AREAS PARTICIPANTES

- El presente trabajo de investigación fue realizado en las instalaciones de los laboratorios de Señalización Intracelular y de Biología Molecular, en el edificio de graduados, de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la D. en C. Claudia Camelia Calzada Mendoza y de la D. en C. Gisela Gutiérrez Iglesias.
- Participaron también la División de Ginecología y Obstetricia y el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de la Mujer de la Secretaría de Salud.

“Everything should be made
as simple as possible,
but not simpler.”

Albert Einstein



AGRADECIMIENTOS

Este sitio para dar las gracias es para mí muy especial porque me brinda la oportunidad de demostrar mi agradecimiento a todos los que han formado parte de este trabajo.

Primero quiero agradecer a la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional por haberme aceptado como alumno en sus aulas.

En el ámbito Politécnico mi agradecimiento especial para la D. en C. Claudia C. Calzada Mendoza y para la D. en C. Gisela Gutiérrez Iglesias por todo el tiempo que me han dedicado y el conocimiento que me han transmitido durante el desarrollo de la presente investigación.

También he de agradecer a los integrantes de mi Comité Tutorial, la D. en C. Rosa Adriana Jarillo Luna, el D. en C. José Rubén García Sánchez y la MISS María Elena Reyes Gutiérrez por sus valiosas opiniones en el aula y durante los Seminarios de Investigación.

Mi agradecimiento para Dra. Vanessa Tijero Méndez, Dra. Gabriela Lugo Martínez, Dra. Elia Adriana del Moral Laguna y Dr. Said Fernández Hernández, jóvenes investigadores que colaboran con tanto entusiasmo en el laboratorio de señalización intracelular con la dirección de la Dra. Claudia Calzada Mendoza. Y no faltaré en agradecer a todos los Profesores de las distintas asignaturas cursadas durante la Maestría; y a mis compañeros de curso, por supuesto he de agradecerles su camaradería y valiosas observaciones.

En el Hospital de la Mujer de la Secretaria de Salud mi agradecimiento para las doctoras Georgina Guerrero Ambriz, Angélica Flores Martínez, María de la Luz Linares Pérez, los doctores Enrique Medina Herrera, Sergio Martínez Arroyo y a mis compañeros de la Unidad Tocoquirúrgica, los doctores Delfino Cruz Cruz, Eric García Morales, Jesús Prado Alcázar y Héctor Peña Dehesa.

Pero una tesis va más allá de las paredes de los laboratorios y las aulas. Quiero agradecer a mi familia pues su confianza en mí y mis posibilidades me ha acompañado muchos años. Éste es un logro más que me han ayudado a conseguir.

En resumen, Ustedes ya saben que este trabajo es de todos.

GRACIAS.

DEDICATORIA

Por supuesto:



Para mi esposa Guadalupe, el ser humano más hermoso que he conocido y para mi hijo Guillermo, que camina firme en su crecimiento personal y que seguramente será el Médico que sueña ser.

Con todo mi amor.

ÍNDICE TEMÁTICO

RELACIÓN DE TEMAS	PÁGINA
Índice temático.....	8
Índice de tablas y figuras.....	10
Abreviaturas.....	12
Glosario.....	14
Resumen.....	23
Abstract.....	24
1. Marco teórico.....	25
1.1 Miomatosis uterina.....	25
1.1.1 Definiciones y Conceptos.....	25
1.1.2 Epidemiología.....	26
1.1.3 Clasificación.....	28
1.1.3.1 Histopatología.....	28
1.1.3.2 Localización y topografía.....	28
1.1.3.3 Tamaño.....	30
1.1.3.4 Sintomatología.....	31
1.1.4 Etiopatogenia y dependencia hormonal de los miomas.....	32
1.1.4.1 Estrógenos.....	32
1.1.4.1.1 Efectos genómicos y no genómicos de los estrógenos.....	34
1.1.4.2 Progesterona.....	39
1.1.4.2.1 Efectos genómicos de la progesterona.....	41
1.1.4.2.2 Efectos no genómicos de la progesterona.....	41
1.1.4.2.3 Convergencia de vías genómicas y no genómicas.....	41
1.1.4.3 Vía de señalización Wnt/beta-catenina.....	43
1.1.4.4 Fulvestrant.....	49
1.1.4.5 Mifepristona.....	51
2. Planteamiento del problema.....	53
3. Pregunta de investigación.....	54
4. Justificación.....	54
5. Hipótesis.....	55
6. Objetivos.....	55
6.1 Objetivo general.....	55
6.2 Objetivos particulares.....	55
7. Diseño Metodológico.....	56
7.1 Tipo de estudio.....	56
7.2 Ubicación temporal y espacial, universo y población.....	56
7.3 Criterios de selección.....	56

7.3.1 Criterios de inclusión.....	56
7.3.2 Criterios de no inclusión.....	56
7.3.3 Criterios de exclusión.....	57
7.3.4 Criterios de eliminación.....	57
7.4 Descripción operativa del estudio.....	57
7.5 Tamaño de muestra.....	58
7.6 Definición de variables.....	59
7.6.1 Variables independientes.....	59
7.6.1.1 Localización del tejido de estudio.....	59
7.6.1.2 Fase del ciclo menstrual.....	59
7.6.2 Variables dependientes.....	59
7.6.2.1 Expresión proteica y del gen de Wnt-7a y de Wnt-5a.....	59
8. Material y métodos.....	59
8.1 Metodología de laboratorio.....	59
8.1.1 Análisis de la expresión de las proteínas Wnt-7a y Wnt-5a.....	59
8.1.1.1 Western blot.....	59
8.1.1.2 Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	61
8.1.1.2.1 Extracción de RNA de biopsia de tejido.....	61
8.1.1.2.2 Cuantificación de RNA y electroforesis.....	61
8.1.1.2.3 Protocolo de RT-PCR.....	61
8.1.1.2.4 Transcripción reversa. Síntesis de DNA complementario (cDNA).....	61
8.1.1.2.5 Diseño de iniciadores.....	62
8.1.1.2.5.1 “Primers”	62
8.1.1.3 Inmunohistoquímica.....	63
9. Resultados.....	64
9.1 Características generales y epidemiológicas de las pacientes.....	64
9.2 Expresión de Wnt-5a y Wnt-7a por inmunoblot.....	66
9.3 Expresión de Wnt-5a y Wnt-7a por inmunohistoquímica.....	67
9.4 Expresión del gen de Wnt-7a y Wnt-5a.....	68
10. Discusión.....	71
10.1 Características general de las pacientes.....	71
10.2 Análisis proteica y del gen de Wnt-7a y Wnt-5a.....	73
11. Conclusiones.....	79
12. Bibliografía.....	80
13. Anexos.....	89
13.1 Anexo 1: Autorización por hospital sede.....	89
13.2 Anexo 2: Control de muestras.....	90
13.3 Anexo 3: Consentimiento informado (texto).....	91
13.4 Anexo 4: Consentimiento informado (formato para firmas).....	94

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1. Clasificación histopatológica de los miomas	28
Tabla 2. Localización y topografía de los miomas	29
Tabla 3. Clasificación de Wamsteker y Block de los miomas	29
Tabla 4. Clasificación de Labastida de los miomas	30
Tabla 5. Cuadro clínico de la miomatosis uterina	31
Tabla 6. Características generales y epidemiológicas de las pacientes	65
Tabla 7. Índice de masa corporal de las pacientes estudiadas	66
Tabla 8. Clasificación de la fase endometrial	66

FIGURAS

Fig. 1. Tipos de miomas por localización, número y tamaño	26
Fig. 2. Esquema de la clasificación de Wamsteker y Block de los miomas	30
Fig. 3. Esquema de la clasificación de Labastida de los miomas	31
Fig. 4. Biosíntesis de hormonas esteroideas	33
Fig. 5. Dominios funcionales del receptor de estrógenos	34
Fig. 6. Efectos genómicos del receptor nuclear de estrógenos	35
Fig. 7. Efectos no genómicos del receptor de membrana de estrógenos	36
Fig. 8. Estructura del estradiol	38
Fig. 9. Estructura de la progesterona	39
Fig. 10. Dominios funcionales del receptor de progesterona	40
Fig. 11. Mecanismos de acción de la progesterona	43
Fig. 12. Esquema de las dos vertientes no canónicas de la vía WNT	46
Fig. 13. Vía Wnt canónica	47
Fig. 14. La vía Wnt en el núcleo	48
Fig. 15. Estructura de fulvestrant	50
Fig. 16. Estructura de mifepristona	51
Fig. 17. Expresión de Wnt-5a y Wnt-7a por Inmunoblot	67
Fig. 18. Expresión de Wnt-5a y Wnt-7a por Inmunohistoquímica	68

Fig. 19. Electroforesis que muestra la integridad del RNA	68
Fig. 20. Expresión génica de Wnt-5a en fase secretora del ciclo menstrual	69
Fig. 21. Expresión de Wnt-7a en fase secretora del ciclo menstrual	69
Fig. 22. Expresión de Wnt-5a en fase proliferativa del ciclo menstrual	69
Fig. 23. Expresión de Wnt-7a en fase proliferativa del ciclo menstrual	70

ABREVIATURAS

17-β-HSD:	17- β -Hidroxiesteroide-deshidrogenasa
ADN:	ácido desoxirribonucleico
APC:	proteína de la poliposis adenomatosa coli
Bcl-2:	oncogen Bcl-2
Ca⁺²:	ion calcio
CaMKII:	cinasa II dependiente de calmodulina y Ca ⁺²
Cer1:	proteínas cerberus 1
c-myc:	oncogen c-myc
DHEA:	dehidroepiandrosterona
DHEAS:	sulfato-dehidroepiandrosterona
Dkk:	proteínas Dkkopf
Dvl:	proteínas Disheveled
E₁:	estrona
E₂:	17 β -estradiol
E₃:	estriol
EGF:	factor de crecimiento epidérmico
ER:	receptor de estrógenos
ERα:	receptor de estrógenos tipo alfa
ERβ:	receptor de estrógenos tipo beta
FZD:	genes Frizzled
Fzd:	proteínas Frizzled
GAP:	proteína asociada al crecimiento

GSK-3α:	cinasa-sintasa de glucógeno 3 alfa
GSK3β:	cinasa-sintasa de glucógeno 3 beta
HDACS:	desacetilasas de histonas
ICI-182780:	fulvestrant
IGF:	factor de crecimiento tipo insulina
Krm:	proteínas Kremens
LEF/TCF:	factor de transcripción LEF/TCF
LRP:	proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad
MAPK:	proteína cinasa activada por mitógenos
mRNA:	ácido ribonucleico mensajero
P53:	proteína p53
PDGF:	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI-3-K:	fosfatidilinositol-3-cinasa
PKC:	proteína cinasa C
PLC:	fosfolipasa C
PR-A:	receptor de progesterona tipo A
PR-B:	receptor de progesterona tipo B
RU-486:	mifepristona
sFRP:	proteínas secretadas relacionadas a Frizzled
TGF-β1:	factor de crecimiento transformante β 1
TGF-β3:	factor de crecimiento transformante β 3
TNFα:	factor de necrosis tumoral α
VEGF:	factor de crecimiento del epitelio vascular

GLOSARIO

Andrógenos: son hormonas sexuales que corresponden a la testosterona, la androsterona y la androstenediona. Los andrógenos son hormonas esteroideas derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno; su función principal es estimular el desarrollo de los caracteres sexuales masculinos. Son segregados por los testículos, pero también por los ovarios en la mujer (androstenediona) y por la corteza de las glándulas suprarrenales (dihidroepiandrosterona). En el hombre sólo el 10% de los andrógenos tiene origen suprarrenal (Speroff, 2007).

Angiogénesis: es el proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos preexistentes. Es un fenómeno normal durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y en la cicatrización de las heridas. También es un proceso fundamental en la transformación maligna del crecimiento tumoral (Sánchez, 2001).

Apoptosis: es una forma de muerte celular, que está regulada genéticamente. La muerte celular programada es parte integral del desarrollo de los tejidos tanto de plantas como de animales pluricelulares. En animales, la forma de muerte celular programada más común es la "apoptosis". Cuando una célula muere por apoptosis, empaqueta su contenido citoplasmático, lo que evita que se produzca la respuesta inflamatoria característica de la muerte accidental o necrosis. En lugar de hincharse o reventar y derramar su contenido intracelular dañino enzimático hacia el espacio extracelular, las células en proceso de apoptosis y sus núcleos se encogen, y con frecuencia se fragmentan conformando vesículas pequeñas que contienen el material citoplasmático. De esta manera, pueden ser eficientemente englobadas vía fagocitosis y, consecuentemente, sus componentes son reutilizados por macrófagos o por células del tejido adyacente (www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash).

Aromatasas: son enzimas de la superfamilia del citocromo P450, cuya función es la de aromatizar los andrógenos produciendo estrógenos (estradiol a partir de la testosterona y estrona a partir de la androstenediona). Este proceso es un importante factor en el desarrollo sexual. Las proteínas del citocromo P450 son monooxigenasas que poseen como función la catálisis de algunas reacciones en la síntesis de colesterol, los esteroideos y otros lípidos. Estas proteínas se encuentran en el retículo endoplasmático de las células y catalizan los últimos pasos de la biosíntesis de los estrógenos (Speroff, 2007).

Autocrino: El término liberación autocrina se aplica a un tipo de secreción química que afecta a la misma célula que secretó la sustancia. Los receptores para la sustancia secretada están sobre la misma célula que la sintetizó. La liberación autocrina es un tipo de comunicación celular que emplea mensajeros químicos (Speroff, 2007).

Carcinoma: es una forma de cáncer que tiene su origen en células de tipo epitelial o glandular. Los dos grandes grupos son los carcinomas epidermoides y los adenocarcinomas y constituyen el tipo más común de cáncer. Lugares comunes de carcinomas son la piel, la boca, el pulmón, las mamas, el estómago, el colon, el útero y el pene (Schorge, 2008).

Climaterio: es un periodo de transición que se prolonga durante años, antes y después de la menopausia, como consecuencia del agotamiento ovárico, asociado a una disminución en la producción de estrógenos y que pierde con los años la capacidad para producir hormonas, folículos y ovocitos; suele confundirse con la menopausia, que es la última menstruación (Schorge, 2008).

Cromosoma: del griego χρώμα - *chroma*, color y σῶμα, - *soma*, cuerpo o elemento; se llama así a cada uno de los pequeños cuerpos en forma de bastoncillos en que se organiza la cromatina del núcleo celular durante las divisiones celulares. La cromatina es un material microscópico que lleva la información genética de los organismos eucariotas y está constituida por ADN asociado a proteínas llamadas histonas (Lodish, 2000).

Desacetilasas: pertenecen a enzimas que, junto con las acetilasas, metilasas y desmetilasas de histonas, llevan a cabo las funciones de modificar a las histonas. Las histona deacetilasas (o HDAC) son un tipo de enzimas implicadas en la eliminación de los grupos acetilo de los residuos de lisina en las histonas. Esta actividad enzimática es la opuesta de la que llevan a cabo las histona acetiltransferasas (HAT). Las HDAC también son referidas como lisina deacetilasas (KDAC), con el fin de describir de un modo más preciso tanto su diana como su función, lo que incluye numerosas proteínas no histonas (Choudhary, 2009).

Electroforesis en gel: es un grupo de técnicas empleadas para separar moléculas basándose en propiedades como el tamaño, la forma o el punto isoeléctrico. La electroforesis en gel se utiliza generalmente con propósitos analíticos, pero puede ser una técnica preparativa para purificar moléculas parcialmente antes de aplicar espectrometría de masas, PCR, clonación o secuenciación de ADN (Bandow, 2008).

Electroforesis: es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico. La separación puede realizarse sobre la superficie hidratada de un soporte sólido (electroforesis en papel o en acetato de celulosa), o bien a través de una matriz porosa (electroforesis en gel), o bien en disolución (electroforesis libre). Dependiendo de la técnica que se use, la separación obedece en distinta medida a la carga eléctrica de las moléculas y a su masa (Bandow, 2008).

Embriogénesis: es el proceso que se inicia tras la fertilización de los gametos para dar lugar al embrión, en las primeras fases de desarrollo de los seres vivos pluricelulares. En el ser humano este proceso dura unas ocho semanas, momento a partir del cual el producto de la concepción acaba su primera etapa de desarrollo y pasa a denominarse feto (Sadler, 2004).

Endocrino: El sistema endocrino o endócrino es un sistema de glándulas que segregan un conjunto de sustancias llamadas hormonas que, liberadas al torrente sanguíneo, regulan las funciones del cuerpo. Es un sistema de señales similar al del sistema nervioso, pero en este caso, en lugar de utilizar impulsos eléctricos a distancia, funciona exclusivamente por medio de sustancias (señales químicas) (Speroff, 2007).

Endometrio: es la mucosa que recubre el interior del útero y consiste en un epitelio simple prismático con o sin cilios, glándulas y un estroma rico en tejido conjuntivo y altamente vascularizado. Su función es la de alojar al cigoto o blastocisto después de la fecundación, permitiendo su implantación. Es el lugar donde se desarrolla la placenta y presenta cambios cíclicos en sus glándulas y vasos sanguíneos durante el ciclo menstrual en preparación para la implantación del embrión humano (Schorge, 2008).

Endometriosis: consiste en la aparición y crecimiento de tejido endometrial funcional fuera de la cavidad uterina, sobre todo en la cavidad pélvica, como en los ovarios, detrás del útero, en los ligamentos uterinos, en la vejiga urinaria o en el intestino. Es menos frecuente que la endometriosis aparezca fuera del abdomen como en los pulmones o en otras partes del cuerpo. La endometriosis es una enfermedad relativamente frecuente, que puede afectar a cualquier mujer en edad fértil, desde la menarquia hasta la menopausia, aunque algunas veces, la endometriosis puede durar hasta después de la menopausia (Schorge, 2008).

Esterilidad: es una cualidad atribuible a aquellas personas u otros organismos biológicos que no se pueden reproducir, bien sea debido al mal funcionamiento

de sus órganos sexuales o a que sus gametos son defectuosos. Las causas de la esterilidad son diversas y varían en función del sexo (Speroff, 2007).

Estrógenos: son hormonas sexuales esteroideas derivadas todas ellas del ciclopentanoperhidrofenantreno, producidas principalmente por los ovarios y, en menores cantidades, por las glándulas adrenales (Speroff, 2007).

Estroma: El concepto de estroma alude al tejido (células y elementos extracelulares) que cumple función cohesiva de otros tipos tisulares de un organismo pluricelular. Es parte importante de la histoarquitectura de un órgano. Clásicamente se considera al estroma como el tejido de sostén o soporte del tejido que cumple la función específica de un órgano. Éste último está formado por células que forman el tejido denominado "parénquima". Estos conceptos están basados en épocas pretéritas de la Histología (con una visión morfológica más que funcional), cuando al tejido conectivo se le asignaba solamente las funciones de sostén y cohesividad, dadas por el desconocimiento de "otras funciones" del tejido conectivo. Actualmente las interacciones estroma-parénquima están siendo investigadas, y se entiende que sin tales interacciones (colaboración morfofisiológica) tanto el parénquima como el estroma pierden su especificidad. Aislados uno del otro, en medios de cultivo tisular, pierden sus características típicas y sobreviven poco tiempo. Así, hoy en día, se entiende que el estroma es tan funcional como el parénquima y no solamente un componente de sostén (Ross, 2006).

Folículos ováricos: son las unidades básicas de la biología reproductiva femenina. Consisten en una acumulación de células haploides que son toscamente esféricas y que se encuentran en el interior del ovario, rodeando un ovocito. Estas estructuras se activan periódicamente e inician el proceso de crecimiento y desarrollo para culminar, generalmente, en la ovulación de un solo ovocito viable. Estos ovocitos son envueltos por una capa de células granulosas encerradas en una matriz extracelular - la membrana folicular principal o lámina basal - que constituye el folículo ovárico (Speroff, 2007).

Gemelos dicigóticos: son los que se originan por fecundación separada, y más o menos simultánea, de dos óvulos por dos espermatozoides. Los individuos resultantes son diversamente llamados gemelos dicigóticos, gemelos bivitelinos, gemelos no idénticos o gemelos fraternales. Su grado de identidad genética no es mayor que en dos hermanos nacidos de gestaciones separadas y comparten estadísticamente el 50 % de sus genes (Gilbert, 2006).

Gemelos monocigóticos: es el caso en que un embrión originado en una fecundación típica, a partir de un único óvulo y un único espermatozoide, se

escinde accidentalmente en dos durante las primeras fases de su desarrollo, en un proceso que debe biológicamente considerarse de multiplicación asexual. El resultado puede llegar a consistir en dos embriones viables, llamados gemelos monocigóticos o gemelos univitelinos, por derivar de un solo cigoto, o gemelos idénticos, porque coinciden en todos sus rasgos (Gilbert, 2006).

Gen: es considerado como la unidad de almacenamiento de información genética y unidad de herencia al transmitir esa información a la descendencia. Los genes se disponen a lo largo de ambas cromátides de los cromosomas ocupando en el cromosoma una posición determinada llamada *locus*. El conjunto de genes de una especie, y por tanto de los cromosomas que los componen, se denomina genoma. Gen también es la secuencia organizada de nucleótidos en la molécula de ADN (o ARN en el caso de algunos virus), que contiene la información necesaria para la síntesis de una macromolécula con función celular específica, normalmente proteínas, pero también ARNm, ARNr y ARNt (Lodish, 2000).

Glicoproteínas: son moléculas compuestas por una proteína unida a uno o varios hidratos de carbono, simples o compuestos. Tienen entre otras funciones el reconocimiento celular cuando están presentes en la superficie de las membranas plasmáticas (glucocálix). El término glicoproteína se usa en general para referirse a una molécula de dimensiones específicas, integrada normalmente por uno o más oligosacáridos unidos de modo covalente a cadenas laterales específicas de polipéptidos.

Hipotálamo: del griego ὑπό, *ypó*: 'debajo de', y θάλαμος, *thálamos*: 'cámara nupcial, dormitorio', es una glándula endocrina que forma parte del diencefalo, y se sitúa por debajo del tálamo. Libera al menos nueve hormonas que actúan como inhibidoras o estimulantes en la secreción de otras hormonas en la adenohipófisis, por lo que se puede decir que trabaja en conjunto con ésta. Suele considerarse el centro integrador del sistema nervioso vegetativo (o sistema nervioso autónomo), dentro del sistema nervioso periférico. También se encarga de realizar funciones de integración somatovegetativa.

Histerectomía: del griego ὑστέρα *hystera* "útero" y εκτομία *ektomia* "sacar por corte", es la extracción del útero o matriz, por medio de una intervención quirúrgica (Schorge, 2008).

Histeroscopia: es un procedimiento clínico que le permite a un ginecólogo ver el interior del útero por medio de una endoscopia. Este procedimiento puede realizarse con fines de diagnóstico o para tratamientos de patologías intrauterinas y como método de intervención quirúrgica (Schorge, 2008).

