

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del grado Académico de Doctora en Ciencias
Biológicas

EL SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO Y SU EFECTO SOBRE EL DESARROLLO Y LA DIFERENCIACIÓN HISTOFUNCIONAL DEL ÚTERO

Lic. en Biotecnología Gisela S. Bracho

Director de Tesis: Dra. Verónica L. Bosquiazzo

Co-director de Tesis: Dr. Enrique H. Luque

Lugar de realización: Instituto de Salud y Ambiente del Litoral,
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional
del Litoral

-2022-

*A mi madre, por su amor incondicional y por
brindarme su apoyo en cada paso.*

*A mis tíos Abel y Cata, por acompañarme
siempre.*

*A mis amigos y compañeros por estar
presentes en todo momento.*

AGRADECIMIENTOS

A la **Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas** de la Universidad Nacional del Litoral, por ofrecerme la posibilidad de realizar este trabajo de tesis doctoral.

Al **CONICET**, por haberme otorgado la beca de posgrado que permitió la realización de esta tesis doctoral.

A las directoras del **Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL)**, Dra. Mónica Muñoz de Toro y Dra. Laura Kass, por permitirme formar parte de este grupo de trabajo y apoyarme durante el desarrollo de mi trabajo de investigación a lo largo de todos estos años.

A mi directora Dra. Verónica L. Bosquiazzo y a mi codirector Dr. Enrique H. Luque por abrirme las puertas del laboratorio y brindarme las enseñanzas necesarias para poder concretar este trabajo de investigación y estar siempre dispuestos frente a mis inquietudes y necesidades.

A mis compañeros y amigos del ISAL con quienes compartí gran parte de mis días durante estos años: por su amistad y por cada momento compartido dentro y fuera del instituto.

A mis tíos Cata y Abel, porque siempre me acompañan incondicionalmente.

A mis amigos de toda la vida: María, Aye, Jesús, Gabi, Toto, Ger y Lula porque siempre estuvieron conmigo de una u otra manera.

A mi madre, por su amor incondicional y por siempre estar conmigo.

A mis abuelos, que desde el cielo sé que me acompañan siempre.

A todas aquellas personas que formaron parte de esta etapa e hicieron posible la realización de esta tesis doctoral.

¡MUCHAS GRACIAS!

APORTES CIENTÍFICOS-TECNOLÓGICOS

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

Publicaciones en revistas internacionales indexadas

Bracho, G.S., Altamirano, G.A., Kass L., Luque, E.H. & Bosquiazzo, V.L (2019): Hyperandrogenism induces histo-architectural changes in the rat uterus. *Reproductive Sciences*, 26(5), 657-668. <https://doi.org/10.1177/1933719118783881>.

Bracho, G.S., Acosta, M.V., Altamirano, G.A., Tschopp, M.V., Luque, E.H., Kass L. & Bosquiazzo VL (2020). Androgen receptor and uterine histoarchitecture in a PCOS rat model. *Molecular and cellular endocrinology*, 518, 110973. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110973>.

Índice general

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	7
RESUMEN	10
ABSTRACT	14
I. INTRODUCCIÓN	18
1. SISTEMA REPRODUCTIVO DE LA RATA	19
2. CICLO ESTRAL DE LA RATA ADULTA JOVEN	19
3. ÚTERO DE LA RATA	23
3.1 Descripción morfológica del útero de la rata	23
4. METABOLISMO TISULAR DE HORMONAS ESTEROIDEAS EN EL ÚTERO	26
5. REGULACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN FUNCIONAL UTERINA EN LA RATA.....	29
5.1 Receptores de hormonas esteroideas	29
5.1.1 Estructura de los receptores de hormonas esteroides	31
5.1.2 Acción de hormonas esteroideas medida por sus receptores.....	31
5.2 Genes de la familia Hox y Wnt.....	34
5.3 Factores de crecimiento	35
5.4 PTEN.....	36
6. GESTACIÓN EN LA RATA.....	39
7. CICLO ESTRAL Y CAMBIOS EN LA HISTOLOGÍA UTERINA DE RATAS ADULTAS	41
8. ALTERACIONES Y LESIONES UTERINAS LA RATA	43
9. SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO	48
9.1 Etiología, diagnóstico y tratamiento	48
9.2 El SOP y su relación con fertilidad y patologías endometriales	49
II. OBJETIVOS	53
III. MATERIALES Y MÉTODOS	56
1. ANIMALES	57
1.1 Diseño experimental	57

2.1 Procedimiento	58
2.2 Disección de los cuernos uterinos y ovarios	59
2.3 Procesamiento de las muestras	60
2.4 Evaluación de las características histomorfológicas del útero y ovario	61
2.4.1 <i>Evaluación de la histología ovárica y la presencia de lesiones uterinas</i>	61
2.4.2 <i>Evaluación de la altura del epitelio luminal, espesor del estroma subepitelial y muscular uterino</i>	63
2.4.3 <i>Evaluación de la densidad celular y de las glándulas uterinas</i>	65
2.4.4 <i>Evaluación del nivel de organización de fibras de colágeno</i>	65
2.4.5 <i>Determinación de la proliferación celular uterina</i>	66
2.4.6 <i>Determinación del índice de apoptosis</i>	67
2.4.7 <i>Cuantificación de la relación proliferación/apoptosis</i>	68
2.5 Evaluación de expresión proteica del útero	69
2.6. Generación de anticuerpo policlonal contra PTEN	70
2.6.1 <i>Obtención del antígeno recombinante en células procariotas</i>	70
2.6.1.1. <i>Diseño bioinformático, amplificación y clonado del antígeno de PTEN</i>	70
2.6.1.2. <i>Expresión y purificación de los antígenos recombinantes</i>	72
2.6.2 <i>Obtención y caracterización de anticuerpos policlonales</i>	72
2.6.2.1 <i>Inoculación de los conejos</i>	72
2.6.2.2 <i>Caracterización de los anticuerpos generados por Western Blot e IHQ</i>	73
2.7. Expresión génica mediante RT-PCR en tiempo real	73
2.7.1. <i>Extracción de ARN total y transcripción reversa (RT)</i>	74
2.7.2 <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real</i>	74
2.7.3 <i>Cuantificación de los niveles de expresión relativa</i>	77
3. EFECTO DEL SOP SOBRE LA FERTILIDAD EN RATAS ADULTAS JÓVENES	78
3.1 Procedimiento	78

4. EFECTO DEL SOP SOBRE EL DESARROLLO DE ALTERACIONES UTERINAS A LARGO PLAZO	79
4.1 Procedimiento	79
4.2 Procesamiento de muestras	80
4.3 Evaluación del estado endócrino de los animales a nivel sistémico	80
4.4 Evaluación de las anomalías uterinas	80
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	81
IV- RESULTADOS.....	82
1. HISTO-FUNCIONALIDAD UTERINA EN RATAS SOP EN LA ETAPA PERIPUBERAL	83
1.1 Histología ovárica y perfil endócrino	83
1.2 Efectos del SOP sobre la histomorfología uterina.....	84
1.2.1 Histología uterina.....	84
1.2.2 Organización de las fibras de colágeno	85
1.2.3 Contenido de agua en el útero.....	86
1.2.4 Receptores de hormonas esteroideas: RA y RE- α	88
1.3 Efectos de la inhibición del RA sobre el útero ratas con SOP	89
1.3.1 Ciclos estrales, histología ovárica y perfil endócrino.....	89
1.3.2 Histomorfología uterina.....	90
1.3.2.1 Anomalías uterinas	90
1.3.2.2 Parámetros histomorfométricos	92
1.3.2.3 Estudio de la matriz extracelular	93
1.3.3 Recambio celular, expresión de PTEN, IGF-1 e IGF-1R.....	96
1.3.4 Expresión de moléculas relacionadas con la diferenciación celular uterina	99
1.3.5 Enzimas involucradas en el metabolismo de esteroides	100
2. SOP E HISTO-FUNCIONALIDAD UTERINA A LARGO PLAZO	105
2.1. Fertilidad de la rata en DG18	105
2.2. Anomalías uterinas	105

<i>2.2.1 Perfil hormonal de rata hembra de 18-24 meses</i>	105
<i>2.2.2 Evaluación histológica del tejido uterino en rata adulta mayor</i>	106
V- DISCUSIÓN	109
1. EFECTOS DEL SOP EN EL ÚTERO	110
2. SOP E HISTO-FUNCIONALIDAD UTERINA	115
2.1 SOP y fertilidad	115
2.2 SOP y anomalías uterinas en ratas adultas mayores	116
VI- RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	118
VII- BIBLIOGRAFÍA	121

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%	Por ciento
°C	Grados Celsius
α-SMA	alfa actina de músculo liso
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
pmol	Picomol
3α-HSD	3 α -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa
5α-DHP	5 α -Dihidroprogesterona
5α-DHT	5 α -Dihidrotosterona
5α-R	Eesteroide 5 α -Reductasa
17β-HSD	17 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa
AQP	Acuaporina
A4	Androstenediona
BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina
CE	Cáncer de endometrio
DG	Día de gestación
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotosterona

5α-DHP	5 α -Dihidroprogesterona
DPN	Día postnatal
DOI	Densidad óptica integrada
E1	Estrona
E2	17 β -estradiol
Eg	Estrógeno
FLU	Flutamida
FSH	Hormona folículo estimulante
g	Gramo
GAG	Glicosaminoglicanos
GGH	Glándulas con glándulas hijas
HE	Hiperplasia endometrial
H-E	Hematoxilina-eosina
h	Horas
IGF	Factor de Crecimiento Similar a la Insulina
IHQ	Inmunohistoquímica
kDa	Kilodalton
L19	Proteína ribosomal L19
LH	Hormona leutinizante
M	Molar
mM	Milimolar
mg	Miligramo
ml	Mililitro

min	Minutos
P4	Progesterona
PAS	Ácido Peryódico de Schiff Periodic Acid-Schiff
pc	Peso corporal
pg	Picogramo
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
RA	Receptor de andrógeno
RE-α	Receptor de estrógeno alfa
RE-β	Receptor de estrógeno beta
RP	Receptor de progesterona
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundo
SEM	Error estándar medio
SOP	Síndrome de ovario poliquístico
StAR	Proteína de la Regulación Esteroidogénica Aguda
STS	Sulfatasa de esteroides
T	Testosterona
V	Voltaje

RESUMEN

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es una patología endocrina con alta prevalencia en mujeres en edad reproductiva. Se caracteriza por oligo/anovulación, quistes en los ovarios y/o hiperandrogenismo. Esta situación clínica aumenta el riesgo de subfertilidad/infertilidad, aborto espontáneo, hiperplasia y cáncer endometrial. Los mecanismos por los cuales esto ocurre son pobremente conocidos. En el presente trabajo de tesis nos planteamos investigar los efectos del SOP sobre el útero de ratas en diferentes momentos: a) a los 41 días de edad estudiamos los efectos sobre la histomorfología uterina, b) en ratas adultas jóvenes evaluamos los efectos sobre la fertilidad y c) en ratas adultas mayores evaluamos los efectos sobre el desarrollo de lesiones uterinas. Para ello se utilizó un modelo animal de SOP en el que el síndrome es inducido por la administración por vía subcutánea de dehidroepiandrosterona (DHEA) durante 20 días consecutivos. Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar, de 21 días de edad que fueron asignadas a los siguientes grupos experimentales: el grupo **CONTROL**, que recibió aceite de sésamo; el grupo **SOP** tratadas con DHEA 60 mg/kg pc/día y el grupo **SOP+FLU** tratadas con DHEA (60 mg/kg pc/día) más flutamida (20 mg/kg pc/día) un antagonista del receptor de andrógenos (RA). Todos los animales fueron tratados desde los 21 a 40 días de edad. Luego del tratamiento, un grupo de animales se sacrificó en el día postnatal 41, mientras que el resto de los animales se los dejó crecer hasta la edad adulta. En ratas adultas jóvenes se estudiaron animales del grupo **CONTROL** y **SOP** que se sacrificaron en el día gestacional 18 (**DG18**). Otro grupo de ratas **CONTROLES** y con **SOP** se sacrificaron entre los 18-24 meses de edad.

En primera instancia evaluamos si el SOP fue inducido en los animales mediante la determinación de los niveles séricos de testosterona y la evaluación de la histología ovárica. Demostramos que los animales con **SOP** y **SOP+FLU** presentaron altos niveles de testosterona y quistes foliculares en los ovarios confirmando el SOP. Los resultados obtenidos demostraron que los niveles séricos de E2 y P4 no se modificaron en las ratas del grupo **SOP** y **SOP+FLU**, siendo el hiperandrogenemia el principal cambio observado a nivel sistémicos. En los animales con SOP se observaron alteraciones en el epitelio luminal y en el compartimiento glandular. En el epitelio luminal demostramos la presencia de focos con estratificación, lúmenes intraepiteliales, formación de glándulas intraepiteliales y pólipos, mientras que en el compartimiento glandular observamos la presencia de glándulas quísticas, conglomerados de glándulas, glándulas con metaplasia y glándulas con atipia celular. Los parámetros morfométricos demostraron un aumento de la altura del epitelio luminal, de la densidad de glándulas y del espesor del estroma subepitelial y miometrio.

Además, disminuyó la densidad de células del estroma uterino, asociado a un mayor contenido de agua y organización de las fibras de colágeno, evidenciando cambios a nivel celular y del espacio extracelular. En los animales tratados con el inhibidor del RA (grupo **SOP+FLU**) el aumento en el espesor del miometrio y la organización de las fibras de colágeno fueron menores respecto a los animales **SOP**, demostrando que estos efectos fueron mediados a través del RA.

Para explicar los cambios observados en el espacio extracelular estudiamos la expresión de las acuaporinas (AQPs) como posibles mediadores de los cambios observados en el contenido de agua. Como resultado se demostró que el útero de todos los animales **CONTROL** expresó los transcritos de AQP1 a 9, con excepción de AQP6. Particularmente, la expresión de ARNm de AQP3 y AQP8 aumentaron, mientras que la expresión de AQP7 disminuyó en los animales con **SOP**. Si bien, en los animales con **SOP+FLU** aumentó el contenido de agua, no se observó el aumento de la expresión de AQP8 respecto a los **CONTROLES**, demostrando que esta proteína estaría regulada a través del RA y que AQP8 y/o el RA no estarían regulando el movimiento de agua dentro del útero.

Para conocer si el desarrollo de focos de hiperplasia epitelial, el aumento de la densidad de glándulas y la disminución de la densidad de células estromales en los animales con SOP se debían a modificaciones en la proliferación y/o apoptosis estudiamos dichos procesos y moléculas involucradas en su regulación (IGF-1/IGF-1R, PTEN, WNT5a/7a y HOXA10). En los animales con SOP se observó una disminución de la proliferación en el estroma subepitelial y un aumento del índice de apoptosis en los epitelios y en el miometrio. en asociación con un aumento de la expresión del ARNm de IGF-1 y una disminución de la expresión de PTEN, WNT5a y HOXA10. Si bien los cambios en la expresión de IGF-1 y PTEN no se asociaron temporalmente con cambios en la proliferación del epitelio luminal y glandular explicarían el desarrollo de las anomalías observadas en estos compartimientos. Las modificaciones en la expresión de WNT5a y HOXA10 regularían los cambios observados en el recambio celular del compartimiento subepitelial y miometrial respectivamente. Por otra parte, en los animales del grupo **SOP+FLU** disminuyó el índice de apoptosis y la proliferación en el miometrio junto con modificaciones en la expresión de HOXA10 respecto a los animales **SOP**. De esta manera, se demostró que estos cambios estarían regulados a través del RA.

Los efectos que observamos en los animales con SOP son hormonodependientes y podrían estar regulados por modificaciones en las concentraciones séricas de las hormonas, cambios en su biodisponibilidad tisular y/o en la expresión de receptores hormonales. Nuestros resultados demostraron que en animales con SOP disminuyó la expresión del

ARNm de la proteína StAR (transporta el colesterol hacia el interior de la mitocondria) y aumentó la expresión de las enzimas 17β -HSD2 (convierte el E2 en estrona), 5α -R1 (convierte la T en 5α -Dihidrotestosterona y la P4 en 5α -Dihidroprogesterona) y P450arom (aromatiza los andrógenos en estrona y E2). Estos cambios demostraron que el SOP disminuyó la síntesis de novo de esteroides y modificó el metabolismo de esteroides en el útero. Al inhibir el RA (grupo **SOP+FLU**) no se observó el aumento de la expresión de P450arom, evidenciando que el RA regula la expresión de ésta enzima. En relación a los receptores hormonales, demostramos que en los animales del grupo **SOP** aumentó la expresión del RA. Cuando los animales fueron tratados con FLU no se modificó la expresión de este receptor respecto al grupo **CONTROL**, sugiriendo que los andrógenos regulan la expresión de su propio receptor. Además, la expresión del RE- α disminuyó en el estroma uterino cuando se inhibió el RA, indicando una rápida degradación del ARNm o mayor inestabilidad de la proteína por el tratamiento con FLU.

En conjuntos estos resultados demostraron que el SOP induce modificaciones en el microambiente endócrino promovieron importantes cambios en la histomorfología uterina.

En una segunda etapa estudiamos si el SOP alteró la fertilidad. Para ello a los animales con **SOP** y **CONTROLES**, se los dejó crecer hasta los 90 días de edad. Se le realizaron extendidos vaginales durante 15 días, para evaluar la ciclicidad estral, y luego se los alojó con una rata macho de fertilidad comprobada durante 3 semanas consecutivas hasta confirmar la preñez de los animales. Las ratas que resultaron preñadas fueron separadas del macho, colocadas en jaulas individuales y sacrificadas en día gestacional 18 (**DG18**). Estudiamos los siguientes parámetros: nº de cuerpos lúteos; nº de sitios de implantación y nº de sitios de reabsorción. Los resultados demostraron que los animales con SOP tuvieron ciclos estrales regulares a los 90 días de edad. Además, las hembras quedaron preñadas sin problemas y no se observaron alteraciones en el número de fetos implantados ni pérdidas post-implantación. De esta manera demostramos que la fertilidad no fue afectada en este modelo animal de ratas con SOP.

En la última etapa de esta tesis, estudiamos la incidencia de lesiones uterinas en animales adultos de edad avanzada y su perfil hormonal. Para este objetivo, los animales con **SOP** y **CONTROLES** se los dejó crecer hasta alcanzar los 18-24 meses de edad y fueron sacrificados en diestro vaginal. Demostramos que los animales con SOP presentaron una mayor incidencia de anomalías en el epitelio luminal en asociación con altos niveles séricos de E2. Al analizar la histopatología uterina, observamos una mayor incidencia de lúmenes intraepiteliales, glándulas intraepiteliales y focos de epitelio estratificado. Estas mismas

alteraciones habían sido observadas en animales con SOP de 41 días de edad, lo que sugiere un adelantamiento en la aparición de estas lesiones.

Los resultados de esta tesis aportan nuevas evidencias de los mecanismos moleculares que subyacen a las alteraciones uterinas generadas por el SOP, las cuales podrían aumentar el riesgo de complicaciones ginecológicas afectando la calidad de vida de las mujeres que padecen este síndrome

ABSTRACT

The Polycystic ovary syndrome (PCOS) is an endocrine disorder particularly prevalent in women of reproductive age. It is characterized by anovulation, ovarian cysts and/or hyperandrogenism. This clinical issue increases the risk of subfertility/infertility, spontaneous abortion, hyperplasia and endometrial cancer and the mechanisms by which this occurs are poorly understood. This thesis aimed to investigate the PCOS effects on the rat uterus at different reproductive stages as follows: a) at 41 days of age, to evaluate the effect on the uterine histomorphology; b) on young adult rats, to evaluate the effects on the fertility; c) in aged rats, to study the development of uterine lesions. A PCOS animal model was used to induce the syndrome by subcutaneous administration of Dehydroepiandrosterone (DHEA) during 20 consecutive days. 21-day-old female Wistar rats were used for this aim, which were assigned to the following experimental groups: the **CONTROL** group, which were injected subcutaneously with sesame oil; the **SOP** group, which was treated by subcutaneous injections with DHEA solution (60 mg/kg body weight [bw]/day), and the **SOP+FLU** group, which was treated by subcutaneous injections with DHEA plus flutamide solution (DHEA: 60 mg/kg bw/day +flutamide [FLU] 20 mg/kg bw/day). FLU is an antagonist of the androgen receptor (AR). All the animals were treated between 21 and 40 days of age. After the treatment, a subset of animals was euthanized at postnatal day 41, whereas the remaining ones were left to reach adulthood. Regarding young adult rats, a subset of **CONTROL** and **SOP** group were studied and later euthanized at gestational days 18 (**GD18**). Another subset of **CONTROL** and **SOP** groups were sacrificed between 18 and 24 months of age.

First of all, we evaluated whether the PCOS was induced in the animals by determining the serum testosterone levels and the ovarian histology. It was demonstrated that animals with **SOP** and **SOP+FLU** showed high testosterone levels and follicular cysts in the ovaries, which confirmed the PCOS. The results demonstrated that the serum levels 17 β - estradiol (E2) and progesterone were not changed in the **SOP** and **SOP+FLU** groups, and the main change observed at a systemic level was hyperandrogenism. In **SOP** animals, some changes in the luminal epithelium and in the glandular tissue were observed. The presence of stratification areas, intraepithelial lumens, intraepithelial glands and polyps were observed in the luminal epithelium, whereas in the glandular tissue the presence of cystic gland, conglomerates of gland, glands with metaplasia and glands with cell atypia were observed. The morphometric parameters demonstrated an increase in the luminal epithelium height, in

gland density and in the subepithelial stroma and myometrium thickness. In addition, the density of cells in the uterine stroma lowered, which was associated with a higher water content and organization of collagen fibers, which show changes at cellular level and in the extracellular space. **SOP+FLU** rats showed a smaller increase in the myometrial thickness and the organization of collagen fibers compared to the **SOP** rats, thus demonstrating that these effects were mediated through the AR.

Considering that the effects induced by PCOS on the extracellular space, aquaporin (AQP) expression were studied as channel proteins that regulate the water flow. As a result, the uterus of all **CONTROL** animals expressed the AQP 1 to 9, except the AQP6. In **SOP** animals, the AQP3 and AQP8 mRNA expression particularly increased, whereas the expression of AQP7 decreased. Although the water content increased in **SOP+FLU** animals, the increase in the AQP8 expression was not observed compared to the **CONTROL** group, thus demonstrating that this protein may be regulated through the AR and also that AQP8 and/or AR may not be regulating the water movement within the uterus.

In order to know whether the development of epithelial hyperplasia, the increase in gland density and a reduction in the stromal cells density in the animals with PCOS were associated to changes in the cell proliferation and/or apoptosis index, molecules involved in their regulation (IGF-1/IGF-1R, PTEN, WNT5a/7a and HOXA10) were studied. In the **SOP** group, a reduction in the cell proliferation in the subepithelial stroma and an increase in the apoptosis index in the epithelium and in the myometrium. These changes were associated with an increase in the IGF-1 mRNA expression and a decrease in the PTEN, WNT5a and HOXA10 expression. Although the changes in the IGF-1 and PTEN expression were not temporarily associated with the changes in the cell proliferation of the luminal and glandular epithelium, the modifications of these molecules expression may explain the abnormalities that was observed in the epithelium. The changes in the WNT5a and HOXA10 expression would regulate the cell proliferation of the subepithelial stroma and myometrium, respectively. On the other hand, the apoptosis index and the cell proliferation in the myometrium decreased compared to the **SOP** group. These changes could be regulated through the AR and the decreased cell proliferation in myometrium could be associated with a decrease HOXA10 expression.

The effects observed in animals with PCOS are hormone-dependent and might be regulated by changes in hormone serum concentrations, changes in their tissue bioavailability and/or in hormone receptors expression. Our results demonstrated that the StAR mRNA expression (moving cholesterol from the outer to inner mitochondrial membrane) decreased in **SOP** animals, and the expression of enzymes 17β -HSD2 (which convert the E2 into estrone), 5α -

R1 (which converts T into 5 α - Dihydrotestosterone and the P4 into 5 α -Dihydroprogesterone), and P450arom (responsible for the aromatization of androgens into estrogens and E2) increased. Our results showed that in the **SOP** group decreased *de novo* synthesis of steroid hormones and the uterine metabolism of these hormones was altered. By inhibiting of the AR (**SOP+FLU** group), the expression of P450arom was increased, showing that AR regulates the expression of this enzyme. Regarding to hormone receptors, the **SOP** group showed a higher AR expression. When the animals were treated with FLU, the receptor expression was not changed compared to the **CONTROL** group, which suggests that the androgens regulate the expression of their own receptor. Furthermore, the RE- α protein expression decreased in the uterine stroma when the AR was inhibited, thus indicating a rapid mRNA degradation or a higher protein instability by the treatment with FLU.

These results altogether demonstrated that PCOS induces changes in the endocrine microenvironment, which promoted major changes in the uterine histomorphology.

For the second stage, a study was carried out to determine whether the PCOS altered the fertility. Therefore, both the **SOP** and the **CONTROL** groups were allowed to grow up until 90 days of age. Vaginal smears were performed for 15 days to evaluate estrous cyclicity and then the female rats were housed individually for three consecutive weeks with males of proven fertility to allow several possible matings. The pregnant rats were separated from the male rat, placed into individual cages and sacrificed on gestational day 18 (**GD18**). The following parameters were studied: number of corpora lutea; number of implantation sites and number of reabsorption sites. The results demonstrated that the **SOP** animals had regular estrous cycles at 90 days of age. In addition, the female rats became pregnant without difficulty and no alterations in the number of implanted fetuses nor post-implantation losses were observed. Thus, it was demonstrated that fertility was not affected in this PCOS rat model.

During the last stage of this thesis, the incidence of uterine lesions in aged animals and their hormone profile were studied. Therefore, animals from the **SOP** and **CONTROL** groups were allowed to grow up until they were 18-24 months old. The rats were euthanized when the evaluation of vaginal cytology samples evidenced stages of diestrus. The animals with SOP showed a higher incidence of abnormalities in the luminal epithelium associated with high serum E2 levels. Also, the uterine histopathology analysis showed a higher incidence of intraepithelial lumens, intraepithelial glands and stratification of the luminal epithelium. These abnormalities had already been observed in 41-day-old animals with SOP, which suggests an advancement in the onset of these epithelial lesions.

The results of this thesis provide new evidence on the underlying molecular mechanisms of uterine lesions caused by PCOS, which might increase the risk of gynecological problems and thus affect the quality of life of women who suffer from this syndrome.

I. INTRODUCCIÓN

1. SISTEMA REPRODUCTIVO DE LA RATA

El sistema reproductivo de la rata está conformado por los ovarios, los oviductos, el útero, el cérvix, la vagina y los genitales externos. En la rata, a diferencia de la mujer, el útero es un órgano bicorne (formado por dos cuernos uterinos), largo y hueco; que se sitúa en la pelvis (entre la vejiga y el recto). Cada extremo de ambos cuernos uterinos se conecta por un lado con el cérvix y por el otro extremo se continúa con el oviducto, más adelante se encuentra el ovario (**Figura 1**).

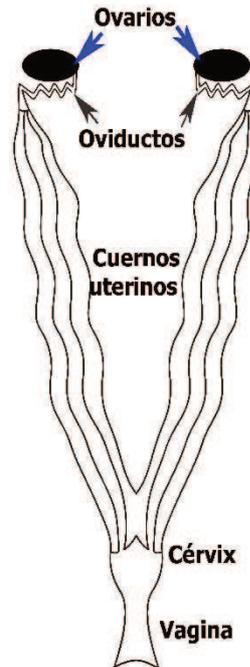


Figura 1. Estructura macroscópica del útero de la rata y de los órganos que forman parte del tracto reproductor femenino: vagina, cérvix, útero, oviductos y ovarios. Figura modificada de Spencer et al. (2012)

2. CICLO ESTRAL DE LA RATA ADULTA JOVEN

La rata hembra es un mamífero de ovulación regular y espontánea, aunque no ocurra apareamiento (Lohmiller & Swing, 2006). El ciclo estral de la rata tiene una duración de 4 o 5 días y se la considera poliéstrica continua, es decir, los ciclos ocurren durante todo el año sin cambios estacionales en las colonias de laboratorio (siempre que los animales se mantengan en un esquema de luz-oscuridad y de temperatura controlados) (Ojeda & Skinner, 2006). La receptividad sexual en las hembras varía de acuerdo con la fase del ciclo en la que se encuentre (Powers, 1970; Yoest et al., 2019). Durante las horas previas y posteriores a la ovulación, las hembras presentan una mayor disposición frente al macho (Lohmiller & Swing, 2006), asegurando así la oportunidad para la fertilización y la preñez.

Cuando hablamos de ciclo estral, hacemos referencia a una secuencia de eventos morfofisiológicos y de comportamiento, altamente sincronizados que se repiten secuencialmente en el tiempo. El ciclo estral comienza desde el momento en que la rata hembra llega a la pubertad, siendo la apertura vaginal el indicativo del momento de la pubertad y coincide con la primera ovulación. El momento de la pubertad es variable y depende de la cepa, el peso y la edad. En general, el ciclo estral se puede dividir en 4 etapas: proestro, estro, metaestro y diestro (Montes & Luque, 1988). Los efectos de la variación hormonal a lo largo del ciclo estral se pueden monitorear por la observación directa de la citología vaginal mediante extendidos. En la **Tabla 1** se muestra un resumen de duración de cada etapa del ciclo estral, el comportamiento que presenta la rata hembra y la citología vaginal que se puede observar en cada etapa (Montes & Luque, 1988).

Tabla 1: Descripción de la duración, comportamiento de la hembra y citología del extendido vaginal de cada etapa del ciclo estral de la rata

Fase del ciclo	Duración (h)	Comportamiento	Citología del extendido vaginal
PROESTRO	12	Comportamiento receptivo al final de la fase	Extendido desprovisto de leucocitos y presencia de células epiteliales nucleadas. Estas células son redondas y aparecen en racimos.
ESTRO	30	Lordosis, comportamiento receptivo	Ausencia de leucocitos y presencia de células epiteliales de forma poligonales con marcada cornificación.
METAESTRO	6	Sin aceptación al macho	En el metaestro temprano, los principales tipos de células encontrados son leucocitos y células cornificadas.
DIESTRO	48	Sin aceptación al macho	Ausencia de células cornificadas y los leucocitos son muy abundantes.

Durante el ciclo estral, los órganos reproductivos presentan cambios cíclicos tanto a nivel histológico como funcional, en respuesta a las fluctuaciones en los niveles séricos de las hormonas esteroides ováricas, que son reguladas por las gonadotrofinas hipofisarias, hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH), secretadas por la adenohipófisis o hipófisis anterior.

Como se puede ver en la **Figura 2A**, los niveles hormonales cambian durante el ciclo estral de la rata. Los perfiles de secreción de LH muestran una secreción pulsátil, con frecuencias más altas durante el proestro y más bajas durante el estro/diestro (**Figura 2A**). El pico de LH durante el proestro estimula a los folículos preovulatorios a ovular y a la formación morfológica de los cuerpos lúteos (Freeman, 2006). Dos picos de FSH peri-ovulatorios estimulan el crecimiento de folículos más pequeños. El primer pico de FSH se correlaciona con el de LH (**Figura 2A**) y el segundo pulso está asociado con una disminución de la inhibina ovárica después de la ovulación. Durante la tarde del proestro, la secreción de prolactina se eleva para producir un pico pre-ovulatorio que es coincidente con el aumento de la LH. En los roedores, la prolactina tiene acción luteotrófica y esencial para la activación y mantenimiento funcional del cuerpo lúteo durante los primeros días de gestación. La fase lútea del ciclo estral en roedores es transitoria sin activación de los cuerpos lúteos (Smith et al., 1975). Para que ocurra la implantación el cuerpo lúteo debe activarse por estímulo de la prolactina secretada en respuesta al coito (Freeman, 2006).

La variación de los niveles hormonales de 17β -estradiol (E2) y progesterona (P4) a lo largo de un ciclo estral es semejante en ratas que poseen ciclos de 4 o 5 días (Haim et al., 2003). Se observan dos picos de P4 en proestro y en diestro 1-2. Durante el metaestro, el cuerpo lúteo secreta P4, que decae durante el segundo día del diestro cuando comienzan a aumentar los niveles de E2. El segundo pico de P4 se produce casi de manera simultánea con el pico de LH (**Figura 2A**) en el proestro. En el caso del E2 los niveles plasmáticos llegan a valores basales en el estro, se mantienen bajos y comienzan a incrementarse en la tarde del segundo día del diestro. Este aumento continúa hasta alcanzar los valores máximos a mitad del proestro. El ciclo se completa cuando el pico de E2 que ocurre a la mañana del proestro estimula la liberación de gonadotropinas que llevan a la ovulación (Lohmiller & Swing, 2006). Durante la tarde del proestro los niveles de E2 caen alcanzando valores basales en la mañana del estro (**Figura 2A**). Es importante destacar que la hembra es receptiva al macho a partir de las 19 hs del proestro y que la ovulación ocurre a las 02 hs del estro.

Con respecto a los niveles de andrógenos, principalmente la T sérica es la que tiene grandes variaciones a lo largo del ciclo, y éstas se deben a los cambios generados principalmente en la producción de andrógenos de origen ovárico (Lu et al., 1979). La T alcanza su punto máximo en el proestro en ratas que ciclan con 4 días y en diestro-3 en las que ciclan cada 5 días (**Figura 2B**). En ratas con ciclos estrales de 4 días, los niveles plasmáticos de T y androstenediona (A4) tienen un patrón similar al estradiol (Freeman,

2006). En general, los niveles de T en las ratas que ciclan cada 5 días son más bajos, pero permanecen más tiempo elevados en comparación a las que ciclan cada 4 días.

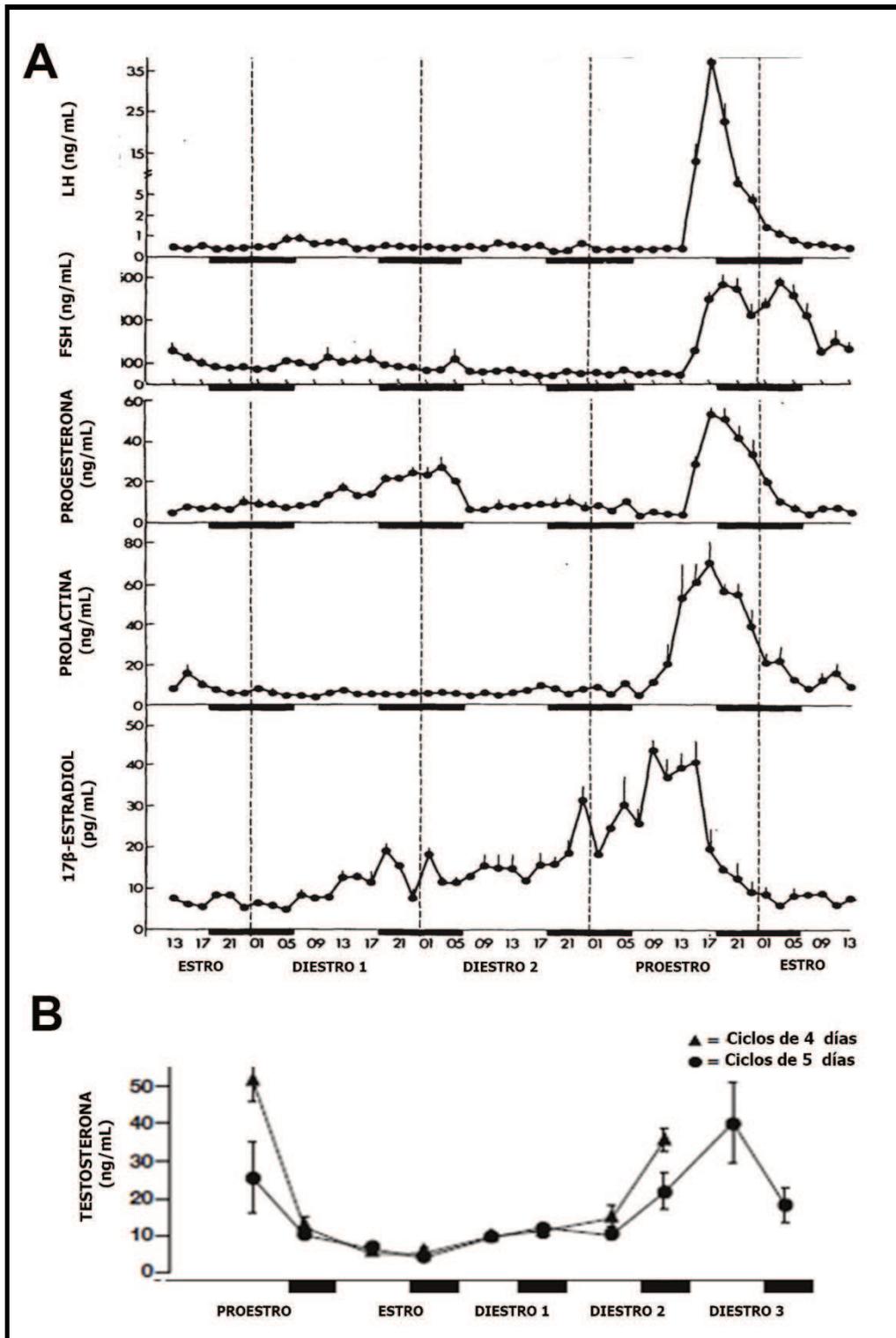


Figura 2. Cambios en los niveles hormonales durante el ciclo estral de la rata. A) Perfil de secreción de LH (ng/ml), FSH (ng/ml), progesterona (ng/ml), prolactina (ng/ml), 17β-estradiol (pg/ml), durante el ciclo estral de la rata (ciclo de 4 días). B) Cambios en los niveles hormonales de testosterona (ng/ml) en ratas con ciclos estrales de 4 días y 5 días. Sobre el eje x se representan distintos momentos del

día. Las barras en negro representan el período de oscuridad. Figuras modificadas de Smith et al. (1975) y Haim et al. (2003).

3. ÚTERO DE LA RATA

3.1 Descripción morfológica del útero de la rata

En roedores (ratas y ratones) el desarrollo y la diferenciación de la mayoría de los órganos del tracto reproductor femenino están completos al nacer. Sin embargo, el útero de la rata no está totalmente desarrollado y diferenciado en este momento. El establecimiento de la histoarquitectura característica del tejido uterino se completa postnatalmente en roedores (Bartol et al., 1999). Histológicamente, luego del **DPN15**, el útero de rata adquiere una organización similar al de una rata adulta en el que pueden visualizarse tres capas: endometrio, miometrio y perimetrio (Cunha, 1976) (**Figura 3**):

- **Endometrio:** esta capa está constituida por un epitelio cilíndrico simple (epitelio luminal) que recubre el lumen del útero y glándulas tubulares simples revestidas por un epitelio cúbico simple (epitelio glandular). Las glándulas se encuentran rodeadas por una capa de tejido conectivo laxo muy vascularizada, correspondiente al estroma endometrial. El componente celular del estroma son los fibroblastos que expresan proteínas específicas como la vimentina (componente de los filamentos intermedios) (**Figura 3**).
- **Miometrio:** Está compuesto por dos capas de músculo liso, una capa circular interna y una longitudinal externa, separadas por una capa intermedia de tejido conectivo con abundantes vasos sanguíneos. Las células musculares de ambas capas expresan el microfilamento alfa actina de músculo liso (α -SMA) (**Figura 3**).
- **Perimetrio:** capa más externa que recubre al útero; está compuesto por mesotelio y una delgada capa de tejido conjuntivo laxo. Presenta abundantes vasos linfáticos, sanguíneos y fibras nerviosas. Está recubierto por la serosa peritoneal.

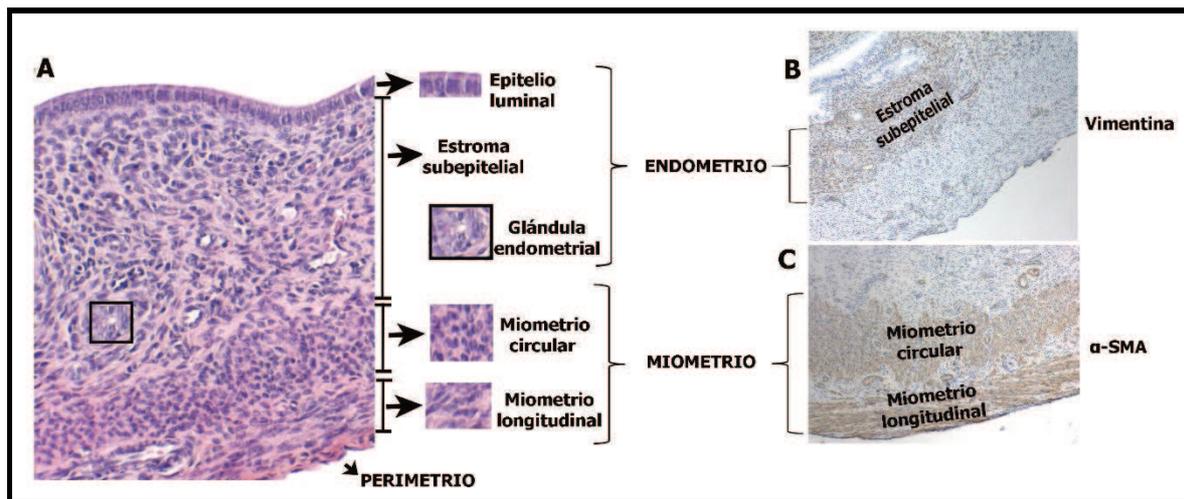


Figura 3. Figura 3. Fotomicrografías representativas de secciones longitudinales uterinas de rata. Cortes histológicos teñidos con H-E (A) e inmunomarcadas con vimentina (B) y α -SMA de músculo liso (C). En A se observan las características histológicas del tejido: epitelio luminal, glándula endometrial, estroma subepitelial, capa circular interna del miometrio, capa longitudinal externa del miometrio y perimetrio. En B se puede observar la inmunomarcación positiva para vimentina (estroma subepitelial) y en C la inmunomarcación para α -SMA de músculo liso (en miometrio longitudinal y circular). Magnificación: 200X.

3.2 Matriz extracelular

Se conoce como matriz extracelular a la gran red de proteínas y otras moléculas que rodean, sostienen y dan estructura a las células del estroma del útero. La matriz extracelular ayuda a que las células se mantengan unidas, se comuniquen con las células cercanas y desempeña una función importante en la división y el movimiento celular, así como en la reparación de los tejidos y en otras funciones celulares (Aplin et al., 2008; Bosman & Stamenkovic, 2003). La remodelación de la matriz extracelular uterina se asocia con el desarrollo y el normal funcionamiento de varias situaciones fisiológicas (López-Martínez et al., 2021; Sanches et al., 2010). Además, la desregulación de la matriz extracelular se asocia con situaciones patológicas (Leppert et al., 2014).

Comúnmente, la matriz extracelular del útero se compone de tres clases principales de biomoléculas: glicosaminoglicanos, proteoglicanos, y proteínas fibrosas como el colágeno (Oliveira et al., 2015). Esta proteína constituye el elemento estructural principal de la matriz extracelular, proporciona resistencia a la tracción, regula la adhesión celular, apoya la quimiotaxis y la migración, y dirige el desarrollo tisular. Se han descrito varios tipos de colágeno en útero de ratón (colágeno tipo I, II, III, V) (Spiess et al., 2007). Las cadenas de polipéptidos de colágeno se sintetizan en los ribosomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico y se introducen en la luz como moléculas precursoras, llamados cadenas pro- α . Cada cadena pro- α luego se une a las otras dos por medio de enlaces de hidrógeno para

formar una molécula de triple cadena, conocida como procolágeno. Después de la secreción, la molécula fibrilar de procolágeno se divide para convertirse en moléculas de colágeno, que convergen en fibrillas (Lamande & Bateman, 1999).

En respuesta a cambios en los niveles de los esteroides sexuales, el útero experimenta una extensa remodelación de la matriz extracelular en los diferentes estadios del ciclo reproductivo, produciéndose numerosos cambios en la histología uterina (Westwood, 2008). Se sabe que el contenido de colágeno puede ser determinado a través de la cuantificación de la hidroxiprolina. Con relación a los cambios en la concentración de colágeno durante el ciclo estral. Morgan (1963) demostró que la hidroxiprolina tiene niveles bajos en el estro, observándose la máxima concentración en el proestro. Otro parámetro que es importante tener en cuenta es el nivel de organización de las fibras de colágeno. Se ha estudiado el efecto de las hormonas esteroideas sobre la remodelación de estas fibras, describiendo cómo es su compactación o el nivel de organización. Halme and Woessner (1975) demostraron que la P4 disminuye la actividad colagenolítica en el útero después del parto. La actividad colagenolítica de ciertas enzimas ocasiona la pérdida de estructura helicoidal en las fibras de colágeno y, por lo tanto, disminuye su compactación. Por otro lado, la administración de E2 a ratas inmaduras ovariectomizadas indujo una remodelación extensa de la matriz de colágeno en el estroma endometrial (Pastore et al., 1989); En ratas androgenizadas con dehidroepiandrosterona (DHEA) hay altos niveles de fibrosis (colágeno tipo IV) en el tejido uterino (Zhang et al., 2013) y un aumento de la cantidad y la organización del colágeno del estroma uterino (Lobl & Maenza, 1975). Otros estudios han descrito que E2 y DHT tienen efectos superpuestos pero distintos sobre los genes implicados en la remodelación de la matriz de colágeno (Nantermet et al., 2005).

3.3 Contenido de agua uterino

La histoarquitectura uterina puede modificarse por imbibición de agua. El proceso de imbibición puede definirse como la absorción de un líquido (agua) por un sólido, lo que genera como consecuencia un aumento del volumen. A nivel celular existen diferentes mecanismos por los cuales el agua puede atravesar la membrana celular. El movimiento del agua a través de las células puede ocurrir por difusión a través de la bicapa lipídica o de los canales de agua de las proteínas denominadas acuaporinas (AQPs). Estos canales son pequeñas proteínas integrales de membrana hidrofóbicas que facilitan el movimiento pasivo del agua a través de la membrana celular (Agre & Kozono, 2003). En la actualidad, se han identificado en mamíferos trece isoformas de AQPs, y doce de ellas se pueden encontrar en diferentes tejidos de ratones, ratas, perros, cerdos y seres humanos (Zhu et al., 2015). Diversos estudios demostraron que estas proteínas se localizan en el tracto femenino de

ratas y ratones, participando en la homeostasis del líquido uterino y su expresión puede ser regulada por hormonas sexuales esteroideas. Incluso, varios subtipos de AQPs también son permeables a moléculas pequeñas (urea, glicerol, etc.) (Wang et al., 2006). Por otro lado, la evidencia reciente ha demostrado que estas proteínas pueden facilitar la migración, invasión y proliferación celular en el desarrollo del cáncer de endometrio, así como también, estar implicadas en procesos de muerte celular (Li et al., 2018; Shi et al., 2014). La inhibición de la expresión de AQP2 en carcinoma endometrial humano atenuó significativamente la migración, la adhesión y la invasión de células de este tipo de carcinoma *in vitro* (Zou et al., 2011).

En el útero, el transporte de agua a través de AQPs también es importante para mantener el volumen de líquido dentro de la luz del epitelio luminal (Lindsay & Murphy, 2007). Los Eg aumentan el volumen del líquido uterino en la luz del epitelio luminal, mientras que la P4 y la T lo disminuyen (Mohd Mokhtar et al., 2014; Salleh et al., 2005). La modificación de este volumen podría afectar negativamente los procesos reproductivos uterinos, por lo que podría afectar la fertilidad. Además, a lo largo del ciclo estral, el endometrio presenta recurrentes procesos de edematización en respuesta a estímulos hormonales (Astwood, 1939). El contenido de agua uterino aumenta al máximo antes del proestro y luego cae abruptamente con la primera aparición de células cornificadas en el extendido vaginal (Astwood, 1939). AQP 1, 3 y 8 se expresan constitutivamente en el útero de ratón ovariectomizado (Jablonski et al., 2003). Sin embargo, se ha documentado que las hormonas esteroideas inducen cambios en la expresión uterina de las AQPs y que el efecto podría ser diferente, dependiendo del tipo de hormona. Por ejemplo, el E2 induce la expresión de ARNm de AQP1 y la T regula positivamente los niveles de expresión de AQP 1, 5 y 7 en el útero de ratas ovariectomizadas (Salleh et al., 2015).

4. METABOLISMO TISULAR DE HORMONAS ESTEROIDEAS EN EL ÚTERO

La visión clásica de la endocrinología indica que las hormonas esteroideas sintetizadas en las gónadas y en glándulas suprarrenales, difunden desde el espacio extracelular al interior de los capilares y son transportadas por la sangre hacia distintos tejidos, incluyendo el útero. De esta manera, ejercen su efecto en aquellas células que poseen receptores específicos para cada hormona. A partir del año 1988 (Leiderman & Fernández, 2011) ha surgido otro concepto que se ha denominado "intracrinología". Este concepto hace referencia a la síntesis de esteroideos activos en tejidos periféricos con acción en las mismas células en las que se produce su síntesis. Incluso, se ha descrito la presencia de distintas isoformas de enzimas esteroideogénicas en los tejidos. Esto permite el control de la síntesis y/o

metabolismo de esteroides según las necesidades locales dictadas por las señales intra/extracelulares tisularmente (Konings et al., 2018; Leiderman & Fernández, 2011).

Las enzimas esteroidogénicas implicadas en la síntesis y/o metabolismo de esteroides pueden clasificarse en dos grandes grupos: Citocromos P450 o Hidroxiesteroide Deshidrogenasas (HSD). Los genes que codifican las enzimas Citocromos P450 son comúnmente llamados CYP en humanos y Cyp en roedores, seguidos por un número que indica la familia a la que pertenecen y una letra indicando la subfamilia. En la **Figura 4** se proporciona un esquema en donde se muestran los sustratos y productos derivados de las vías metabólicas en las que están implicadas las proteínas esteroidogénicas.