Histonas: son proteínas básicas, de baja masa molecular, muy conservadas evolutivamente entre los eucariotas y en algunos procariotas. Forman la cromatina junto con el ADN, sobre la base de unas unidades conocidas como nucleosomas. En los seres humanos hay cinco tipos principales: la histona H1 y las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (Choudhary, 2009).

Menopausia: del griego *mens*, que significa "mensualmente", y *pausi*, que significa "cese" se define como el cese permanente de la menstruación y tiene correlaciones fisiológicas, con la declinación de la secreción de estrógenos por pérdida de la función folicular ovárica. Es un paso dentro de un proceso lento y largo de envejecimiento reproductivo, llamado climaterio (Speroff, 2007).

Mioma: es un tumor benigno que crece en el tejido muscular del útero o miometrio en las mujeres. Sólo un 0,5 % de los miomas se convierten en tumores malignos (sarcomas). Se estima que aproximadamente una de cada cuatro a cinco mujeres de más de 35 años de edad padecen de este tipo de tumor (Schorge, 2008).

Paracrino: la liberación paracrino se refiere a un tipo de secreción química que afecta a una célula vecina a la célula emisora. La sustancia secretada difunde en dirección de los receptores específicos sobre las células adyacentes a la célula que la sintetizó. Es un tipo de comunicación celular que emplea mensajeros químicos (Speroff, 2007).

Progesterona: es una de las hormonas sexuales esteroideas que se desarrollan en la pubertad y en la adolescencia en el sexo femenino; actúa principalmente durante la segunda fase del ciclo menstrual, frenando los cambios endometriales proliferativos que inducen los estrógenos y estimulando los cambios secretorios, preparando así al endometrio para la implantación del embrión. Estos efectos también ocurren en la mama. La progesterona también se encarga de engrosar y mantener sujeto al endometrio en el útero y al disminuir sus niveles sanguíneos, el endometrio se desprende, produciendo la menstruación (Speroff, 2007).

Proteólisis: es el proceso de degradación de proteínas. Ocurre mediante enzimas específicas, llamadas proteasas (Lodish 2000).

Proteosoma o proteasoma: es un complejo proteico grande presente en todas las células eucariotas y Archaea, así como en algunas bacterias, que se encarga de realizar la degradación de proteínas (proteólisis) no necesarias o dañadas. En las células eucariotas los proteosomas suelen encontrarse en el núcleo y en el citoplasma. Los proteosomas representan un importante

mecanismo por el cual las células controlan la concentración de determinadas proteínas mediante la degradación de las mismas. Las proteínas a ser degradadas son marcadas por una pequeña proteína llamada ubiquitina, posteriormente mediante la enzima ubiquitina ligasa, se agregan más proteínas de ubiquitina dando como resultado la formación de una cadena poliubiquitínica que le permite al proteasoma identificar y degradar la proteína (Lodish, 2000).

Reacción en cadena de polimerasa: conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde. Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad, virus o bacterias causantes de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado. Estos usos derivados de la amplificación han hecho que se convierta en una técnica muy extendida (Lodish, 2000).

Retrotranscriptasa: o transcriptasa inversa, o transcriptasa reversa, es una enzima de tipo ADN-polimerasa, que tiene como función sintetizar ADN de doble cadena utilizando como molde ARN monocatenario, es decir, catalizar la retrotranscripción o transcripción inversa. Esta enzima se encuentra presente en los retrovirus. Su nombre obedece a que el proceso normal de la transcripción, la que se puede llamar "directa", codifica el ARN a partir de la secuencia inicial de ADN, y no al revés. Una forma sencilla de síntesis de ADN de doble cadena a partir de transcriptasa inversa, también llamada ADN/ARN-polimerasa dirigida, sería partir de un cebador cola de poli-T que establecería bases complementarias con la cola de poli-A del ARN transcrito de la hebra que se va a sintetizar, lo que forma un híbrido ARN/ADN. Dicho híbrido podría separarse mediante ribonucleasas, y después, con la acción de una ADN-polimerasa y un nuevo cebador, ser completada la hebra de ADN de doble cadena. En la biología molecular y la bioquímica, la transcriptasa inversa, también conocida como ADN polimerasa dependiente de ARN, es una enzima ADN polimerasa que transcribe una sola cadena de ARN en una sola cadena de ADN. También ayuda en la formación de una doble hélice de ADN una vez que el ARN ha experimentado una transcripción inversa en una sola cadena de cDNA. La transcripción inversa implica la síntesis de ADN a partir del ARN (Lodish, 2000).

Termociclador: también conocido como máquina de PCR o reciclador térmico de PCR; es un aparato usado en biología molecular que permite realizar los

ciclos de temperaturas necesarios para una reacción en cadena de la polimerasa de amplificación de ADN o para reacciones de secuencia con el método de Sanger (Sanger, 1977).

Traducción genética: es el segundo proceso de la síntesis proteica (parte del proceso general de la expresión génica). La traducción ocurre en el citoplasma, donde se encuentran los ribosomas. Los ribosomas están formados por una subunidad pequeña y una grande que rodean al ARNm. En la traducción, el ARN mensajero se decodifica para producir un polipéptido específico de acuerdo con las reglas especificadas por el código genético. Es el proceso que convierte una secuencia de ARNm en una cadena de aminoácidos para formar una proteína. Es necesario que la traducción venga precedida de un proceso de transcripción. El proceso de traducción tiene cuatro fases: activación, iniciación, elongación y terminación (Lodish, 2000).

Transcripción genética: constituye el primer proceso de la expresión génica, mediante el cual se transfiere la información contenida en la secuencia del ADN hacia la secuencia de proteína utilizando diversos ARN como intermediarios. Durante la transcripción genética, las secuencias de ADN son copiadas a ARN mediante una enzima llamada ARN polimerasa que sintetiza un ARN mensajero que mantiene la información de la secuencia del ADN. De esta manera, la transcripción del ADN también podría llamarse síntesis del ARN mensajero (Lodish, 2000).

Trizol: reactivo utilizado en el aislamiento de ARN de células y tejidos; es una solución monofásica de fenol e isocianato de guanidina que durante la homogenización o lisis de la muestra mantiene la integridad del ARN, al mismo tiempo que altera la estabilidad de las células y disuelve los componentes celulares. Ha demostrado estabilidad hasta por 12 meses a temperatura ambiente. Sin embargo, se recomienda almacenarlo a temperatura de 2-8°C para rendimiento óptimo (Chomczynski, 1987).

Ubiquitina: es una pequeña proteína que aparece naturalmente en las células eucariotas. Su principal función es la de marcar a otras proteínas para su destrucción. Varias moléculas de ubiquitina se anclan a la proteína a eliminar y esta se mueve hacia el proteasoma, una estructura con forma de barril donde se lleva a cabo el proceso de proteólisis. La ubiquitina puede marcar incluso proteínas de la membrana de la célula, por ejemplo receptores, para que sean eliminadas de la membrana. La ubiquitina está formada por 76 aminoácidos y tiene una masa molecular de aproximadamente 8,6 kDa. Su estructura está sumamente conservada en el linaje eucariota (Kimura, 2010).

Western blot: o inmunoblot, es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada (una mezcla compleja de proteínas, como un extracto tisular). Mediante una electroforesis en gel se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura e hidrofobicidad. Hay casi tantas posibilidades como tipos de electroforesis existen. Luego son transferidas a una membrana adsorbente (típicamente de nitrocelulosa o de PVDF) para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella. Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por quimioluminiscencia o por colorimetría. De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto y analizar su cantidad relativa respecto a otras proteínas (Lodish, 2000).

RESUMEN

Introducción: La miomatosis uterina es la enfermedad tumoral más frecuente del aparato genital femenino y es la causa más frecuente de cirugía pélvica ginecológica. Es una patología ginecológica clásica en la que aparentemente casi todo es bien conocido y sin embargo aún quedan muchos aspectos por aclarar desde los puntos de vista etiológico, patogénico e histopatológico, de su asociación a los problemas de fertilidad o a otras patologías y de las posibilidades terapéuticas. Los factores que promueven el inicio de los miomas y que regulan su crecimiento permanecen pobremente entendidos. Se ha implicado a la ruta Wnt-CPA-beta-catenina como mediadora de la proliferación celular en algunas estirpes celulares. Una de las proteínas que participa en la vía Wnt es la cinasa-sintasa de glucógeno (GSK3 β). La unión de Wnt a sus receptores inicia una serie de eventos que inhibe la actividad de la GSK3 β y evita la degradación de β -catenina. En ausencia de la señal Wnt, GSK3 β fosforila a β -catenina y la degrada.

Material y métodos: se realizó un estudio observacional, analítico, prospectivo y transversal analizando la expresión proteica y génica de Wnt-7a y de Wnt-5a en tejidos de tres regiones de útero con miomatosis (mioma, subtumoral y miometrio sano) mediante técnicas de Western blot, de inmunohistoquímica y de reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Resultados y conclusiones: Wnt-7a y Wnt-5a presentaron una expresión proteica y génica mayor en el tejido del mioma que en los tejidos de la región subtumoral y del miometrio sano. La expresión proteica de Wnt-7a y de Wnt-5a fue mayor en la fase proliferativa que en la fase secretora del ciclo menstrual. La expresión génica de Wnt-7a fue mayor en la fase secretora del ciclo. Estas observaciones pueden ser debidas a la participación de las hormonas esteroides en las vías de señalización de Wnt, específicamente en la vía canónica de Wnt, mediada por Wnt-7a, y en la vía Wnt/Ca⁺² “no canónica”, mediada por Wnt-5a.

Palabras clave: Wnt-7a, Wnt-5a, miomatosis uterina, Wnt-CPA-beta-catenina.

ABSTRACT

Introduction: The uterine fibroid tumor is most common female genital tract disease and is the most common cause of gynecologic pelvic surgery. It's a classic gynecologic pathology in which almost everything is apparently well known and yet many aspects remain to be clarified from the viewpoints etiological, pathogenic and pathological, their association with fertility problems or other pathologies and therapeutic possibilities. Factors that promote the onset of fibroids and regulate their growth remain poorly understood. Have been implicated the Wnt-CPA-beta-catenin pathway as a mediator of cell proliferation in some cell lines. One of the proteins involved in the Wnt pathway is glycogen synthase kinase (GSK3). The binding of Wnt to its receptors initiates a series of events that inhibits the activity of GSK3 and prevents degradation of β -catenin. In the absence of Wnt signal, GSK3 phosphorylates and degrade β -catenin.

Material and methods: An observational, analytical, prospective, and cross was performed, examining the protein expression and gene expression of Wnt-7a and Wnt-5a in tissue from three regions of the uterus with fibroids (myoma, subtumoral tissue and healthy myometrium) using techniques Western blot, immunohistochemistry and polymerase chain reaction (PCR).

Results and conclusions: Wnt-7a and Wnt-5a have protein expression and a gene expression higher in fibroid tissue than in the tissues of subtumoral region and healthy myometrium. The protein expression of Wnt-7a and Wnt-5a was higher in the proliferative phase than secretory phase of the menstrual cycle. Gene expression of Wnt-7a was higher in the secretory phase of the cycle. These observations may be due to the involvement of steroid hormones in the Wnt signaling pathways, specifically in the canonical Wnt pathway, mediated by Wnt-7a, and Wnt / Ca⁺² "noncanonical" mediated by Wnt-5a.

Keywords: Wnt-7a, Wnt-5a, uterine fibroids, Wnt-CPA-beta-catenin.

1. MARCO TEORICO

“Sorprendernos por algo es el primer paso de la mente hacia el descubrimiento”
Louis Pasteur

1.1 MIOMATOSIS UTERINA

1.1.1 DEFINICIONES Y CONCEPTOS

Los miomas son tumores benignos, predominantemente compuestos de células musculares lisas y cantidades variables de estroma fibroso. Derivan de las fibras musculares lisas y del estroma fibroso estructural del miometrio. Su presencia en el útero mismo se refiere al concepto de miomatosis uterina (Kasai y cols, 2004).

El mioma también es conocido como leiomioma (del griego, *leio*:liso, *mio*:músculo, *oma*:tumor) y es un tumor del que hace más de 40 años se comprobó su origen monoclonal y unicelular, incluso de cada uno de ellos cuando son múltiples (Townsend, 1970).

Los miomas son tumores benignos del músculo liso uterino bien circunscritos, no encapsulados, limitados por una delgada capa de tejido conectivo, esféricos, de consistencia firme, con una superficie de corte de aspecto arremolinado y color que va desde el blanco al rosa o grisáceo; su tamaño varía desde pequeños nódulos apenas visibles hasta tumores que pueden ocupar toda la pelvis (Mata y cols, 2006) y a menudo son múltiples (Wallach, 2004; Buja, 2006) (fig. 1).

Existen leiomiomas que son identificados como “tumores de potencial maligno desconocido” que exhiben 40 ó más figuras de mitosis en 100 campos de gran aumento y son más frecuentes en mujeres de entre 30 a 35 años de edad en los que el concepto de “benignidad” no es del todo exacto.

La transformación maligna del mioma hacia leiomiosarcoma es rara, y ocurre apenas en el 0.5 % de los casos; con más frecuencia los miomas sufren cambios conocidos como “degeneración”, cuyas variantes son: hialina o mixoide, quística, roja o hemorrágica, fibrosa, grasa, y calcificación (Ortiz, 2009).

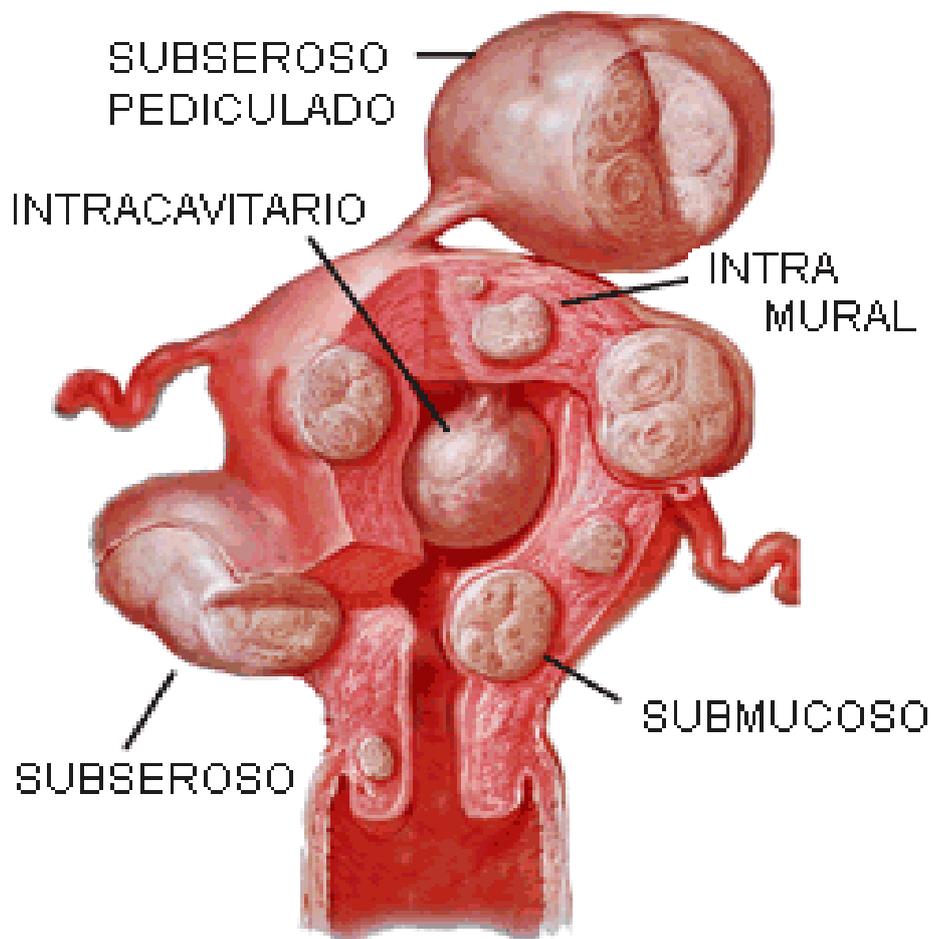


Fig. 1: Tipos de miomas por localización, número y tamaño. Se muestra mioma intramural, motivo del presente estudio (Netter, 2006)

1.1.2 EPIDEMIOLOGÍA

Aunque clásicamente se dice que un 30 a 40 % de las mujeres en edad fértil padecen de miomas uterinos, lo cierto es que son mucho más frecuentes. Estudiando con cortes seriados los úteros de autopsias de mujeres fallecidas por distintas causas, la incidencia de miomas fue de 77% (Cramer, 1990). En estudios ecográficos se han encontrado hasta en 80% de mujeres con o sin síntomas (Day Baird, 2003).

Ya se han estudiado los diferentes factores epidemiológicos relacionados con los leiomiomas.

Con relación a la edad, si bien se han diagnosticado incluso en niñas, el 90 % de las veces se diagnostican entre los 35 y los 54 años; su presentación es rara tras la menopausia y su tamaño suele disminuir durante la misma, pero sin desaparecer. Las tasas de incidencia de miomatosis uterina aumentan a través de los años durante la edad reproductiva; la prevalencia de miomatosis uterina clínicamente significativa permanece alta durante los años de la perimenopausia y declina posterior a la menopausia (Flake, 2003).

Al analizar la raza, los miomas son más frecuentes en la negra americana (alrededor del 50 %) pero son raros entre las negras africanas; en la raza amarilla y la raza blanca es menor la frecuencia y es similar entre ambas. La frecuencia es 2 a 3 veces más alta en las mujeres de raza negra, con 61 % de los casos, que en las mujeres de raza blanca, con 29 % (Nassera, 2004).

Analizando los factores hereditarios, se han descrito “familias de miomas” con una frecuencia elevada, pero no bien cuantificada. Se sugiere la participación de un gen dominante simple o la herencia de “una predisposición”. Estudios de agregación familiar han sugerido la heredabilidad de estos tumores. Estudios con gemelas han demostrado que las monocigóticas tienen dos veces más riesgo que las dicigóticas (Parker, 2007).

Los factores hormonales se ponen de manifiesto con varias evidencias epidemiológicas, como la mayor frecuencia de miomatosis en edad fértil o la disminución del tamaño tumoral con la menopausia, que sugieren una relación directa de los miomas con los estrógenos (Cramer, 2000; Sumitami, 2000). Se ha comprobado que en el tejido miomatoso existe mayor conversión de andrógenos a estrógenos y menor formación de estrona a partir de estradiol. Todo esto hace que en el mioma exista un ambiente hiperestrogénico (Rein, 2000). La frecuente asociación de miomatosis uterina a patologías que cursan con hiperestrogenismo, como la hiperplasia endometrial, la endometriosis, el síndrome de ovarios poliquísticos y su mayor incidencia entre mujeres

estudiadas por esterilidad, favorecen la idea de que existe un efecto “estrogénico ininterrumpido” (Orhan, 2006). Los contraceptivos orales no parece que influyan o pueden disminuir la incidencia (Chiaffarino, 1998).

Los aspectos constitucionales no son concluyentes, pero los miomas parecen ser más frecuentes en mujeres con sobrepeso y obesas. Existe asociación frecuente con malformaciones uterinas y los miomas tienen menor incidencia en las mujeres fumadoras.

1.1.3 CLASIFICACIÓN

Los miomas pueden ser clasificados en diversas formas, dependiendo del parámetro usado para ello:

1.1.3.1 Histopatología: los miomas se han clasificado en base a su estructura histológica y características celulares (Ortiz, 2009) (tabla 1).

Tabla 1: Clasificación histopatológica de los miomas (Ortiz, 2009)

Clasificación histopatológica de los miomas

- Leiomiomas comunes
- Leiomiomas celulares
- Leiomiomas pleomórficos, simplásticos o atípicos
- Leiomiomas epitelioides o leiomioblastomas
- Leiomiomas mixoides
- Leiomiomas vasculares
- Leiomiomas hemorrágicos o apopléjicos
- Leiomiomas con actividad mitótica
- Lesiones de músculo liso relacionadas con los leiomiomas (leiomiomatosis peritoneal diseminada, leiomiomatosis intravenosa, leiomioma metastatizante, adenomioma).

1.1.3.2 Localización y topografía: los miomas se clasifican también de acuerdo a su localización con respecto al miometrio en subserosos, intramurales y subserosos y a su topografía en relación con las diferentes partes del útero en corporales, ístmicos y cervicales (Buja, 2006; Ortiz, 2009) (tabla 2 y fig. 1).

Tabla 2: Localización y topografía de los miomas (Ortiz, 2009)

Localización y topografía de los miomas

- Intramurales (intersticiales)
- Subserosos
- Submucosos
- Intraligamentarios
- Pedunculados (subserosos, submucosos)
- Corporales, ístmicos, cervicales

Los miomas submucosos han sido motivo de dos clasificaciones específicas, para las cuales se requiere la valoración mediante histeroscopia para observar las características que definen a los diferentes tipos. La histeroscopia sustituido con ventaja a la valoración mediante histerosonografía o histerosalpingografía para los propósitos de valoración de los miomas submucosos.

En la clasificación de Wamsteker y Block se considera el porcentaje del mioma que se observa submucoso durante el estudio histeroscópico (Wamsteker y Block, 1993) (tabla 3 y fig. 2).

Tabla 3: Clasificación histeroscópica de los miomas (Wansteker y Block, 1993)

Clasificación de Wamsteker y Block de los miomas

- Tipo 0: pediculados o sésiles, el 100 % es submucoso
- Tipo I: intracavitario, más del 50 % es submucoso
- Tipo II: intramural, menos del 50 % es submucoso

La clasificación de Labastida se basa en el volumen del mioma que se observa intramural o intracavitario durante la evaluación histeroscópica (Dexeus y Labastida, 1986) (tabla 4 y fig. 3).

La valoración histeroscópica es útil para las decisiones en cuanto a las posibilidades de tratamiento quirúrgico. Igualmente permite el diagnóstico diferencial con otras alteraciones intracavitarias como los pólipos endometriales

y en caso necesario hace accesible la toma de biopsias para el diagnóstico histopatológico preciso de tales situaciones patológicas.