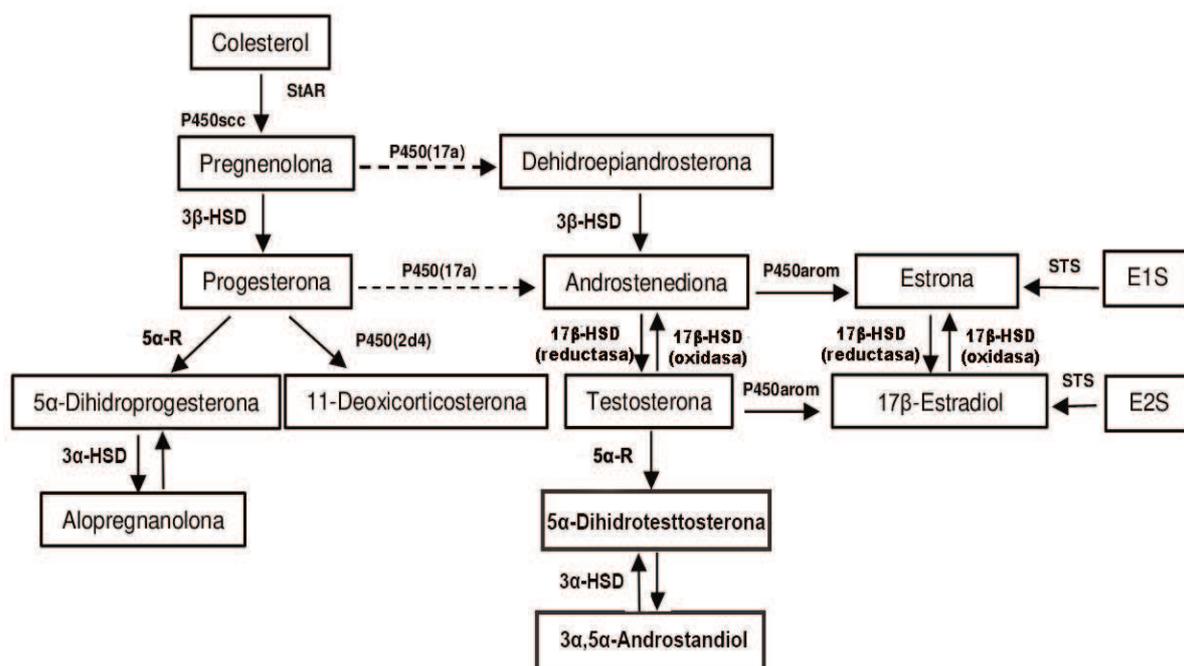


Figura 4. Diagrama simplificado de esteroides implicados en la biosíntesis tisular de estrógenos y andrógenos. Las flechas simples y dobles indican reacciones irreversibles e irreversibles, respectivamente. **E1**: estrona. **E2**: 17β-estradiol, **E1S**: Sulfato de estrona, **E2S**: Sulfato de Estradiol. Figura modificada de Rossetti et al. (2015).

La Proteína de la Regulación Esteroidogénica Aguda (StAR) inicia el proceso de esteroidogénesis mediante el transporte de colesterol libre en la célula, desde las membranas mitocondriales externas hacia las internas. Se considera que la translocación del colesterol por StAR a través del espacio que separa las membranas es un paso limitante de la velocidad en esteroidogénesis (Zurvarra et al., 2009). El colesterol es transformado en pregnenolona por la división de la cadena lateral de la enzima P450scc (también llamada Cyp11A1).

La enzima 3 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa (3 β -HSD) una deshidrogenasa/isomerasa y actúa convirtiendo la pregnenolona en P4. Existen al menos dos isoformas de 3 β -HSD en humanos y cuatro en roedores (Do Rego et al., 2009). En rata, la isoforma 1 ha sido reportada en altos niveles de expresión en testículos y ovarios (Mellon et al., 2001). La pregnenolona también puede ser convertida a DHEA (Mellon et al., 2001) por P450 (17 α) (Cyp17A1) y luego a A4 por acción de la enzima 3 β -HSD. A4 puede entonces convertirse en T por acción de la enzima 3 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa (17 β -HSD). Esta enzima multifuncional cataliza un proceso reversible entre los 17-cetoesteroides (androstenediona y estrona-E1) y los 17 β -hidroxiesteroides (T y E2) (Labrie et al., 2000). Hasta el momento, se encuentran descritas en vertebrados doce isoenzimas (tipo 1-12) que difieren en términos de distribución tisular, localización subcelular, actividad catalítica, especificidad de sustrato y propiedades bioquímicas (Do Rego et al., 2009). Las de tipo 1, 3, 5, 7 y 12 actúan como reductasas, responsables de la formación de los 17-hidroxiesteroides (como T y E2); mientras que las de tipo 2, 4, 6, 9, 10 y 11 poseen actividades oxidativas y catalizan las reacciones opuestas (formación de androstenediona y E1) (Do Rego et al., 2009; Kimoto et al., 2010) (**Figura 4**).

Posteriormente, T se puede aromatizar en E2 por P450arom (Cyp19 o aromatasa) o reducirse a 5 α -Dihidrotosterona (también denominada 5 α -DHT o DHT) por 5 α -reductasa (5 α -R). La enzima P450arom es un complejo enzimático terminal que cataliza la aromatización de los andrógenos de C19 (androstenediona y T) a Eg de C18 (E1 y E2, respectivamente) (Compagnone & Mellon, 2000). En muchas especies, incluidos humano, rata y ratón, el gen que codifica para dicha enzima es único (Do Rego et al., 2009). Por otro lado, la enzima 5 α -R tiene dos propiedades fundamentales: convertir T en DHT (uno de sus andrógenos más potentes) y P4 en 5 α -Dihidroprogesterona (5 α -DHP) (Do Rego et al., 2009). Se han reportado dos isoformas de la 5 α -R tipo 1 (5 α -R1) y tipo 2 (5 α -R2).

La 3 α -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa (3 α -HSD) es una enzima bifuncional que convierte, de manera reversible, esteroides 5 α -reducidos en tetrahidroesteroides. Entre las reacciones que cataliza, la más destacada es la conversión de 5 α -DHP en alopregnenolona (Do Rego et al., 2009) y de DHT a 3 α -androstadiol. Hay una única isoforma en rata, la cual interviene en todas las reacciones oxidativas y reductivas (Penning et al., 2001).

La enzima sulfatasa esteroidea (STS) es otra enzima involucrada en la producción de Eg, a través de la conversión de los Sulfatos de E1 y E2 (E1S y E2S) en sus formas no conjugadas (Fusi et al., 2008; Purohit et al., 2008).

5. REGULACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN FUNCIONAL UTERINA EN LA RATA

La diferenciación funcional del útero es un proceso regulado por diversos mecanismos endocrinos, celulares y moleculares. El proceso está regulado por varios factores, entre ellos:

5.1 Receptores de hormonas esteroideas

Las hormonas esteroideas son reguladores claves del crecimiento, la diferenciación y las funciones fisiológicas de muchos tejidos, incluyendo el tracto reproductor femenino. Estas hormonas ejercen su acción a través de sus receptores específicos, que forman parte de una superfamilia de receptores nucleares activados por ligandos (hormonas).

En rata, dos genes diferentes, *Esr1* y *Esr2*, ubicados en distintos cromosomas (cromosomas 1 y 6 respectivamente) codifican para el receptor de estrógeno α y β , respectivamente (RE- α y el RE- β). Sin embargo, ambos receptores presentan afinidades similares para E2 (Hewitt & Korach, 2008). El RE- α es la forma predominante en el útero y es el principal mediador de los efectos de los Eg en este órgano (Couse & Korach, 1999). Por el contrario, y a pesar de su expresión relativamente baja en útero, el RE- β actúa como un modulador negativo de las acciones de los Eg. Distintos estudios han revelado que ratones mutantes para este gen exhiben una respuesta exacerbada a un tratamiento exógeno con E2 (Nakajima et al., 2015; Wada-Hiraike et al., 2006). El receptor de progesterona (RP) está codificado por un único gen (cromosoma 8) en humanos y roedores, y su transcripción a partir de la activación de diferentes promotores origina tres isoformas, *Pgr-A*, *Pgr-B* y *Pgr-C* (Li & O'Malley, 2003). Finalmente, en humano y en rata, el receptor de andrógeno (RA) se encuentra codificado en el cromosoma X y en tejido prostático normal de rata se han detectado dos isoformas clasificadas de acuerdo a sus distintos puntos isoeléctricos (Xia et al., 2000). Diversas variantes de empalme han sido descritas en humanos y se las ha relacionado con el desarrollo de cáncer de próstata. Por ejemplo, la variante AR-45 que carece del dominio de unión a ligando (LBD) se encuentra en el tejido prostático normal (Ahrens-Fath et al., 2005), y su expresión está aumentada en tumores de próstata (Dehm et al., 2008). También se ha descrito una forma truncada del RA (AR-V7/V3), presente en cáncer de próstata resistente a la castración química (Watson et al., 2010).

En roedores, la expresión del receptor de estrógeno en el útero ha sido reportada por diversos autores. Si bien la expresión del RE- α no es esencial para desarrollo organogenético y diferenciación del útero fetal (Hewitt et al., 2010), sí lo es para el crecimiento y desarrollo uterino peripuberal en el ratón (Lubahn et al., 1993). Por otro lado,

distintos trabajos han revelado que, a diferencia de lo que sucede en el adulto, la proliferación de las células uterinas epiteliales y estromales es independiente de la acción del E2 (Ogasawara et al., 1983) y de la expresión del RE- α en neonatos (Nakajima et al., 2015). Además de la activación directa dependiente del ligando de RE- α en epitelios, los efectos proliferativos inducido por Eg parece estar mediados principalmente por RE- α estromal a través de la producción de factores de crecimiento derivados del estroma (acción paracrina), tales como: el factor de crecimiento similar a la insulina, IGF-1 e IGF-2 (Hall et al., 2001).

Los andrógenos pueden promover el crecimiento uterino a través del RA (J. P. Choi et al., 2015; Nantermet et al., 2005). Ratones hembra a las que se les inactivó la expresión génica del RA poseen paredes y áreas uterina reducidas comparación con los controles normales (Walters et al., 2009). Además, los ratones ovariectomizados expuestos a DHT muestran no sólo un aumento endometrial y del área miometrial, sino también un aumento del peso uterino (Simitsidellis et al., 2016). J. P. Choi et al. (2015) demostraron que el tratamiento con T (andrógeno aromatizable) y con DHT (andrógeno no aromatizable) son capaces de restaurar el peso uterino en animales ovariectomizados, pero no tienen efecto sobre el peso uterino en hembras a las que se les inactivó la expresión génica del RA Efectos similares se observaron utilizando ratones hembras a las que se les inactivó la expresión génica del RE- α y fueron tratadas con DHT, no ocurriendo cambios en el crecimiento uterino (Nantermet et al., 2005). Sugiriendo la existencia de conexiones entre las vías de señalización del RA y RE- α .

Con respecto a la dinámica celular, el efecto de los andrógenos es controversial. Estudios *in vitro* en células endometriales primarias humanas demostraron que los andrógenos tienen efectos antiproliferativos (Marshall et al., 2012; Tuckerman et al., 2000), mientras que en células miometriales humanas los andrógenos tienen efectos antiapoptóticos actuando a través de su receptor (Li et al., 2014). Como habíamos mencionado, la señalización paracrina intercelular incluye la secreción del IGF-1 del estroma y su posterior unión a sus receptores en el epitelio, activando vías que promueven la proliferación celular y los efectos antiapoptóticos (Párrizas et al., 1997; Sato et al., 2002). También se ha demostrado que la proliferación de las células epiteliales y miometriales está mediada por IGF-1 (Sahlin et al., 1994; Simitsidellis et al., 2016);. En este compartimento uterino, el RA modula la proliferación de células miometriales a través de la vía del receptor-1 del IGF-1 (IGFR-1) (Kowalski et al., 2004; Sahlin et al., 1994).

5.1.1 Estructura de los receptores de hormonas esteroideas

La comparación de secuencias ha revelado que los receptores hormonales pertenecen a una familia diversa de genes activados por ligandos, que comparten una estructura altamente conservada y mecanismos comunes que afectan la transcripción de genes. Para comprender cómo los receptores de hormonas esteroideas regulan la función de los genes, es importante conocer la estructura de estas proteínas.

En la **Figura 5** se muestra un esquema genérico de la estructura de los receptores de hormonas esteroideas, así como las funciones de cada dominio. En la región N-terminal se localiza la región A/B que contiene la función de activación independiente del ligando y modula la transcripción de genes a través de su función de activación N-terminal-1 (AF-1). En la región C se encuentra el dominio de unión a ADN (DBD) que está altamente conservado; compuesto por dos dedos de zinc, a través de los cuales el receptor interactúa físicamente de manera directa con la hélice del ADN. Estos dominios también contienen una señal de localización nuclear (NLS) y dimerización (Mueller & Korach, 2005). La región C contiene los sitios de reconocimiento de los denominados elementos de respuesta hormonal. A continuación, se encuentra el dominio E (conectado por la llamada región bisagra, D), en el que está el dominio de unión a ligando (LBD) cerca del extremo COOH-terminal que contiene una función de transactivación 2 (AF-2), dependiente de la presencia del ligando. La región F es muy variable entre diferentes especies (Mueller & Korach, 2005).

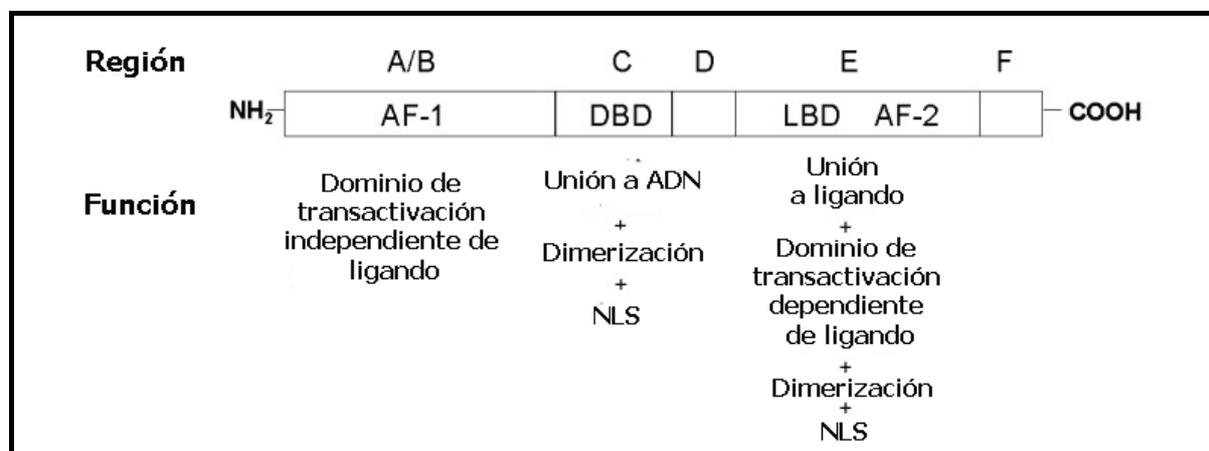


Figura 5. Representación esquemática de regiones estructurales y dominios funcionales de los receptores de hormonas esteroideas. Figura modificada de Mueller and Korach (2005)

5.1.2 Acción de hormonas esteroideas medida por sus receptores

Una característica de la vía de acción de las hormonas esteroideas, radica en que ejercen su acción a través de sus receptores específicos que actúan como factores de transcripción

con capacidad de unión a ligandos naturales y sintéticos. También se han descrito otros mecanismos de acción de hormonas esteroideas que implican la vía genómica y no genómica. A continuación, en la **Figura 6** se esquematizan los posibles mecanismos de acción genómico y no genómicos de las hormonas esteroideas.

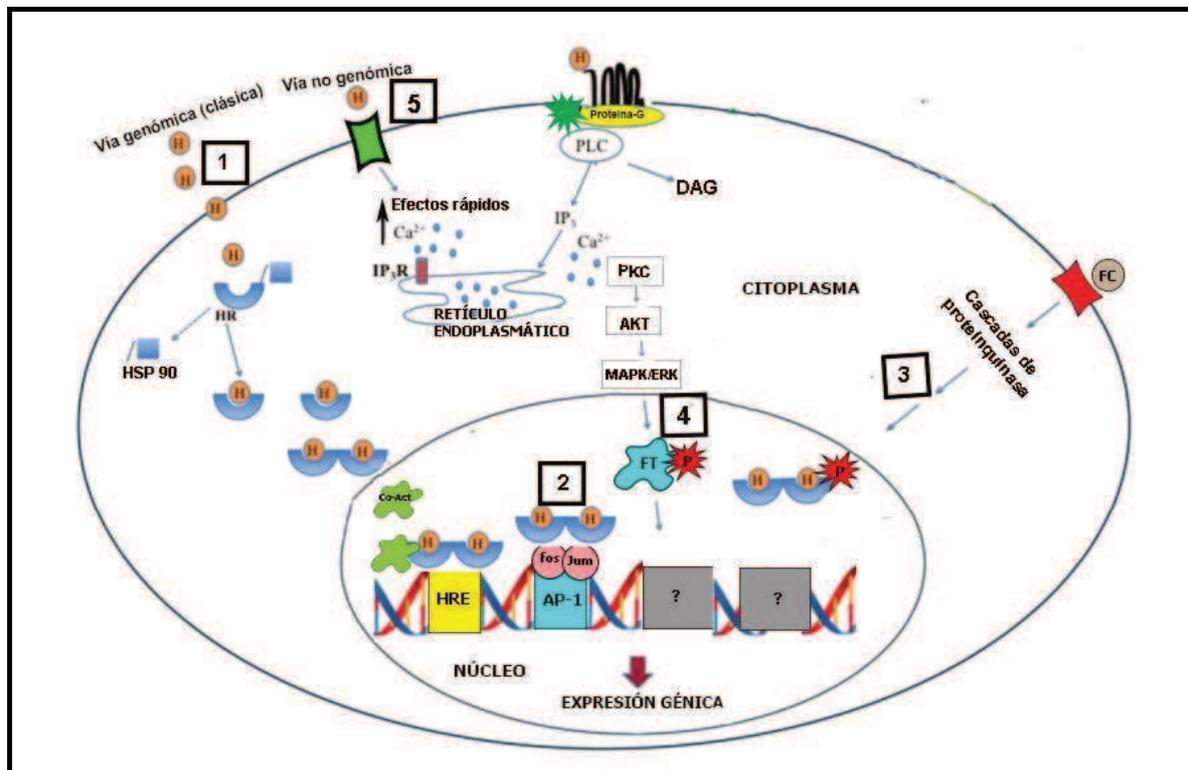


Figura 6. Representación esquemática de las distintas vías de acción de hormonas esteroideas y de sus receptores. 1) Vía genómica (clásica); 2) Regulación indirecta de la transcripción de genes; 3) Vía genómica independiente de ligando; 4) Vía de acción mediada por receptores de membrana acoplados a proteína G; 5) Vía no genómica. **H**: hormona esteroidea; **FC**: factores de crecimiento; **FT**: factor de transcripción **HRE**: elemento de respuesta a hormonas. Figura modificada de Contrò et al. (2015).

1) En la vía genómica (clásica) ocurre la dimerización de los receptores en respuesta a la unión del ligando (hormona) y esto ocasiona un cambio conformacional que permite interactuar con coactivadores y proteínas reguladoras de la transcripción (**Figura 6-1**). Es decir, una vez activados por ligando, los receptores nucleares dimerizan y se traslocan al núcleo donde se unen a secuencias específicas de ADN y se inicia la transcripción del gen. Estas secuencias se denominan elementos de respuestas a hormonas (en inglés, "*Hormone Response Elements*", HRE) (**Figura 6-1**). En la **Tabla 1** se puede observar las secuencias y el nombre de la secuencia HRE para los RP, RA y RE- α y RE- β . En ausencia de hormonas,

los receptores existen como complejos oligoméricos inactivos secuestrados en el citoplasma por la proteína de choque térmico (Hsp) 90, que se comporta como chaperona.

Tabla 1: Secuencias denominadas HRE para el RP (PRE), RA (ARE) y RE (ERE)

Receptor	Nombre del HRE	Secuencia
RP	PRE	GGTACAnnnTGTTCT
RA	ARE	GGTACAnnnTGTTCT
RE (α y β)	ERE	AGGTCAAnnnTGACCT

2) Los receptores nucleares de hormonas esteroideas pueden regular la expresión de genes diana de manera indirecta. Por ejemplo, se ha descrito la inducción de la expresión de genes regulados por el RE unido a E2, en los que no era evidente ninguna secuencia similar a ERE. Este mecanismo implica la interacción del RE con factores de transcripción como la proteína activadora 1 (AP-1) o Sp-1, utilizando los sitios de unión a ADN que son reconocidos por esas proteínas (**Figura 6-2**). Un ejemplo de este tipo de mecanismo de acción se presenta con el gen del IGF-1, la colagenasa, y la ciclina D1 que son activados por E2 a través de la unión del RE- α con los factores de transcripción Fos y Jun en sitios de unión AP-1 de genes diana (Björnström & Sjöberg, 2005).

3) En la vía genómica independiente de ligando, ciertos factores de crecimiento (FC) o AMPc se unen a sus receptores en la membrana celular activando las vías de proteinquinasas intracelulares, lo que conduce a la fosforilación y activación del receptor de hormonas esteroideas y posterior acción como factores de transcripción (**Figura 6-3**).

4) Otra variante del mecanismo genómico puede darse por unión de la hormona esteroidea a receptores de hormonas esteroideas ubicados en la membrana celular, que están acoplados a la proteína G y activan a la fosfolipasa C (PLC). En la reacción, una molécula de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato sufre ruptura y produce dos compuestos: el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). El IP3 luego se difunde hasta unirse a receptores específicos del inositol trifosfato, los cuales son canales de calcio. Esto permite la salida de Ca^{+2} hacia el citoplasma, aumentando la concentración intracelular de este ion y activando cascadas de transducción de señales que incluyen por ejemplo a PKC–AKT–MAPK/ERK, y modula la actividad de los factores de transcripción (**Figura 6-4**).

5) Los mecanismos no genómicos involucran la unión de hormonas a receptores asociados a la membrana plasmática, iniciando una cascada de señalización intracelular que implican el desarrollo de respuestas rápidas que no requieren transcripción ni síntesis proteica. De esta manera estos efectos ocurren en tiempos muy cortos (Björnström & Sjöberg, 2005). Este tipo de señalización se inicia al unirse las hormonas a receptores

localizados en la membrana e incluye la modulación de segundos mensajeros (**Figura 6-5**) tales como calcio intracelular, AMPc y óxido nítrico (NO).

5.2 Genes de la familia Hox y Wnt

Los genes de la familia *Hox* (del inglés: *Homeobox*) y *Wnt* (del inglés: *Wingless-related MMTV integration site*) son reguladores esenciales del proceso de organogénesis postnatal y de la diferenciación funcional del útero de la rata.

Los genes homeóticos de la familia *Hox* poseen una secuencia altamente conservada de 183 pares de bases (pb) que codifica para un dominio de 61 aminoácidos llamado “homeodominio”. Esta región posee una estructura que es responsable de reconocer y unirse a secuencias de ADN específicas para regular la expresión de genes diana. En el ratón y en el humano, los genes *Hox* se distribuyen en 4 *clústers* separados: A, B, C y D, conteniendo cada uno entre 9 y 13 genes. Dentro de esta familia de genes *Hox*, HOXA10 es un gen esencial para el desarrollo del endometrio y la implantación de blastocisto. HOXA10 se expresa en el estroma y decidua del útero de ratón preñado y regula la proliferación estromal (Lim et al., 1999). Roedores hembra deficientes en el gen HOXA10, son estériles debido a un defecto uterino que afecta la implantación de los embriones (Satokata et al., 1995; Varayoud et al., 2014). Se ha sugerido que HOXA10 podría regular la proliferación celular en células del miometrio. En estudios *in vitro* llevados a cabo por Ciarmela et al. (2008), se demostró que el tratamiento con activina-A disminuyó la expresión del ARNm de HOXA10 y la proliferación celular en células PHM1 (en inglés *Pregnant Human Myometrial 1*).

Por otro lado, se conoce que la expresión de HOXA10 es regulada por hormonas esteroideas. Mientras el E2 y la P4 inducen la expresión de esta proteína, la T y la DHT disminuye la expresión de HOXA10 en estudios *in vitro* con células Ishikaw (Cermik et al., 2003). Además, HOXA10 está regulado diferencialmente en cada compartimento uterino por la P4. La expresión de HOXA10 es inducida en el estroma uterino; mientras que en el miometrio se encontró disminuida. Postulándose de esta manera que, las hormonas esteroides regulan la expresión del gen HOXA10 diferencialmente en el endometrio y miometrio (Cermik et al., 2003).

La familia de genes WNT, son genes homólogos de los genes “*Wingless*” de *Drosophila Melanogaster*; implicados en el establecimiento de patrones de polaridad de segmentos corporales durante la embriogénesis de la mosca (Spencer et al., 2012). Esta familia de genes codifica una gran familia de proteínas que desempeñan papeles importantes en el

desarrollo embrionario y la homeostasis de los tejidos adultos (Ring et al., 2014). Una expresión alterada de genes WNTs está relacionada con estados patológicos en el sistema reproductivo, incluyendo hiperplasia y cáncer endometrial (Yip et al., 2013). Seis miembros de esta familia (WNT4, WNT5a, WNT7a, WNT7b, WNT11 y WNT16) se expresan en el útero durante el desarrollo (Hayashi et al., 2010; Kurita, 2011) y exhiben roles cruciales en la interacción célula-célula, en la proliferación y diferenciación celular. Entre las alteraciones detectadas en los mutantes para el gen WNT5a se observan cuernos uterinos de menor diámetro con un epitelio luminal normal, ausencia de glándulas endometriales y estructuras cervicales y vaginales bien definidas (Mericskay et al., 2004). Similarmente, los ratones deficientes en WNT7A poseen útero hipoplásico con un epitelio luminal estratificado rodeado de una pequeña capa de estroma que carece de glándulas endometriales, un miometrio hiperplásico y desorganizado (Miller & Sassooun, 1998). En ausencia de expresión de WNT7a, el epitelio uterino se diferencia en un epitelio estratificado y demuestra una falta de respuesta epitelio-mesénquima, sugiriendo un rol importante de WNT7a en este tipo de interacciones y en el mantenimiento de la identidad del epitelio uterino (Kurita, 2011).