Tabla 4: Clasificación histeroscópica de los miomas (Dexeus y Labastida, 1986)

. Clasificación de Labastida de los miomas

Tipo I: miomas pediculados

Tipo II: miomas sésiles

Tipo III: miomas con $\frac{1}{3}$ de su volumen intramural

Tipo IV: miomas con el $\frac{1}{2}$ de su volumen intramural

Tipo V: miomas con al menos $\frac{2}{3}$ de su volumen intramural

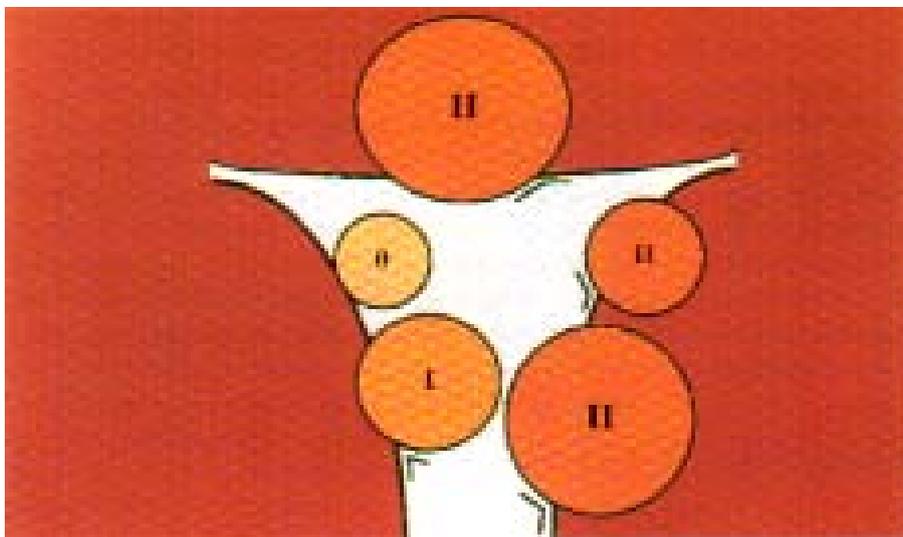


Fig. 2: Clasificación histeroscópica de los miomas. Se observa el porcentaje de mioma que se encuentra submucoso (Wansteker y Block, 1993)

1.1.3.3 Tamaño: por su tamaño los miomas han sido clasificados como pequeños cuando sus dimensiones son de 2 cm. o menores, medianos cuando están entre 2.1 y 5 cm. y son grandes cuando superan 5 cm.; aunque generalizada, esta clasificación por tamaño de los miomas uterinos ha sido adoptada tomando en consideración las dimensiones que se usan en otro tipo de tumores malignos para la clasificación por estadios clínicos.

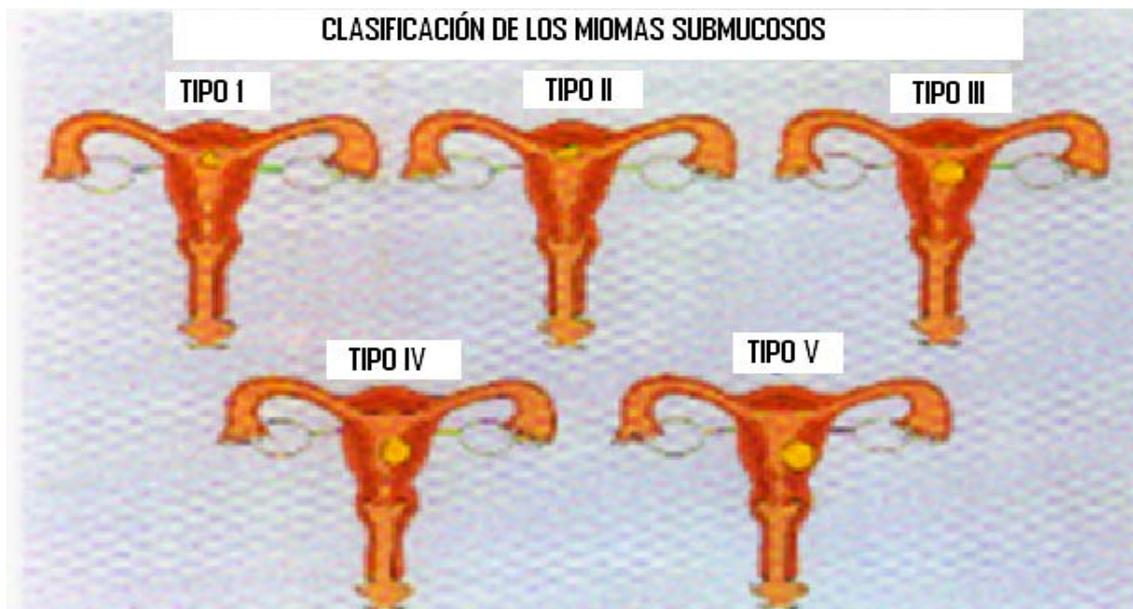


Fig. 3: Clasificación histeroscópica de los miomas. Se observa el volumen del mioma que está intramural vs submucoso (Dexeus y Labastida, 1986)

1.1.3.4 Sintomatología: por su relevancia clínica los miomas suelen clasificarse como asintomáticos cuando su presencia no se relaciona con alguna manifestación clínica y como sintomáticos cuando son causa de uno o más síntomas atribuibles a dichos tumores. Las manifestaciones clínicas más frecuentemente relacionadas con los miomas son variadas y dependen de diversos factores, como su histología, su localización y topografía, su tamaño y número (tabla 5).

Tabla 5: Cuadro clínico de la miomatosis uterina (Ortiz, 2009)

Cuadro clínico de la miomatosis uterina

- Manifestaciones clínicas en menos del 50 %
- Hemorragia uterina anormal en cerca del 33 %
- Dolor (generalmente agudo, rara vez crónico), 33 %
- Esterilidad e infertilidad (20 a 30 %)
- Distorsión abdominal
- Compresión genitourinaria
- Compresión gastrointestinal
- Compresión pélvica
- Otros síntomas y alteraciones generales

1.1.4 ETIOPATOGENIA Y DEPENDENCIA HORMONAL DE LOS MIOMAS

A continuación se revisa el conocimiento actual y la evidencia científica existente, basada en estudios preclínicos y clínicos de las décadas pasadas y años recientes, que demuestra la dependencia hormonal de los miomas. Específicamente se analizan estrógenos y progesterona, como las dos principales hormonas esteroides involucradas en el crecimiento de los miomas; también se revisa fulvestrant y mifepristona, conocidos compuestos antagonistas de estrógenos y progesterona, respectivamente, cuyo estudio ha incrementado sustancialmente el conocimiento de la relación que estas hormonas tienen con el desarrollo de los miomas.

En otro ámbito del conocimiento se revisa la evidencia reciente y creciente que apoya la teoría de la probable participación de las proteínas Wnt y los ligandos relacionadas con ellas, en el origen y desarrollo de los miomas. En especial, se analiza la probable regulación por estrógenos y progesterona de la vía canónica, mediada por Wnt-7a, que induce la estabilización y acumulación en el citoplasma de β -catenina y su posterior translocación al núcleo celular en donde afecta la transcripción de genes blanco (Gottardi, 2004); también se revisa esta probable regulación por estrógenos y progesterona de la vía Wnt/ Ca^{+2} “no canónica” que regula la adhesión celular y la motilidad mediada por Wnt-5a y dispara la liberación del ion calcio (Ca^{+2}) intracelular para activar enzimas sensibles a Ca^{+2} como la proteína cinasa C (PKC) y cinasa II dependiente de calmodulina y Ca^{+2} (CaMKII) sin activación de la vía β -catenina (Gumbiner, 2005).

1.1.4.1 Estrógenos

Ya se ha mencionado que las evidencias epidemiológicas, como la mayor frecuencia de los miomas en mujeres en edad fértil o la disminución del tamaño tumoral con la menopausia, sugieren una relación directa de los miomas con los estrógenos (Cramer, 2000; Sumitani, 2000); Además, se ha comprobado que en el tejido miomatoso existe mayor conversión de andrógenos a estrógenos y menor formación de estrona a partir de estradiol. Todo eso hace que en el mioma exista un ambiente hiperestrogénico (Rein, 2000).

Los estrógenos 17 β -estradiol o E₂, estrona o E₁ y estriol o E₃ son producidos en la mujer principalmente en los folículos ováricos. En tejidos periféricos, la producción de estrógenos depende de la expresión local y actividad de enzimas aromatasas, deshidrogenasa-17- β -hidroxiesteroide y de las estrona-sulfatasas. Dicha producción extragonadal también depende de la presencia de precursores androgénicos C-19. Los niveles circulantes de testosterona, androstenediona, dehidroepiandrosterona (DHEA) y sulfato-dehidroepiandrosterona (DHEAS), son importantes para la biosíntesis de estrógenos en esos tejidos, principalmente adiposos (Gruber, 2002; Simpson, 2005; Yager y Davidson, 2006; Calzada, 2006, King, 2011) (fig. 4).

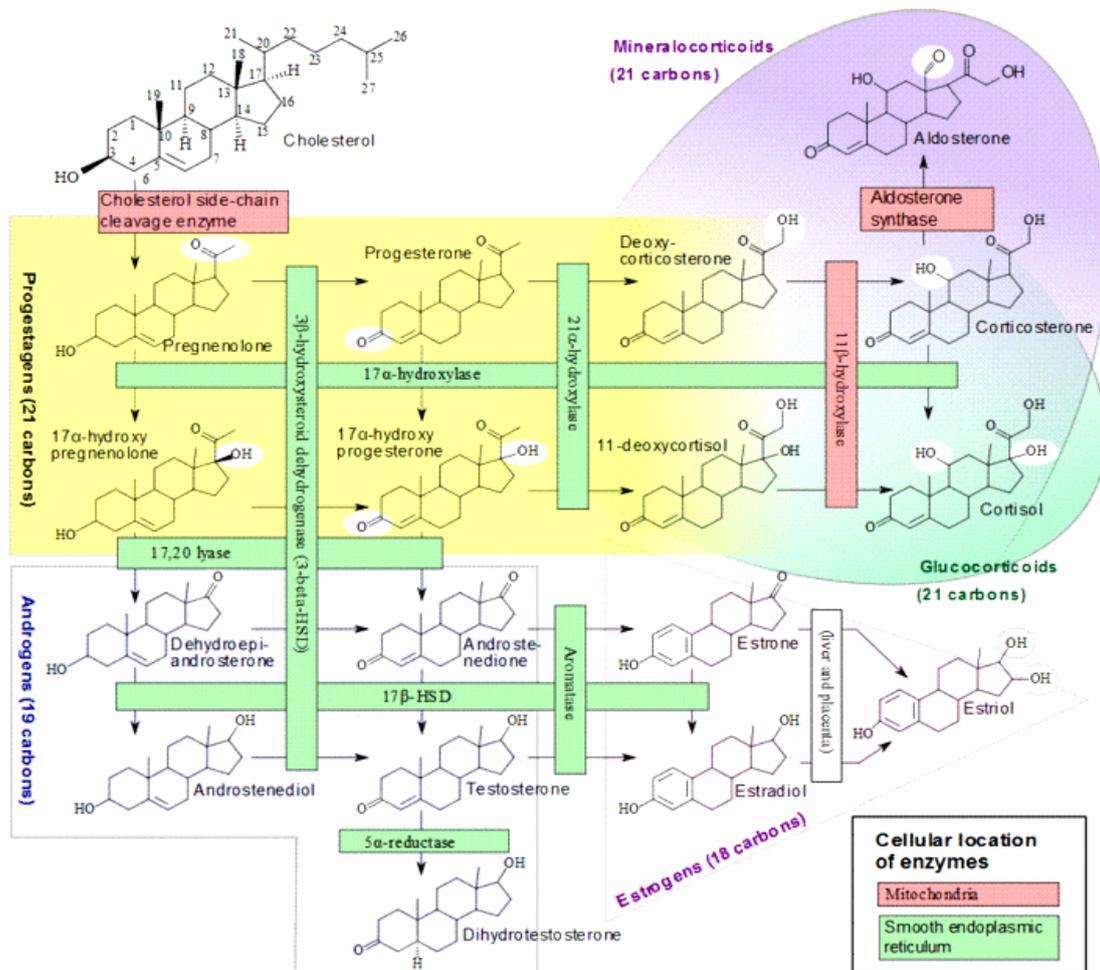


Fig. 4: Biosíntesis de las hormonas esteroides. Se muestran las sustancias de origen, las enzimas y las hormonas finales en el proceso de síntesis de las hormonas esteroides (King, 2011)

Los estrógenos poseen funciones en la fisiología reproductiva femenina y masculina; incrementan la producción de proteínas hepáticas, intervienen en la fisiología cardiovascular (Franco, 2003; Gruber, 2002); tienen acción en funciones cognitivas y del estado de ánimo, son neuroprotectores, promueven el desarrollo del hueso y el mantenimiento de la densidad mineral ósea (Sumitani, 2000; Franco, 2003; Simpson, 2005).

Las acciones de los estrógenos son realizadas a través de la interacción con sus receptores (ER), los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el organismo (cerebro, mama, ovario, útero, piel, endotelio, músculo liso, hueso), y que están organizados en seis dominios denominados por letras de la “A” a la “F”. De este modo, los estrógenos poseen funciones diferentes de acuerdo al tejido donde ejercen su acción (fig. 5).

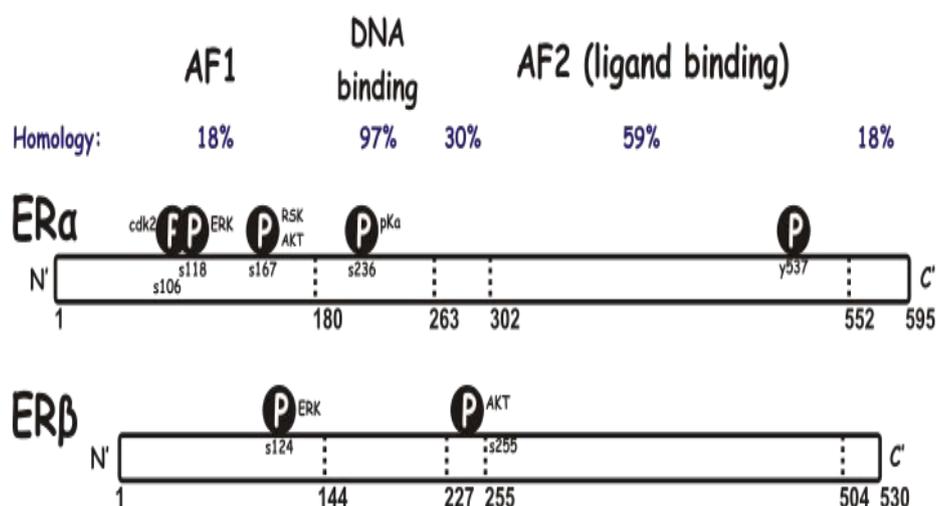


Fig. 5: Dominios funcionales del receptor de estrógenos. Se observa la estructura de los receptores de estrógenos y los sitios o dominios de interacción con el estrógeno (Leung, 2006)

1.1.4.1.1 Efectos genómicos y no genómicos de los estrógenos

En las células existen los receptores intranucleares, cuya activación induce la síntesis proteica, a través de sus “efectos genómicos” (Sánchez y Benítez, 2003) (fig. 6), y los receptores intracitoplasmáticos y de membrana, cuya activación

provoca la estimulación de diversas vías de señalización, por sus efectos “no genómicos” (Tommaso y Gennazzani, 2003; Björnström y Sjöberg, 2005) (fig. 7).

Desde el punto de vista estructural, se han identificado dos isoformas de ER: ER α y ER β . El gen codificador de ER α se encuentra en el cromosoma 6; este receptor se ubica principalmente en el endometrio, el estroma ovárico, células de cáncer de mama, y núcleo ventromedial hipotalámico en cerebro; el gen del ER β se encuentra en el cromosoma 14, y el receptor se ubica principalmente en las células de la granulosa, aunque también se ha encontrado en riñón, mucosa intestinal, parénquima pulmonar, médula ósea, hueso, cerebro, células endoteliales y glándula prostática (Gruber, 2002); en útero se han descrito las dos isoformas de receptores de estrógenos, siendo la principal la isoforma alfa (Noriega, 2009). Existe un tercero y nuevo receptor de estrógenos intracelular transmembranal (7TMR), conocido como GPR30, que actúa de manera independiente de ER α y ER β , e influye en la activación del factor de crecimiento epidermal (EGF), pudiendo así participar en la biología del cáncer de mama (Filardo, 2006).

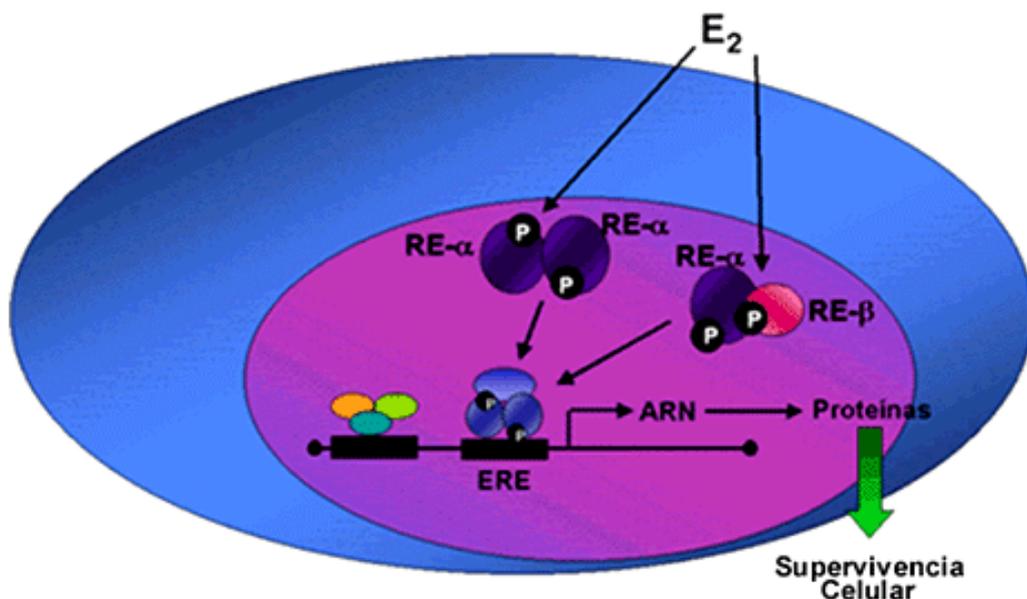


Fig. 6: Efectos genómicos del receptor de estrógenos. Los estrógenos actúan en el receptor de estrógenos en el núcleo celular (Falkenstein, 2000)

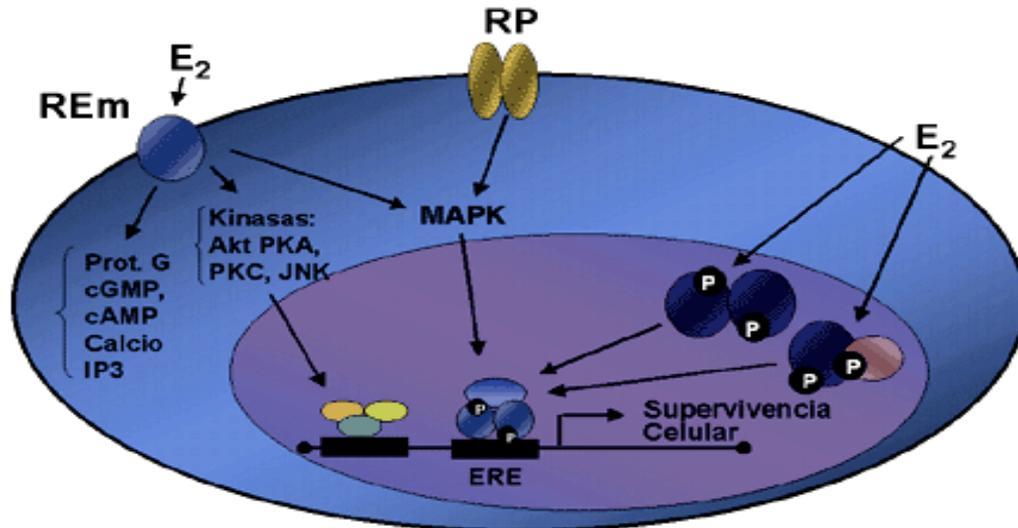


Fig. 7: Efectos no genómicos del receptor de membrana de estrógenos. Los estrógenos actúan en el receptor de membrana y estimulan vías de señalización citoplasmática hacia el núcleo de la célula (Falkenstein, 2000)

Se han descrito diversas isoformas del receptor de estrógeno; concretamente 3 formas del ER α y 5 formas del ER β . Las isoformas del receptor ER β pueden transactivar la transcripción únicamente cuando se forma un heterodímero con el receptor funcional ER β 1 de 59 kDa. El receptor ER β 3 ha sido detectado en los testículos a elevadas concentraciones. Las dos otras isoformas del receptor ER α poseen 36 y 46 kDa (Nilsson, 2001; Leung, 2006).

Ligandos diferentes pueden diferir en su afinidad por la isoforma alfa o beta del receptor de estrógeno:

- El 17 β -estradiol con la misma afinidad a ambos receptores.
- La estrona se une con mayor afinidad al receptor alfa.
- El estriol, el raloxifeno y la genisteína se unen con mayor afinidad al receptor beta.

En ausencia de hormona, los receptores de estrógeno se encuentran localizados principalmente en el citoplasma. La unión de la hormona al receptor pone en funcionamiento un cierto número de eventos que comienzan con la migración del receptor desde el citoplasma al núcleo celular, la dimerización del

receptor y la unión de este dímero a unas secuencias específicas de ADN conocidas como elementos de respuesta a hormonas.

El complejo receptor/ADN recluta entonces otras proteínas implicadas en la transcripción de los genes diana y así expresar determinadas proteínas que darán lugar a variaciones en la función celular. Los receptores de estrógeno también tienen un dominio de unión a ADN y pueden actuar como factores de transcripción para regular la producción de proteínas.

El receptor también interacciona con el factor de transcripción AP-1 y con Sp1 para promover la transcripción por medio de varios coactivadores tales como PELP-1 (Levin, 2005).

Algunos receptores de estrógeno se asocian con la superficie de la membrana celular y pueden ser rápidamente activados por exposición de las células al estrógeno (Zivadinovic, 2005; Björnström, 2004).

Además, algunos de estos receptores pueden asociarse con membranas celulares mediante anclaje a la caveolina-1 para formar complejos con proteínas G, estriatina, receptores tirosina quinasa (como por ejemplo EGFR e IGF-1) y receptores no-tirosina quinasa (como por ejemplo Src) (Levin, 2005; Zivadinovic, 2005). A través de la estriatina, algunos de estos receptores de estrógeno unidos a membrana pueden dar lugar a un incremento de los niveles de Ca^{2+} y óxido nítrico (NO) (Lu, 2004). A través de los receptores tirosina quinasa, las señales son enviadas al núcleo por medio de la vía de las MAPK y la vía PI3K/AKT (Kato, 1995). La glicógeno sintasa quinasa-3 ($\text{GSK-3}\beta$) inhibe la transcripción inducida por los receptores de estrógeno nucleares mediante la inhibición de la fosforilación del residuo de serina 118 de los receptores tipo α . La fosforilación de $\text{GSK-3}\beta$ impide este efecto inhibitorio, la cual puede ser llevada a cabo por la ruta PI3K/AKT y la ruta MAPK/ERK, vía cinasa s6 ribosomal.