La vía de señalización de WNT implica la unión de WNTs a los receptores de membrana de la familia Frizzled (Fzd). Luego de la unión Wnt-Fzd, se pueden activar tres vías de señalización distintas (van der Horst et al., 2012): la denominada vía canónica WNT/ β -catenina, que involucra la activación intracelular de β -catenina como principal mediador (Clevers, 2006), la no canónica de polaridad celular planar (Kato, 2005) y la no canónica Wnt/ Ca^{2+} (Kohn & Moon, 2005). En la vía canónica, luego de unirse alguno de los WNT a receptor Fzd se activa una serie de cascadas vía citoplasmática que implican la estabilización de β -catenina y acumulación de esta proteína en el citosol, la cual posteriormente se transloca al núcleo y activa la expresión de diversos genes. Se ha demostrado la importancia de la vía de señalización WNT/ β -catenina en el mantenimiento del fenotipo epitelial columnar uterino. Utilizando un modelo de ratón al que se inactivó condicionalmente la expresión génica del gen de β -catenina, la expresión de una forma estabilizada de esta proteína resultó en hiperplasia glandular, mientras que la inhibición de la expresión indujo metaplasia escamosa en el útero de estos animales (Jeong et al., 2009).

5.3 Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento derivados del estroma tienen un papel importante sobre la proliferación epitelial, diferenciación en muchos órganos epitelio-mesenquimales, incluido el útero. Entre estos factores de crecimiento, podemos mencionar a los de la familia del IGF (del inglés: *insulin-like growth factor*), IGF-I e IGF-II que regulan la proliferación, diferenciación y funciones celulares actuando a través de mecanismos autocrinos y/o

paracrinamente en muchos sistemas de órganos, incluido el útero. En roedores, el E2 induce la proliferación de las células epiteliales uterinas actuando a través del RE- α ubicado en el estroma (Hewitt et al., 2010; Klotz et al., 2002). De esta manera, el IGF-1 podría actuar de manera paracrina induciendo la proliferación en epitelio luminal. Se sabe que el RE- α es necesario para la activación del IGF-1R en presencia de E2 (Klotz et al., 2002). Sumado a esto, ratones transgénicos en los que se ha silenciado el gen del IGF-1 muestran ausencia en la respuesta mitogénica al E2 en el epitelio uterino (Adesanya et al., 1999). Teniendo en cuenta que el IGF-1 es producido predominantemente en el estroma mientras que su receptor (IGF-1R) se localiza sobre todo en el epitelio uterino (Sato et al., 2002), se ha propuesto la hipótesis de que E2 induce la producción local de IGF-1 por el estroma uterino y, posteriormente esta molécula puede actuar de manera paracrina sobre IGF-1 localizado en el epitelio uterino, induciendo efectos mitogénicos. La expresión uterina de IGF-1 es inducida por E2 y andrógenos (Sahlin et al., 1994; Simitsidellis et al., 2016). Incluso se ha informado que altas concentraciones de IGF-1 regulan negativamente la expresión proteica de IGF-1R en blastocistos de ratón, disminuyendo la señalización de IGF-1R y acelerando así el proceso de apoptosis (Chi et al., 2000).

5.4 PTEN

PTEN (en inglés *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) es una proteína clasificada como un supresor tumoral. En humanos, el gen de PTEN está codificado en el cromosoma 10q23 y en ratas en el cromosoma 1q52. En ambas especies, la proteína codificada contiene 403 aminoácidos. *In vitro*, PTEN es capaz de desfosforilar fosfopéptidos y fosfolípidos (Chen et al., 2018). Por lo tanto, PTEN actúa como una fosfatasa de proteínas y lípidos. Los efectos biológicos de PTEN se relacionan con su capacidad para desfosforilar el fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP3), reduciendo sus niveles intracelulares e inhibiendo la activación de proteínas posteriores de la vía de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), incluida la vía de serina/treonina quinasa (AKT). En particular, PTEN actúa regulando negativamente la vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR,

En la **Figura 7** se puede observar el mecanismo de acción de PTEN a nivel citoplasmático y nuclear. Por un lado, PTEN al desfosforilar el PIP3 reduce sus niveles intracelulares. Es sabido que PIP3 se une al dominio de homología a pleckstrina (PH) de proteínas como AKT, recluta esta proteína en la membrana plasmática y también cambia la conformación de éstas para que luego pueda ser activada por fosforilación a través de una proteína quinasa dependiente de 3-fosfoinosítido quinasa (PDK) (Chen et al., 2018). Una vez activado AKT fosforila diversas proteínas involucradas en el crecimiento, la supervivencia, muerte celular y

el metabolismo. De esta manera PTEN regula negativamente la secuencia de eventos que ocurren cascada abajo en la vía de PIP3.

Por otro lado, a nivel nuclear PTEN también desempeña su actividad de fosfatasa lipídica (similar a lo descrito en la membrana citoplasmática) y actúa sobre la estabilidad de cromosomas, la reparación del ADN y la regulación del ciclo celular (Chen et al., 2018) (**Figura 7**).

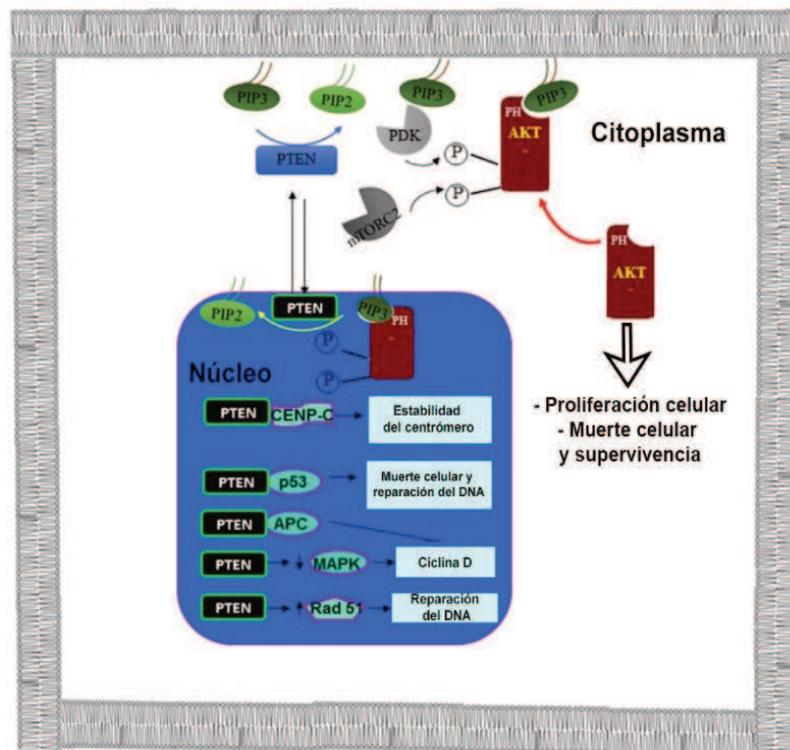


Figura 7. Vías de acción de PTEN en el citoplasma y núcleo. Figura modificada de Chen et al. (2018).

En la **Figura 8** se presenta un esquema de la estructura de PTEN. La estructura cristalina de PTEN reveló que se compone de 403 aminoácidos conteniendo: una región N-terminal de 185 aminoácidos (1–185) que incluye un dominio de unión fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, PIP2 (dominio PBD) y el dominio fosfatasa responsable de su actividad enzimática. La región C-terminal está compuesta por un dominio C2, una región denominada “C-tail” que contiene dos secuencias PEST (prolina, ácido glutámico, serina, treonina) y un motivo de interacción PDZ al final. Los dos dominios PEST y PDZ pueden regular la estabilidad y localización subcelular de PTEN, respectivamente (Lee et al., 2018).

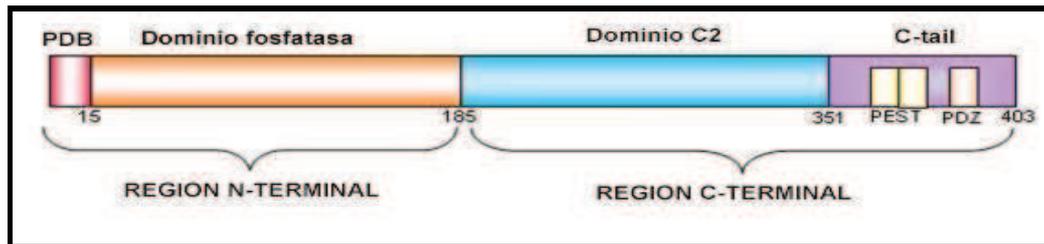


Figura 8. Esquema estructural de la proteína PTEN. Figura modificada de Molinari and Frattini (2014).

La expresión y la actividad de PTEN se puede modificar de diversas formas, que van desde las modificaciones postranscripcionales, mutaciones genéticas, regulación epigenética (acetilación de las histonas, metilación del promotor y microARNs). También hay varios sitios posibles de unión de factores de transcripción en el promotor de PTEN, que pueden regular su expresión (Stambolic et al., 1998; Virolle et al., 2001).

PTEN puede encontrarse SUMOilado lo que facilita su unión a la membrana. La acetilación de PTEN disminuye su capacidad para inhibir la actividad de PI3K/AKT. También puede ocurrir oxidación de PTEN que conduce a la formación de un enlace disulfuro dando como resultado una actividad reducida de PTEN. Las fosforilaciones de PTEN en general aumentan su estabilidad, pero reducen su actividad. PTEN debe dimerizar para cumplir con sus funciones y la enzima WWP1 (en inglés: *WW domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1*) está encargada específicamente de la poliubiquitinación de PTEN para suprimir su dimerización. Se ha descrito que la monoubiquitinación de proteínas lleva a su localización nuclear y estabilización en la forma monomérica, sin embargo, la poliubiquitinación lleva a la destrucción por proteosoma (Trotman et al., 2007).

La expresión disminuida o mutaciones del gen PTEN han sido observadas en diferentes tipos de cánceres incluso el endometrial. Debido a esto, PTEN es considerado un marcador de diagnóstico temprano para pre-cáncer de endometrio (Mutter et al., 2000). Los mecanismos centrales en la patogénesis de la hiperplasia atípica endometrial humana y cáncer de endometrio incluyen la activación de la vía de señalización de insulina/IGF-1, la activación de la señalización de PI3K/AKT/mTOR y la pérdida de expresión de PTEN (Daikoku et al., 2008). Estudios previos han demostrado que mujeres con síndrome de ovario poliquístico (SOP) tienen aproximadamente tres veces mayor riesgo de desarrollar cáncer endometrial en comparación con las mujeres sin SOP (Dumesic & Lobo, 2013); los mecanismos moleculares precisos que vinculan el SOP y cáncer endometrial no están completamente claros. Shafiee et al. (2016) demostraron que la expresión del gen PTEN aumentó en el endometrio de las mujeres con SOP y cáncer endometrial en comparación

con mujeres sanas. Por otro lado, se ha descrito que el miR-222-3p actúa como oncogén y regula la expresión de PTEN (Li et al., 2016). La sobreexpresión de miR-222-3p y la inactivación de PTEN en carcinoma de ovario humano podría aumentar la proliferación celular, mejorar la capacidad de invasión y promover la transición de la fase G1 a la S, como resultado de una hiperactivación de AKT, lo que promueve la proliferación celular e inhibe la apoptosis (Gong et al., 2018).

En el endometrio normal, PTEN estaría bajo control hormonal (Mutter et al., 2000). Guzeloglu-Kayisli et al. (2003) demostraron que E2 promueve la fosforilación de PTEN y que la P4 induce un aumento de la expresión proteica en células endometriales, estromales y epiteliales. El impacto de los andrógenos en la expresión de PTEN en el endometrio es poco conocido y es probable que sea dependiente del contexto celular, ya que la señalización dependiente del RA inhibe la expresión de PTEN en las células de cáncer de próstata, mientras que la estimulación de la señalización de RA aumenta la expresión de PTEN en las células de cáncer de mama (Wang et al., 2011). Choi et al. (2015) estudiaron el efecto de los andrógenos mediado por el RA sobre el cáncer de útero en ratones a los que se inactivó la expresión génica de PTEN (PTENKO heterocigotos). Este tipo de ratones se utiliza como modelo de inducción de cáncer de útero. Cuando se inactiva la expresión del RA y de PTEN en ratones hembras (PTENARKO) se observó que una reducción en la carcinogénesis uterina y, además, disminuyó la expresión estromal del RE- α y la sensibilidad a los Eg (Choi et al., 2015).

6. GESTACIÓN EN LA RATA

La gestación en la rata tiene una duración de 22-24 días en promedio (Lohmiller & Swing, 2006). El establecimiento y mantenimiento de la preñez en la rata involucra dos eventos endocrinos. El primero es relacionado con el apareamiento, en el que la estimulación cervico-vaginal y de los flancos del macho, desencadena un reflejo neuroendocrino que estimula la secreción bifásica (una diurna y otra nocturna) de prolactina hipofisaria. Este aumento de prolactina induce la expresión de receptores de LH en las células lúteas estimulando la síntesis y secreción de P4 necesaria para el mantenimiento de la preñez (Lohmiller & Swing, 2006). El segundo evento endocrino es necesario para mantener la preñez y depende del éxito del proceso de implantación, de la decidualización y del desarrollo normal del feto. Se sabe que el E2 y P4 desempeñan un rol fundamental en la implantación y la decidualización, en los primeros días de gestación en la rata y ratón (Thorpe et al., 2013; Wang et al., 2017). La preparación del útero en los roedores durante los primeros días de gestación, comienza con los niveles elevados de E2 provenientes de la secreción ovárica en el estadio pre-ovulatorio que estimulan la proliferación de las células

epiteliales luminales y glandulares (Huet-Hudson et al., 1989). Luego los niveles séricos de E2 disminuyen y los niveles de P4 proveniente de los cuerpos lúteos recientemente formados promueven la proliferación en el estroma subepitelial. Estos cambios están acompañados por una inducción de la expresión del RP en el estroma subepitelial (Curtis Hewitt et al., 2002; Kurita et al., 2000). Por otro lado, los andrógenos también tienen participación en la implantación en ratas y ratones (Diao et al., 2008; Zhang et al., 2021). Es probable que el aumento de los niveles de andrógenos durante la gestación sea importante para el establecimiento y mantenimiento del embarazo, e incluso en el inicio del parto. Por ejemplo, bajos nivel de andrógenos puede retrasar la implantación de embriones, mientras que el exceso de estas hormonas conduce a una expresión génica aberrante en sitios de implantación en ratón (Diao et al., 2008). En un modelo de implantación retardada se demostró que el tratamiento con una dosis baja de propionato de testosterona (PT) alargó el tiempo para la implantación y una dosis alta de PT resultó en una implantación exitosa, pero esto último fue acompañado por una expresión anormal de algunos genes deciduales (Diao et al., 2008).

Los estudios realizados en miometrio durante la gestación de ratas han demostrado que las células contráctiles especializadas del músculo liso miometriales (MSMC, en inglés: *myometrial smooth muscle cells*) experimentan cuatro cambios fenotípicos (Shynlova et al., 2009). Hay una etapa inicial proliferativa, seguida de una sintética y una etapa contráctil; finalmente la etapa del trabajo de parto. Al principio del embarazo, y después de la implantación, las MSMC proliferan rápidamente y el miometrio se vuelve hiperplásico. Se cree que la hiperplasia está mediada por la señalización hormonal de factores de crecimiento, como IGF-1 y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Después de la fase proliferativa, las MSMC presentan una fase sintética intermedia a partir del día **DG14** de roedores (Lye et al., 2001). El fenotipo sintético se caracteriza por el aumento de la síntesis de matriz extracelular e hipertrofia celular de las MSMC (Shynlova et al., 2009). En el **DG21** del roedor, los miocitos cambian a un fenotipo contráctil. La diferenciación en un fenotipo contráctil se atribuye en gran parte al estiramiento mecánico (Manabe et al., 1981). El miometrio desarrolla contracciones sincrónicas y expresa una serie de proteínas asociadas a la contracción, como la conexina 43, el receptor de oxitocina y el receptor de prostaglandina F (Erkinheimo et al., 2000; Makieva et al., 2014). Una vez expulsados los fetos, se incrementará el índice de apoptosis en estas células miometriales para retornar a un estado no gestante (Roh et al., 2000; Shynlova et al., 2009).

En ratas gestantes se describió que el RA está altamente expresado en MSCM durante la etapa proliferativa y declina progresivamente hacia el final de la gestación, lo que sugiere un

papel en el desarrollo miometrial en las primeras etapas de la gestación (Liu et al., 2013). También se demostró que la disminución de RA afecta la estabilidad del IGF-1R y, por lo tanto, regula las cascadas de señales en las que está involucrado el IGF-1 (incluido P13K/AKT, que es muy importante en las vías proliferativas) (Liu et al., 2013). En el miometrio porcino se ha observado una disminución significativa en la expresión del RA 3 semanas antes del parto (Słomczyńska et al., 2008).

Los andrógenos, además, tienen efecto en las últimas etapas de la gestación, específicamente al momento del parto. Ji et al. (2008) han examinado la participación de la RA en la maduración cervical por parte de los andrógenos. En ese estudio, utilizando flutamida (FLU) se inhibieron eventos asociados con la maduración del cérvix, induciendo una disminución en la organización de las fibrillas de colágeno, en la resistencia cervical y en la síntesis de proteoglicanos en ratas preñadas pretratadas con DHT en **DG16**. Aunque este estudio no examinó la expresión de RA en el cuello uterino, otras investigaciones llevadas a cabo en humano, rata y ratón han demostrado la expresión del RA en cérvix (Ji et al., 2008; Vladic-Stjernholm et al., 2009; Wilson & McPhaul, 1996). Además, los andrógenos regulan positivamente la expresión de RA en el cuello uterino humano y en rata (van der Kwast et al., 1994) demostrando efectos relajantes de la T, DHT, A4 y DHEA-S en el miometrio de ratas (Kubli-Garfias et al., 1980). Este efecto relajante ocurrió solo en concentraciones farmacológicas (mM) y es rápido, lo que sugiere un mecanismo de acción no genómico (Perusquía et al., 1990). Todos estos estudios destacan la importancia del rol de los andrógenos en las respuestas endometriales durante el embarazo dependiendo de las concentraciones en las que se encuentren.

7. CICLO ESTRAL Y CAMBIOS EN LA HISTOLOGÍA UTERINA DE RATAS ADULTAS

La senescencia reproductiva marca el final de la vida reproductiva de la hembra e involucra una serie de irregularidades del ciclo estral como consecuencia del avance de la edad en ratas y ratones. Las ratas no presentan un cese abrupto y permanente de la ciclicidad estral, sino que comienzan a manifestar cambios transitorios antes de entrar en anestro permanente (ausencia del estro) (**Figura 9**) que es la última etapa de la senescencia reproductiva (Lu et al., 1979; vom Saal, 1994). La edad en la que comienza este proceso varía según la cepa, sin embargo, las características de cada etapa se describen a continuación:

a) Período de ciclos irregulares; en este efecto la P4 juega un papel importante al influir en la duración del ciclo en roedores. En esta etapa es posible encontrar una proporción elevada de Eg/P4 (antes de la ovulación) en la mayoría de las ratas de mediana edad. El

déficit de P4 tiene una responsabilidad significativa por este aumento en la duración del ciclo (vom Saal, 1994) .

b) Estro persistente (también llamado cornificación vaginal persistente). Este estado, que puede durar varios meses, es el resultado de altos niveles de E2, manteniéndose a un nivel tónico (Lu et al., 1979; Nelson et al., 1981) produciendo una mayor altura del epitelio endometrial. La secreción tónica de Eg estimula la cornificación del epitelio vaginal, por lo que este estado también provoca una cornificación vaginal persistente.

c) **Anestro o diestro persistente** al final de la vida (vom Saal, 1994). En esta etapa, hay una caída permanente en los niveles de E2 (con características similares a las observadas en ratas ovariectomizadas) y las ratas no presentan ovulación (vom Saal, 1994). La morfología del tracto reproductivo se caracteriza por un epitelio vaginal bajo, algo mucificado y un epitelio endometrial inactivo. Hay niveles bajos de P4, lo que refleja la ausencia de cuerpos lúteos (Lu et al., 1979).

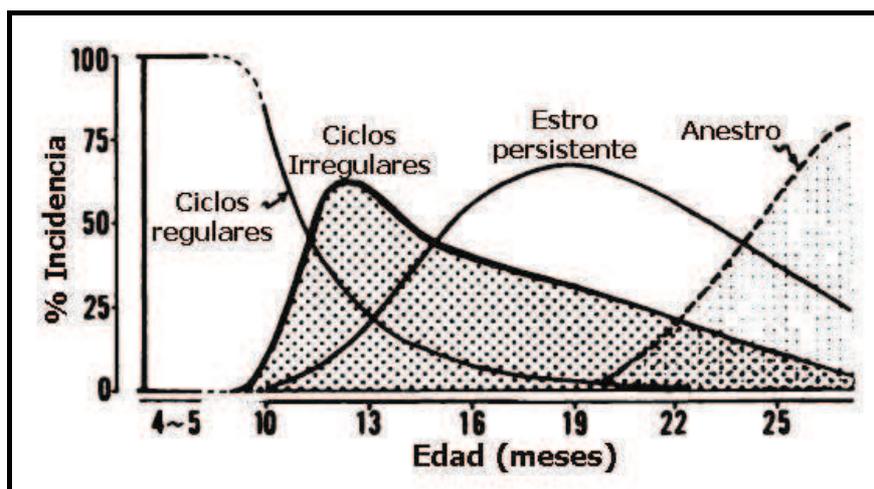


Figura 9. Cambios cronológicos en los patrones de periodicidad del ciclo estroal de ratas hembra entre 9 y 26 meses de edad. Figura modificada de Lu et al. (1979).

Histológicamente, el cambio más notable en el útero de ratas adultas de edad avanzada se relaciona con modificaciones estructurales del colágeno (Kong et al., 2012). Se ha confirmado un aumento de la fibrosis uterina con la edad de las ratas (Hsueh et al., 1979). Este proceso genera que la densidad de las fibrillas de colágeno aumente con la edad, especialmente en el endometrio, donde el grado de la celularidad se encuentra marcadamente disminuida y los haces de colágeno forman agregados grandes y compactos. También se ha reportado un aumento en el número de mastocitos en el útero, que se sabe que está asociado con procesos de fibrosis (Atkins & Clark, 1987) y un aumento en

depósitos de lipofuscina en el citoplasma de algunas células estromales, así como en el número de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos (Craig, 1981).

8. ALTERACIONES Y LESIONES UTERINAS LA RATA

Si bien existen cambios fisiológicos uterinos a lo largo del ciclo estral; como por ejemplo la presencia de lúmenes intraepiteliales (o vacuolas) en el epitelio uterino de ratas principalmente en el estro (Yuan & Foley, 2002); es importante mencionar que estas estructuras están ausentes en otros estadios del ciclo (principalmente en el proestro y diestro). Además, estas estructuras se han descrito en epitelio luminal de ratas hembras expuestas a andrógenos tales como nandrolona decanoato (Mobini Far et al., 2007) y DHEA (Demacopulo & Kreimann, 2019); observándose una marcación ácido periódico de Schiff (PAS) positiva en las estructuras internas del lumen (**Figura 10**).

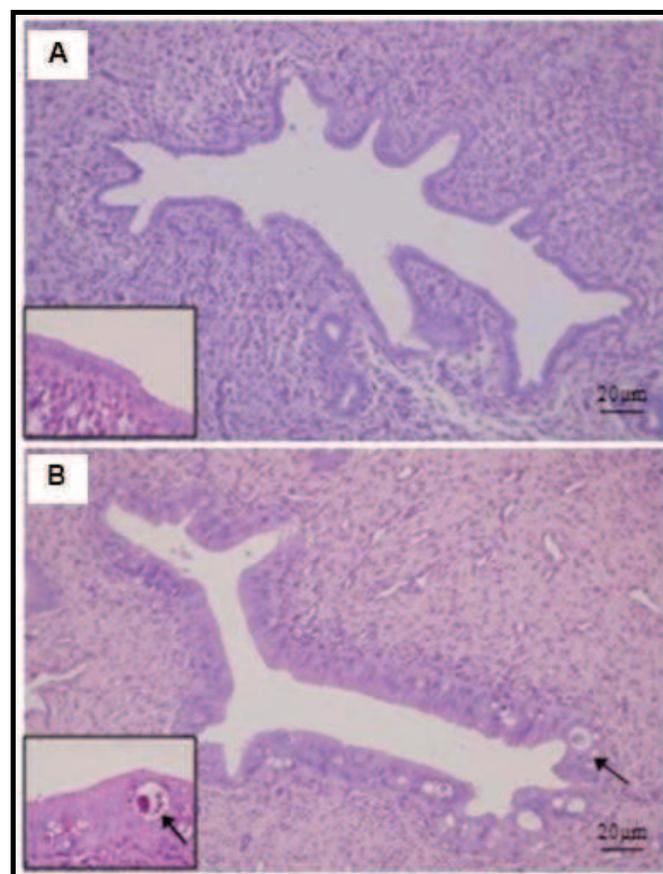


Figura 10. Alteraciones en el epitelio luminal uterino de ratas expuestas a DHEA. Fotomicrografías representativas de secciones uterinas teñidos con H-E (A) y PAS (B). Epitelio normal de una ratas hembra control en diestro (A). Epitelio luminal de una ratas hembra tratada con DHEA (B). En el ínsset se observa un lumen intraepitelial positivo para tinción de PAS. Barras de escala: 20 μm. Figura modificada de Demacopulo Demacopulo and Kreimann (2019).