Finalmente, el 17 β -estradiol ha demostrado ser capaz de activar los receptores acoplados a proteínas G, GPR30 (Prossnitz, 2007). La localización subcelular y el papel de este receptor son todavía objeto de controversia (Otto, 2008).

El tejido de los miomas responde al efecto de los estrógenos sintetizando factores de crecimiento y componentes de la matriz extracelular (Cesen-Cummings, 2000), que aumentan el tamaño del leiomioma al mismo tiempo que preservan su actividad benigna manteniendo su diferenciación; el 50% de los miomas presentan un aumento de la actividad mitótica durante la fase luteínica del ciclo, mientras que permanecen relativamente inactivos durante la fase folicular (Mata, 2001).

La concentración fisiológica normal de estradiol (fig. 8) en sangre de mujeres premenopáusicas es de 20 a 400 pg/ml y dentro de los miomas estos niveles se incrementan de 2 a 3 veces (Lierh, 2000; Parker, 2007). El ovario es la fuente principal de estrógenos para el crecimiento del mioma; sin embargo, el tejido miomatoso sintetiza estrógenos, pues se ha demostrado la expresión de aromatasa en el tumor (Sumitani, 2000; Shozu, 2003; Kasai, 2004; Calzada, 2006); de igual manera, se ha visto que la 17- β -Hidroxiesteroide-deshidrogenasa (17- β -HSD) tipo 1 se encuentra sobre expresada en células de mioma en comparación con las células del miometrio adyacente sano (Kasai, 2004).

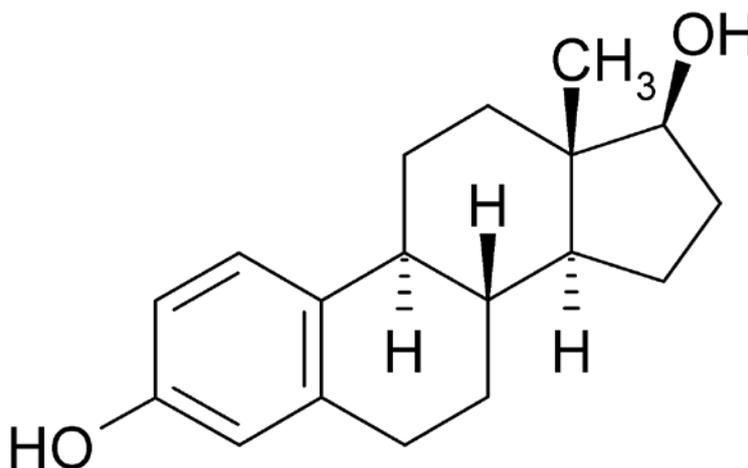


Fig. 8: Estructura del estradiol (Speroff, 2007)

Así, los estrógenos promueven el crecimiento del leiomioma al estimular la síntesis del mRNA de colágena I y III, de la proteína conexina 43 de las uniones GAP, del factor de crecimiento epidérmico (Rein, 2000); por otra parte, inhiben la expresión de p53 (Maruo, 2004). Los efectos mitogénicos de los estrógenos en el leiomioma se deben a la activación de MAPK (proteína cinasa activada por mitógenos) y a la estimulación de la transcripción de la proteína tirosina-cinasa, de proteínas intracelulares, como la asociada al crecimiento (GAP), la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI-3-K), y la fosfolipasa C (PLC); estimulan la síntesis de factores de crecimiento como el factor transformante $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$), el factor de crecimiento tipo insulina (IGF) I y II, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor derivado de plaquetas (PDGF) (Cesen-Cummings, 2000; Maruo, 2004; Dixon, 2000; Arici y Sozen, 2003).

1.1.4.2 Progesterona:

Tradicionalmente los estrógenos han sido considerados como los promotores más importantes del crecimiento de los miomas. Recientes evidencias bioquímicas, histológicas y clínicas han demostrado el importante rol de la progesterona (fig. 9) en el crecimiento de los leiomiomas uterinos. Estudios bioquímicos y clínicos indican que la progesterona, progestinas y receptores de progesterona (PR-A y PR-B) aumentan la actividad proliferativa en los miomas (Maruo, 2000).

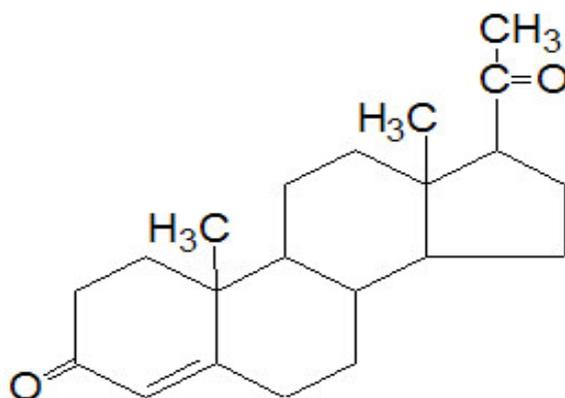


Fig. 9: Estructura de la progesterona (Speroff, 2007)

Igual que ocurre con los receptores de estrógenos, las cantidades absolutas de PR-A y PR-B (fig. 10) y la relación PR-A/PR-B son diferentes en los tejidos de los miomas comparados con miometrio normal (Nisolle, 1999; Wu, 2002).

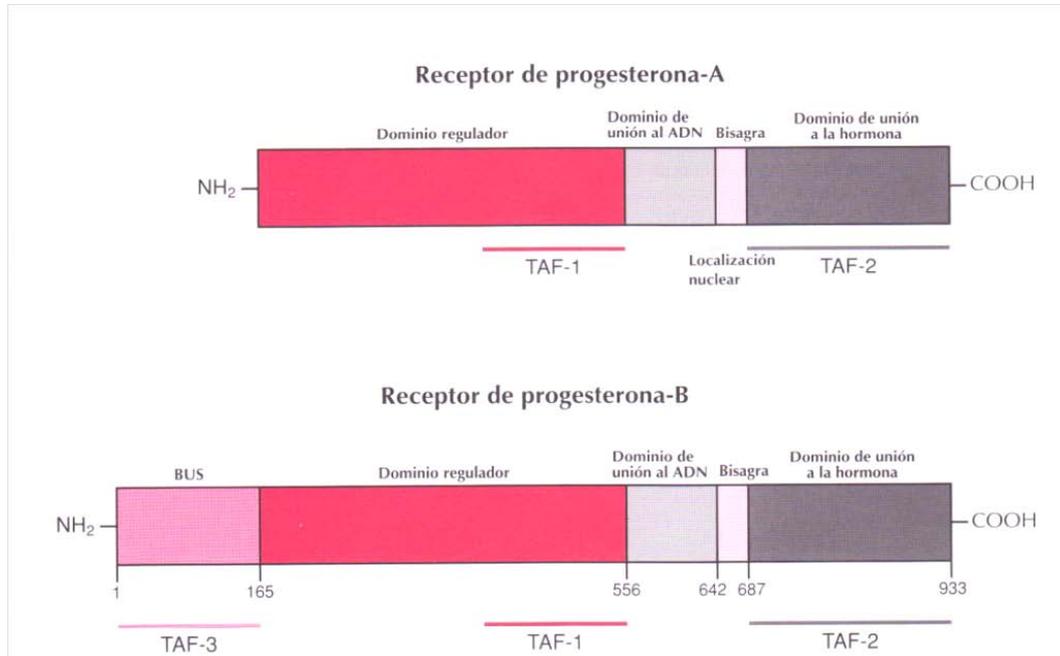


Fig. 10: Dominios funcionales del receptor de progesterona. Se observa la estructura de los receptores de progesterona y los sitios o dominios de interacción con la hormona (Speroff, 2007)

Los receptores de progesterona (RP) son también miembros de la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción. Han sido implicados en una amplia variedad de procesos biológicos, incluyendo el desarrollo de la glándula mamaria, la regulación de la progresión del ciclo celular, el procesamiento de proteínas, el metabolismo y la inducción de otros eventos de señalización (Li, 2003).

Existen dos isoformas del receptor de progesterona (PR), llamadas A (RP-A) y B (RP-B) que derivan de promotores alternativos de un gen localizado en el cromosoma 11 q22-q23 humano 57. Originalmente clonado en células de cáncer de mama, el receptor B contiene 933 aminoácidos y un peso molecular (PM) de 116 kDa, mientras que el receptor A carece de los 164 aminoácidos iniciales teniendo un PM de 94 kDa. Estos receptores se caracterizan por tener

una región A/B amino-terminal, una región de unión al ADN formada por dos dedos de zinc (DBD), una región bisagra (región H) participante en la dimerización de la proteína y un dominio carboxi-terminal de unión a la hormona (HBR, región E) (Kastner, 1990).

1.1.4.2.1 Efectos genómicos de la progesterona.

La unión de la progesterona a su receptor produce la liberación de los complejos de proteínas de choque de calor (HSP) como hsp 90 y hsp 70 a las que se encontraba unida, y un aumento de su fosforilación. Una vez liberado el complejo de HSP se produce la dimerización del receptor en homodímeros o heterodímeros y su unión a una secuencia de consenso en el ADN denominada elemento respondedor a progesterona (PRE) o a otros factores de transcripción como el Sp1 (Kastner, 1990).

Posteriormente, estos dímeros interactúan con factores de transcripción basales, otras proteínas de unión al ADN y otros coactivadores; y de esta manera regulan la transcripción del gen (Kastner, 1990).

1.1.4.2.2 Efectos no genómicos de la progesterona.

La unión de progesterona a los receptores clásicos localizados en la membrana celular, a los mRP, o bien la unión de factores de crecimiento (FC) a sus receptores es capaz de desencadenar eventos como la regulación de los niveles de AMPc o la fosforilación de MAPK y AKT. Estas últimas son entonces las encargadas de traslocar al núcleo y fosforilar factores de transcripción, iniciando la síntesis de proteínas de ciclo celular (Bottino, 2010).

1.1.4.2.3 Convergencia de vías genómicas y no genómicas.

La unión de progesterona a los receptores localizados en la membrana celular induce variaciones en los niveles de AMPc y fosforilación de proteínas quinasas. La fosforilación de estas quinasas puede darse también por la unión de factores de crecimiento (FC) autocrinos o paracrinos. De esta forma, las quinasas pueden fosforilar al RP clásico unido o no a la progesterona, traslocando éste al núcleo, uniéndose a secuencias respondedoras, reclutando

coactivadores e iniciando la transcripción de genes de ciclo celular, factores de crecimiento y quemoquinas. Asimismo, las proteínas quinasas activadas pueden inducir la fosforilación de factores de transcripción, llevando también a la activación génica, donde las proteínas sintetizadas pueden a su vez actuar como factores autocrinos o paracrinos (Bottino, 2010).

La progesterona contribuye al crecimiento de los miomas al estimular la expresión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y sus receptores, el factor de crecimiento transformante (TGF β 1 y TGF β 3) (Lee y Nowak, 2001; Maruo, 2004.); además estimula la supervivencia de estos tumores a través de la sobreexpresión de Bcl-2 y regulando una escasa expresión del factor de necrosis tumoral α (TNF α) en células tumorales (Arici y Sozen, 2003; Bodner, 2004). El efecto inhibitorio respecto al crecimiento y supervivencia de estos tumores se ejerce a través de una disminución de la expresión del factor de crecimiento tipo insulina IGF-1 (Maruo, 2004; Yamada, 2004).

Además de su acción promotora del gen Bcl-2 con su inhibición final de la apoptosis se ha demostrado que la progesterona también tiene efecto en el estímulo de la proliferación por la acción mitogénica del gen c-myc sobreexpresado (Viegas, 2004; Moore, 1997). Ambos genes Bcl-2 y c-myc están sobreexpresados en el tejido de los miomas (Wu, 2002; Lessl, 1997) y específicamente los niveles de Bcl-2 tienden a ser más altos en tejidos de los miomas que en el miometrio normal durante la fase secretora que durante la fase proliferativa del ciclo.

Las progestinas también inducen la expresión (aunque en menor cantidad y frecuencia) del factor de crecimiento del epitelio vascular (VEGF), principalmente en el estroma del útero; estas hormonas elevan los niveles de mRNA de VEGF, de manera uniforme por todo el estroma, mientras que los estrógenos activan su expresión (Bottino, 2010) (fig. 11).

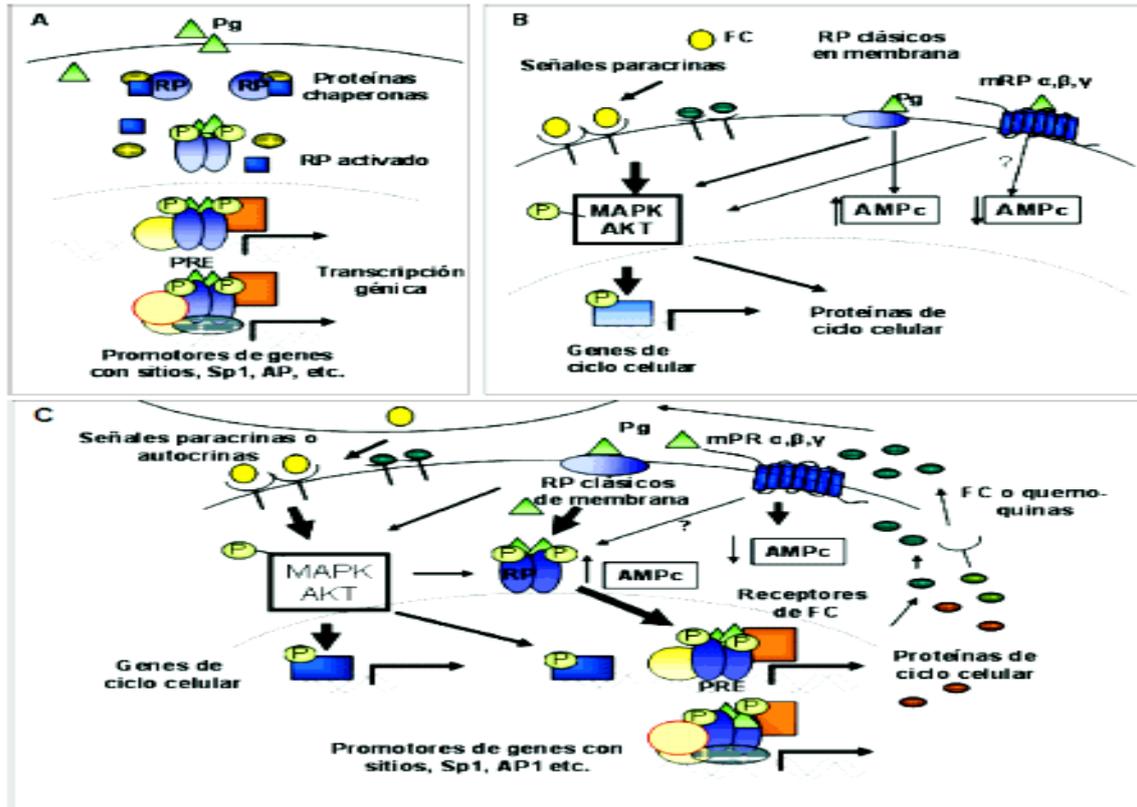


Fig. 11: Mecanismos de acción de la progesterona. A: efectos genómicos a través de receptores nucleares, B: efector no genómicos a través de receptores de membrana, C: integración de la vía genómica y no genómica (Bottino, 2010)

1.1.4.3 Vía de señalización Wnt/beta-catenina:

Las “Wnt’s” comprenden una gran familia de glicoproteínas que, actuando como ligandos, afectan diversos procesos biológicos, tales como la inducción embriológica, la generación de polaridad celular y la especificidad de la fase celular (Logan y Nusse, 2004; Nusse, 2008).

La familia génica Wnt comprende al menos 19 miembros identificados. Las proteínas Wnt, cuyos tamaños son de entre 39 y 46 kDa, son definidas más por su secuencia proteica que por sus propiedades funcionales. La secuencia proteica se caracteriza por una “secuencia señal” seguida por una región de 23 a 24 residuos de cisteínas (Martínez, 2005).

Las proteínas Wnt son secretadas desde las células después de tener modificaciones post-traduccionales en forma lipídica y altamente hidrofóbica que

solo puede ser solubilizada por detergentes. La modificación lipídica consiste en la unión covalente de un palmitato a una cisteína conservada cerca del amino terminal de la proteína Wnt. La remoción enzimática del palmitato resulta en la pérdida de la actividad, lo cual indica que la adición de lípidos es importante para la señalización (Martínez, 2005).

Las proteínas Wnt, secretadas al medio extracelular, actúan como ligandos que se unen a receptores membranales de las mismas células que las producen y de células adyacentes. El receptor de Wnt pertenece a la familia de proteínas Frizzled (Fzd), las cuales tienen siete dominios transmembranales. El amplio espectro de procesos celulares regulados por la vía de Wnt puede ser explicado al menos en parte por la gran diversidad de ligandos y receptores Fzd. En el genoma humano, han sido identificados 19 genes WNT y 11 genes FZD (Nusse, 2008). Las interacciones entre las proteínas Wnt y sus receptores muestran un importante índice de inespecificidad (Klaus, 2008); por lo tanto, una proteína Wnt puede unirse a diferentes receptores Fzd y viceversa. Esta interacción requiere la cooperación de LRP5 y LRP6 (de: proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad), proteínas que actúan como correceptores transmembranales (Mikels, 2006). Mutaciones en ambos correceptores pueden conducir al desarrollo de defectos parecidos a las mutaciones que inactivan genes WNT, como por ejemplo, defectos en el desarrollo del tálamo dorsal, anomalías esqueléticas y del tubo neural, disminución en la proliferación de osteoblastos, osteopenia y la vascularización persistente en los ojos del embrión (Zhou, 2004; Kokubu, 2004). Esta evidencia muestra que las proteínas LRP5/6 juegan un importante papel en la activación y regulación de la vía Wnt.

La interacción entre LRP5/6, Fzd y Wnt puede ser regulada negativamente por proteínas secretadas como Dkk (Dkk), proteínas secretadas relacionadas a frizzled (sFRP), y Cerberus1 (Cer1), que llegan a inhibir la señalización de esta vía a través de la unión directa a Wnt o a sus correceptores. Dkk se une a LRP junto con otras proteínas transmembranales llamadas Kremens (Krm); de esta manera se promueve la internalización e inactivación de LRP5/6, regulando así esta vía de señalización (Mao, 2002; Pinson, 2000).

Actualmente, se conocen tres vías que son activadas después del acoplamiento de Wnt con sus receptores; la determinación de la vía que será activada dependerá de la especificidad del ligando de Wnt con su receptor Fzd y muy probablemente de componentes celulares coactivadores y correceptores que modulan las señales. Estas vías son:

- La vía canónica, mediada por Wnt-7a, que induce la estabilización y acumulación en el citoplasma de β -catenina y su posterior translocación al núcleo celular en donde afecta la transcripción de genes blanco (Logan, 2004).
- La vía de la polaridad celular planar (PCP) “no canónica”, la cual establece la polarización de las células a lo largo del plano de una membrana tisular. Esta vía es importante durante el cierre del tubo neural y la extensión de la cóclea del oído interno (Qian, 2007) (fig. 12).
- Finalmente, la vía de Wnt/ Ca^{+2} “no canónica” que regula la adhesión celular y la motilidad mediada por Wnt-5a, dispara la liberación de Ca^{+2} intracelular para activar enzimas sensibles a Ca^{+2} como la proteína cinasa C (PKC) y cinasa II dependiente de calmodulina y Ca^{+2} (CaMKII) sin activación de la vía β -catenina (Gumbiner, 2005) (fig. 12).
- Una cuarta vía, de la orientación y división celular asimétrica, está aún poco estudiada.

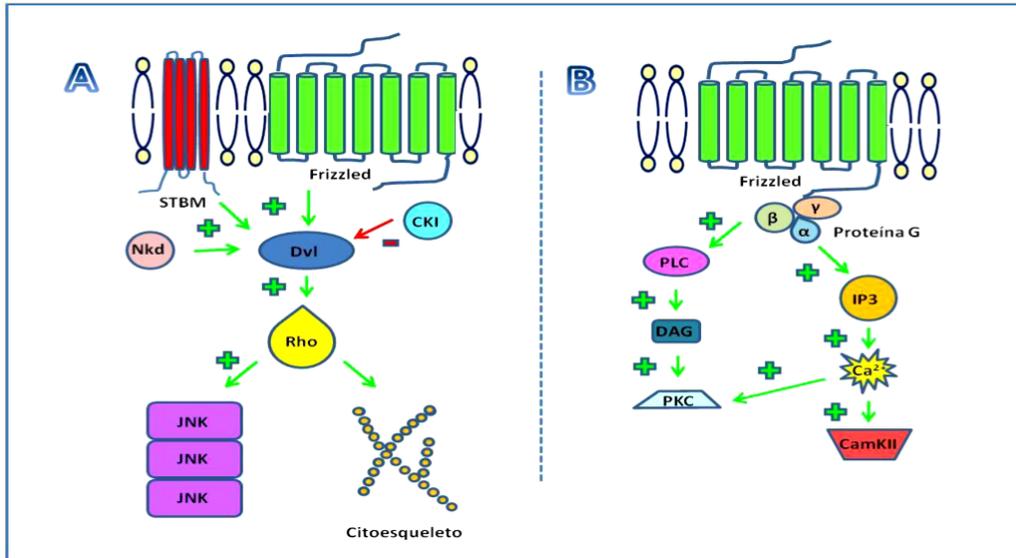


Fig. 12: Esquema de las dos vertientes no canónicas de la vía Wnt. A: vía de la polaridad celular planar (PCP) “no canónica”, B: vía de Wnt/Ca²⁺ “no canónica” (Modificado Peifer and McEwen, 2002)

La vía canónica (fig. 13) es la mejor estudiada; después de la trimerización de Wnt/Fzd/LRPs, el correceptor de LRP es fosforilado guiando a la unión y fosforilación de Disheveled (Dvl), el cual transduce la señal de Wnt a la célula a través de la unión directa con Fzd (Umbhauer, 2000; Wallingford, 2005). Dvl es un elemento clave en la amplificación de señales de Wnt a través de efectores específicos (Wharton, 2003). Dvl interactúa con axina, la cual realiza la función de unión molecular por su asociación con proteínas que son clave para la fosforilación y poliubiquitinación de β -catenina, incluyendo GSK-3 β , CK1, APC así como β -catenina. Cuando no existe señal de Wnt a través de sus receptores, axina se encuentra activa por medio de la fosforilación en residuos específicos, lo que lleva a la inactivación de β -catenina por la vía del proteosoma. Sin embargo, una vez que se lleva a cabo la trimerización de Wnt/Fzd/LRPs, axina es degradada por la vía del proteosoma; no se conoce aún el mecanismo exacto (Yamamoto, 2005). Tal vez el evento más importante en el contexto de los procesos moleculares de la activación de la vía de Wnt en tumores, es la estabilización de β -catenina en el citoplasma y su acumulación en el núcleo. Esto es posible debido a la liberación de β -catenina del “Complejo de Degradación”, un conjunto de proteínas ensambladas y activas en ausencia de

señales de Wnt, cuya función principal es adicionar ubiquitinas a β -catenina produciendo su inactivación a través de la vía del proteosoma (Peifer y Polakis, 2000). En una célula no estimulada, β -catenina interactúa con E-caderina y β -catenina en las uniones adherentes, regulando la adhesión celular.