Por otro lado, podemos observar alteraciones que podrían estar relacionados con procesos patológicos (preneoplásicos o neoplásico). Entre éstas alteraciones se ha descrito una

marcada estratificación con presencia de núcleos hipocrómicos y figuras mitóticas en el epitelio luminal (**Figura 11A**). Este tipo de alteraciones fue encontrado en ratas ovariectomizadas luego del tratamiento con E2 y expuestas a un herbicida a base de glifosato (Guerrero Schimpf et al., 2018).

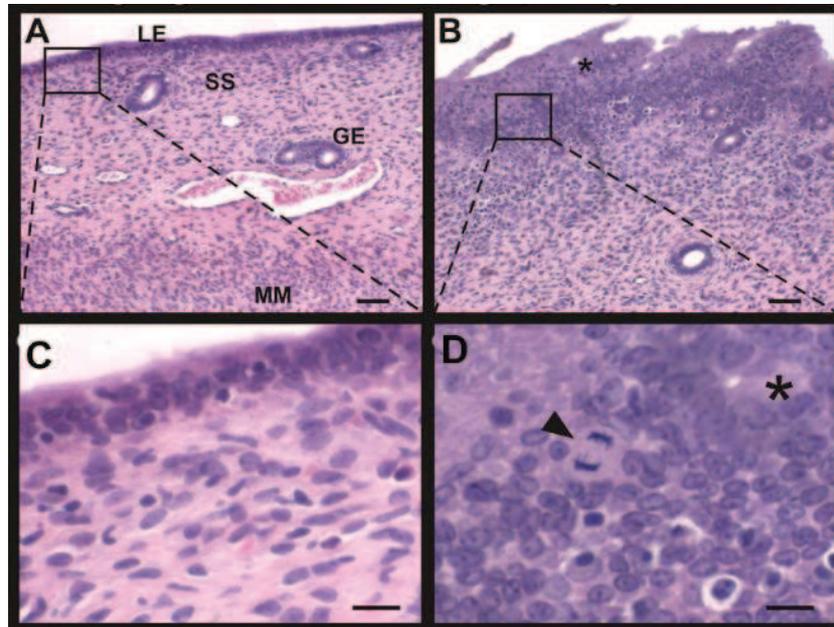


Figura 11: Fotomicrografías de secciones uterinas de rata donde se observa epitelio luminal estratificado (B y D) en comparación a histología uterina normal en ratas control ovariectomizadas luego del tratamiento con E2. (A y C) Se indican áreas de endometrio con marcada estratificación del epitelio luminal (asterisco), núcleos hipocrómicos (asterisco) y figuras mitóticas (puntas de flecha). Las áreas histológicas en los recuadros se magnifican en el panel inferior. **EL:** epitelio luminal; **EG:** epitelio glandular; **ES:** estroma subepitelial; **MM:** miometrio. Barras de escala: (A y B) 50 μ m; (C y D) 10 μ m. Figura modificada de Guerrero Schimpf et al. (2018).

Otra alteración que puede observarse en epitelio luminal es la clasificada como pólipo (**Figura12**). Los pólipos tienen mayor incidencia en el endometrio de ratas que han recibido agentes estrogénicos y aparecen como una protuberancia del tejido estromal dentro de la luz uterina (pólipo estromal). Incluso, pueden presentar estructuras glandulares a menudo hiperplásicas en la mayor parte del pólipo (pólipos glandulares) (Dixon et al., 2014).



Figura 12: Fotomicrografía representativa de sección uterina transversal teñida con H-E, en donde se observa la presencia de pólipo estromal en el epitelio luminal de rata. Figura modificada de Dixon et al. (2014).

Por otro lado, las glándulas uterinas normales se caracterizan por presentar un epitelio simple cúbico y diversas formas, como redondeada, ovalada o alargada (**Figura 13**, asterisco). Entre las alteraciones uterinas detectadas en el epitelio glandular uterino, podemos mencionar:

a) Glándulas con metaplasia, caracterizadas por poseer dos o más capas de células, constituyendo una estratificación del epitelio glandular (**Figura 13A**). La metaplasia a menudo se desarrolla en el útero de rata y ratón bajo el estímulo estrogénico o combinación oral de anticonceptivos (Dixon et al., 2014; Vigezzii, 2016).

b) Glándulas quísticas, usualmente de gran tamaño, amplia luz y epitelio simple plano (**Figura 13B**). La presencia de las glándulas quísticas puede conducir al desarrollo de hiperplasia endometrialquística. Esta lesión se caracteriza por la presencia de una agrupación de glándulas quísticas (tres o más glándulas), de aspecto tortuoso, con el lumen dilatado y con un epitelio cuboidal o columnar. Este tipo de lesión se ve a menudo en ratas adultas y es una lesión muy común en ratones de avanzada edad. El diámetro de las glándulas dilatadas a menudo varía de tamaño, desde pequeño a más de la mitad del tamaño de la luz uterina (Dixon et al., 2014; Vigezzii, 2016).

c) Glándulas con anomalías celulares. En este tipo de glándulas hay células pleomórficas con núcleos hipocrómicos. Las células epiteliales que recubren las glándulas afectadas a menudo muestran pérdida de polarización nuclear (bordes citoplasmáticos poco definidos y disposición atípica), cariomegalia (aumento desproporcionado del tamaño del núcleo sin agrandamiento del citoplasma), mitosis (**Figura 13 C y D**). Este tipo de lesión puede conducir al desarrollo de hiperplasia endometrial atípica cuando se encuentra presente tanto en epitelio luminal como glandular (Dixon et al., 2014).

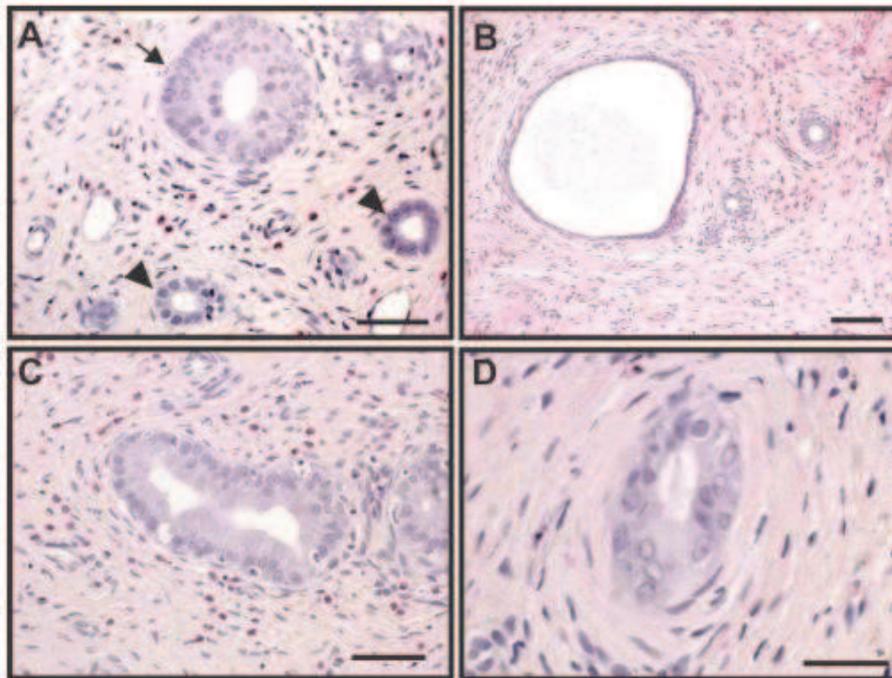


Figura 13. Fotomicrografías representativas de alteraciones encontradas en el epitelio glandular uterino de rata. (A-B) Las secciones uterinas fueron teñidas con H-E. Glándula normal (punta de flecha, A), Glándula con metaplasia (A) Glándula quística (B) Glándulas con anomalías celulares: Células cilíndricas (C), núcleos hipocrómicos, bordes citoplasmáticos poco definidos y disposición atípica de las células (D). Barras de escala: A, C y D: 50 μm ; B: 75 μm . Figura modificada de Vigezzii (2016).

d) Glándulas con glándulas hijas, caracterizadas por exhibir varias formas (redondas, alargadas, tortuosas, estrelladas) y tamaños, y presentar glándulas dentro del epitelio de la glándula madre, o bien en la superficie externa de la glándula madre (como glándulas en ciernes) (**Figura 15A**).

e) Glándulas formando conglomerados que, según se ha reportado (Gunin et al., 2001) pueden representar un estadio más avanzado de las glándulas con glándulas hijas (GGH) (**Figura 15A**), al proliferar y separarse de la glándula madre, quedando agrupadas con muy poco estroma entre ellas (**Figura 15B**). Este tipo de alteraciones glandulares fueron descritas en el útero de ratas adultas de edad avanzada en presencia de estrógenos (Eg) exógenos o endógenos (Vigezzii, 2016).

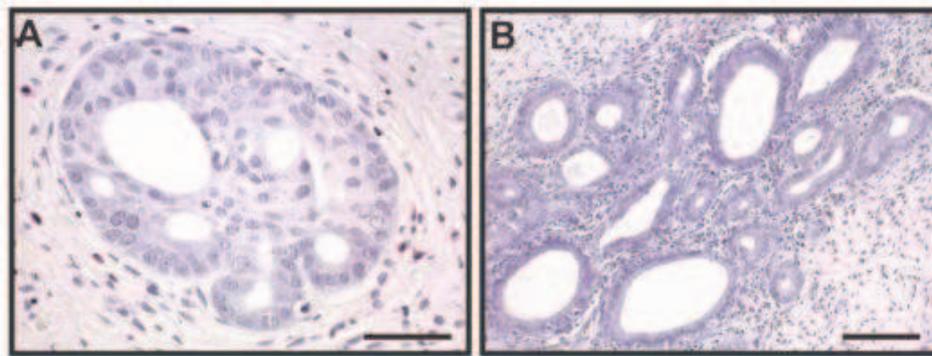


Figura 15: Fotomicrografías que muestran alteraciones glandulares en ratas tratadas con implante de E2. Se observan glándulas con glándulas hijas (A) y glándulas formando conglomerados (B). Barras: (A) 50 μm y (B) 75 μm . Figura modificada de Vigezzii (2016)

f) La hiperplasia endometrial quística es una patología uterina que se caracteriza por un incremento en la relación estroma-glándula en comparación con el endometrio proliferativo normal. La importancia clínica de esta lesión es el riesgo asociado de progresión hacia cáncer de endometrio y formas "atípicas" de hiperplasia endometrial que se consideran lesiones premalignas (Dixon et al., 2014; Sanderson et al., 2017).

Las glándulas quísticas pueden conducir al desarrollo de hiperplasia endometrial quística (**Figura 16A y B**). Esta lesión está caracterizada por la presencia de una agrupación de glándulas quísticas, de aspecto tortuoso, y glándulas que poseen el lumen dilatado. El estroma que rodea este tipo de lesión es a menudo menor que el del endometrio circundante.

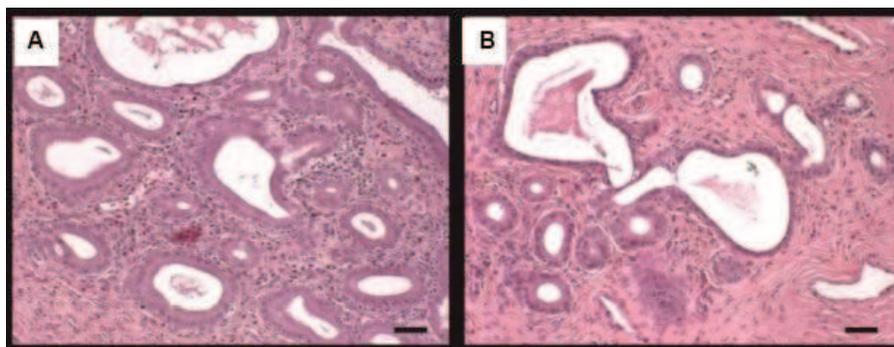


Figura 16: Fotomicrografías que muestran hiperplasia glandular quística encontrada en útero de rata. Barra de escala: 50 μm . Figura modificada de Guerrero Schimpf et al. (2018).

9. SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO

9.1 Etiología, diagnóstico y tratamiento

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es una endocrinopatía que afecta a mujeres en edad reproductiva y tiene una prevalencia de un 8-13% (Hoeger et al., 2021), dependiendo la población de estudio y el criterio de diagnóstico aplicado. Esta patología comprende un conjunto heterogéneo de signos y síntomas como: oligo/anovulación, quistes ováricos detectables por evidencia ecográfica, hiperandrogenismo, hirsutismo, insulinoresistencia, entre otras manifestaciones. La etiología de la enfermedad, si bien se estudió bastante no está completamente dilucidada. Se considera al SOP, un síndrome de origen multifactorial en el que pueden estar implicados factores genéticos, endócrinos, metabólicos y medioambientales, tales como la obesidad y los perturbadores endócrinos (Anagnostis et al., 2018).

Debido a estas consideraciones se necesitaba establecer un criterio de diagnóstico del SOP y por eso en 1990 el "Instituto Nacional de la Salud" (NIH) estableció la triada clínica para diagnóstico: poliquistosis en ovarios, hiperandrogenismo y oligo/amenorrea. Este criterio sentó las bases para que en el año 2003 el "Consenso de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) y la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) en Rotterdam" establezcan como criterio de diagnóstico el conceso de Rotterdam 2003 (ESHRE /ASRM) ("Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS)," 2004). Este consenso definió que deben cumplirse al menos dos de tres criterios para el diagnóstico de SOP: hiperandrogenismo clínico o bioquímico, oligo/anovulación y/o morfología ovárica poliquística excluyendo previamente otras patologías, como ser hiperplasia suprarrenal congénita, tumores secretores de andrógenos, hiperprolactinemia, entre otras. Posteriormente, en el año 2006, la "Sociedad de Exceso de Andrógenos y Síndrome de Ovario Poliquístico" (AES) estableció que el diagnóstico de SOP debería basarse predominantemente en el hiperandrogenismo como requisito obligatorio, junto con un marcador de disfunción ovulatoria (disfunción ovárica u ovarios ecográficamente de aspecto poliquísticos). Sin embargo, los criterios de AES no fueron universalmente adoptados y la existencia de más de un consenso ocasionó problemas en el diagnóstico. En 2012, el NIH reevaluó los criterios existentes y como resultado, se recomendó la utilización del criterio de Rotterdam y realizó una descripción más detallada de las características, especificando la existencia de distintos fenotipos de SOP (National Institutes of Health, 2012) los cuales se detallan a continuación:

- **Fenotipo A:** Hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico + Disfunción ovulatoria + Ovarios poliquísticos
- **Fenotipo B:** Hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico + Disfunción ovulatoria
- **Fenotipo C:** Hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico + Ovarios poliquísticos
- **Fenotipo D:** Disfunción ovulatoria + Ovarios poliquísticos

El SOP puede provocar problemas como obesidad, resistencia de la insulina, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, subfertilidad/infertilidad e hiperplasia y cáncer endometrial (Anagnostis et al., 2018). También hay evidencia que estas alteraciones inducen un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis y presión arterial alta como así también ansiedad y depresión (Zehravi et al., 2021). Actualmente se ha relacionado a la enfermedad con una mayor predisposición al SARS-CoV-2 y se considera que SOP es un factor de riesgo para contraer las formas más severa de COVID-19 (Kyrou et al., 2020).

Con respecto a los tratamientos disponibles, la terapia está orientada a las características clínicas y al deseo reproductivo de cada paciente. La pérdida de peso en aquellas mujeres con sobrepeso u obesidad puede restaurar los ciclos menstruales, disminuir el riesgo metabólico y representa la primera línea de tratamiento. Los anticonceptivos orales son el tratamiento farmacológico de elección ya que atenúan las manifestaciones del hiperandrogenismo y aquellos que contienen progesterona (o algún análogo) ofrecen protección endometrial. En las pacientes con oligoanovulación que buscan embarazo, el citrato de clomifeno es el tratamiento aconsejado en primera instancia. La metformina, así como otros sensibilizadores a la insulina, podría usarse en aquellas con intolerancia a la glucosa o diabetes 2 y también como segunda línea de tratamiento para restaurar los ciclos e inducir la ovulación (Hoeger et al., 2021).

9.2 El SOP y su relación con fertilidad y patologías endometriales

En mujeres con SOP, el metabolismo y la función endometrial están alterados y este estado se agrava por la hiperinsulinemia y la obesidad. Estas modificaciones aumentan el riesgo de fallas reproductivas como complicaciones del embarazo y aborto espontáneo. Si bien la oligo/anovulación es una causa obvia de infertilidad en el SOP, se han descrito en mujeres en las que se ha restaurado la ovulación, complicaciones obstétricas que incluyen hipertensión inducida por el embarazo, diabetes mellitus gestacional y macrosomía (Yu et al., 2016), problemas relacionados con el desarrollo endometrial alterado y en el proceso de receptividad (Jiang & Li, 2021). Se ha sugerido que esto se produce debido al deterioro en la vía de señalización de insulina/glucosa y a la sobreexpresión del RA en el endometrio,

desregulando la vía de señalización celular necesaria para implantación (Lopes et al., 2011). Los tratamientos de infertilidad con agentes inductores de la ovulación como el citrato de clomifeno o mioinositol, no aseguran alta tasa de embarazos (Kamenov et al., 2015), indicando que la restauración de la ovulación no asegura un embarazo exitoso y que deben tenerse en cuenta las alteraciones que se producen en el útero.

En mujeres con SOP, las respuestas de las células uterinas a los estímulos que promueven proliferación y diferenciación están alteradas, incrementando el riesgo de desarrollar hiperplasia endometrial y adenocarcinoma (Hoeger et al., 2021). La hiperplasia endometrial es una lesión preneoplásica del endometrio que puede ser inducida por altos y/o constantes niveles de estrógenos (Giudice, 2006). Múltiples mecanismos pueden ser responsables del aumento del riesgo de este tipo de lesión. Entre ellos, el crecimiento y la diferenciación endometrial están influenciados por los andrógenos, la insulina y por una exposición crónica a Eg sin oposición a los efectos de la P4, debido a que la concentración sérica de esta última hormona es subóptima (Charalampakis et al., 2016).

En la **Figura 17** se pueden observar los cambios que se producen en el endometrio de una mujer que tiene ciclos ovulatorios normales comparado con el endometrio de una mujer con SOP. En la **Figura 17A** se observa que luego de la fase proliferativa endometrial (una vez producida la ovulación); el cuerpo lúteo comienza a producir P4, generando un incremento en los niveles de esta hormona. Como consecuencia, el endometrio pasa a la fase secretora. En contraste, en una mujer anovulatoria con SOP (**Figura 17B**), el endometrio se encuentra en una fase proliferativa constante debido a la exposición crónica a Eg. Al no ocurrir la ovulación, los niveles de P4 son muy bajos. Se observa una alta proliferación de células uterinas que pueden conducir al carcinoma endometrial en determinadas condiciones, constituyendo el SOP un factor de riesgo para el desarrollo de esta patología (Hoeger et al., 2021).

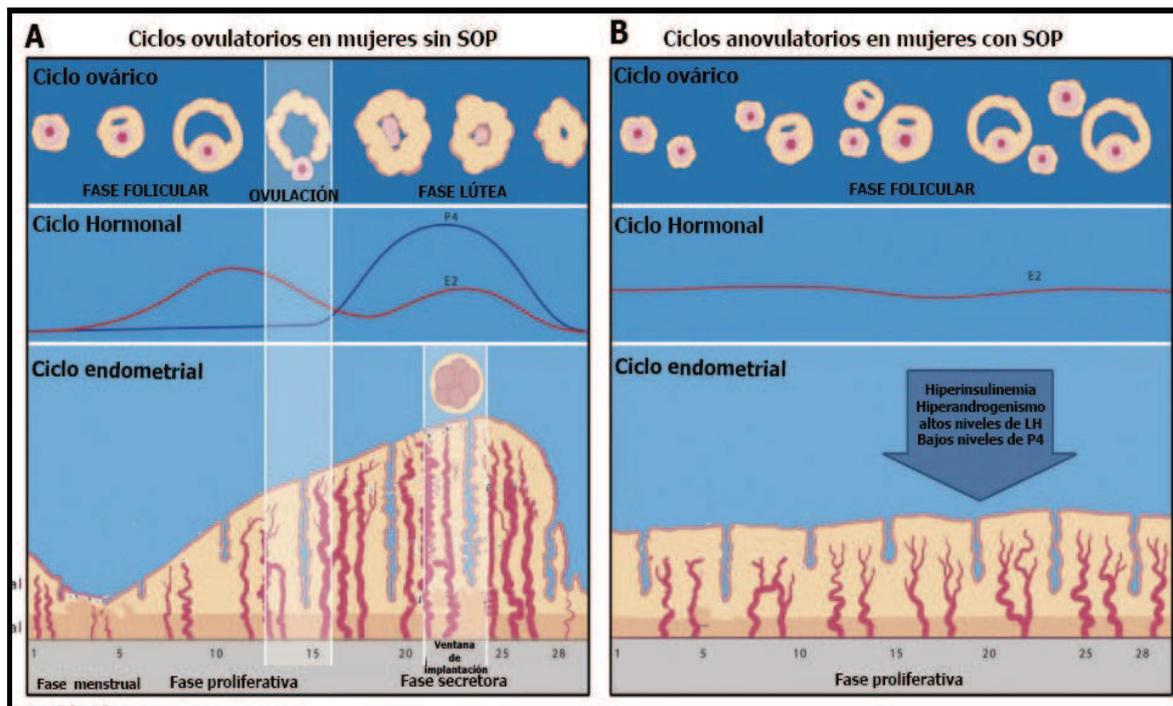


Figura 17. Esquema comparativo de los cambios que se producen en el endometrio de una mujer que tiene ciclos ovulatorios normales y en una mujer anovulatoria con SOP. Figura modificada de Piltonen (2016).

Como se mencionó previamente, la obesidad es una característica bastante común en las mujeres con SOP y se ha informado que entre el 50-70 % de las mujeres con SOP presentan resistencia a la insulina e hiperinsulinemia (Moggetti, 2016). La hiperinsulinemia disminuye la producción hepática de la globulina fijadora de hormonas sexuales aumentando la proporción de T libre (biológicamente activa), también aumenta la síntesis de andrógenos en las células de la teca del ovario (Dinicola et al., 2021). El exceso de andrógenos puede ser aromatizado en tejidos periféricos, como el tejido adiposo, provocando un aumento del nivel de los Eg circulantes (Ostinelli et al., 2022). Sumado a esto, ensayos con endometrios obtenidos durante la fase secretora de mujeres control y con SOP revelaron una mayor expresión del ARNm de 17 β -HSD tipo 1 (reduce la E1 a E2) y menor actividad de sulfotransferasa (genera sulfato de estrógeno) en el endometrio de mujeres con SOP en comparación con las mujeres normales. Se ha reportado que la expresión de la enzima P450arom fue indetectable en endometrio de mujeres normales y con SOP (Leon et al., 2008). En contraste, (Zhao et al., 2014) demostraron que el nivel de ARNm de P450arom aumenta en el endometrio de pacientes con SOP. En el endometrio de mujeres con SOP se observa una mayor expresión de co-activadores de receptores esteroideos lo que sugiere un aumento de sensibilidad a la acción de esteroideos en ese tejido (Shang et al., 2012). Es posible que el tejido endometrial en las mujeres con SOP se encuentra constantemente bajo los efectos estimulantes y mitogénicos de tipo estrogénicos,

ya sea por su mayor biodisponibilidad y/o sensibilidad del tejido a las hormonas esteroides que contribuyen a la desregulación de la homeostasis tisular, lo que conduciría a un crecimiento tisular excesivo, patrones de sangrado impredecibles e hiperplasia endometrial que puede progresar hacia cáncer de endometrio.

En función de todo lo descrito anteriormente sobre los efectos del SOP surge la necesidad de estudiar con mayor profundidad las complicaciones que produce este síndrome. Si bien hay diversos estudios recientes, la relación entre SOP con la función endometrial alterada no se comprende completamente. Esto último puede deberse, entre otras causas, a las limitaciones de los estudios clínicos con seres humanos. Por ello, en este trabajo de tesis doctoral se ha desarrollado un modelo animal de SOP que nos ha permitido profundizar la investigación de las alteraciones a nivel del útero y sus consecuencias en la fertilidad de la hembra.