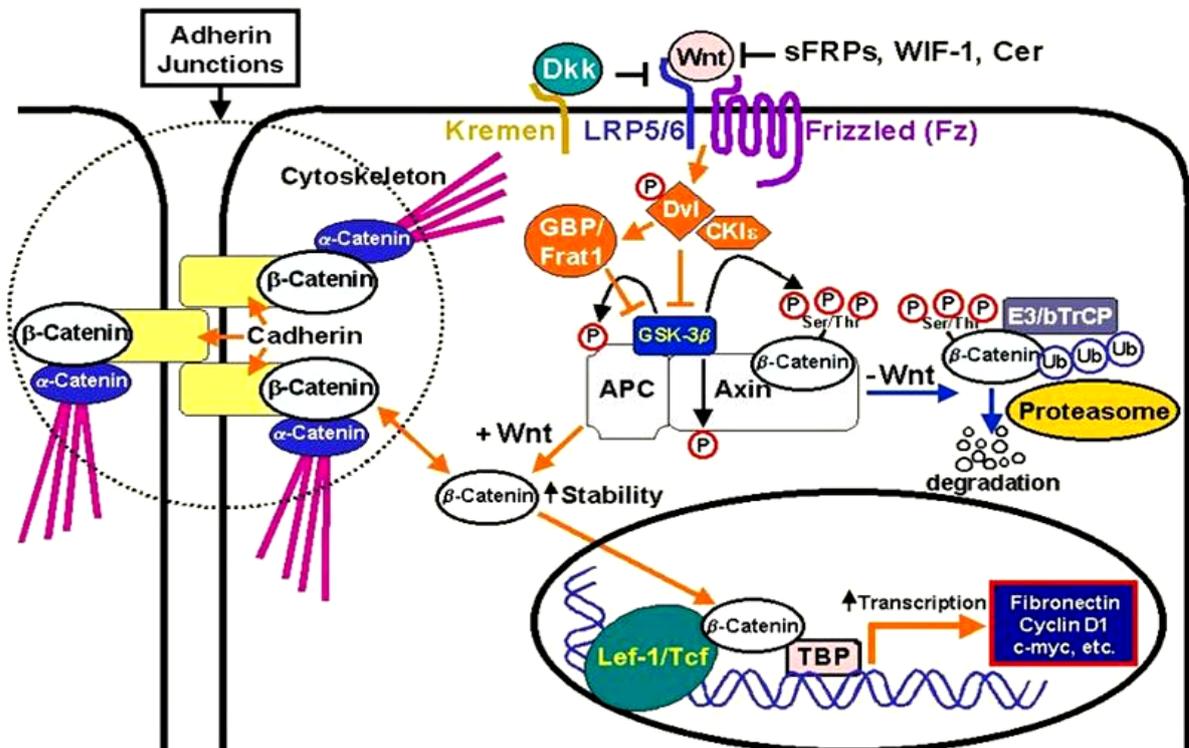


Fig.13: Vía Wnt canónica. +Wnt induce la estabilización y acumulación en el citoplasma de β -catenina y su traslocación al núcleo celular en donde afecta la transcripción de genes blanco; en ausencia de Wnt el "complejo de degradación", formado por APC, Axina y GSK-3 β , degrada a β -catenina a través de la vía del proteosoma (Gordon y Nusse, 2006)

El exceso en los niveles de β -catenina es modulado por medio del "Complejo de Degradación" (Nelson, 2004). Un componente clave de dicho complejo es APC, que se encuentra unido a axina. Para que el "Complejo de Degradación" pueda actuar, β -catenina necesita ser fosforilada por la glucógeno sintasa kinasa (GSK3 β) en residuos serina/treonina específicos; así, β -catenina fosforilada incrementa su afinidad por APC, desplazando la unión de este con axina pues los motivos de unión de APC a axina y β -catenina se traslapan (Xing y cols,

2003). Una gran cantidad de tumores colorrectales contienen mutaciones en este motivo de unión, lo que impide que APC se una a axina o degrade β -catenina (Kawano, 2003). Después de la activación de FZ/LRP por su ligando, la actividad cinasa del “complejo de degradación” es inhibida. Consecuentemente, la isoforma no fosforilada de β -catenina se estabiliza, lo que lleva al aumento de sus niveles en el citoplasma.

Esta acumulación conduce a la translocación hacia el núcleo celular de β -catenina (fig. 13), donde se asocia con el factor de transcripción LEF/TCF y a un activador transcripcional llamado Pygopus (Pygo). Pygo contiene un dominio compartido entre una gran cantidad de proteínas que tienen papel de remodeladores de la cromatina nuclear y coactivadores transcripcionales (Belenkaya, 2002). Mutaciones en Pygo tienen como resultado diversos defectos que son similares a los que se producen por la pérdida de las funciones de la proteína Wnt (Kramps, 2002).

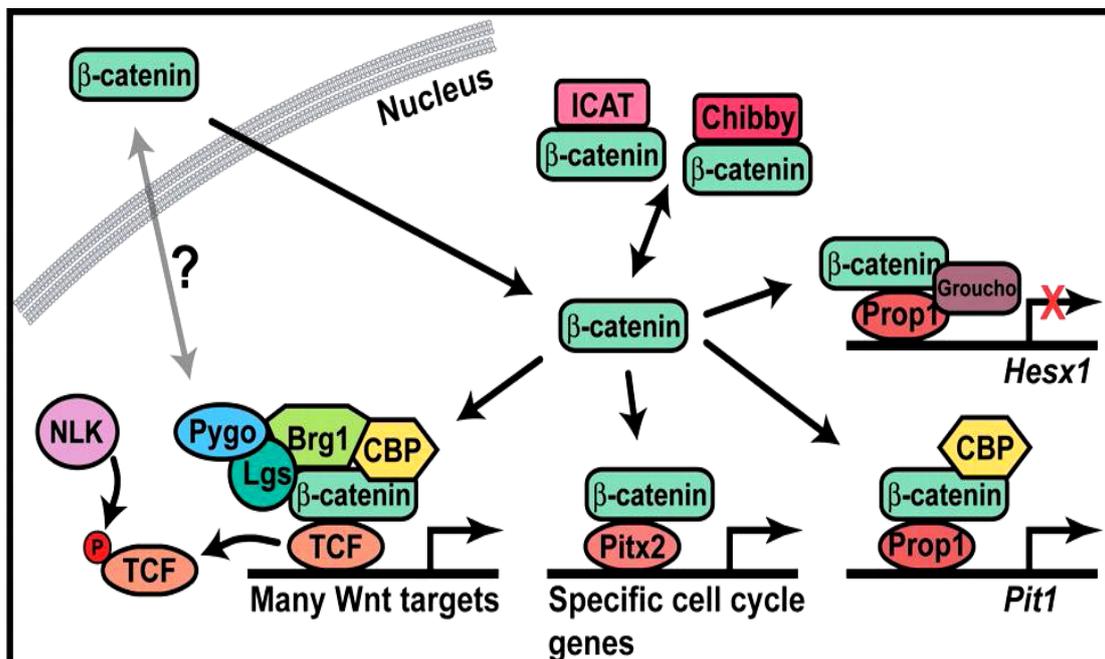


Fig. 14: La Vía Wnt en el núcleo. β -catenina en el núcleo se asocia con LEF/TCF, a Pygopus y otros coactivadores transcripcionales, afectando la transcripción de genes blanco; en ausencia de Wnt TCF se une a Groucho formando un complejo represor de genes (Gordon y Nusse, 2006)

En ausencia de la señalización de Wnt, TCF se une a Groucho, formando un complejo represor de los genes que se activan transcripcionalmente por esta vía. Groucho puede reprimir la transcripción de genes por medio de la inhibición de la maquinaria basal de transcripción y el reclutamiento de desacetilasas de histonas (HDACS) (Yu, 2001; Chen, 1999). Aunque Groucho no interactúa con el ADN, ejerce su función represiva por su interacción con las regiones amino-terminal de las histonas H3 y H4 y por la modificación de la estructura de la cromatina (Sekiya y Zaret, 2007). De esta manera, la especificidad de los genes que serán reprimidos por Groucho está dada por LEF/TCF. Cuando β -catenina entra al núcleo convierte al complejo represor LEF/TCF/Groucho en un complejo activador. Esto es posible debido a que Groucho es desplazado por la interacción de β -catenina y LEF/TCF, activando así genes blanco (Daniels y Weis, 2005).

Se ha implicado a la ruta Wnt-CPA-beta-catenina como mediadora de la proliferación celular en algunas estirpes celulares. Una de las proteínas que participa en la vía Wnt es la cinasa-sintasa de glucógeno (GSK3 β). La unión de Wnt a sus receptores inicia una serie de eventos que inhibe la actividad de la GSK3 β y evita la degradación de β -catenina. En ausencia de la señal Wnt, GSK3 β fosforila a β -catenina y la degrada.

En el desarrollo de las neoplasias ginecológicas participan diversos factores endocrinos, autocrinos y paracrinos, relacionados principalmente con hormonas sexuales. En la miomatosis uterina participan principalmente estrógenos y progesterona. Se ha determinado en células epiteliales uterinas de ratón que GSK3- β es estimulada por los estrógenos e inhibida por la progesterona. Esto sugiere la regulación de dichas hormonas sobre la vía Wnt

1.1.4.4 Fulvestrant:

Los estrógenos tienen efectos pleiotróficos en el útero. Sus funciones son preparar al útero para la implantación y ocurren mediante la promoción de proliferación y remodelación endometrial y de angiogénesis. Los estrógenos

Fulvestrant provoca específicamente la inmovilización del receptor de estrógeno (ER- α) en la matriz nuclear al provocar una rápida degradación de la vía ubiquitina-proteosoma (Xinghua, 2006).

1.1.4.5 Mifepristona:

Muy poco después del descubrimiento de los receptores de progesterona (Chabbert, 2005) se postuló que el desarrollo de un antagonista para dichos receptores tendría un gran potencial terapéutico.

El primer reporte sobre mifepristona, con propiedades de antagonista a receptores de progesterona y glucocorticoides, fue publicado en los inicios de la década de 1980 (Philibert, 1981). Desde entonces, numerosos compuestos han sido sintetizados, con un espectro de actividad desde antagonismo puro a receptores de progesterona a combinación de efectos agonistas y antagonistas.

Mifepristona, conocida también como RU-486 (fig. 16) es el antiprogéstágeno más utilizado para el tratamiento de los leiomiomas. La progesterona se adhiere al receptor de progesterona A o B (PR-A, PR-B). La mifepristona ejerce sus efectos básicamente a través del PR-A, que abunda más en los miomas que el PR-B (Blithe, 2003).

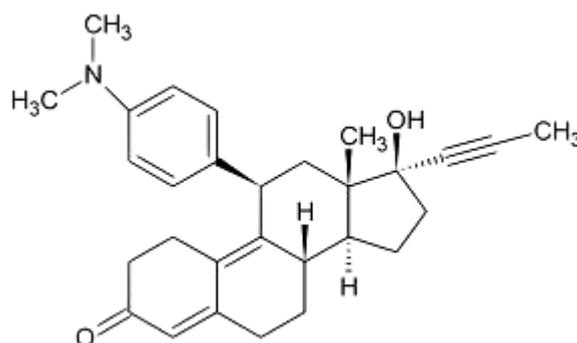


Fig. 16: Estructura de mifepristona (Speroff, 2007)

Los estudios iniciales con mifepristona y los más recientes con asoprisnil han demostrado la eficacia de estos agentes para el tratamiento de los leiomiomas. Sin embargo la observación de una incidencia de hasta 25 % de hiperplasia

endometrial (Eisinger, 2003) hace necesario realizar estudios adicionales para documentar su seguridad.

Bajo condiciones “in vitro” un antagonista puede comportarse como un agonista, dependiendo del tipo de modelo y ligando, el contexto celular y de la dosis y duración de la exposición al ligando. El método habitual para evaluar la actividad progestacional de una molécula es el test de McPhail (McPhail, 1934; Elger, 2000), que determina el grado de proliferación y transformación endometrial en conejas inmaduras cebadas con estradiol y subsecuentemente tratadas con la sustancia bajo prueba. Las propiedades de antagonista de la sustancia pueden ser evaluadas mediante la administración de progesterona junto con la sustancia bajo prueba. En este test mifepristona, onapristona (ZK-98299) y CDB-2914 demostraron ser antagonistas puros de receptores de progesterona sin ninguna actividad agonista.

Otros modelos se han utilizado para evaluar la actividad progestacional de estos compuestos. Mifepristona y CDB-2914 se han mantenido como antagonistas puros (Attardi, 2002; Blithe, 2003). En los mismos modelos, asoprisnil demostró menor actividad de antagonista que mifepristona (DeManno, 2003).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La miomatosis uterina es la enfermedad tumoral más frecuente del aparato genital femenino y es la causa más frecuente de cirugía pélvica ginecológica. Su relevancia clínica tiene que ver con las repercusiones en el estado de salud de las mujeres afectadas. Es una patología ginecológica clásica en la que aparentemente casi todo es bien conocido y sin embargo aún quedan muchos aspectos por aclarar desde los puntos de vista etiológico, patogénico e histopatológico, de su asociación a los problemas de fertilidad o a otras patologías y de las posibilidades terapéuticas.

Los factores que promueven el inicio de los miomas y que regulan su crecimiento permanecen pobremente entendidos. Se ha implicado a la ruta Wnt-CPA-beta-catenina como mediadora de la proliferación celular en algunas estirpes celulares. Una de las proteínas que participa en la vía Wnt es la cinasa-sintasa de glucógeno (GSK3 β). La unión de Wnt a sus receptores inicia una serie de eventos que inhibe la actividad de la GSK3 β y evita la degradación de la β -catenina. En ausencia de la señal Wnt, GSK3 β fosforila a β -catenina y la degrada.

En el desarrollo de las neoplasias ginecológicas participan diversos factores endocrinos, autocrinos y paracrinos, relacionados principalmente con hormonas sexuales. En la miomatosis uterina participan principalmente estrógenos y progesterona. Se ha determinado en células epiteliales uterinas de ratón que GSK3- β es estimulada por los estógenos e inhibida por la progesterona. Esto sugiere la regulación de dichas hormonas sobre la vía Wnt.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo es la expresión proteica y del gen de Wnt-7a y Wnt-5a en tejidos de tres regiones de útero con miomatosis durante las fases estrogénica y progestacional del ciclo menstrual?

4. JUSTIFICACIÓN

Los factores que promueven el inicio de los miomas y que regulan su crecimiento permanecen pobremente entendidos. Estudios sugieren que la vía de señalización celular Wnt y sus ligandos relacionados contribuyen al inicio y desarrollo de los miomas uterinos a través de mecanismos antiapoptóticos (Fukuhara, 2002; Mangioni, 2005).

Durante el desarrollo Wnt modula procesos relacionados con movimiento, forma y polaridad. En el adulto, la vía Wnt también regula varios procesos, tales como el desarrollo de la glándula mamaria. La desregulación de la vía Wnt en la embriogénesis puede causar defectos incompatibles con la vida y en el adulto se le ha relacionado con el desarrollo de carcinomas colorectales, cáncer hepatocelular, cáncer de útero, cáncer de ovario y melanomas (Dimitriadis, 2001; Dong, 2001); como mecanismo se ha propuesto una alteración en la expresión de GSK-3 β y GSK-3 α (Franca, 2002).

Se ha determinado en células epiteliales uterinas de ratón que GSK-3 β es estimulada por los estrógenos e inhibida por la progesterona. Esto sugiere la regulación de dichas hormonas sobre la vía Wnt (Chen, 2005).

En el desarrollo de neoplasias ginecológicas participan factores endocrinos, autocrinos y paracrinos, relacionados principalmente con hormonas sexuales. En la miomatosis uterina participan estrógenos y progesterona.

Analizar la expresión proteica y del gen de Wnt-7a y de Wnt-5a en tejido del mioma, del tejido subtumoral y del miometrio sano en las fases estrogénica proliferativa y progestacional secretora del ciclo menstrual en el mismo útero de

pacientes con miomatosis uterina permitirá obtener conocimiento básico acerca del mecanismo de acción de estas proteínas y genes en estas tres regiones de dichos úteros en un ambiente hormonal estrogénico y progestacional. De esta manera se podrían empezar a entender los mecanismos involucrados en el inicio y crecimiento de los miomas, con futuras posibilidades de encontrar formas de prevención y tratamiento hasta ahora no disponibles. Estos son objetivos que requerirán de otros estudios, con fundamento en los conocimientos derivados del presente estudio.

5. HIPÓTESIS

“La expresión proteica y génica de las vías de señalización Wnt-7a y Wnt-5a es mayor en el mioma que en la región subtumoral o el miometrio sano en tejidos de estas tres regiones de útero con miomatosis durante las fases estrogénica y progestacional del ciclo menstrual”.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general:

- Analizar la expresión proteica y genética de las proteínas Wnt-7a y Wnt-5a en biopsias de tres regiones de útero con miomatosis en las fases estrogénica y progestacional del ciclo menstrual.

6.2 Objetivos particulares:

1. Comparar la expresión proteica de Wnt-7a y Wnt-5a en tejidos de tres regiones de útero con miomatosis durante las fases estrogénica y progestacional del ciclo menstrual.
2. Comparar la expresión génica de Wnt-7a y Wnt-5a en tejidos de tres regiones de útero con miomatosis durante las fases estrogénica y progestacional del ciclo menstrual.

7. DISEÑO METODOLÓGICO

7.1 Tipo de estudio:

El presente es un estudio observacional, analítico, prospectivo y transversal; fue realizado en tejidos humanos obtenidos del útero de pacientes operadas de una histerectomía total abdominal por diagnóstico de miomatosis uterina y que firmaron un consentimiento informado.

7.2 Ubicación Temporal y Espacial, Universo y Población:

La población objetivo para el presente estudio fueron pacientes con diagnóstico de miomatosis uterina de medianos elementos, y la población accesible fueron pacientes con diagnóstico de miomatosis uterina de medianos elementos, que fueron operadas de histerectomía total abdominal en los quirófanos de cirugía programada del Hospital de la Mujer de la Secretaría de Salud durante el período de tiempo comprendido entre los meses de octubre de 2010 y abril de 2011, y que cumplieron con los criterios de selección que se enumeran a continuación:

7.3 Criterios de selección

7.3.1 Criterios de inclusión:

- Pacientes de 30 a 45 años de edad.
- Pacientes con diagnóstico de miomatosis uterina de medianos elementos.
- Pacientes cuyo tratamiento consistente en histerectomía total abdominal fue decidido previamente a su inclusión en el estudio.
- Pacientes que firmaron el consentimiento informado.

7.3.2 Criterios de no inclusión:

- Pacientes con diagnóstico de miomatosis uterina de pequeños o grandes elementos.
- Pacientes con patología ovárica.
- Pacientes con tratamiento de radioterapia y/o quimioterapia hasta un año

antes de la cirugía.

- Pacientes con tratamiento hormonal hasta un año antes de la cirugía.
- Pacientes con otros tumores al momento del diagnóstico de miomatosis.

7.3.3 Criterios de exclusión:

- Muestras que al momento del análisis histopatológico presenten pólipos, adenomiosis o necrosis.
- Muestras que al momento del análisis histopatológico no sea posible determinar la fase del ciclo menstrual en el endometrio.

7.3.4 Criterios de eliminación:

- Pacientes que no quieran seguir participando en el protocolo y retiren su consentimiento informado.

7.4 Descripción operativa del estudio:

Los tejidos fueron obtenidos inmediatamente después de la extracción del útero mediante histerectomía total abdominal de las pacientes incluidas en el protocolo de investigación con el siguiente programa de actividades:

1. Se acudió a revisión de la programación de cirugía para histerectomía abdominal de las pacientes el día previo a la misma.
2. El mismo día de la cirugía se revisó el expediente clínico para determinar si la paciente cumplía con los criterios para este estudio.
3. Se estableció contacto, a través de su médico tratante, con las pacientes que tuvieron el perfil para entrar en el estudio, e invitarlas a participar en el mismo y obtener su consentimiento, con la firma del formato diseñado para tal fin. Esta actividad se llevó a cabo en la sala de preparación de las pacientes una hora antes de la programada para su cirugía, haciendo énfasis en que su decisión de participar o no en el estudio no modificaría en nada el tratamiento quirúrgico inmediato o posterior ya planeado con anticipación por su médico tratante.

4. Los datos del expediente fueron corroborados, y en caso necesario fueron complementados, por interrogatorio directo para tener disponible toda la información pertinente para conocer y controlar las variables del estudio.
5. Bajo condiciones de asepsia y antisepsia estándar, se recibió de manos de la instrumentista la pieza quirúrgica (útero, con o sin anexos) la cual se examinó externamente y palpó para determinar la localización de los miomas.
6. Se realizó una incisión longitudinal al útero, se examinó internamente y se localizó (aron) el(los) mioma(s) por sus características macroscópicas (masas bien circunscritas, firmes, duras, de color aperlado, de aspecto arremolinado). En este protocolo solo se estudiaron los miomas de localización intramural, por reunir las características necesarias para el estudio.
7. Se tomaron 2 cm³ de tejido del centro del mioma, y a partir de uno de los bordes de éste, y con dirección opuesta al centro del tumor, se hizo otro corte de 2 cm³ que correspondió al tejido subtumoral (o la interfase mioma/miometrio). Para obtener muestra de miometrio sano se tomó un fragmento de tejido de 2 cm³ en una región del útero opuesta a la localización del mioma, y que estuvo libre de estas tumoraciones.
8. Cada una de las porciones así obtenidas se dividió en dos segmentos y guardaron en contenedores preparados para las diferentes metodologías de laboratorio del estudio.

7.5 Tamaño de muestra:

El tamaño de muestra que se usó es de 20 pacientes que cumplieron con todos los criterios de selección ya mencionados. Este tamaño de muestra fue elegido por los investigadores, sin cálculo, al tratarse de un estudio preclínico de tipo exploratorio.

Se determinó la expresión proteica y del gen de Wnt-7a y Wnt-5a en las tres regiones de útero con miomatosis ya señaladas, durante las dos fases del ciclo menstrual, y las variables son:

7.6 Definición de variables

7.6.1 Variables independientes

7.6.1.1 Localización del tejido estudiado, del centro del mioma, de la región subtumoral y del miometrio sano.

7.6.1.2 Fase del ciclo menstrual, proliferativa o secretora.

7.6.2 Variables dependientes

7.6.2.1 Expresión de proteica y del gen de Wnt-7a y de Wnt.5a.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Metodología de laboratorio

8.1.1 Análisis de la expresión de las proteínas Wnt-7a y Wnt-5a: La expresión de Wnt-7a y Wnt-5a se realizó por medio de western blot (Lane y Harlow, 1988) y de inmunohistoquímica.

8.1.1.1 Western Blot: Las muestras obtenidas se conservaron a temperatura estable de -80°C . Bajo condiciones estériles, las muestras se maceraron con nitrógeno líquido hasta obtener un granulado fino, se agregó buffer con inhibidores de proteasas y se homogenizaron por 15 a 30 segundos en un potter en un baño con hielo. Posteriormente se centrifugaron 10 minutos a 10,000 rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante; las muestras se almacenaron a 4°C mientras se llevaba a cabo la cuantificación de proteínas.

Para la cuantificación de proteínas se realizó una curva patrón con diferentes concentraciones de albúmina (0.2, 0.5, 5, 10, 20, 40 mg) por duplicado. Para la cuantificación de las muestras se mezclaron 200 μl de reactivo de Bradford, 2 μl de la muestra y 798 μl de agua destilada; posteriormente se homogenizaron y se hizo la lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm; se

obtuvieron dos valores por cada muestra y se sacó la media, a la que se aplicaron los factores de dilución y se obtuvo la concentración de proteína.

Las proteínas se sometieron a electroforesis SDS-PAGE, en condiciones desnaturizantes; para ello se preparó un gel separador y uno concentrador, tomando en cuenta para el primero el tamaño (Kda) de la proteína de interés. En el caso del separador, a una concentración del 10% se utilizaron 1 ml de glicerol 50%, 1.08 ml de agua, 1.25 ml de Tris 1.5M, 1.66 ml de acril-bis y 0.05 ml de SDS 10%. En el caso del concentrador 1.83 ml de agua, 0.75 ml de Tris 0.5M, 0.39 ml de acril-bis y 0.03 ml de SDS 10%.

En cada pocillo se cargaron 50 µg de proteína y la electroforesis se desarrolló a 110V por dos horas. La transferencia se realizó en membrana PVDF, a 20V por 45 minutos en cámara semiseca. Después de la transferencia las membranas se bloquearon por 1 hora a temperatura ambiente y con agitación utilizando 20 ml de leche al 5% en TBS-tween; luego se lavó con agua. Posterior a esto se incubó con el anticuerpo primario a una dilución de 1:1000 a 4°C, con agitación por 12 horas.

Al finalizar este período se realizaron tres lavados TBS-tween y se adicionó el anticuerpo secundario diluido en una proporción 1:5000 en TBS-tween, en agitación por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron tres lavados con TBS-tween en agitación y a temperatura ambiente.

Para revelar la reacción antígeno-anticuerpo se agregó a la membrana 2 ml de una solución de diaminobenzidina y se dejó reposar hasta la aparición de las bandas de interés para su posterior análisis densitométrico.

Las bandas obtenidas se sometieron a un análisis de imágenes (densitométrico) con el software "Quantity One"; dichas lecturas se normalizaron con las bandas obtenidas de la proteína de referencia, que en este caso fue la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

8.1.1.2 Retrotranscripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

8.1.1.2.1 Extracción de RNA de biopsias de tejido: La muestra pulverizada fue incubada con proteinasa-K libre de RNAsas, a 50°C por 12 horas, en agitación constante durante este tiempo. Se extrajo el RNA con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos. La fase superior se transfirió a un nuevo tubo y se añadió acetato de amonio y etanol. Posteriormente se incubó a -20°C mínimo una hora y se lavó con etanol al 70%, se secó y resuspendió para su cuantificación.

La integridad del RNA se determinó por medio de una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.5%, la cual se basa en el desplazamiento de moléculas de RNA a través de una matriz porosa formada por la agarosa polimerizada. Al aplicarse una corriente eléctrica a través del gel, los ácidos nucleicos que poseen carga negativa derivada de los grupos fosfatos que contienen migran hacia el ánodo en condiciones de pH neutro.

8.1.1.2.2 Cuantificación de RNA y Electroforesis: Se realizaron diluciones del RNA en agua libre de RNAsas. La concentración de RNA obtenida se determinó espectrofotométricamente. La integridad del RNA se corroboró por medio de electroforesis y se observaron las bandas de RNA en el transiluminador.

8.1.1.2.3 Protocolo de RT-PCR. Una vez cuantificado el RNA se realizó la RT-PCR.

8.1.1.2.4 Transcripción reversa. Síntesis de DNA complementario (cDNA).

La transcripción reversa es una reacción que consiste en la síntesis de DNA monocatenario o complementario (cDNA) a partir de moléculas de RNA monocatenario catalizada por la enzima transcriptasa reversa.

Para llevar a cabo esta reacción se utilizó 1 µl de RNA purificado de cada muestra así como un kit comercial (Epicentre CA); la reacción se llevó a cabo conforme a las instrucciones del proveedor.

Se preparó una mezcla de reacción con 1 µl de Random primers, 3 µl de RNA, 1 µl de dNTP Mix 10 mM y se agregaron 8 µl de agua MiliQ para obtener un volumen final de 13 µl. La mezcla de reacción se colocó en un tubo de polipropileno para PCR. La reacción se sometió a un ciclo de desnaturalización a 65°C por 2 minutos, en un termociclador convencional. Al finalizar el ciclo se colocó el tubo en hielo para evitar la renaturalización.

Posteriormente se agregaron 4 µl de solución amortiguadora MMLV 10X, 2 µl de DDT, 1µl de enzima transcriptasa reversa (TR), obteniéndose un volumen total de 20 µl. La mezcla se sometió a un ciclo de síntesis de cDNA a 37°C por 60 minutos y otro ciclo de inactivación y desnaturalización de la enzima a 85°C por 5 minutos. El cDNA resultante se cuantificó en el espectrofotómetro a una absorbancia de 260 nm. Con los datos obtenidos se calculó el volumen de reacción que contuviera 1000 ng de cDNA para poder ser amplificados por PCR en tiempo real.

8.1.1.2.5 Diseño de Iniciadores. Para el análisis de la expresión de los genes involucrados en la vía Wnt se diseñaron iniciadores específicos para los genes WNT-5a, WNT-7a y DVL-1. Este diseño se hizo en el programa Roche Applied Science, sitio Web en línea donde se evaluó el tamaño de amplicón, la sonda para PCR en Tiempo Real a utilizar entre otras variables. Los iniciadores diseñados se corroboraron con el programa OligoExplorer versión 1.2.

8.1.1.2.5.1 “Primers”:

Wnt-7aSense5'-GCCGTTACAGTGGAGCCTGTGCGTGC-3'

antisense 5'-AGCATCCTGCCAGGGAGCCCGCAGCT-3'

Wnt-5a sentido CATGAACTTGCAACAACG

antisentido ACAGCACATGAGGTCACAGC

Una vez terminada la amplificación se realizó electroforesis en agarosa utilizando marcadores de DNA, para visualizar el producto amplificado.

8.1.1.3 Inmunohistoquímica

Inmediatamente después de la obtención de los tejidos, éstos se fijaron con paraformaldehído (al 4% en PBS pH 7.4) por 4 horas; a continuación la inclusión en parafina se desarrolló mediante pases secuenciales en alcohol al 70, 80, 96 y 100 %, seguidos de alcohol-xileno (1:1), xileno y parafina. Una vez obtenidos los bloques de tejido embebidos en la parafina se procedió a realizar cortes histológicos de 5 micras de grosor, para posteriormente desarrollar la técnica de inmunohistoquímica como sigue:

Los cortes se sumergieron durante cinco minutos en la batería de rehidratación compuesta por Xileno (I y II) alcohol etílico al 100, 96, 80, 70 % y buffer PBS (pH 7.4), a continuación se incubaron en una solución de tritón X-100 durante 5 minutos, posteriormente se realizaron lavados con PBS-T (0.005 %) 3x5, y se inhibió a las peroxidasas con una solución de peróxido de hidrógeno al 0.3 % en metanol por 30 minutos en oscuridad, luego se realizaron tres lavados con PBS-T (0.05 %); el bloqueo se realizó con una solución de suero normal de cabra al 1 % en PBS, por 30 minutos, después se repitieron los lavados con PBS-T y se adicionó el anticuerpo primario que reconoce a las proteínas Wnt-5a y Wnt-7a (Wnt-5a sc-30224 cabra y Wnt-7a sc-2636, anticabra) (1:250), durante 12 horas a 4°C en cámara húmeda; al finalizar este periodo se hicieron lavados y se procedió a la exposición al anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (sc-2313, en ambos casos anticabra), por 2 horas a 37°C; después de lo anterior se lavó (3X5). La reacción se reveló, incubando con diaminobenzicida y se contratiñó con hematoxilina y los tejidos fueron deshidratados mediante pases secuenciales en la siguientes soluciones: etanol al 70 % (3'), al 80 % (3'), al 96 % (3'), al 100 % (3'), xileno (3'). Finalmente se recubrieron con resina y se observó al microscopio de campo claro.

9. RESULTADOS

9.1 Características generales y epidemiológicas de las pacientes

La edad de las pacientes estuvo previamente determinada como variable controlada (tabla 6).

El mayor número de pacientes se encontraron casadas o en unión libre y solo un grupo pequeño de ellas estaban solteras (tabla 6). El nivel de escolaridad más frecuente entre las pacientes fue de secundaria seguido de primaria (tabla 6).

El lugar de residencia estuvo igualmente repartido, con domicilios localizados en el Distrito Federal y el estado de México (tabla 6). La religión católica fue la preponderante entre las pacientes del estudio con un porcentaje muy similar al de la población general del país (tabla 6).

La gran mayoría de las pacientes se dedican a las labores de su hogar exclusivamente y solamente un pequeño porcentaje practican una actividad laboral remunerada (tabla 6).

Por otro lado, un alto porcentaje de las pacientes no tuvieron algún antecedente familiar de tumores malignos distintos de la miomatosis uterina (tabla 6). De acuerdo a los datos contenidos en los expedientes, un porcentaje elevado de las pacientes cursó con anemia secundaria a los trastornos del sangrado. La hipertensión arterial y la diabetes mellitus fueron las enfermedades asociadas más frecuentes (tabla 6).

El promedio de número de embarazos previos fue 2.4 con mínimo de 0 y un máximo de 6. El método anticonceptivo más frecuentemente reportado fue la oclusión tubaria bilateral.

Un número importante de pacientes no usaban ningún método anticonceptivo previo a su cirugía. Por criterios de no inclusión los métodos anticonceptivos hormonales no aparecen cuantificados (tabla 6).

Tabla 6. Características generales y epidemiológicas de las pacientes (n=20)

Característica observada	Porcentaje
Edad (31-45 años)	100
Estado civil:	
Casadas	55
Unión libre	30
Solteras	15
Escolaridad:	
Primaria	10
Secundaria	80
Preparatoria	5
Licenciatura	5
Lugar de residencia:	
Distrito Federal	45
Estado de México	55
Religión:	
Católica	85
No profesa alguna	10
No proporciona dato	5
Ocupación:	
Labores del hogar	90
Empleada doméstica	5
Profesionista	5
Antecedentes familiares de cáncer:	
Con antecedentes familiares de cáncer	30
Sin antecedentes familiares de cáncer	70
Enfermedades asociadas:	
Ninguna	30
Diabetes mellitus	10
Hipertensión arterial	15
Anemia	60
Método anticonceptivo:	
Oclusión tubaria bilateral	55
Condomes	5
Ninguno	40

Un mayor número de pacientes presentaron un índice de masa corporal anormal, con diferentes grados de sobrepeso u obesidad (tabla 7).

Tabla 7. Índice de masa corporal de las pacientes estudiadas

Índice de masa corporal	Total	Porcentaje
Normal (18.5-24.9)	2	10
Sobrepeso (25-29.9)	12	60
Obesidad tipo I (30-34.9)	5	25
Obesidad tipo II (35-39.9)	1	5
Totales	20	100

En el mayor número de pacientes el estudio histopatológico del endometrio demostró que éste se encontraba bajo el efecto progestacional de la fase lútea del ciclo (tabla 17).

Tabla 8. Clasificación de la fase endometrial

Fase endometrial	Total (n=20)	%
Estrogénica o proliferativa	6	30
Progestacional o secretora	14	70
Totales	20	100

9.2 Expresión de Wnt-5a y Wnt-7a por Inmunoblot:

El análisis de las proteínas wnt-5a y Wnt-7a mediante la técnica de Inmunoblot en miometrio sano, tejido subtumoral y del mioma mostró que Wnt-5a se expresa igual en los tres tejidos uterinos tanto en la fase secretora como en la fase proliferativa (fig. 17). Con respecto al análisis de Wnt-7a en tejidos de la fase

secretora mostró una expresión ligeramente mayor en mioma; esta situación tiene la misma tendencia en la fase proliferativa con mayor intensidad (fig. 17).

De acuerdo a lo anterior se resume que la proteína con mayor expresión fue Wnt-7a en el mioma de la fase proliferativa.

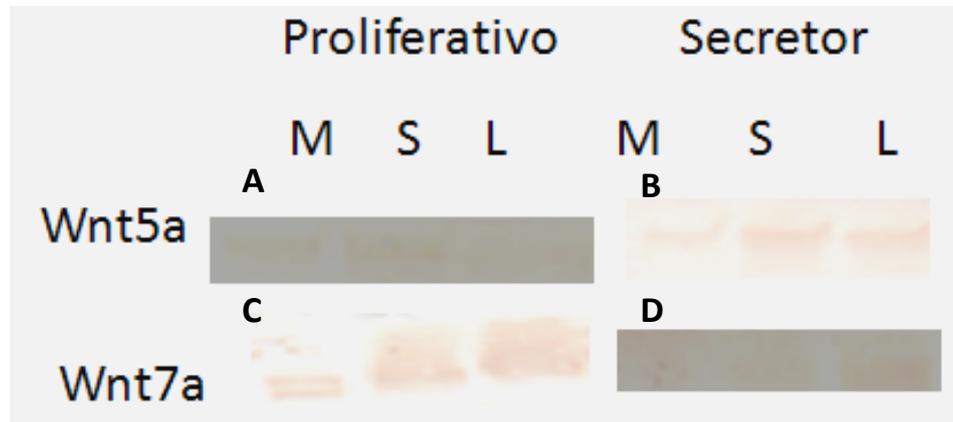


Fig. 17: Imagen representativa del análisis de Inmunoblot. A) expresión de Wnt-5a en tejidos uterinos de fase proliferativa, B) expresión de Wnt-5a en tejidos uterinos de fase secretora, C) expresión de Wnt-7a en tejidos uterinos proliferativos, D) expresión de Wnt-7a en tejidos de fase secretora, (M=miometrio sano, S=tejido subtumoral, L=leiomioma).

9.3 Expresión de Wnt-5a y Wnt-7a por Inmunohistoquímica:

Se desarrolló la técnica de inmunohistoquímica para observar la localización de Wnt-5a y Wnt-7a en los tejidos.

La inmunohistoquímica indicó que Wnt-7a estaba presente en células de músculo liso y no en las células endoteliales o cercano a vasos sanguíneos de los tejidos proliferativos, y específicamente en tejido tumoral. Adicionalmente, no se observa la expresión en los tejidos de fase secretora.

Con respecto a la expresión y localización de Wnt-5a no se observó en ninguno de los tres tejidos en ninguna de las dos fases del ciclo menstrual (fig. 18).

La expresión de Wnt-7a se observa mayor en tejido de mioma que en tejido de miometrio sano o de región subtumoral en la fase proliferativa.

No se observó con claridad la presencia de Wnt-7a en los tejidos de la fase secretora (fig. 18).

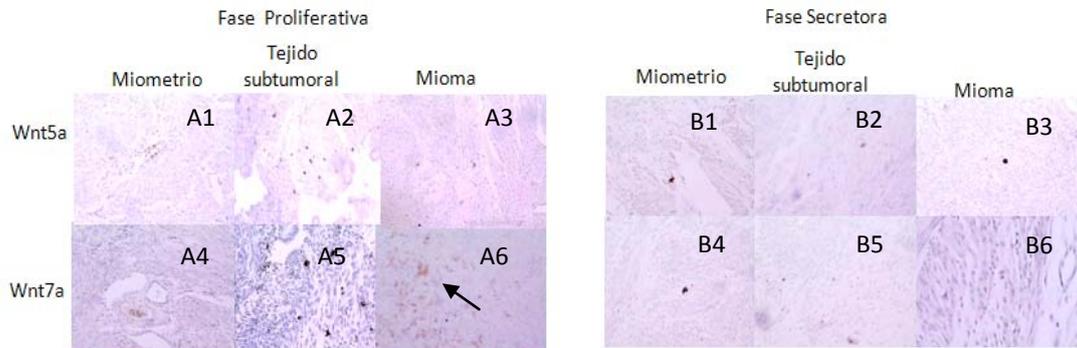


Fig. 18: Inmunohistoquímica. Wnt-7a se expresó más en mioma de fase proliferativa (panel A6) y no se observa con claridad la positividad en tejidos de fase secretora (paneles B1-B3). En ninguna fase se detectó Wnt-5a en ninguno de los tres tejidos (paneles A1-A3 y B1-B3).

9.4 Expresión del gen de Wnt-7a y de Wnt-5a.

Después de la extracción, la integridad del RNA se determinó por medio de una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.5% (fig. 19).

Se realizaron diluciones del cDNA para tomar 500 ng de muestra para analizar la expresión de los genes de Wnt-5a y de Wnt-7a en mioma, región subtumoral y miometrio sano en fases proliferativa y secretora del ciclo.

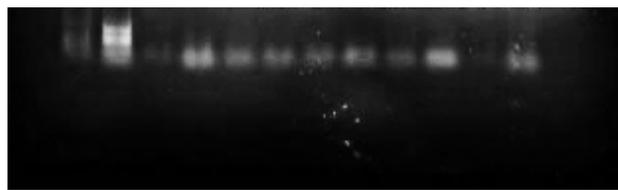


Fig.19: Gel teñido con bromuro de etidio que muestra la integridad del RNA aislado a partir de las muestras de las diferentes regiones del útero en estudio. Se muestran 2 bandas íntegras características del RNA.

Con respecto a la expresión de Wnt-5a, se encontró que en la fase secretora fue constante en los tres tejidos (fig. 20).

En esta misma fase el gen Wnt-7a se expresó igual en miometrio sano y tejido subtumoral, pero en el mioma fue mayor (fig. 21).

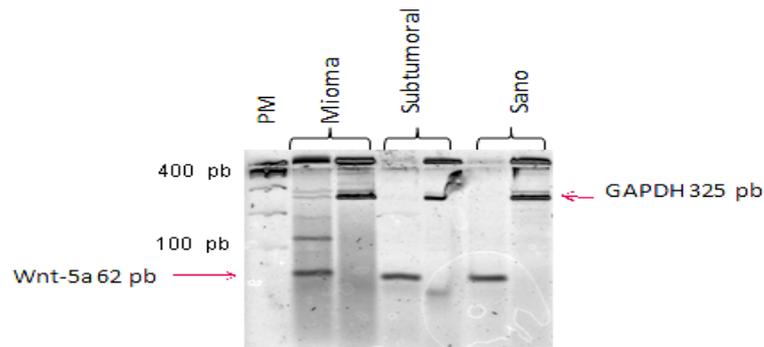


Fig. 20: Expresión génica de Wnt-5a en fase secretora de 2 muestras. Se observa que es muy similar en las tres regiones (gel de agarosa al 1.5 %).

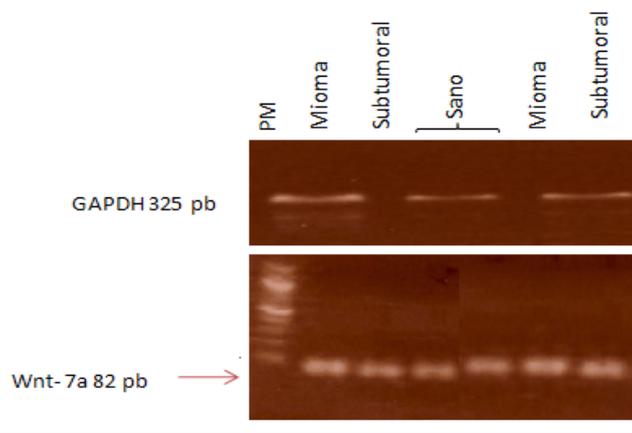


Fig. 21: Expresión de Wnt-7a en fase secretora del ciclo menstrual. Se observa que la expresión en el mioma es mayor que en tejido subtumoral y tejido sano (gel de agarosa al 1.5 %).

En la fase proliferativa del ciclo menstrual Wnt-5a no se expresó en miometrio sano; pero sí se observó en tejido tumoral y aumentó en el mioma (fig. 22).

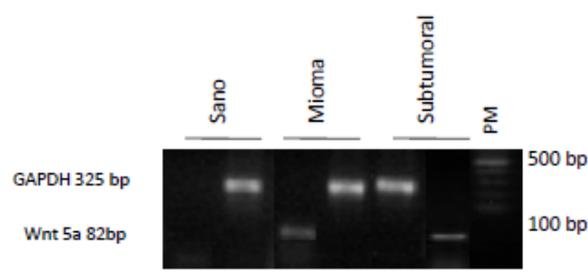


Fig. 22: Expresión de Wnt-5a en fase proliferativa del ciclo menstrual. Se observa expresión mayor en mioma que en tejido subtumoral y ausencia de expresión en miometrio sano (gel de agarosa al 1.5 %).

En la fase proliferativa el gen Wnt-7a no se expresó en el miometrio sano; pero sí se expresó en el tejido subtumoral y mioma, siendo similar en ambos (fig. 23).

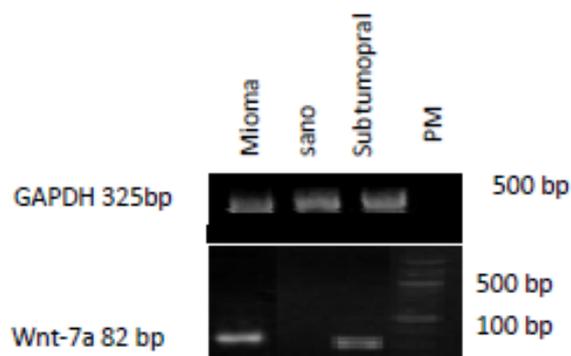


Fig. 23: Expresión de Wnt-7a en fase proliferativa del ciclo menstrual. Se observa expresión igual en tejido subtumoral y mioma y ausencia de expresión en miometrio sano (gel de agarosa al 1.5 %).

10. DISCUSIÓN

10.1 Características generales de las pacientes

A pesar de ser una muestra pequeña de pacientes las que se incluyeron en el presente estudio, es posible hacer consideraciones pertinentes en cuanto a sus características epidemiológicas y poblacionales, pues son representativas de los rasgos que comparten muchas de las pacientes que son atendidas en un hospital del sector público a población abierta, como es el Hospital de la Mujer de la Secretaría de Salud. Estas variables se reportan en la tabla 6.