II. OBJETIVOS

En base a los antecedentes citados, nuestra hipótesis de trabajo postula que el hiperandrogenismo asociado al SOP, inducido en etapas tempranas de la vida, modifica el desarrollo histofuncional del útero alterando la fertilidad y predisponiendo a un mayor riesgo de desarrollar patologías uterinas en la vida adulta. En función de esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

En el presente trabajo de tesis nos planteamos investigar los efectos del SOP sobre el útero de ratas en diferentes momentos: hembras peripuberales (**DPN41**) y en hembras adultas (**3 meses y 18-24 meses**), utilizando un modelo de rata expuestas experimentalmente a dehidroepiandrosterona (DHEA) durante el periodo prepuberal. Este modelo ha sido empleado para estudiar el desarrollo y los efectos del SOP en roedores (Elia et al., 2009; Maliqueo et al., 2014). A continuación, se describen los objetivos específicos de nuestro trabajo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto del SOP sobre el desarrollo histo-funcional del útero de ratas en DPN41

Para este fin se estudió:

- El estado endocrino para validar el modelo de SOP mediante la determinación sérica de los niveles hormonales de E2, P4 y T.
- La histomorfología ovárica para validar el modelo de SOP y verificar la presencia de quistes.
- La histomorfología del útero, determinando la altura del epitelio luminal, el espesor de estroma subepitelial y muscular, la densidad de glándulas endometriales, la densidad de núcleos en estroma subepitelial y miometrio y la presencia de anomalías en epitelio glandular y luminal.
- La dinámica celular (proliferación y apoptosis) en los distintos compartimentos uterinos (epitelio luminal y glandular, estroma subepitelial y muscular).
- Las vías de acción de hormonas esteroides, evaluando en el útero la presencia de receptores RE- α , RP y RA.
- La expresión de genes por RT-PCR reguladores de la esteroidogénesis: proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR), 3 α -hidroxisteroide deshidrogenasa (HSD) (3 α -HSD), 3 β -HSD isoformas 1,2,3,5 y 7 (3 β -HSD1,2,3 y 5 y 3 β -HSD7), 5 α -reductasa tipo 1 y 2 (5 α -R1 y 5 α -R 2), P450arom (aromatasa), P450d4, P45017a, 17 β -HSD isoformas 1, 2, 3 y 4 (17 β -HSD1, 17 β -HSD2, 17 β -HSD3 y 17 β -HSD4), y sulfatasa de esteroides (STS) y la expresión de P450arom por IHQ

- La vía de acción de factor de crecimiento similar a la insulina; estudiando la expresión por RT-PCR de IGF-1 y de su receptor (IGF-1R)
- La expresión del gen supresor tumoral por IHQ de PTEN.
- La expresión por RT-PCR e IHQ de genes relacionados con el desarrollo del tracto reproductor femenino: HOXA10, WNT5a y 7a y β -catenina.
- Modificaciones en la matriz extracelular evaluando la organización de las fibras de colágeno, la expresión por RT-PCR e IHQ de AQPs y la determinación del contenido de agua uterino.
- Marcadores de diferenciación estromal como presencia de vimentina y α -SMA por inmunohistoquímica.

2. Evaluar los efectos del SOP sobre la fertilidad de la hembra y patologías uterinas.

- En ratas hembras adultas jóvenes (3 meses de edad) se evaluaron parámetros relacionados con la fertilidad (por ejemplo: número de cuerpos lúteos, sitios de implantación y de reabsorción) en día gestacional 18 (**DG18**).
- En ratas hembras de 18-24 meses se evaluó el estado endocrino a nivel sistémico mediante la determinación de E2, P4, T y la presencia de anomalías uterinas, lesiones pre-neoplásicas y/o cáncer uterino.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Los protocolos experimentales se diseñaron de acuerdo a la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos y aprobado por el comité de ética de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina). Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar pertenecientes al bioterio del ISAL, (UNL-CONICET), de la FBCB. Los animales fueron mantenidos durante todo el experimento bajo condiciones reguladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), con fotoperíodo de 14 h de luz (desde las 05.00 h hasta las 19.00 h) y 10 h de oscuridad. Las ratas fueron alojadas en jaulas de acero inoxidable con “cama” de viruta de madera de pino. Los animales tuvieron libre acceso al agua en botellas de vidrio con tapones de goma y al alimento balanceado en forma de pellets (Nutrición Animal, Rafaela, Argentina).

1.1 Diseño experimental

Se utilizó un modelo de rata expuestas experimentalmente a DHEA para inducir el SOP. Este modelo ha sido ampliamente empleado para estudiar el desarrollo y efectos del SOP en roedores (Giudice, 2006; Lee et al., 2016; Maliqueo et al., 2014).

Para generar nuestro modelo de SOP se utilizaron ratas hembras que fueron tratadas por vía subcutánea (sc) con DHEA (60 mg/kg pc/día (grupo **SOP**) desde el **DPN21** y durante 20 días consecutivos. El grupo **CONTROL** fueron animales tratados con aceite de sésamo vía sc. También se generó otro grupo experimental con inyecciones sc con DHEA (60 mg/kg pc /día) + flutamida (20 mg/ kg pc /día, grupo **SOP+FLU**) (Rudmann et al., 2005). La flutamida es un antagonista del RA, por lo tanto, éste último grupo experimental se incorporó con el objetivo de evaluar cuáles de los efectos uterinos generados por el SOP son inducidos a través del RA.

Luego del tratamiento, los animales fueron asignados a tres experimentos distintos (**Figura 18**):

- A.** Un grupo se sacrificó a las 24 h posteriores a la última inyección (**DPN41**). Estos son los grupos **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU**.
- B.** Un segundo grupo de animales se dejó crecer hasta adultos jóvenes (alrededor de 3 meses). A partir del **DPN90**, cada rata hembra fue alojada con un macho de fertilidad comprobada y una vez comprobada la preñez por presencia de esperma en el extendido vaginal (**DG1**); las hembras fueron estudiadas en **DG18**. A estos animales se les asignó el nombre de ratas **CONTROL-DG18** y **SOP-DG18**.
- C.** Un tercer grupo se dejó crecer hasta los 18-24 meses de edad (ratas adultas mayores, AM); siendo sacrificadas en diestro vaginal determinada por citología

vaginal. A estos animales se les asignó el nombre de ratas **CONTROL-AM** y **SOP-AM**.

A partir del destete (**DPN21**) y durante el resto del experimento, los animales fueron mantenidos con agua y comida *ad libitum*.

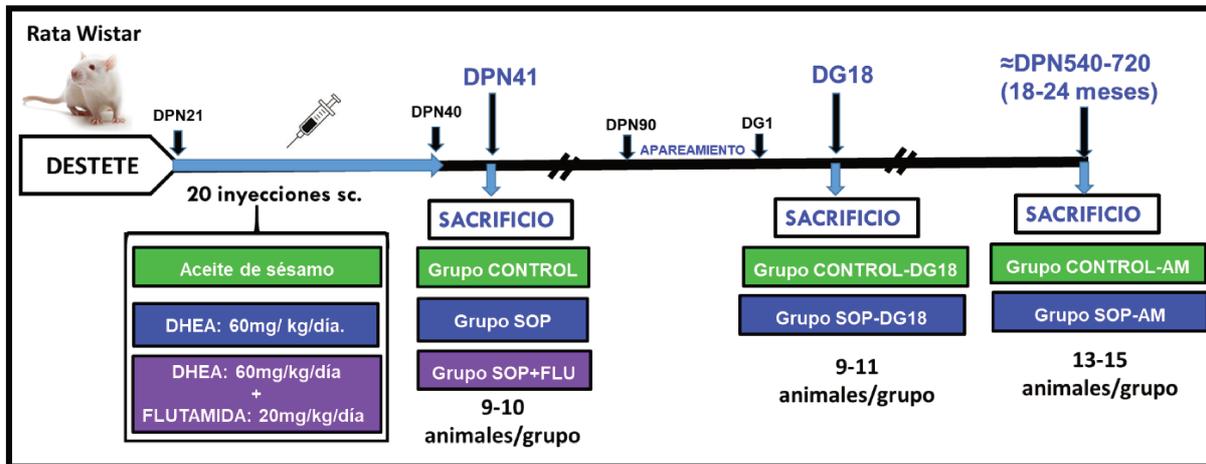


Figura 18. Diseño experimental utilizado para investigar los efectos del SOP en distintos momentos. La línea de tiempo indica los días postnatales (DPN). Inyecciones sc: inyecciones subcutáneas. **DPN:** día postnatal. **DHEA:** dehidroepiandrosterona; **DG:** día gestacional; **AM:** adulto mayor; **FLU:** flutamida.

La elección de las dosis de DHEA y de flutamida seleccionadas, como así también, las vías de administración fueron tomadas de la bibliografía (Jang et al., 2014; Kim et al., 2018; Roy et al., 1962), al igual que la dosis de flutamida (Rudmann et al., 2005).

EFFECTOS DEL SOP SOBRE LA DIFERENCIACIÓN Y EL DESARROLLO HISTOFUNCIONAL DEL ÚTERO DE RATAS DE DPN41

2.1 Procedimiento

El tratamiento experimental de los animales se especificó en la sección anterior (**Sección 1.1 de Materiales y métodos**). Los animales fueron sacrificados en el día **DPN41** y dos horas antes de la autopsia, cada rata fue inyectada intraperitonealmente (ip) con bromodeoxiuridina (BrdU; 60 mg/kg pc; Sigma-Aldrich), un análogo de timidina, para evaluar la proliferación celular. El sacrificio de los animales **CONTROL** se realizó en la etapa de diestro, debido a que los animales tratados con DHEA y DHEA+FLU no ciclaron y presentaron un extendido vaginal con abundantes leucocitos. En la **Figura 19** se muestra un esquema del diseño experimental utilizado y las muestras obtenidas. Al momento del sacrificio, se obtuvieron muestras de sangre periférica para la obtención de suero y se diseccionaron los ovarios y cuernos uterinos.

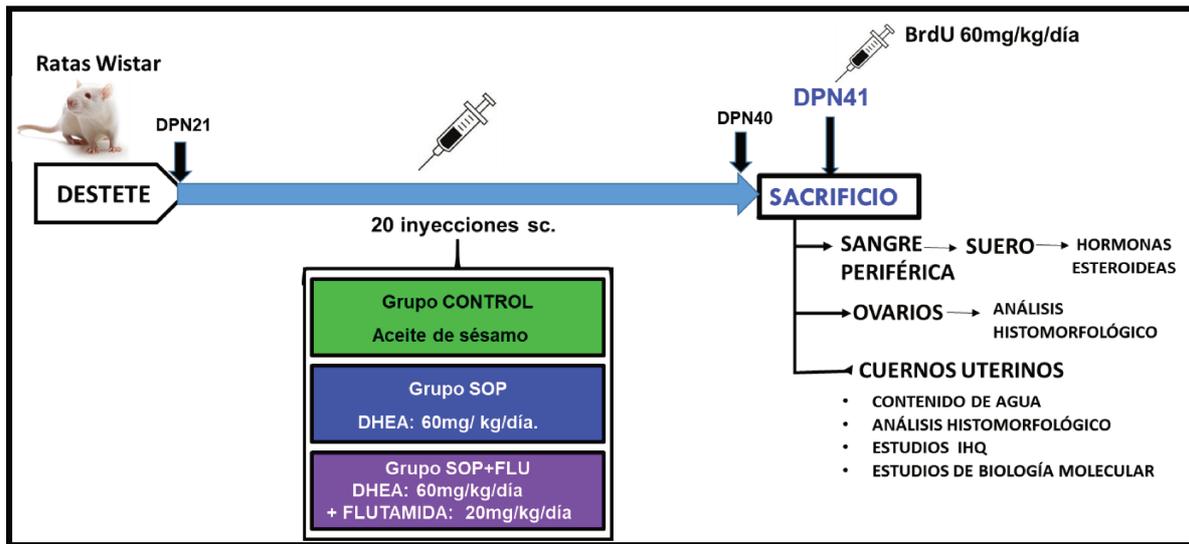


Figura 19. Diseño experimental utilizado para estudiar los efectos del SOP sobre el desarrollo histofuncional del útero de ratas peripuberales (DPN41). sc: subcutánea. DPN: día postnatal. BrdU: bromodeoxiuridina. IHQ: inmunohistoquímica.

2.2 Disección de los cuernos uterinos y ovarios

Para obtener las muestras de útero y ovario, los animales fueron anestesiados en cámara de CO₂, y luego sacrificados por decapitación. Posteriormente, los animales fueron colocados sobre una tabla de disección sujetándolos de sus extremidades, con el abdomen hacia arriba, y se desinfectó el campo quirúrgico con alcohol al 70%. Se procedió a levantar la piel con pinza de punta “diente de ratón” a unos 1.5 cm del orificio vaginal y con la tijera de punta roma se practicó una incisión en un ángulo de 45° hacia los laterales, hasta la altura de las últimas costillas, quedando expuestos los músculos abdominales. Con pinza anatómica de punta roma y tijera de punta fina se practicó la misma maniobra quirúrgica sobre los músculos abdominales, quedando expuesta la cavidad abdominal. Con pinza anatómica de punta roma se separaron las asas intestinales y la grasa mesentérica hacia un lado, visualizando el tracto genital. Finalmente, con tijera de punta fina se realizó la disección de los ovarios y ambos cuernos uterinos.

A continuación, en la **Figura 20** se detalla de manera esquemática los órganos diseccionados y el destino que se otorgó a cada una de las muestras obtenidas. Los ovarios se procesaron para estudios histomorfológicos. Una porción del cuerno 1 se destinó para estudios por microscopía óptica y la otra porción se utilizó para estudios por técnicas de biología molecular. El cuerno 2 se utilizó para la determinación del contenido de agua uterino. La elección del cuerno uterino 1 y 2 fue aleatoria al momento de realizar el sacrificio de los animales.

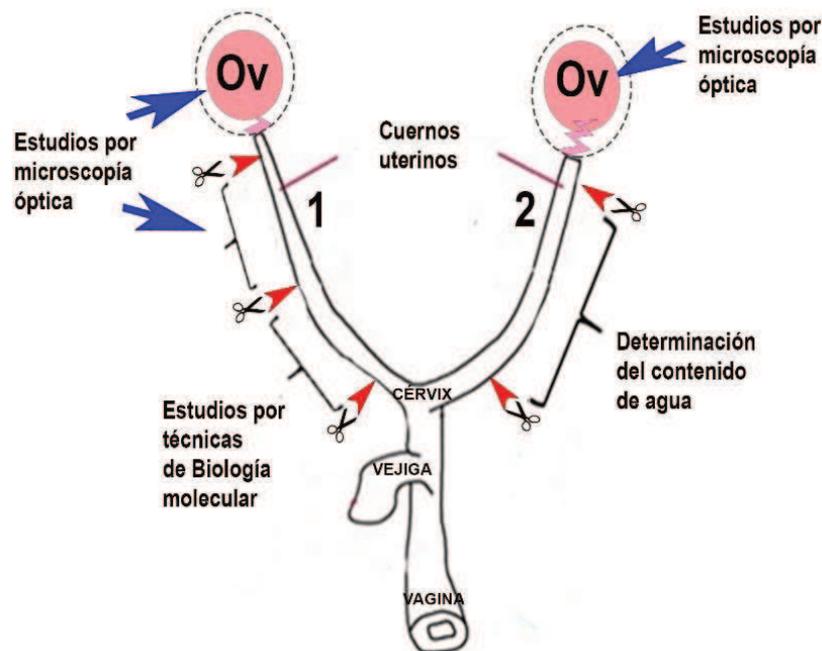


Figura 20. Esquema de las muestras obtenidas y procesadas en ratas de **DPN41**. OV: ovario envuelto en la bursa ovárica

Las muestras obtenidas fueron procesadas de acuerdo al tipo de estudio a realizar, como se detalla a continuación.

2.3 Procesamiento de las muestras

La sangre fue recolectada en tubos de vidrio de centrífuga e incubada en estufa a 37 °C por 15 min para facilitar la formación del coágulo. Posteriormente, los tubos se centrifugaron y se separó el suero, el cual fue conservado a -20 °C hasta el momento de su utilización. A partir de las muestras de suero se determinaron los niveles séricos de E2, P4 y T por ensayos de quimioluminiscencia, utilizando un Immulite®2000 sistema de diagnóstico *in vitro* (Siemens Healthcare SA, Argentina), siguiendo las especificaciones del fabricante.

Las muestras de tejidos fueron procesadas de diferentes maneras de acuerdo a los siguientes propósitos:

i) Estudios por microscopía óptica

Una porción del cuerno uterino 1 y los dos ovarios diseccionados fueron fijados durante 6 h en formol bufferado (pH 7,5) al 10% v/v en buffer fosfato salino (PBS) con el objetivo de conservar las estructuras histológicas del tejido. Luego se realizaron dos lavados con PBS de 10 min cada uno y posteriormente, las muestras se conservaron en una solución de alcohol al 70% hasta su procesado por técnicas histológicas de rutina para incluirlos en parafina y obtener un bloque de parafina denominado “taco” con el tejido en su interior (Junqueira & Junqueira, 1983). Para realizar el procesado histológico, las muestras fueron

Materiales y métodos

deshidratadas en alcoholes de graduación creciente, y luego se hicieron pasajes por Bioclear (solvente con característica no polar y miscible en parafina fundida). Para realizar la inclusión en parafina, se colocó la muestra dentro de un frasco que contenía parafina fundida en estufa a 60°C. El calor provoca la evaporación de los restos del solvente (Bioclear) y de esta forma, los espacios ocupados por éste son impregnados por la parafina. Por último, la muestra impregnada en parafina se colocó sobre un soporte, se cubrió con parafina líquida y se dejó solidificar para obtener el taco.

ii) Determinación del contenido de agua uterino

El contenido de agua uterino fue calculado como la diferencia entre el peso húmedo y seco (por cm de órgano) y expresado en porcentaje (%). Para ello, se midió la longitud del cuerno uterino 2 diseccionado al momento de la cirugía y luego se pesó (peso húmedo). Seguidamente, el mismo se colocó en estufa a 70 °C durante un mínimo de 24 h y hasta obtener una pesada constante (peso seco) siguiendo el protocolo descrito por Ashby et al. (1997).

iii) Estudios por técnicas de biología molecular

La otra porción del cuerno uterino 1 fue diseccionada, congelada rápidamente en N₂ líquido y conservados a -80 °C hasta su posterior utilización en ensayos de RT-PCR en tiempo real.

2.4 Evaluación de las características histomorfológicas del útero y ovario

2.4.1 Evaluación de la histología ovárica y la presencia de lesiones uterinas

Utilizando un micrótopo, los ovarios fueron seccionados completamente en cortes histológicos para determinar la presencia de estructuras quísticas. La histología del ovario fue analizada en diferentes cortes histológicos, espaciados 50 µm entre ellos, los que fueron coloreados con H-E según el protocolo descrito en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Protocolo para la tinción con H-E.

Desparafinación e hidratación	Tiempo
Bioclear 1, 2 y 3	5 min c/u
Alcohol 100º, 96º y 70º	1 min c/u
Agua	2 min
Tinción	
Hematoxilina de Mayer	4 min
Agua de canilla	2 min
Agua amoniaca	30 seg
Agua de canilla	2 min
Eosina	2 min
Deshidratación y montaje	
Alcohol 70º, 96º	1 pasaje rápido
Alcohol 100º	30 seg
Bioclear 1 y 2	5 min c/u

Montaje con medio de montaje permanente (Eukitt)

Por otro lado, las muestras de útero embebidas en parafina fueron seccionadas longitudinalmente en cortes de 5 µm de espesor y fueron coloreadas con H-E (**Tabla 2**) y PAS de acuerdo con el protocolo descrito en la **Tabla 3**. Posteriormente, se realizó un exhaustivo análisis histológico y se identificaron por microscopía óptica (Olympus BH2, Tokio, Japón) las distintas alteraciones presentes en el epitelio luminal y glándulas. Las glándulas uterinas se clasificaron como se describe en Vigezzi et al. (2015). La incidencia de esas alteraciones se cuantificó determinando el porcentaje de animales que presentaban al menos una alteración histológica.

Tabla 3. Protocolo general utilizado para la técnica de tinción de PAS.

Desparafinación e hidratación	Tiempo
Bioclear 1, 2 y 3	5 min c/u
Alcohol 100º, 96º y 70º	1 min c/u
Agua de canilla (corriente)	2 min
Tinción	
Ácido peryódico	8 min
Agua de canilla (corriente)	5 min
Agua destilada	1 pasaje
Hematoxilina de Harris (filtrada)	6 min
Reactivo de Shiff (trabajar en oscuridad)	10 min
Agua de canilla	7 min
Hematoxilina de Mayer	1 min
Agua de canilla	5 pasajes
Agua amoniacal	10-15 seg
Agua de canilla	2 min
Deshidratación y montaje	
Alcohol 70º, 96º y 100º	1 min c/u
Bioclear 1 y 2	5 min c/u
Montaje con medio de montaje permanente (Eukitt)	

2.4.2 Evaluación de la altura del epitelio luminal, espesor del estroma subepitelial y muscular uterino

En cortes histológicos seccionados longitudinalmente se midió el espesor del estroma subepitelial y muscular, en 3 profundidades, utilizando la detección IHQ de vimentina y α -SMA. La vimentina permitió identificar la extensión del estroma subepitelial y la α -SMA se utilizó para demostrar el miometrio.

La IHQ se llevó a cabo según el protocolo detallado en la **Tabla 4**. Se utilizaron anticuerpos primarios contra α -SMA (dilución 1/200, Novocastra, clon ASM-1), vimentina (dilución 1/100, Novocastra, clon V9), y anticuerpo secundario biotinilado anti-ratón con dilución 1/200, 1/200 y 1/100, respectivamente (ISAL, Santa Fe, Argentina).

Tabla 4. Protocolo general utilizado para la técnica de IHQ.

Desparafinización e hidratación		Tiempo
Bioclear 1, 2 y 3		5 min c/u
Alcohol 100º, 96º y 70º		3 min c/u
PBS		5 min
Recuperación antigénica		
Calentamiento en horno microondas utilizando buffer citrato 0,01 M pH 6,0	Calentar el buffer 3 min a 100% de potencia, agregar las muestras y calentar 1 min a 100%, 14 min a 40%. Dejar 20 min apagado.	
PBS		5 min
Bloqueo de actividad de peroxidasa endógena		
Agua oxigenada al 3% en metanol (36 ml metanol + 4 ml H ₂ O ₂ 30 vol)		15 min
PBS		15 min
Bloqueo de uniones no específicas		
NHS 1/20 disuelto en PBS con 1,5% de leche en polvo descremada		30 min (en cámara húmeda)
Anticuerpo primario		
Incubación con el anticuerpo específico		14-16 h a 4 °C (en cámara húmeda)
PBS		15 min
Anticuerpo secundario biotinilado		
Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado		30 min a TA (en cámara húmeda)
PBS		5 min
Estreptavidina-peroxidasa		
Incubación con el complejo estreptavidina-peroxidasa en una dilución 1/150		30 min a TA (en cámara húmeda)
PBS		5 min
Revelado		
Sustrato enzimático (5 µl de H ₂ O ₂ 30 vol) + cromógeno (2,3 mg DAB) disueltos en 3,3 ml de Tris- HCl 0,05 M pH 7,5		10 min
Agua destilada		5 min
Contracoloración con Hematoxilina de Mayer		
Deshidratación y montaje		
Alcohol 70º, 96º y 100º		1 min c/u
Bioclear 1 y 2		5 min c/u
Montaje con medio de montaje permanente (Eukitt)		

TA. Temperatura ambiente. DAB: diaminobencidina

La medición del espesor del estroma y del miometrio circular y longitudinal se realizó mediante análisis digital de imágenes utilizando el software Image Pro-Plus 5.0.2.9 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EE. UU) siguiendo la metodología previamente descrita en nuestro laboratorio (Ramos et al., 2003). Brevemente, las imágenes fueron obtenidas con la cámara de video color Spot Insight V3.5 (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, EE. UU), acoplada al microscopio Olympus BH2, y utilizando una objetiva Dplan 40X. Para la calibración espacial del analizador, se capturaron imágenes del reticulado de la cámara de Neubauer. Luego de calibrar espacialmente el sistema, se realizaron mediciones de longitud punto a punto en cada uno de los compartimentos uterinos (estroma subepitelial y miometrio circular y longitudinal). Los resultados fueron expresados en μm .

2.4.3 Evaluación de la densidad celular y de las glándulas uterinas

En cortes teñidos con H-E (siguiendo el protocolo especificado en la **Tabla 2**) y mediante el análisis digital de imágenes utilizando el software Image Pro-Plus 5.0.2.9 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EE. UU), se cuantificó:

- la densidad de glándulas: se determinó el área ocupada por glándulas, relativizando este parámetro en función del área del estroma subepitelial seleccionada.
- la densidad de células: se determinó el área ocupada por las células en el estroma subepitelial o muscular relativizando en función del área seleccionada de dicho compartimento uterino.

En ambas determinaciones se excluyeron de la cuantificación el área ocupada por vasos sanguíneos y cuando se determinó la densidad de núcleos se excluyó también el área ocupada por glándulas.

2.4.4 Evaluación del nivel de organización de fibras de colágeno

Se estudió el nivel de organización de las fibras de colágeno, cuantificando la birrefringencia del colágeno mediante microscopía de polarización (Montes, 1996). La cuantificación se realizó en secciones uterinas teñidas con Picrosirius/Hematoxilina, siguiendo el protocolo descrito en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Protocolo general utilizado para la técnica de tinción con Picrosirius/Hematoxilina

Desparafinización e hidratación	Tiempo
Bioclear 1, 2 y 3	5 min c/u
Alcohol 100º, 96º y 70º	1 min c/u
Agua	2 min
Tinción	
Picrosirius	1 hora
Agua de canilla (corriente)	1 min
Hematoxilina de Harris (filtrada)	6 min
Agua de canilla (corriente)	15 min
Deshidratación y montaje	
Alcohol 70º, 96º y 100º	1 min c/u
Bioclear 1 y 2	5 min c/u
Montaje con medio de montaje permanente (Eukitt)	

En este método, el área de la birrefringencia del colágeno se encuentra relacionada con el grado de remodelación del colágeno debido a que cuando las moléculas de colágeno están densamente empaquetadas y dispuestos regularmente, aparecen como estructuras birrefringentes en el campo del microscópico al ser observadas con luz polarizada. En cambio, cuando las fibras de colágeno no se encuentran densamente y/o espacialmente ordenadas, presentan una menor birrefringencia. Para cada animal, se capturaron 10 imágenes por tejido uterino que fueron capturadas, digitalizadas y analizadas como se describe en Kass et al. (2001). El área del estroma subepitelial o área miometrial ocupado por colágeno birrefringente (estructura organizada) se midió como la densidad óptica integrada (DOI) utilizando el programa analizador de imágenes Image Pro-Plus 5.0.2.9 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EE. UU). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (Kass et al., 2001).

2.4.5 Determinación de la proliferación celular uterina

El índice de proliferación celular se evaluó por detección IHQ de la BrdU incorporada. La incorporación de BrdU en la fase S del ciclo celular se analizó cuantitativamente en secciones de tejido inmunomarcadas. En cortes histológicos se realizó IHQ de acuerdo con lo descrito en la **Tabla 4**, incorporando al procedimiento un paso fundamental de hidrólisis ácida (utilizando HCl 2 N durante 30 min a 37°C) para desnaturalizar las hebras de doble cadena del ADN, previo al bloqueo de uniones inespecíficas. Posteriormente, los cortes deben ser neutralizados por incubación durante 10 min en una solución 0,1 M de bórax (pH 8). Se utilizó como anticuerpo primario Anti-BrdU (dilución 1/100, Newcastle upon Tyne, UK,

Materiales y métodos

clone 85-2c8) y luego los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado anti ratón (dilución 1/100, ISAL, Santa Fe, Argentina).

Se calculó el porcentaje de células BrdU positivas, contando un total de 3000 células en epitelio luminal y 1000 células en epitelio glandular. En el estroma subepitelial y muscular el porcentaje de células positivas para BrdU se obtuvo por medio del sistema de imágenes computarizado Image Pro-Plus 5.0.2.9 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EE. UU). Se evaluaron al menos 10 imágenes de cada área tisular mediante análisis de segmentación de color, que extrae objetos localizando todos los objetos de un color específico (mancha azul o marrón).

2.4.6 Determinación del índice de apoptosis

Para evaluar la apoptosis celular, se analizaron secciones de útero en las cuales se realizó la técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase deoxy Uridine triphosphate Nick End Labeling*), siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Brevemente, esta técnica se basó en la incubación de los tejidos a estudiar con una solución conteniendo desoxiuridina trifosfato (dUTP) marcados con fluoresceína, y la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT, del inglés: *Terminal deoxynucleotidyl transferase*); enzima que polimeriza los dUTP marcados a los extremos 3'-OH de las hebras de ADN fragmentadas durante el proceso de apoptosis. Posteriormente, los cortes histológicos se incubaron con el anticuerpo anti-fluoresceína conjugado a peroxidasa de rábano picante y se reveló con la mezcla de sustrato-cromógeno (DAB; Sigma). Las muestras se contracoloraron y se montaron con medio de montaje permanente (Eukitt). Los controles negativos se realizaron siguiendo el mismo procedimiento, pero utilizando la mezcla de reacción (dUTP) sin la enzima TdT. Como control positivo, se evaluó un corte histológico de próstata de rata en involución después del segundo día de castración (Ramos et al., 2002). El protocolo utilizado, se describe en la **Tabla 6**.

Para determinar el índice de apoptosis se cuantificaron 2000 células epiteliales luminales y 1000 células del epitelio glandular y se calculó el porcentaje de células positivas. En el estroma subepitelial y miometrio se determinó el porcentaje de células en apoptosis contando de manera visual el número de células en apoptosis. Para calcular el número de células totales se utilizó el sistema de imágenes computarizado Image Pro-Plus 5.0.2.9 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EE. UU). Se evaluaron al menos 10 imágenes de cada área tisular mediante análisis de imágenes.

Tabla 6. Protocolo utilizado para la técnica de apoptosis (TUNEL).

Desparafinización e hidratación	Tiempo
Bioclear 1, 2 y 3	5 min c/u
Alcohol 100º, 96º y 70º	3 min c/u
PBS	5 min
Bloqueo de actividad de peroxidasa endógena	
Agua oxigenada al 3% en metanol (36 ml metanol + 4 ml H ₂ O ₂ 30 vol)	15 min
PBS	15 min
Bloqueo de uniones no específicas	
Tris-HCl 0,1 M pH 7,5- BSA 3%-NHS 20%	30 min (en cámara húmeda)
Reacción de TUNEL	
Incubación con el anticuerpo específico	½ hora a 37 °C (en cámara húmeda)
PBS	3 lavados de 5 min
Conversión de la señal	
Incubación con el Converter-POD en una dilución 1/5 (en PBS-BSA)	30 min a TA (en cámara húmeda)
PBS	3 lavados de 5 min
Revelado	
Sustrato enzimático (5 µl de H ₂ O ₂ 30 vol) + cromógeno (2,3 mg DAB) disueltos en 3,3 ml de Tris-HCl 0,05 M pH 7,5	10 min
Agua destilada	5 min
Contracoloración con hematoxilina de Mayer (opcional)	
Deshidratación y montaje	
Alcohol 70º, 96º y 100º	1 min c/u
Bioclear 1 y 2	5 min c/u
Montaje con medio de montaje permanente (Eukitt)	

TA. Temperatura ambiente. DAB: diaminobencidina.

2.4.7 Cuantificación de la relación proliferación/apoptosis

Con los valores obtenidos de proliferación y de apoptosis de cada animal se calculó la relación proliferación/apoptosis como medida indirecta del índice de recambio celular para cada compartimento uterino. Se expresó como proliferación/apoptosis x 100 (expresado como %).

2.5 Evaluación de expresión proteica del útero

Se investigó la expresión de las moléculas que se detallan a continuación:

- 1) RE- α , RA y RP
- 2) AQP 3, 7 y 8
- 3) PTEN
- 4) P450arom
- 5) HOXA10
- 6) WNT5a,
- 7) WNT7a
- 8) β -catenina

Para ello se empleó IHQ utilizando el protocolo general previamente detallado en la **Tabla 4**. Los anticuerpos y las condiciones de los ensayos se muestran en la **Tabla 7**. En particular, para estudiar la expresión de la proteína PTEN por IHQ, generamos previamente el anticuerpo policlonal anti-PTEN como se detalla en la **sección 2.5**.

Tabla 7. Anticuerpos utilizados en los ensayos de IHQ

Anticuerpo primario utilizado	Dilución	Anticuerpo secundario biotinilado	Proveedor del anticuerpo primario
Anti-RA	1/400	Anti-conejo 1/200 (Zymed)	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA)
Anti-ESR1	1/200	Anti-conejo 1/200	ISAL (Santa Fe, Argentina)
Anti-RP	1/200	Anti-conejo 1/200	Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (Santa Fe, Argentina)
Anti-HOXA10 (sc-17159)	1/50	Anti-cabra 1/100 (Santa Cruz)	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
Anti-WNT7a	1/400	Anti-conejo 1/200	Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (Santa Fe, Argentina)
Anti-WNT5a	1/200	Anti-conejo 1/200	Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (Santa Fe, Argentina)
Anti- β catenina	1/800	Anti-mouse 1/200	Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (Santa Fe, Argentina)
Anti PTEN *	1/750	Anti-conejo 1/400	Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (Santa Fe, Argentina)
Anti-P450arom	1/100	Anti-conejo 1/200	Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (Santa Fe, Argentina)
Anti AQP3	1/300	Anti-conejo 1/200	Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Anti-AQP7	1/100	Anti-conejo 1/200	Alpha Diagnostic International, San Antonio, EEUU.
			Alomone Labs, Jerusalem, Israel

* El anticuerpo Anti-PTEN fue generado como un objetivo específico de este trabajo de tesis.

En todos los casos se realizaron controles negativos de especificidad, sustituyendo el anticuerpo primario por un suero no inmune, y controles positivos, incluyendo una sección de tejido cuya reacción positiva para la proteína de interés fue comprobada con anterioridad.

La cuantificación de la expresión de los receptores esteroides, PTEN, AQPs (isoformas 3, 7 y 8) y P450arom se realizó en IHQ sin contracoloración, mediante análisis digital de imágenes utilizando el software Image Pro-Plus 5.0.2.9 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EE. UU). Se obtuvieron imágenes digitales de los distintos compartimentos histológicos a estudiar con una cámara de vídeo color Spot Insight V3.5, acoplada al microscopio Olympus BH2. Previo a la captura de imágenes, el microscopio fue acondicionado para la iluminación Koehler y una imagen de referencia de un campo vacío fue utilizada para corregir la iluminación desigual (corrección de sombras). Las imágenes fueron convertidas a escala de grises, se delimitó el compartimento histológico a evaluar y se calibró el nivel de grises del programa de tal manera que la tinción de fondo (*background*) sea considerada como “cero”. Luego se determinó el área total ocupada por el compartimento seleccionado, el área de marcación positiva y el promedio de la intensidad de marcación. A partir de estos parámetros se calculó la DOI, utilizando la siguiente fórmula $DOI = [(Área\ de\ marcación\ positiva / Área\ total\ evaluada) \times 100] \times \text{promedio de la intensidad de marcación}$ (Ramos et al., 2002). Debido a que la DOI es un parámetro adimensional, los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias. La expresión de HOXA10, WNT5a, WNT7a y β -catenina fue estudiada cualitativamente, observando el patrón de localización en los diferentes compartimentos uterinos.

2.6. Generación de anticuerpo policlonal contra PTEN

2.6.1 Obtención del antígeno recombinante en células procariotas

2.6.1.1. Diseño bioinformático, amplificación y clonado del antígeno de PTEN

La región de la secuencia del gen de PTEN que se utilizó para generar el antígeno fue seleccionada utilizando la herramienta BioPlot del programa bioinformático Vector NTI, capaz de identificar zonas proteicas con alta antigenicidad teórica. Una vez analizadas estas zonas, se seleccionó una de ellas, la cual incluye la región correspondiente a los aminoácidos 309-401 de la secuencia de la proteína de rata (n° de acceso NP_113794.1).

Para producir el antígeno se utilizó una estrategia de clonado direccional EcoRI-XhoI, amplificando por PCR las secuencias nucleotídicas de la región antigénica previamente seleccionada. Para generar los amplicones de esa zona por PCR, se empleó ADNc obtenido

Materiales y métodos

de muestras de cerebro, útero y ovario de rata y se utilizaron oligonucleótidos diseñados específicamente con el agregado de sitios de corte para enzimas de restricción (EcoRI: GAATTC y XhoI: CTCGAG). En la **Tabla 8** se muestran las secuencias de los oligonucleótidos y el tamaño del amplicón obtenido.

Tabla 8: Oligonucleótidos diseñados para amplificar y clonar la secuencia de PTEN.

Gen	Secuencia	Tamaño (pb)
PTEN	S: 5'-gggttGAATTC TCGTGC GGATAATGACAAGGA-3'	305
	AS: 5'-cgggCTCGAG TTTGTAATTTGTGAATGCTG-3'	

* En minúsculas se muestran los extremos 5' no específicos de los oligonucleótidos. Subrayado se resalta la secuencia de corte de las enzimas EcoRI y XhoI (Promega) utilizadas para el clonado direccional en el vector de expresión pGEX4T-3. S: sentido; AS: antisentido.

El producto de PCR obtenido se purificó a partir de un gel de agarosa utilizando el kit Wizard SV Gel and Clean-up System (Promega) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Luego cada producto de PCR se digirió con las enzimas EcoRI y XhoI en buffer H (Promega) durante 3 h a 37°C. Los productos de los cortes de restricción fueron purificados y ligados al vector pGEX-4-T3 (**Figura 21**, Stratagene Corp., La Jolla, CA) digerido con las mismas enzimas, durante toda la noche a 4°C utilizando la enzima T4 ADN ligasa (Promega). Así, se logró el clonado direccional en el vector de expresión pGEX-4T-3.

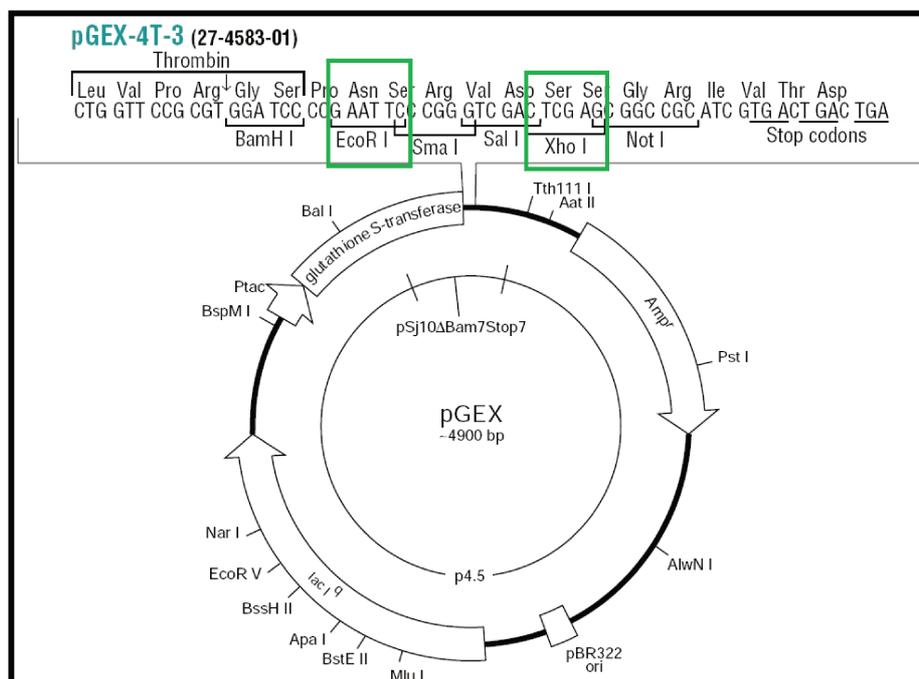


Figura 21. Plásmido pGEX-4T-3 y estrategia de clonado direccional utilizada para la expresión de los antígenos de PTEN como una proteína de fusión con glutatión-S-transferasa (GST-PTEN). Imagen extraída y modificada de Vigezzii (2016)

De esta forma, el marco de lectura de PTEN queda en fase con el de la glutatión-S-transferasa (GST, **Figura 21**), obteniéndose la construcción del vector pGEX-4T-3/PTEN (plásmido recombinante), que permitirá la expresión de la proteína de fusión GST-PTEN. Con el plásmido recombinante obtenido se transformaron bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (Stratagene Corp., La Jolla, CA) por el método del CaCl₂ (Sambrook & Russell, 2001). Se seleccionaron clones de bacterias transformadas al azar y se chequeó por PCR que efectivamente habían sido transformadas con el vector recombinante. Se generaron stocks de esas bacterias y se almacenaron a -80 °C.

2.6.1.2. Expresión y purificación de los antígenos recombinantes

Para expresar en forma soluble las proteínas recombinantes, células de *E. coli* BL21 (Stratagene Corp., La Jolla, CA) fueron transformadas con el vector pGEX-4T-PTEN y cultivadas en medio Luria Bertoni (1% peptona de carne, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl). La expresión de las proteínas de fusión se indujo con el agregado de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, Promega) en una concentración final de 250 nM. Luego de la inducción, se cultivaron las células a 37 °C durante 3 h. El cultivo de células fue sonificado en baño de hielo (High Intensity Ultrasonic Processor, Vibra-Cell, Sonics and Materials Inc., Newton, CT, USA) y centrifugado a 14000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado y la proteína de fusión fue purificada a partir del mismo utilizando una columna cromatográfica GSTrap™ (GE Healthcare, Buenos Aires, Argentina). Se recogieron las fracciones de elución, cuya concentración de proteína se estimó determinando la absorbancia a 280 nm. Las fracciones obtenidas fueron sembradas y corridas en un gel de poliacrilamida del 12% para evaluar su pureza relativa. Se juntaron todas las fracciones que contenían proteína y se las concentró utilizando tubos de filtración forzada (Centricon, límite de paso 10 kDa, Millipore, Billerica, MA).

2.6.2 Obtención y caracterización de anticuerpos policlonales

2.6.2.1 Inoculación de los conejos

Una vez obtenida la proteína de fusión purificada (GST-PTEN) se procedió a la inoculación de un conejo de acuerdo al siguiente protocolo (Harlow Lane, 2014; Vaitukaitis et al, 1971):

- 1) Se tomó muestra de sangre de la cual se obtuvo el suero control basal para luego inocular el antígeno.
- 2) Se inyectó por vía sc una preparación de 300 µl del antígeno en una concentración de 1 µg/µl disuelto en PBS con 300 µl de adyuvante completo de Freund.
- 3) 15 días después se realizó una nueva inoculación de la misma preparación antes descripta, pero esta vez utilizando adyuvante incompleto de Freund. Este

procedimiento se repitió dos veces cada 15 días, finalizando el proceso de inoculación a los 60 días de la primera inoculación. Dos semanas posteriores a la última inyección los conejos fueron sacrificados y los sueros se almacenaron a -20 °C.

2.6.2.2 Caracterización de los anticuerpos generados por Western Blot e IHQ

Para caracterizar los anticuerpos producidos (anti-PTEN) se usó Western blot con un extracto proteico de útero de rata como control positivo de la presencia de PTEN (Dery MC, et. Al 2003). La concentración de proteína total se determinó con un kit colorimétrico de ensayo de proteínas BCA de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, EE. UU.). Cantidades equivalentes de proteína (100 μ g) de útero se sembraron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en gradiente 4-12%, corridos en cubas electroforéticas y luego electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% disuelta en buffer Tris-salino Tween (Tris 25 mM, NaCl 0,14 M, Tween-20 0,05% v/v, pH 7,4) durante 1.30 h en agitación a temperatura ambiente para evitar uniones inespecíficas. Posteriormente, se lavó con solución tampón Tris con Tween (TBST) y se incubó con el suero anti-PTEN (dilución 1/1000) en TBST-leche 2% toda la noche a 4 °C (en agitación). Al día siguiente, la membrana se lavó 3 veces con TBST y se incubó con anticuerpo secundario (anti-conejo conjugado con peroxidasa (Sigma) diluido 1/200 en TBST-leche 2%) durante 1 h a 37 °C a 150 rpm. La membrana se lavó 3 veces con TBST y la reacción se visualizó con DAB 0,5 mg/ml (Sigma). Los pesos moleculares se determinaron por comparación con los estándares de peso molecular (Rainbow ECL, Amersham Pharmacia, Amersham Biosciences Argentina, Bs As, Argentina).

Para confirmar la reactividad y la especificidad del antisuero generado; el péptido antigénico GST-PTEN se usó para preabsorber el antisuero-PTEN, incubando 40 μ g de antígeno con el antisuero-PTEN diluido 1/750 durante 24 h a 4 °C. La mezcla antígeno-anticuerpo fue utilizada en ensayos de IHQ en secciones uterinas de rata, siguiendo el protocolo descrito previamente (**Tabla 4**). Anteriormente, se realizó una prueba de preadsorción con 5, 10, 20 y 40 μ g de antígeno purificado para encontrar la cantidad óptima para llevar a cabo la prueba de especificidad. Los cortes fueron contracolorados con H-E según la técnica detallada en la **Tabla 4**.

2.7. Expresión génica mediante RT-PCR en tiempo real

Se determinaron los niveles de expresión de los siguientes genes en el útero: RE- α , RA, Acuaporinas (AQP, isoformas 1 a 9), IGF-1, IGF-1R, WNT5a y 7a, HOXA10 y β -catenina, proteínas implicadas en la esteroidogénesis: StAR, 3 α -HSD, 3 β -HSD 1,2,3,5 y 7, 5 α -R1 y 5 α -R2, P450arom, P450(2d4), P450(17 α), 17 β -HSD 1, 2, 3 y 4 y STS.

2.7.1. Extracción de ARN total y transcripción reversa (RT)

La extracción de ARN total se realizó con el reactivo comercial "TRIzol Reagent" (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina), que se fundamenta en el método del isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (Chomczynski & Sacchi, 1987). La extracción de ARN total se realizó con el reactivo comercial "TRIzol Reagent" (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina), que se fundamenta en el método del isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo

A partir de los ARN extraídos se realizaron transcripciones reversas con el fin de obtener los correspondientes ADNc. La RT se llevó a cabo empleando cantidades iguales (1 μ g) del ARN total y utilizando la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV, 300 U, Promega, Madison, WI, EE.UU). Se emplearon oligonucleótidos hexaméricos (200 pmoles, Promega) como cebadores de la enzima. Al tubo de reacción se le adicionaron 20 U de inhibidor de ARNasa (RNAout, Invitrogen) y 100 nmol de una mezcla de dNTPs (deoxinucleótidos trifosfatos) y se alcanzó un volumen final de 30 μ l con la solución amortiguadora de la reacción provista por el fabricante de la enzima. La reacción de RT se realizó a 70 $^{\circ}$ C por 5 min y 30 seg con la mezcla de los ARN y los oligonucleótidos hexaméricos, luego se agregó el resto de los reactivos y se continuó la reacción a 37 $^{\circ}$ C por 90 min y a 42 $^{\circ}$ C por 15 min. La reacción se detuvo calentando a 80 $^{\circ}$ C por 5 min y a 94 $^{\circ}$ C por 30 segundos, y realizando posteriormente un enfriamiento a 25 $^{\circ}$ C. Las reacciones de RT se llevaron a cabo en el termociclador T18 (IVEMA, Buenos Aires, Argentina). Una vez obtenido el ADNc, se diluyó con agua libre de ARNsas, llevándolo a un volumen final de 60 μ l.

2.7.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

Luego de la extracción del ARN total y posterior retrotranscripción, se determinaron los niveles de expresión de los genes que se detallan en la **Tabla 9** mediante ensayos optimizados de PCR en tiempo real utilizando oligonucleótidos específicamente diseñados para amplificar los distintos genes en estudio (**Tabla 9**).

Tabla 9: Oligonucleótidos utilizados en PCR en tiempo real.

Gen	Secuencias de oligonucleótidos	Tamaño (pb)	Ta(°C)
AQP1	S: 5'- CATTGGCTTGTCTGTGGCTC -3' AS:5'- CCCACCCAGAAAATCCAGTG -3'	132	58
AQP2	S: 5'- GGACCTGGCTGTCAATGCTC -3' AS:5'- GTCGGTGGAGGCAAAGATGC -3'	109	58
AQP3	S: 5'- CTGTGGTTCCGTGGCTCAAG -3' AS: 5'- AGCAGGGTTCAAGTGGGCTC -3'	139	59
AQP4	S: 5'- GAGCCAGCATGAATCCAGC -3' AS: 5'- AGGCTTCCTTTAGGCGACG -3'	171	58
AQP5	S: 5'- CTCCCAGCCTTATCCATTG -3' AS: 5'- GAAAGATCGGGCTGGGTTCA -3'	94	57
AQP6	S: 5'- CTGCGGTCATTGTTGGGAAG -3' AS: 5'- CGGTCTTGGTGTGAGGAAAC -3'	117	57
AQP7	S: 5'- GTGCTACAGAAGACTTGGGTGC -3' AS: 5'- TAGCTGCCAAGCCTTTCTCC -3'	119	57
AQP8	S: 5'- CTGTGTGTATGGGTGCCGTC -3' AS: 5'- AGGCACGAGCAGGGTTCATG -3'	132	58
AQP9	S: 5'- AGGACGGTGCCAAGAAGAGC -3' AS: 5'- GGACCGCTTGGGCAATAGAG -3'	132	59
RE- α	S: 5'-ACTACCTGGAGAACGAGCCC-3' AS: 5'-CCTTGGCAGACTCCATGATC-3'	153	60
RA	S: 5'- AGGGAGGTTACGCCAAAG -3' AS: 5'- AGACAGTGAGGACGGGAT -3'	101	58
IGF-1	S: 5'- ACTTCAACAAGCCACAGG-3' AS: 5'- AGCGGAGCACAGTACATCTC -3'	121	57
IGF-1R	S: 5'- GCCGCTGTGTGAGAAGACG-3 AS: 5'-CATGGGTCTCCGTACACC -3	115	57
3 β -HSD1,2,3,5	S: 5' CCTGGATGGAGCTGCCTG '3 AS: 5' CCTGGCAGCTCTCCTCA '3	220	61
3 β -HSD7	S: 5' GAGCGGAAGGAAGGAAGCCT '3 AS: 5' AGGAAGCCACAGCCACCTGT '3	167	61
17 β -HSD1	S: 5' AGATACTGGAATTGGATGTCA '3 AS: 5' AAGAACATTCACATCCAGTACA '3	170	56
17 β -HSD2	S: 5' AGCGGAGGAATTGAGGAA '3 AS: 5' AGACCCAGCATTGTTGA '3	152	56
17 β -HSD3	S: 5' AGTACCTAAATACCAGCAGGG '3 AS: 5' GGTGCTGCTGTAGAAGATTCT '3	161	55
17 β -HSD4	S: 5' GACAGCACTGGACACATTCG '3 AS: 5' TATGATCCCATGCTGCCC '3	161	57
3 α -HSD	S: 5' GCACTCAACTGGACTATGTGGA '3 AS: 5' GCTCATCTCGTGGGAAAAAT '3	87	50,7

P450(2d4)	S: 5' CGCTGGACTTCTCGCTA '3 AS: 5' CGGTGTCCTCGCTGTAT '3	214	57
P450arom	S: 5' TGGCAGATTCTTGTGGATGG '3 AS: 5' CGAGGACTTGCTGATGATGAGT '3	118	54
P450(17α)	S: 5' GGTGATAAAGGGTTATGCCA '3 AS: 5' GCTTGAATCAGAATGTCCGT '3	117	55
5α-R1	S: 5' CACCTTCAACGGCTATGTAC '3 AS: 5' AGGATGTGGTCTGAGTGGAT '3	144	54
5α-R2	S: 5' TTGTGGTGTCTGGTAGGGATG '3 AS: 5' CAGAAGGCAGTGGCTCTCAA '3	175	56
StAR	S: 5' GCAAAGCGGTGTCATCAG '3 AS: 5' GCGAACTCTATCTGGGTCT '3	172	57
STS	S: 5' CTTGAGGGGGTGAAGTTGAC '3 AS: 5' CCCAGATGATGCCGAGAA '3	150	58
WNT5a	S: 5'-CCTGTAGCCTCAAGACATGCTGG-3 AS: 5'-GAGTTGAAGCGGCTGTTGACCT -3	140	60
WNT7a	S: 5'-CTTACACAATAACGAGGCAGGC-3 AS: 5'-TCTCGGAATTGTGGCAGTGT-3'	126	56
β-catenina	S: 5'-GAGCACATCAGGACACCCAGC-3' AS: 5'-GAGGATGTGGAGAGCCCCAGT-3'	116	60
HOXA10	S: 5'-GAAAACAGTAAAGCCTCTCC-3' AS: 5'-ATAGAACTCCTTCTCCAGC-3'	148	54
L19	S: 5'-AGCCTGTGACTGTCCATTCC-3' AS: 5'-TGGCAGTACCCTTCTCTTC-3'	99	60

S: sentido AS: antisentido. Ta: temperatura de hibridización.