La edad de las pacientes se encontró entre los 30 y 45 años, ya que fue el grupo de edad previamente seleccionado como criterio de inclusión, con la finalidad de que fueran pacientes con ciclos menstruales potencialmente ovulatorios y así tener tejidos en fase preovulatoria (estrogénica) y postovulatoria (progestacional) del ciclo. El 85 % de las pacientes tiene una relación de pareja en matrimonio o unión libre contra un pequeño porcentaje de pacientes solteras. El 90 % de las pacientes se dedican a las labores del hogar de forma exclusiva. El 90 % de las pacientes tienen un nivel de escolaridad de secundaria.

El lugar de residencia de las pacientes cabe ser destacado pues en el 55 % de los casos se encontró fuera del Distrito Federal, ciudad donde se encuentra ubicado el Hospital de la Mujer; este hecho pone de manifiesto la preferencia de las pacientes por este hospital o, probablemente, a la falta de oportunidades de atención en hospitales cercanos a su lugar de residencia.

La religión preponderante entre las pacientes es la católica, como ocurre en general en México.

Se sabe que aproximadamente en el 40 % de los miomas existen alteraciones cromosómicas del tipo de las translocaciones, deleciones y duplicaciones en los cromosomas 6, 7, 10, 12, 14 y 22 dentro del tumor. La miomatosis uterina no es una enfermedad genéticamente heredada, pero sí se ha documentado la mayor frecuencia entre mujeres de un mismo grupo familiar. En el grupo de pacientes

de este estudio se encontró un 30 % de antecedentes heredofamiliares en relación con otro tipo de tumores (malignos) distintos de los miomas.

Las enfermedades relacionadas o concomitantes más frecuentes son la anemia, la hipertensión arterial sistémica y la diabetes mellitus. Es explicable la alta frecuencia de anemia encontrada (60 %), pues la manifestación clínica más frecuente de los miomas uterinos es la metrorragia y otros trastornos del ciclo menstrual. Esta manifestación frecuente de la anemia puede estar relacionada con la mayor pérdida hemática durante los episodios de sangrado o a una tardanza de las pacientes para buscar atención médica. Aunque no se presenta en tabla específica la información, en la base de datos del estudio se encontró que solamente el 20 % de las pacientes requirió transfusión de paquetes de eritrocitos como parte del tratamiento integral para su padecimiento.

El uso de anticonceptivos hormonales no aparece entre los métodos de anticoncepción empleados por las pacientes. La restricción de su uso está en los criterios de selección, para evitar el efecto de los estrógenos y progestágenos de su composición sobre las variables del estudio.

No sorprende que el 90 % de las pacientes tengan algún grado de sobrepeso u obesidad (tabla 7), dada la alta incidencia de estos padecimientos entre la población mexicana, principalmente entre las mujeres. Es probable que la incidencia de miomatosis uterina entre mujeres con sobrepeso u obesidad se relacione con el estado de estrogenismo aumentado y sostenido condicionado por la síntesis de estrógenos en el tejido adiposo mediante el proceso de aromatización de los andrógenos suprarrenales.

En la tabla 8 se observa que el 30 de las pacientes se encontraron en la fase proliferativa o estrogénica del ciclo menstrual, y 70 % estuvieron en una fase progestacional postovulatoria de dicho ciclo menstrual. Estos hallazgos permiten realizar el análisis de una posible influencia de los estrógenos y la progesterona sobre proteínas implicadas en la vía Wnt de señalización celular, al observar en este trabajo la expresión proteica y génica de las proteínas Wnt-7a y Wnt-5a en las dos fases del ciclo menstrual.

10.2 Análisis proteico y expresión del gen de Wnt-7a y de Wnt-5a:

Los resultados de la expresión proteica y génica de Wnt-7a y de Wnt-5a que se tuvieron a través de las metodologías de inmunoblot, inmunohistoquímica y PCR permiten hacer un análisis de las mismas y de las diferencias encontradas.

En relación a Wnt-7a se observó que en fase proliferativa (con influencia tisular estrogénica) presenta una expresión proteica similar en tejido de miometrio sano y tejido subtumoral y que dicha expresión fue mayor en tejido de mioma. Estas observaciones coincidieron al obtenerlas por técnicas de inmunoblot y de inmunohistoquímica, lo cual significa la estabilidad de las moléculas y una relación directa entre cantidad de mRNA con la expresión (o síntesis) de la proteína.

La expresión del gen Wnt-7a no se observó en tejido de miometrio sano, pero sí se evidenció en mioma y en la región subtumoral en fase proliferativa. En los tejidos bajo influencia hormonal progestágena (fase secretora) la expresión proteica de Wnt-7a se observó igualmente incrementada en el mioma, con respecto a la región subtumoral o del miometrio sano, pero con menor intensidad que la observada en la fase proliferativa, pero no fue posible ver estas diferencias por la técnica de inmunohistoquímica pues la positividad no se observó bien en las cortes obtenidos. La expresión del gen de Wnt-7a se observa también mayor en tejido de mioma que en el tejido subtumoral y del miometrio sano en esta fase secretora.

Las diferencias de sensibilidad entre ambos métodos para observar la expresión proteica de Wnt-7a (inmunoblot e inmunohistoquímica) y para observar su expresión génica (PCR) pueden ser la explicación de que las observaciones de dicha expresión no concuerden; esto es posible cuando se comparan con el análisis génico. Sin embargo, existe concordancia con respecto al gen y la proteína Wnt-7a, ya que fue mayor en el tejido de mioma que en los tejidos de la región subtumoral y del miometrio sano en la fase proliferativa del ciclo. La misma tendencia se observa en la fase progestacional del ciclo pero con una

expresión tanto proteica como génica de menor intensidad en esta fase que en la proliferativa.

La mayor expresión proteica de Wnt-7a en los tejidos uterinos de fase estrogénica se puede explicar por la influencia que éstos ejercen en la inducción de Wnt-7a, específicamente en el mioma, que se ha observado que involucra la participación de estas hormonas en la vía canónica de Wnt, donde Wnt-7a induce primero la estabilización y acumulación de β -catenina y su posterior translocación al núcleo, donde activa la transcripción de genes blanco (Logan, 2004). Esto último se puede inferir debido a que se observó igualmente la expresión génica de Wnt-7a en las dos fases del ciclo menstrual, y esto ocurre también con mayor expresión en el tejido de mioma que en los tejidos de la región subtumoral y del miometrio sano. Hasta ahora se desconocía si estas hormonas modulaban esta expresión; sin embargo en este trabajo se puede constatar que sí lo hacen.

Por otra parte, el contenido proteico de Wnt-5a detectado por inmunoblot es similar en el mioma, región subtumoral y miometrio sano expuestos al ambiente estrogénico durante la fase proliferativa del ciclo. Sin embargo, mediante la técnica de inmunohistoquímica, no se indentificó a Wnt-5a en ninguno de los tres tejidos. Con respecto al análisis genético se observó que la expresión del gen Wnt-5a fue mayor en tejido del mioma que en tejido de la región subtumoral y no se observó en el miometrio sano. Durante la fase secretora del ciclo (con influencia de progesterona) la proteína de Wnt-5a se observó igual en los tres tejidos (mioma, región subtumoral y miometrio sano) en los datos obtenidos por inmunoblot. Al igual que en la fase proliferativa, en esta fase secretora no se observó la expresión proteica de Wnt-5a mediante inmunohistoquímica. La expresión del gen de Wnt-5a se observó igual en los tejidos de mioma, región subtumoral y miometrio sano en esta fase secretora.

Igual que lo observado para Wnt-7a, es posible que las diferencias de sensibilidad de los métodos para observar la expresión proteica y génica de Wnt-5a sean la explicación de que las observaciones de dicha expresión sean

diferentes. Sin embargo, se observa que Wnt-5a tiene una expresión proteica y génica mayor en el tejido de mioma que en los tejidos de la región subtumoral y del miometrio sano en la fase proliferativa del ciclo, aunque esto no se observó por la técnica inmunohistoquímica. En los tejidos de fase secretora se observa una expresión tanto proteica como génica de menor intensidad que en los de fase proliferativa, pero de manera igual en los tres diferentes tipos de tejido.

La expresión de mRNA puede no coincidir con los niveles de proteína, puesto que aún no se ha estudiado cómo se comportan en la paciente la expresión génica en el tiempo. Sin embargo, trabajos donde se relacionan ambos tipos de moléculas sugieren que ocurre una relación directa.

Es posible que esto suceda así porque la expresión de Wnt-5a ocurra por los efectos no genómicos de los estrógenos y de la progesterona, lo cual puede significar la participación de estas hormonas esteroides en la vía Wnt/Ca⁺² “no canónica” que regula la adhesión celular y la motilidad mediada por Wnt-5a, dispara la liberación de Ca⁺² intracelular para activar enzimas sensibles a Ca⁺² como la proteína cinasa C (PKC) y cinasa II dependiente de calmodulina y Ca⁺² (CaMKII) sin activación de la vía β -catenina. Esto último se puede sugerir ya que se observó igualmente la expresión génica de Wnt-5a en las dos fases del ciclo menstrual, lo cual puede deberse a la participación de los estrógenos y de la progesterona a través de sus efectos genómicos sobre la vía Wnt/Ca⁺² “no canónica” (Gumbiner, 2005), y esto ocurre también con mayor expresión en el tejido de mioma que en los tejidos de la región subtumoral y del miometrio sano en la fase proliferativa del ciclo.

Se ha encontrado que Wnt-5a dirige la diferenciación endotelial a través de la vía no canónica (Hwang, 2009), sin embargo, los datos disponibles sobre la señalización de Wnt no canónica en el desarrollo vascular son todavía escasos, y la investigación adicional es necesaria para definir en qué medida la vía Wnt no canónica puede actuar en los mecanismos de angiogénesis, en particular en miomatosis uterina.

El estudio de la función del sistema Wnt en el desarrollo vascular embrionario y la angiogénesis ha tenido especial auge en los últimos años, aunque sólo se tiene un conocimiento parcial de cómo funciona el sistema en las células vasculares y cómo puede ser afectado en condiciones patológicas.

Es conocido que células endoteliales derivadas de diferentes tipos de vasos sanguíneos expresan distintos tipos de receptores y responden de manera diferente a los diversos Wnt. Además, Wnt puede actuar en concierto con otras vías de señalización como Notch o como TGF en la modulación del desarrollo vascular y la especificación endotelial (Dejana, 2010). El mismo factor Wnt o receptor puede inducir distintas respuestas, a veces opuestas en las células endoteliales en función del contexto, como, por ejemplo, la activación de factores de crecimiento, los niveles de oxígeno, la inducción de la permeabilidad y la expresión de factores de transcripción (Dejana, 2010). Por otra parte, las células endoteliales puede producir no sólo ligandos para Wnt sino también inhibidores de sus receptores, como Frizzled soluble o Dkks, lo que puede equilibrar la vía de un señalización Wnt (Goodwin, 2006).

El papel de la señalización de Wnt en cáncer fue descrito inicialmente hace 20 años con el descubrimiento seminal del gen *wnt-1* como sitio de integración para el virus de tumor mamario de ratón (MMTV) (Nusse, 1984). Desde entonces una gran cantidad de información ha destacado el papel de la vía de Wnt en el control de varios procesos biológicos, por ejemplo, procesos de diferenciación celular, proliferación, migración, adhesión celular, polaridad celular, arquitectura tisular y organogénesis (Peifer, 2006). En el adulto, Wnt participa en la regulación de la hematopoyesis, osteogénesis, angiogénesis y adipogénesis (Ross, 2000). Este amplio rango de efectos biológicos muestra un alto pleiotropismo de las señales de Wnt, las cuales están involucradas en enfermedades humanas incluidas el cáncer. Varios reportes han demostrado la activación aberrante de la vía de señalización de Wnt en diferentes tumores humanos, incluidos el colorectal (Segditsas, 2006) gástrico (Nojima, 2007) y melanoma. Se conoce poco acerca de la vía de señalización de Wnt en relación a cáncer cervicouterino y en este aspecto, se ha sugerido que la transformación

de queratinocitos humanos inmortalizados por el virus del papiloma humano (VPH) requiere un segundo proceso de activación hacia la malignidad, y esto puede ser llevado a cabo gracias a la activación de la vía canónica de Wnt (Uren, 2005).

Las proteínas WNT influyen múltiples procesos de desarrollo y también han sido implicados en la carcinogénesis, incluido el desarrollo de cáncer de mama. Se ha demostrado que la expresión de Wnt-5a es un predictor de supervivencia libre de enfermedad más prolongada en pacientes con cáncer de mama de estirpe epitelial pues la expresión de esta proteína se relaciona con la disminución de la capacidad de las células tumorales para migrar, debido a un incremento de la adhesión celular. Esto conduce a la disminución del potencial invasivo de este tipo de tumores y a una tendencia menor para las metástasis. Sin embargo, la importancia de Wnt-5a en los procesos de metástasis es debatida por nuevos y contradictorios resultados en relación con los niveles de expresión de Wnt-5b y su interacción con Wnt-5a en diferentes tumores invasivos (Leandersson, 2006).

Se sabe desde tiempos antiguos que existe una relación entre mioma y función ovárica. Los miomas están claramente asociados con la exposición de estrógenos y progesterona circulante y se desarrollan durante el periodo fértil de una mujer, siendo raros antes de la menarca y de tamaño menor tras la menopausia (Wallach, 2004).

En tejido miomatoso se ha comprobado aumento de citocromo p450-aromatasa que transforma los andrógenos a 17-beta-estradiol. Ocurre también aumento de 17-β-estradiol al disminuir la transformación de éste a estrona por disminución de la 17-β-deshidrogenasa (Wallach, 2004).

Los receptores estrogénicos se mantienen altos durante todo el ciclo en los miomas, lo que lleva a la activación permanente de genes regulados por estrógenos, como NFκB, jun, fos (Wallach, 2004).

La progesterona es mitógena en el miometrio normal y en los miomas, lo que se confirma a través del aumento en el índice mitótico de los miomas durante la

fase lútea y del aumento del tamaño tumoral en relación directa a la dosis de progestágeno empleado en la terapia hormonal sustitutiva (Tiltman, 1985).

Los receptores de progesterona permanecen altos durante la fase lútea, y también se han demostrado un incremento en la densidad de éstos en el mioma con respecto al miometrio normal (Tiltman, 1985), lo que concuerda con las moléculas investigadas en este estudio.

Los estrógenos estimulan más a la matriz extracelular e induce otros factores de crecimiento, en tanto que la progesterona actúa principalmente sobre las mitosis de las células musculares (Tiltman, 1985); éstas evidencias permiten sugerir que al estar las proteínas y genes Wnt-7a y Wnt-5a permanentemente con estímulo hormonal estrogénico y progestágeno su expresión se observe en los tejidos de las fases proliferativa y secretora del ciclo. También puede ser la explicación de que se presente una expresión consistentemente mayor en los tejidos de mioma, que en aquellos de la región subtumoral y del miometrio sano, independientemente de la fase del ciclo.

La vía canónica, mediada por Wnt-7a, induce la estabilización y acumulación en el citoplasma de β -catenina y su posterior translocación al núcleo celular en donde afecta la transcripción de genes blanco (Logan, 20004).

La vía de Wnt/ Ca^{+2} "no canónica" que regula la adhesión celular y la motilidad mediada por Wnt-5a, dispara la liberación de Ca^{+2} intracelular para activar enzimas sensibles a Ca^{+2} como la proteína cinasa C (PKC) y cinasa II dependiente de calmodulina y Ca^{+2} (CaMKII) sin activación de la vía β -catenina (Gumbiner, 2005).

Esta vía de Wnt-5a es independiente de GSK-3 β -catenina, pero se ha descubierto que Wnt-5a antagoniza a la vía canónica mediante la promoción de la degradación de β -catenina (Peifer, 2000). Existen pruebas de que Wnt-5a también actúa en vivo para promover la degradación de β -catenina, actualndo en la regulación del desarrollo de las extremidades de mamíferos y, posiblemente, en la supresión de la formación de tumores (Topol, 2003).

11. CONCLUSIONES

Los resultados de las metodologías para analizar la expresión proteica y génica de Wnt-7a y Wnt-5a apoya las siguientes conclusiones:

- Wnt-7a tiene una expresión proteica mayor en la fase proliferativa que en la fase secretora del ciclo.
- La expresión proteica de Wnt-7a es mayor en tejido de mioma que en los tejidos de la región subtumoral o de miometrio sano.
- La expresión génica de Wnt-7a se observó en las dos fases del ciclo menstrual.
- Se observa mayor expresión génica de Wnt-7a en el tejido de mioma que en los tejidos de la región subtumoral y del miometrio sano.
- Wnt-5a tiene una expresión proteica mayor en los tejidos de la fase proliferativa del ciclo .
- La expresión proteica de Wnt-5a es igual en los tres diferentes tipos de tejido (mioma, subtumoral, miometrio sano).
- Se observó igualmente la expresión génica de Wnt-5a en las dos fases del ciclo menstrual, siendo mayor en la fase proliferativa que en la fase secretora.
- También se observó mayor expresión génica de Wnt-5a en el tejido de mioma que en los tejidos de la región subtumoral y del miometrio sano en la fase proliferativa pero en la fase secretora la expresión génica fue igual en los tres tipos de tejido.

Estas observaciones pueden ser debidas a la participación de las hormonas esteroides en las vías de señalización de Wnt. específicamente en la vía canónica de Wnt, mediada por Wnt-7a, y en la vía Wnt/Ca⁺² “no canónica”, mediada por Wnt-5a.

12. BIBLIOGRAFÍA:

Addo S, Yates RA, Laight A. A phase I trial to assess the pharmacology of the new oestrogen receptor antagonist fulvestrant on the endometrium in healthy postmenopausal volunteers. *Br J Cancer* 2002; 87:1354-1359.

Albo D, Wang T. M.D. Anderson Surgical Oncology Handbook, 2005.

Arici A, Sozen I. Expression, menstrual cycle-dependent activation, and bimodal mitogenic effect of transforming growth factor B1 in human myometrium and leiomyoma. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188:76-83.

Attardi BJ. CDB-4124 and its putative monodemethylated metabolite, CDB-4453, are potent antiprogesterins with reduced antiglucocorticoid activity: in vitro comparison to mifepristone and CDB-2914. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 188:111-123.

Bandow J, Baker JD, Berth M, Painter C, et al. Improved image analysis workflow for 2-D gels enables large-scale 2-D gel-based proteomics studies-COPD biomarker discovery study. *Proteomics* 2008.

Barkhem T, Nilsson S, Gustafsson JA. *Am. J. Pharmacogenomics* 2004; 19-28.

Belenkaya TY, Han C, Standley HJ, Lin X, et al. *pygopus* encodes a nuclear protein essential for Wingless/Wnt signaling. *Development* 2002; 129:4089-4101.

Björnström L. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular Endocrinology* 2005; 19:833-842.

Björnström L, Sjöberg M. Estrogen receptor-dependent activation of AP-1 via non-genomic signalling. *Nucl Recept* 2004; 2(1):3.

Blithe DL, Nieman LK, Blye RP, et al. Development of the selective progesterone receptor modulator CDB-2914 for clinical indications. *Steroids* 2003; 68:1013-1017.

Bodner K, Bodner-Adler B, Kimberger O, Czerwenka K, Mayerhofer K. Bcl-2 receptor expression in patients with uterine smooth muscle tumors: an immunohistochemical analysis comparing leiomyoma, uterine smooth muscle tumor of uncertain malignant potential, and leiomyosarcoma. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11(3):187-91.

Bottino MC, Lanari C. Localización extra nuclear de receptores esteroides y activación de mecanismos no genómicos. *Medicina Buenos Aires* 2010; 70:173-184.

Buja LM. Netter Anatomía Patológica, 1a. ed. 2006.

Calzada M CC, Sánchez EC, Campos RR, Becerril AM, Madrigal EB, Sierra AR, Mendez EB, Ocharán EH, Herrera NG, Ceballos-Reyes G. Differential aromatase (CYP19) expression in human arteries from normal and neoplastic uterus: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Front Biosci* 2006; 11:389-393.

Cesen CK, Copland JA, Barret JCI, Walker CL, Davis BJ. Pregnancy, Parturition and Prostaglandins: Defining Uterine Leiomyomas. *The Environmental Health Perspectives* 2000; 108:817-820.

Chabbert N. Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and clinical applications. *Human Reproduction Update* 2005; Vol.11, 3:293-307.

Chen B, Pan H, Zhu L, Deng Y, Pollard JW. Progesterone Inhibits the Estrogen-Induced Phosphoinositide 3-Kinase3AKT3GSK-3 β -3Cyclin D13pRB Pathway to Block Uterine Epithelial Cell Proliferation. *Molecular Endocrinology* 2005; 19:1978-1990.

Chen G, Fernandez J, Mische S, Courey A. A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev* 1999; 13:2218-2230.

Chiaffarino EA. Oral contraceptives use and benign gynecologic conditions. A review. *Contraception* 1998; 57:11-18.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1):156-9.

Choudhary C, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 2009; **325**(5942):834-40.

Cramer SF, Marchetti C. Relationship of myoma cell size and menopausal status in small uterine leiomyomas. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:1448-1453.

Cramer SF, The frequency of uterine leiomyomas. *Amer J Clin Path* 1990; 94:435-38.

Cuzzocrea S, Bruscoli S, et al. Estrogen Receptor Antagonist Fulvestrant(ICI 182,780) Inhibits the Anti-Inflammatory Effect of Glucocorticoids. *Mol Pharmacol* 2007; 71:132.-44.

Daniels DL, Weis WI. beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12:364-371.

Dash P. www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash

Davis AM, Mao J, Naz B, cols. Comparative effects of estradiol, methyl-piperidino-pyrazole, raloxifene, and ICI-182,780 on gene expression in the murine uterus. *Journal of Molecular Endocrinology* 2008; 41:205-217

Day BD, Dunson DB, Hill MC, et al. High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188:100-7.

Dejana E. The Role of Wnt Signaling in Physiological and Pathological Angiogenesis *Circulation Research* 2010; 944 -952.

DeManno D, Elger W, Garg R, Lee R, Schneider B, cols. (J-867): a selective progesterone receptor modulator for gynecological therapy. *Steroids* 2003; 68:1019-1032.

Dexeus S, Labastida R. Hysteroscopy in daily gynaecologic practice. *Acta Eur Fertil* 1986; 17(6):423-5.

Dimitriadis A, Vincan E, Mohammed IM, Roczo N, et al. Expression of Wnt genes in human colon cancers. *Cancer letters* 2001; 166(2):185-191.

Dixon D, He H, Haseman JK. Immunohistochemical localization of growth factors and their receptors in uterine leiomyomas and matched myometrium. *Environmental Health Perspectives* 2000; 108:795-803.

Dong SM, Kim HS, Rha SH, Sidransky D. Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2001; 7(7): 1982-1986.

Eisinger SH, cols. Low-dose mifepristone for uterine leiomyomata. *Obstet Gynecol* 2003; 101:243-250.

Elger W, Bartley J, Schneider B, Kaufmann G, Schubert G, Chwalisz K. Endocrine pharmacological characterization of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators with respect to PRagonistic and antagonistic activity. *Steroids* 2000; 65:713-723.

Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, et al. *Pharmacol Rev* 2000; 52(4):513-56.

Fertuck KC, Eckel JE, et al. Identification of temporal patterns of gene expression in the uteri of immature ovariectomized mice following exposure to ethynylestradiol. *Physiological Genomics* 2003; 15:127-141.

Filardo EJ, Graeber CT, Quinn JA, Resnick MB, Giri D, DeLellis RA, Steinhoff MM, Sabo E. Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin Cancer Res* 2006; 12:6359-6366.

Flake GP, Andersen J, Dixon D. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. *Environ Health Perspect* 2003; 111:1037-54.

Franca KJ, Yeo M, et al. The regulation of glycogen synthase kinase-3 nuclear export by Frat/GBP. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277(46): 43844-43848.

Franco Y, Mendoza FV, Lemini C. Papel de los estrógenos en las enfermedades cardiovasculares. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* 2003; 46:101-116.

Fukuhara K, Kariya M, Kita M, Shime H, Kanamori T, Kosaka C, Orii A, Fujita J, Fujii S. Secreted frizzled related protein 1 is overexpressed in uterine leiomyomas, associated with a high estrogenic environment and unrelated to proliferative activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1729-1736.

Gilbert, SF. Non-identical Monozygotic Twins. *Developmental biology* 2006; Sunderland, Mass: Sinauer Associates.

Goodwin AM, Sullivan KM, D'Amore PA. Cultured endothelial cells display endogenous activation of the canonical Wnt signaling pathway and express multiple ligands, receptors, and secreted modulators of Wnt signaling. *Dev Dyn*. 2006; 235:3110-3120.

Gordon, Nusse R. *J Biol Chem* 2006; 281:22429-22433.

Gottardi CJ, Gumbiner BM. Distinct molecular forms of beta-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *J Cell Biol* 2004; 167: 339-349.

Gruber CJ, Tschugguel W S, Huber J C. Production and actions of estrogens. *The New England Journal of Medicine* 2002; 346:340-352.

Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:622-634.

Hong EJ, Park SH, Choi KC, Leung PC & Jeung EB. Identification of estrogen-regulated genes by microarray analysis of the uterus of immature rats exposed to endocrine disrupting chemicals. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2006;4:49.

Howell A, Osborne CK, Morris C & Wakeling AE. ICI-182780, development of a novel 'pure' antiestrogen. *Cancer* 2000; 89:817-825.

Hwang YS, Chung BG, Ortmann D, Hattori N, Moeller HC, Khademhosseini A. Microwell-mediated control of embryoid body size regulates embryonic stem cell fate via differential expression of WNT5a and WNT11. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:16978-16983.

Kasai T, Shozu M, Murakami K, Segawa T, Shinohara K, Nomura K and Inoue M. Increased expression of type I 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase enhances in situ production of estradiol in uterine leiomyoma. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004; 89:566-568.

Kastner P, Krust A, Turcotte B, et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 1990; 9:1603-14.

Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995; 270(5241):1491-4.

Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 2003; 116(3):2627-34.

Kimura Y, Tanaka K. Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *J Biochem* 2010; 147(6):793-8.

King MW. IU School of Medicine / miking at iupui.edu / © 1996-2011.

Klaus A, Birchmeier W. Wnt signaling and its impact on development and cancer. *Nature* 2008; 8:387-398.

Kokubu C, Heinzmann U, Kokubu T, Sakai N, Kubota T, Kawai M, et al. Skeletal defects in ringelschwanz mutant mice reveal that Lrp6 is required for proper somitogenesis and osteogenesis. *Development* 2004; 131:5469-5480.

Korach KS. Estrogen receptor-dependent genomic responses in the uterus mirror the biphasic physiological response to estrogen. *Mol Endocrinology* 2003; 17:2070-2083.

Kramps T, Peter O, Brunner E, Nellen D, Froesch B, Chatterjee S, et al. Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell* 2002; 109:47-60.

Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA & Smithies O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. PNAS 1998; 95:15677-15682.

Lane D, Antibodies: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1988.

Leandersson K, Riesbeck K, Andersson T. Wnt-5a mRNA translation is suppressed by the Elav-Hur as a human protein in breast epithelial cells. Nucleic Acids Research 2006; 34(14): 3988-3999.

Lessl M, Klotzbuecher M, Schoen S, et al. Comparative messenger ribonucleic acid analysis of immediate early genes and sex steroid receptors in human leiomyoma and healthy myometrium. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82:2596-600.

Leung YK, Mak P, Hassan S, Ho SM. Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(35):13162-7.

Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. Mol Endocrinol 2005; 19(8):1951-9.

Li X, O'Malley BW. Unfolding the action of progesterone receptors. J Biol Chem 2003; 278:39261-4.

Liehr JG. Is Estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? Endocrine Reviews 2000; 21:40-54.

Lodish, et al Molecular Cell Biology 5th. Ed, 2000 W. H. Freeman and Co,mpany.

Logan CW, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. Cell Dev Bio 2004; 20:781-810.

Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol 2004; 20:781-810.

Lu Q, Pallas DC, Surks HK, Baur WE, Mendelsohn ME, Karas RH. Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic activation of endothelial NO synthase by estrogen receptor alpha. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101(49):7126-31.

Mangioni S, Vignani P, Lattuada D, Abbiati A, Vignali M, and Di Blasio AM. J Clin Endocrinol Metab, September 2005; 90(9): 5349-5355.

Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signaling. Nature 2002; 417:664-667.

Marsh Erika E, Bulun, Serdar E. Steroid Hormones and Leiomyomas. Obstet Gynecol Clin N Am 2006; 33 59-67.

Martínez Fierro, ML. Papel de la región 3'UTR en la acumulación del RNA mensajero de VEGF-D en células PC12 que expresan constitutivamente el oncogen Wnt-1. Universidad Autónoma de Nuevo León, Tesis 2005.

Maruo T, cols. Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. Human Reproduc Update 2004; 10:207-220.

Maruo T, Matsuo H, Samoto T, et al. Effects of progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Steroids* 2000; 65:585-92.

Mata MI, Jaramillo SP, Mata EL. Frecuencia de miomatosis uterina en pacientes de consulta externa. *Revista de la Facultad de Medicina de Venezuela* 2006; 28:1-10.

McPhail MK. The assay of progestin. *J Physiol* 1934; 83:145-156.

Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* 2006 Apr; 4(4):115

Moore MR, Zhou JL, Blankenship KA, et al. A sequence in the 5' flanking region confers progestin responsiveness on the human c-myc gene. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; 62:243-52.

Naciff JM, Torontali SM, Overmann GI, Carr GJ, Tiesman JP & Daston GP. Evaluation of the gene expression changes induced by 17- α -ethynyl estradiol in the immature uterus/ovaries of the rat using high density oligonucleotide arrays. *Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology* 2005; 74:164-184.

Nassera SB, Isaac TM. Myometrial tumors. *Curr Obstet Gynecol* 2004; 14:327-336.

Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherin Pathways. *Scienc* 2004; 303:1483-1487.

Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, et al. «Mechanisms of estrogen action». *Physiol Rev* 2001; 81(4):1535-65.

Nisolle M, Gillerot S, Casanas-Roux F, et al. Immunohistochemical study of the proliferation index, oestrogen receptors and progesterone receptors A and B in leiomyomata and normal myometrium during the menstrual cycle and under gonadotrophin-releasing hormone agonist therapy. *Hum Reprod* 1999; 14:2844-50.

Nojima M, Suzuki H, Toyota M, Watanabe Y, Maruyama R, Sasaki S, et al.: Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene* 2007, 26:4699-4713.

Noriega, Langley. *Cancerologia* 2008; 3:29-40.

Nusse R. Wnt signaling and stem cell control. *Cell Research* 2008; 18:523-527.

Nusse R, van Ooyen A, Cox D, Fung Y. Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15. *Nature* 1984; 307:131-136.

Orhan B. Clinical features of myomas. *Obstet Gynecol Clin N Am* 2006; 33:69-84.

Ortiz RME, cols. Miomatosis uterina *An Med Mex* 2009; 54(4):222-233

Osborne CK, Wakeling A, Nicholson RI. Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *British Journal of Cancer* 2004; S1:2-6.

Otto C, Rohde-Schulz B, Schwarz G, Fuchs I, Klewer M, Brittain D, Langer G, Bader B, Prella K, Nubbemeyer R, Fritzeimer KH. G protein-coupled receptor 30 localizes to

the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology* 2008; 149(10):4846-56.

Parker W. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myoma. *Fertility and Sterility* 2007; 87:725-736.

Parker WH. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. *Fertility and Sterility* 2007; 87(4):725-734.

Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis: a look outside the nucleus. *Science* 2000; 287:1606-1609.

Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM, Wongvipat N, Pegram MD, Ramos L, Gorman CM, Parker MG, Sliwkowski MX, and Slamon DJ. *Oncogene* 1995; 10(12): 2435-46.

Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 2000; 407:535-538.

Prossnitz ER, Arterburn JB, Sklar LA. GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol* 2007 265-266:138-42.

Punyadeera C, Dassen H, Klomp J, Dunselman G, Kamps R, Dijcks F, Ederveen A, de Goeij A & Groothuis P. Oestrogen-modulated gene expression in the human endometrium. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2005; 62:239-250.

Qian D, Jones C, Rzadzinska A, Mark S, Zhang X, Steel K, et al. Wnt5a functions in planar cell polarity regulation in mice. *Dev Biol* 2007; 306:121-133.

Rein MS. Advances in uterine leiomyoma research: the progesterone hypothesis. *Environm Health Perspec* 2000; 108: 791-793.

Ross MH, Paulina W. *Histology*. 5th ed. 2006, Lippincott Williams & Wilkins.

Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, et al.: Inhibition of Adipogenesis by Wnt Signaling. *Science* 2000; 289:950-953.

Sadler TW. *Langman Embriología Médica con orientación clínica*. Editorial Médica Panamericana, Madrid (9ª Edición, septiembre de 2004).

Sánchez SP, Benítez BL. Receptores estrogénicos alfa y beta en cáncer de mama. *Acta Médica Grupo Ángeles* 2003; 1:159-161.

Sánchez SV. *Rev Cubana Invest Biomed* 2001; 20(3):223-30.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977; 74(12):5463-7.

Schorge J, et al. *Williams Gynecology*, McGraw-Hill Companies, Inc. 2010.

Segditsas S, Tomlinson I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 2006; 25:7531-7537.

Sekiya T, Zaret KS. Repression by Groucho/TLE/Grg proteins: genomic site recruitment generates compacted chromatin in vitro and impairs activator binding in vivo. *Mol Cell* 2007; 28:291-303.

Shozu M, Murakami K, Segawa Tomoya, Kasai Tadayuki and Inoue Masaki. Successful treatment of a symptomatic uterine leiomyoma in a perimenopausal woman with a nonsteroidal aromatase inhibitor. *Fertility and Sterility* 2003; 79:628-631.

Simpson ER, Misso M., Hewitt K. N, Hill R.A, Boon W.C, Jones M.E, Kovacic A, Zhou J, and Clyne C. D. Estrogen-the good, the bad and the unexpected. *Endocrine Reviews* 2005; 26:322-330.

Speroff L. *Endocrinología ginecológica clínica y esterilidad*, Ed. Lippincott Williams and Wilkins, 2007.

Sumitani H, Shozu M, Segawa T, Murakami K, Yang HJ. In situ estrogen synthesized by aromatase p450 in uterine leiomyoma cells promotes cell growth probably via an autocrine/intacrine mechanism. *Endocrinology* 2000; 141:3852-3861.

Tiltman AJ. The effect of progestins on the mitotic activity of uterine fibromyomas. *Int J Gynecol Pathol* 1985; 4: 89-96.

Tommaso S, Genazzani AR. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *European Journal of Endocrinology* 2003; 148:281-292.

Topol L, Jiang X, *The Journal of Cell Biology* 2003; (162)(5): 899-908.

Townsend DE, Sparkes RS, et al. Unicellular histogenesis of uterine leiomyomas as determined by electrophoresis by glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am J Obstet Gynecol* 1970; 107:1168-73.

Umbhauer M, Djiane A, Goisset C, Penzo-Mendez A, Riou J, et al. The C- terminal cytoplasmic Lys-thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/ betacatenin signalling. *EMBO J* 2000; 19:4944-4954.

Uren A, Fallen S, Yuan H, Usbutun A, Kucukali T, Schlegel R, et al. Activation of the Canonical Wnt Pathway during Genital Keratinocyte Transformation: A Model for Cervical Cancer Progression. *Cancer Res* 2005; 65:6199-6206.

Viegas LR, Vicent GP, et al. Steroid hormones induce bcl-X gene expression through direct activation of distal promoter P4. *J Biol Chem* 2004; 279(11):9831-9.

Wakeling AE, Dukes M, Bowler J. A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res* 1991; 51:3867-3873.

Wallach EE, Vlahos Nikos F. Uterine myomas: An overview of development, clinical features, and management. *Obstet Gynecol* 2004; 104(2):393-404.

Wallingford JB, Habas R. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* 2005; 132:4421-4436.

Wamsteker K, Emanuel MH, de Kruif JH. Transcervical hysteroscopic resection of submucous fibroids for abnormal uterine bleeding: results regarding the degree of intramural extension. *Obstet Gynecol* 1993; 82:736-740.

Wharton KA. Runnin' with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction. *Dev Biol* 2003; 253:1-17.

Wittmann BM, Sherk A & McDonnell DP. Definition of functionally important mechanistic differences among selective estrogen receptor down-regulators. *Cancer Research* 2007; 67:9549-9560.

Wu X, Blanck A, Olovsson M, et al. Expression of Bcl-2, Bcl-x, Mcl-1, Bax and Bak in human uterine leiomyomas and myometrium during the menstrual cycle and after menopause. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 80:77-83.

Wu X, Wang H, Englund K, et al. Expression of progesterone receptors A and B and insulinlike growth factor-I in human myometrium and fibroids after treatment with a gonadotropinreleasing hormone analogue. *Fertil Steril* 2002; 78:985-93.

Xing Y, Clements WK, Kimelman D, Xu W. Crystal structure of a [beta]-catenin//Axin complex suggests a mechanism for the [beta]-catenin Destruction complex. *Genes Dev* 2003; 17:2753-2764.

Xinghua L, Kenneth P. Nephew. Fulvestrant (ICI-182,780) dependent Interacting Proteins Mediate Immobilization and Degradation of Estrogen Receptor. *The journal of biological chemistry* 2006 vol. 281, no. 14, pp. 9607-9615.

Yager JD, and Davidson N. E. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *New England Journal of Medicine* 2006; 354:270-282.

Yamada T, Nakago S, Kurachi O, Wang J, et al. Progesterone down-regulates insulin-like growth factor-1 expression in cultured human uterine leiomyoma cells. *Human Reprod* 2004; 19:1-7.

Yamamoto A, Nagano T, Takehara S, Hibi M, Aizawa S. Shisa promotes head formation through the inhibition of receptor protein maturation for the caudalizing factors, Wnt and FGF. *Cell* 2005; 120:223-235.

Yu X, Li P, Roeder R, Wang Z. Inhibition of androgen receptor-mediated transcription by amino-terminal enhancer of split. *Mol Cell Biol* 2001; 21:4614-4625.

Zhou C, Pinson K, Pleasure S. Severe defects in dorsal thalamic development in low-density lipoprotein receptor-related protein-6 mutants. *J Neurosci* 2004; 24:7632-7639.

Zivadinovic D, Gametchu B, Watson CS. Membrane estrogen receptor-alpha levels in MCF-7 breast cancer cells predict cAMP and proliferation responses. *Breast Cancer Res* 2005; 7(1):101-12.

13. ANEXOS

13.1 Anexo 1



**HOSPITAL DE LA MUJER
SUBDIRECCION DE ENSEÑANZA
E INVESTIGACION**

Prolongación Salvador Díaz Mirón No. 374
Col. Santo Tomás C.P. 11340, México, D.F.
Delegación Miguel Hidalgo Tels. 5341-1909 5341-1100 Ext.1210, 1215



México, D. F., a 21 de octubre de 2010

**DR. CELSO DIÓGENES RAMÍREZ PALACIOS
MEDICO GINECO/OBSTETRA
EN HOSPITAL DE LA MUJER
Presente.**

Estando reunido el Comité de Enseñanza e Investigación de este Hospital, se aprobó el Proyecto de investigación, y el consentimiento informado para el mismo, EXPRESIÓN PROTEICA Y REGULACIÓN POR ESTRADIOL Y PROGESTERONA DE Wnt-7a y Wnt-5a en 3 REGIONES DE ÚTERO CON MIOMATOSIS", que será realizado por el Dr. Celso Diógenes Ramírez Palacios, quedando notificado en la libreta de investigación.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviar a usted un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E


**DR. MAURICIO PICHARDO CUEVAS
DIRECTOR**

MPC*dac.

13.2 Anexo 2

CONTROL DE MUESTRAS

Expresión proteica y regulación por estradiol y progesterona de Wnt-7a y Wnt-5a en tres regiones de útero con miomatosis.

Fecha de la cirugía: _____ No. de expediente: _____

Antecedentes:

Edad: _____ Gestas: _____ Partos: _____ Cesáreas: _____ Abortos: _____

Tratamiento anticonceptivo: Sí: _____ No: _____ Duración: _____

Radioterapia: Sí: _____ No: _____ Duración: _____

Cirugías anteriores: Sí: _____ No: _____ Tipo de cirugía: _____

Antecedentes heredofamiliares:

Cánceres: _____ Hipogonadismo: _____

Patologías concomitantes:

Tipo de tumor: _____

Tipo de cáncer: _____

Infecciones genitourinarias _____

Tipo de tratamiento seguido por la paciente: _____

Diagnóstico: _____

Etapa del ciclo menstrual: _____

Muestreo:

Tiempo entre la extracción de la pieza y la toma de muestra: _____

Resultados de Patología: _____

Observaciones: _____

Recabó información: _____

13.3 ANEXO 3

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Iniciales de la paciente _____

Texto de información para la paciente y consentimiento informado para el protocolo de estudio:

“Expresión proteica y regulación por estradiol y progesterona de Wnt-7a y Wnt-5a en tres regiones de útero con miomatosis”

INVITACIÓN

Usted ha sido escogida por su Médico para invitarla a participar de forma voluntaria en el presente estudio de investigación. Este formulario le proporcionará información detallada acerca del mismo. Léalo atentamente y si lo desea coméntelo con su familiar o pareja. Si hay algo que no entiende o si desea tener más información pregunte a su Médico.

OBJETIVO DE ESTUDIO

Analizar la expresión de las proteínas Wnt-7a, y Wnt-5a, en biopsias de úteros con miomatosis, en pacientes mexicanas.

TEJIDO DE ESTUDIO

El tejido en estudio es una porción del útero que a Usted le será extirpado por razones médicas. En dicho tejido se analizará la presencia de proteínas relacionadas con la actividad de las células de útero (Wnt-7a y Wnt-5a) y que promueven el crecimiento y muerte de células que forman el mioma. Al realizar la cuantificación de las proteínas antes mencionadas, se tratará de encontrar una asociación entre ellas buscando que esto nos aporte información para poder explicar por qué crece un mioma uterino y en su momento se poder proponer la inhibición de estas proteínas para detener el crecimiento de estos tumores.

Es importante mencionar que la obtención del fragmento del útero no interfiere en nada con la operación que se empleará en su caso, ni con el tratamiento o

precauciones que Usted deberá tomar después de su cirugía, pues el tejido utilizado procederá de la pieza quirúrgica (útero), obtenida durante la cirugía realizada para tratamiento de su enfermedad (miomatosis uterina).

BENEFICIOS

Su médico le ha pedido que participe en este estudio porque está seguro que no le perjudicará y porque ayudará a estudiar enfermedades como la suya, pues en un futuro se podrían plantear opciones de prevención y/o tratamiento más específicos y eficaces.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

En caso de aceptar, su participación en este estudio es voluntaria; Usted no tendrá que sufragar ningún gasto adicional al que normalmente está contemplado en su tratamiento y tampoco recibirá ningún pago. Si usted decide participar en el estudio podrá retirarse de éste en cualquier momento sin que se vea afectada su atención médica en el futuro.

Su muestra puede no ser tomada bajo las siguientes circunstancias:

- 1) si el tejido no está en buenas condiciones para los requisitos del estudio
- 2) si a Usted recientemente se le detectó algún trastorno hormonal
- 3) si Usted no regresa para las evaluaciones pertinentes
- 4) si Usted decide en el último momento no participar

CONFIDENCIALIDAD

Al firmar el “consentimiento informado” Usted autoriza al personal de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional y del Hospital de la Mujer de la Secretaría de Salud y miembros del Comité de Ética de estas Instituciones para revisar su expediente clínico. Esto se realiza para verificar que el estudio se esté llevando a cabo correctamente y conforme a normas bioéticas nacionales e internacionales. Cualquier información recogida por estas personas se mantendrá de manera confidencial. Los datos y los resultados obtenidos durante la investigación estarán disponibles exclusivamente para la paciente, el Médico tratante, el equipo de investigadores que realizan el estudio, y los miembros de los Comités de Ética

mencionados. Los documentos que la identifican con su nombre se mantendrán de manera confidencial y si los resultados del estudio se publican, su identidad permanecerá también confidencial.

Su Médico le entregará una copia del “Consentimiento Informado”, junto con una copia de este texto de información para la paciente.

Para cualquier duda sobre el presente protocolo de estudio se puede dirigir con los investigadores participantes: Dra. Claudia C. Calzada Mendoza (Escuela Superior de Medicina-IPN) al teléfono 5729-6300 ext. 62824 y 62820 y Dr. Celso Diógenes Ramírez Palacios (Hospital de la Mujer-SS) al teléfono 04455-54022941.

13.4 ANEXO 4

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio de la presente certifico que voluntariamente acepto participar en el estudio titulado “**Expresión proteica y regulación por estradiol y progesterona de Wnt-7a y Wnt-5a en tres regiones de útero con miomatosis**” y confirmo que he leído y recibido copia de la información para la paciente y del presente “Consentimiento Informado”.

Nombre de la paciente: _____

Firma de la paciente: _____ Fecha: _____

Nombre del médico: _____

Firma del médico: _____ Fecha: _____

Nombre del testigo: _____

Relación con la paciente: _____

Firma del testigo: _____ Fecha: _____

Nombre del testigo: _____

Relación con la paciente: _____

Firma del testigo: _____ Fecha: _____