La expresión de los genes mencionados se determinó mediante PCR en tiempo real, empleando oligonucleótidos diseñados específicamente mediante el software Vector NTI. Para cuantificar la expresión génica de AQPs (isoformas 1 a 9) fueron diseñados 9 pares de oligonucleótidos que permiten amplificar cada isoforma en particular. Respecto a las enzimas involucradas en el metabolismo de hormonas esteroideas; los oligonucleótidos diseñados permitieron cuantificar la expresión génica de las enzimas: P450(17α), P450(2d4), P450arom, 3β-HSD 1, 2, 3 y 5 y 3β-HSD7, 17β-HSD1, 17β-HSD2, 17β-HSD3 y 17β-HSD4, 5α-R1 y 5α-R2, STS y de la proteína mitocondrial StAR. Para el diseño de los oligonucleótidos se tuvo en cuenta seleccionar oligonucleótidos sentido que hibridan en un exón diferente a su correspondiente antisentido, evitando así la amplificación de ADN genómico. Como control interno (gen de referencia) se utilizó la determinación de ARNm del gen de la proteína ribosomal L19 (**Tabla 10**). Una vez diseñados los oligonucleótidos se determinó la temperatura de hibridación (T_a) para cada amplicón obtenido a partir del análisis *in silico* utilizando el software Vector NTI. La especificidad de los oligonucleótidos

fue cotejada por comparación directa de su secuencia contra el genoma completo de *Rattus norvegicus* mediante el uso de la herramienta BLAST disponible en la página web del National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

La metodología utilizada para la cuantificación se basa en la detección y cuantificación ciclo a ciclo de una molécula fluorescente (en este caso se empleó Eva Green) que se intercala entre las hebras de ADN doble cadena. La fluorescencia es detectada y leída por un fluorómetro acoplado al termociclador a medida que transcurre la reacción de PCR.

Los tubos de reacción para la PCR en tiempo real se construyeron con 5 μ l de ADNc que se combinaron con HOT-FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne; BIOCIENTÍFICA; Rosario, Argentina) y 10 pmoles de cada oligonucleótido en un volumen final de 20 μ l. El protocolo general de ciclado utilizado se muestra en la **Tabla 10**. Todas las muestras retro-transcriptas a ADNc fueron amplificadas por duplicado. Las reacciones de RT se llevaron a cabo en un termociclador Applied Biosystems® (Thermo Fisher Scientific, Argentina). La pureza de los productos obtenidos fue confirmada mediante curvas de disociación y electroforesis en geles de agarosa de muestras elegidas al azar en cada corrida. Controles negativos (sin ADNc fueron) se incluyeron en todos los ensayos, los cuales no produjeron amplificación.

Tabla 10: Protocolo general de ciclado de PCR en tiempo real.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95	15 min	1
Desnaturalización	95	15 seg	
Hibridación	Específica para cada para de oligonucleótidos (T_a)	15 seg	40
Extensión	72	15 seg	
Lectura	Específica para cada amplicón (en general se utilizó 81 °C)	4 seg	
Incubación	10	10 min	2

2.7.3 Cuantificación de los niveles de expresión relativa

El cálculo de los niveles de expresión relativa de cada muestra se realizó utilizando el método del ciclo umbral (Ct) (Higuchi et al., 1993). El valor de Ct para cada muestra se calculó utilizando el software Applied Biosystems® (Thermo Fisher Scientific, Argentina) con un umbral de ajuste de fluorescencia automática (Rn). La expresión del ARNm de la proteína ribosómica L19 se utilizó como gen de referencia (control interno) ya que su expresión se mantuvo constante en todas las condiciones experimentales. La eficiencia (Ef) de la reacción de PCR para cada gen estudiado y para el gen de referencia (L19) fue

calculada mediante curvas estándar. Estas curvas se construyen a partir de la amplificación de cada gen en diluciones seriadas de los ADNc. Luego, graficando el logaritmo de las diluciones de los ADNc vs. su correspondiente Ct, se obtiene la fórmula de la recta por regresión lineal a partir de la cual se calcula la Ef ($Ef = 10^{(-1/\text{pendiente}) - 1}$). Dependiendo de las condiciones específicas de PCR, la Ef varió entre 98-102%. El posterior cálculo de los niveles de expresión relativa de cada gen en los animales tratados con respecto a los controles se realizó utilizando el método de la curva estándar relativa (Cikos et al., 2007). Para todas las muestras experimentales, la cantidad relativa del gen de interés y del gen L19 fue determinada a partir de la curva estándar previamente realizada para cada gen. La cantidad obtenida correspondiente al gen de interés fue normalizada con la cantidad relativa del gen L19 en cada grupo experimental.

3. EFECTO DEL SOP SOBRE LA FERTILIDAD EN RATAS ADULTAS JÓVENES.

3.1 Procedimiento

Un segundo grupo de animales fue sometido al mismo protocolo experimental especificado en la **Sección 1.1 de Materiales y Métodos**. Como se describió, desde el DPN21 los animales fueron inyectados sc por 20 días consecutivos, hasta el día **DPN40**, con: aceite de sésamo (grupo **CONTROL**) o con solución de DHEA (60 mg/kg pc /día, grupo SOP). Luego de la última dosis (**DPN40**) las ratas se dejaron crecer hasta el **DPN90** aproximadamente, momento en el que cada hembra fue alojada con una rata macho de fertilidad comprobada durante 3 semanas consecutivas. Todas las mañanas se realizaron extendidos vaginales, en gota fresca para verificar la presencia de espermatozoides junto a células de descamación características del estro (**DG1**) (Montes & Luque, 1988) (**Figura 21**). Las hembras preñadas fueron colocadas en jaulas individuales y sacrificadas en **DG18**. A estos grupos experimentales se les asignó el nombre de **CONTROLES-DG18** y **SOP-DG18** (**Figura 21**).

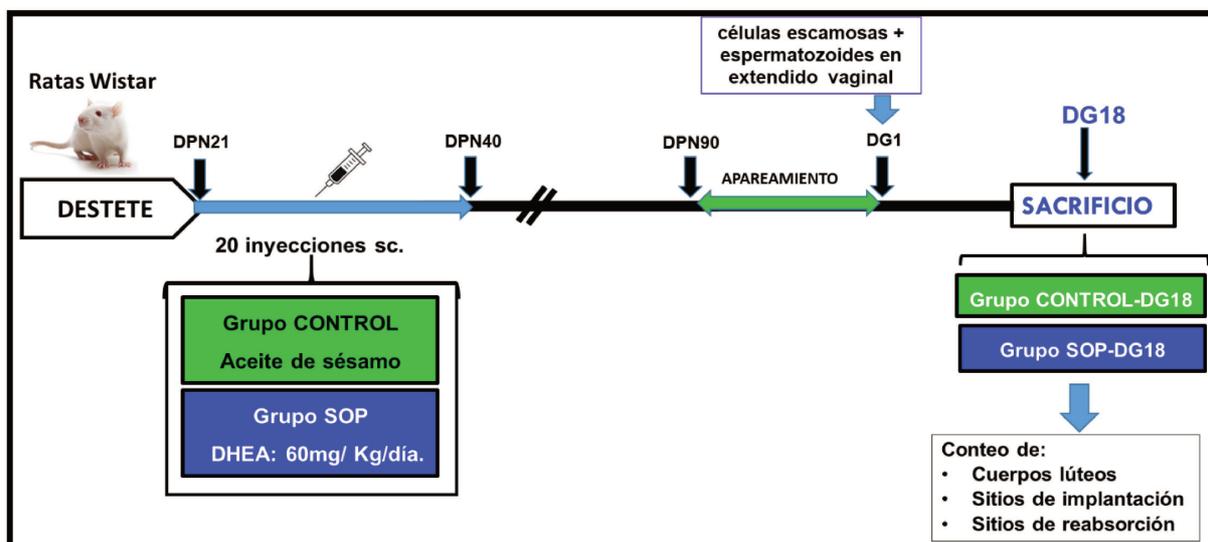


Figura 21. Esquema del diseño experimental utilizado para investigar los efectos del SOP sobre parámetros de fertilidad en ratas adultas jóvenes en **DG18**. La línea de tiempo indica los días postnatales (DPN). DG: día gestacional. sc: subcutánea.

Aquellas ratas hembra que durante 3 semanas consecutivas no presentaron espermatozoides en su extendido vaginal, fueron consideradas no preñadas y con este dato se calculó el porcentaje de preñez (hembras preñadas/número de hembras apareadas \times 100).

En **DG18** se extrajeron los ovarios y se contó el número de cuerpos lúteos mediante visualización directa de los ovarios con lupa estereoscópica (Leica Corp., Buffalo, NY, EE. UU). Se identificó y cuantificó los sitios de implantación y la presencia de reabsorciones fetales. Las reabsorciones son embriones que se han implantado y cuyo crecimiento no progresó, se visualizan en los cuernos uterinos como una masa amorfa de aspecto blanquecino y de tamaño reducido (Varayoud et al., 2011)(**Figura 22**).



Figura 22. Fotografía representativa de sitios de implantación viables (punta de flecha), respectivamente y sitios de reabsorción (flecha) de rata preñada en **DG18**.

4. EFECTO DEL SOP SOBRE EL DESARROLLO DE ALTERACIONES UTERINAS A LARGO PLAZO

4.1 Procedimiento

Se utilizó un tercer grupo de animales que fueron sometidos al protocolo experimental especificado previamente en la **Sección 1.1** de **Materiales y Métodos**. Desde el **DPN21**, los animales fueron inyectados sc por 20 días consecutivos hasta el día postnatal **DPN40** con: aceite de sésamo (grupo **CONTROL**) o con solución de DHEA (60 mg/kg pc /día, grupo **SOP**). Una vez finalizado el tratamiento, **DPN40** (última dosis), se dejó crecer los animales hasta aproximadamente el **DPN540-720** (18-24 meses aproximadamente), momento en el que fueron sacrificados en diestro determinado por citología vaginal (**Figura 23**). Al momento del sacrificio se obtuvieron muestras de sangre y se diseccionaron ambos cuernos

uterinos. Uno de los cuernos fue procesado hasta su inclusión en parafina (para el estudio histológico).

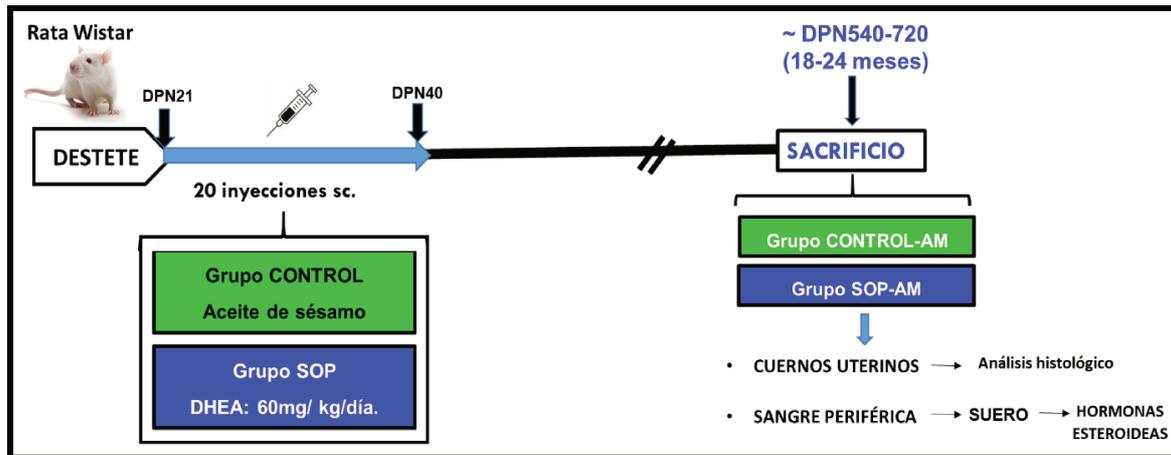


Figura 23. Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto del SOP sobre el desarrollo de lesiones uterinas en ratas adultas mayores (AM) de 18-24 meses de edad. La línea de tiempo indica los días postnatales (DPN).

4.2 Procesamiento de muestras

Las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos de vidrio y se procesó según el protocolo utilizado como se describe en la **Sección 2.3 de Materiales y Métodos** hasta obtener las muestras de suero.

Uno de los cuernos uterinos fue diseccionado y fijado durante 6 h en formol bufferado (pH 7,5) al 10% v/v en PBS, con el objetivo de conservar las estructuras histológicas del tejido. La técnica de procesamiento histológico se describe en la **Sección 2.3 de Materiales y Métodos**.

4.3 Evaluación del estado endócrino de los animales a nivel sistémico

A partir de las muestras de suero se determinaron los niveles séricos de E2, P4 y T por ensayos de quimioluminiscencia según lo descrito en la **Sección 2.3 de Materiales y Métodos**.

4.4 Evaluación de las anomalías uterinas

Muestras de útero embebidas en parafina se colorearon con H-E siguiendo el protocolo descrito en la **Tabla 2 (Sección 2.4.1 de Materiales y Métodos)**. Se analizó exhaustivamente la histología y evaluó la presencia de anomalías uterinas previamente descritas (Bosquiazzo et al., 2013). La incidencia de cada alteración se cuantificó determinando el porcentaje de animales que presentaban al menos una alteración histológica (Bosquiazzo et al., 2013).

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como la media \pm SEM (Error Estándar de la Media). Los datos de dos grupos experimentales fueron analizados con el test de Mann-Whitney. Cuando fue apropiado, los datos fueron analizados por análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y pruebas post-hoc de Bonferroni o prueba de Kruskal-Wallis seguidas de la prueba post-hoc de Dunn (SPSS-PASW Statistics v. 20).

Se utilizó el test de la probabilidad exacta de Fisher para evaluar la incidencia de cada anormalidad uterina y el porcentaje de hembras preñadas en cada grupo experimental. La incidencia de anormalidades uterinas se expresó como el número de ratas afectadas con cada tipo de anormalidad uterina sobre el total de ratas por grupo experimental (expresado como %).

Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

IV- RESULTADOS

1. HISTO-FUNCIONALIDAD UTERINA EN RATAS SOP EN LA ETAPA PERIPUBERAL

Antes de investigar los efectos del SOP sobre la histofuncionalidad uterina, caracterizamos nuestro modelo de SOP. Para ello nos basamos en el criterio diagnóstico de Rotterdam, estudiando la morfología ovárica y el perfil endócrino de las ratas hembras sometidas al tratamiento androgénico previamente mencionado.

1.1 Histología ovárica y perfil endócrino

En **DPN41**, los niveles de T aumentaron significativamente en los animales inyectados con DHEA (grupo **SOP**) respecto a los que recibieron el vehículo (grupo **CONTROL**) (**Figura 24A**). Los ovarios de los **CONTROLES** mostraron folículos en diferentes etapas de desarrollo, indicativo de una morfología ovárica normal, mientras que los del grupo **SOP** exhibieron una apariencia hinchada con múltiples folículos quísticos (**Figura 24B y C**). No se observaron diferencias significativas en los niveles séricos de E2 y P4 entre los grupos experimentales (**Tabla 11**).

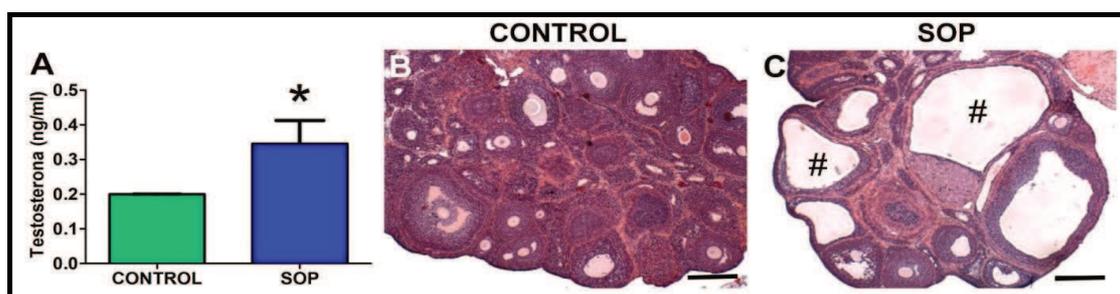


Figura 24. Niveles séricos de T e histología ovárica de ratas **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU** en **DPN41**. El gráfico de barras muestra los niveles séricos de testosterona en animales **CONTROL** y **SOP**. Cada columna representa la media + SEM de 9-10 ratas/grupo). El asterisco indica diferencias significativas (test de Mann-Whitney, * $p < 0,05$). Las fotomicrografías son representativas de secciones de ovarios de ratas **CONTROL** (B) y **SOP** (C) en **DPN41** teñidas con H-E. Los símbolos numerales indican formación de folículos quísticos. Escala: 200 µm. **DPN41**, día postnatal 41.

Tabla 11: Niveles séricos de E2 y P4 de ratas **CONTROL** y **SOP** en **DPN41**.

HORMONA	CONTROL	SOP
E2 (pg/mL)	62,4 ± 9,8	66,2 ± 1,9
P4 (ng/mL)	9,3 ± 1,8	6,9 ± 2,3

Los valores se expresan como media ± SEM de 8 ratas/grupo. Test de Mann-Whitney.

La presencia de estructuras quísticas en los ovarios e hiperandrogenismo confirman que el síndrome se ha establecido adecuadamente en los animales tratados con DHEA.

1.2 Efectos del SOP sobre la histomorfología uterina

Se disecaron ambos cuernos uterinos, durante la inspección macroscópica se observó que los cuernos uterinos en las ratas SOP eran más grandes y opacos en comparación con los CONTROLES (Figura 25A). En los cortes histológicos teñidos con H-E de los animales SOP, el estroma uterino presentó un mayor espesor (Figura 25B-C). Para determinar con que modificaciones celulares y/o tisulares estaban asociadas estos cambios, evaluamos espesor del estroma subepitelial y miometrio, densidad de núcleos uterinos, altura del epitelio luminal, densidad de glándulas, proliferación celular, organización de las fibras de colágeno y el contenido de agua.

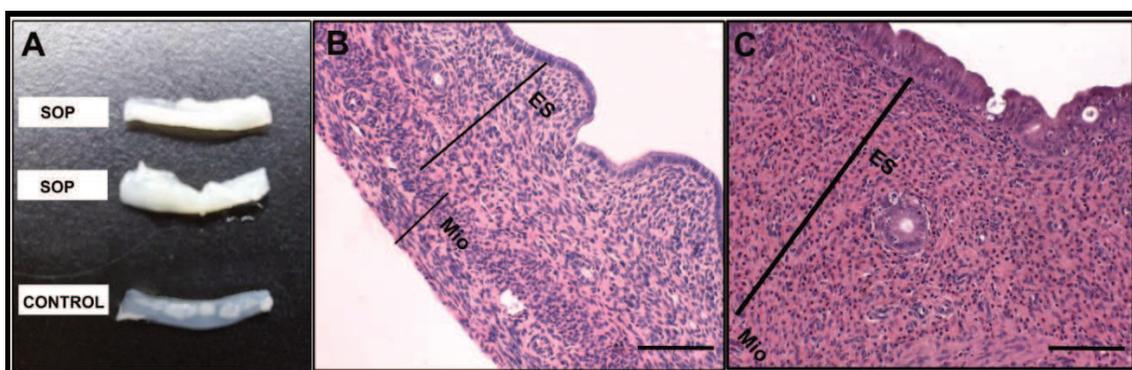


Figura 25. A) Fotografías representativas de úteros de ratas disecados en DPN41. Fotomicrografías de secciones uterinas teñidas con H-E de ratas **CONTROL** (B) y **SOP** (C). Barra de escala: 100 μ m. **ES**: estroma subepitelial, **Mio**: miometrio

1.2.1 Histología uterina

Como se observa en la **Figura 26A** y **B**, el análisis histológico demostró aumentos significativos en la altura epitelial y la densidad glandular en los animales con SOP. Estos resultados no se asociaron con cambios en la proliferación celular. Por otro lado, el espesor del estroma subepitelial y del miometrio aumentó en ratas **SOP** (**Figura 26C** y **D**). El aumento en el espesor uterino fue acompañado por una reducción significativa de la densidad celular tanto en el estroma subepitelial como en miometrio (**Figura 26C** y **D**). Se observaron correlaciones negativas entre el grosor y la densidad celular en ambos compartimentos uterinos (estroma subepitelial: $r = 0,6236$, $P = 0,0009$; miometrio: $r = 0,7620$, $P = 0,0004$).

A continuación, estudiamos si las alteraciones en la densidad celular pueden deberse a cambios en la proliferación celular. En el miometrio, la incorporación de BrdU no

demostró diferencias entre grupos experimentales (**Figura 26D**), mientras que en el estroma subepitelial disminuyó la actividad proliferativa en las ratas SOP (**Figura 26C**).

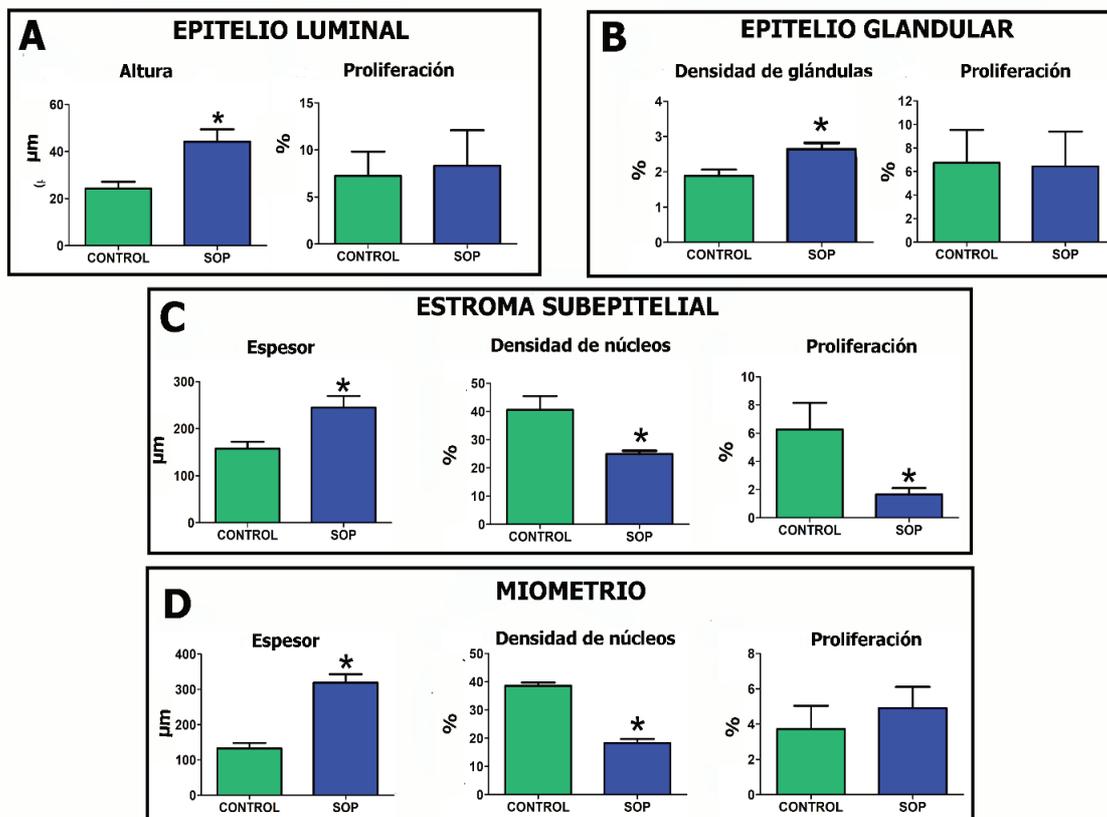


Figura 26. Cuantificación de parámetros histológicos en los compartimentos uterinos de los grupos **CONTROL** y **SOP** en **DPN41**. Cada columna representa la media \pm SEM de 9-10 ratas/grupo. Los asteriscos indican diferencias significativas (test de Mann-Whitney, * $p < 0,05$). **DPN41**: día postnatal 41.

Para determinar si los cambios en el espesor del útero estaban asociados a cambios en el espacio extracelular, evaluamos la organización de las fibras de colágeno y el contenido de agua.

1.2.2 Organización de las fibras de colágeno

Como se observa en la **Figura 27**, la organización de las fibras de colágeno, tanto en el estroma subepitelial como en el miometrio, fue mayor en ratas **SOP**. Esto lo demuestra el aumento en la birrefringencia de las fibras de colágeno en las ratas **SOP** (**Figura 27E y F**).

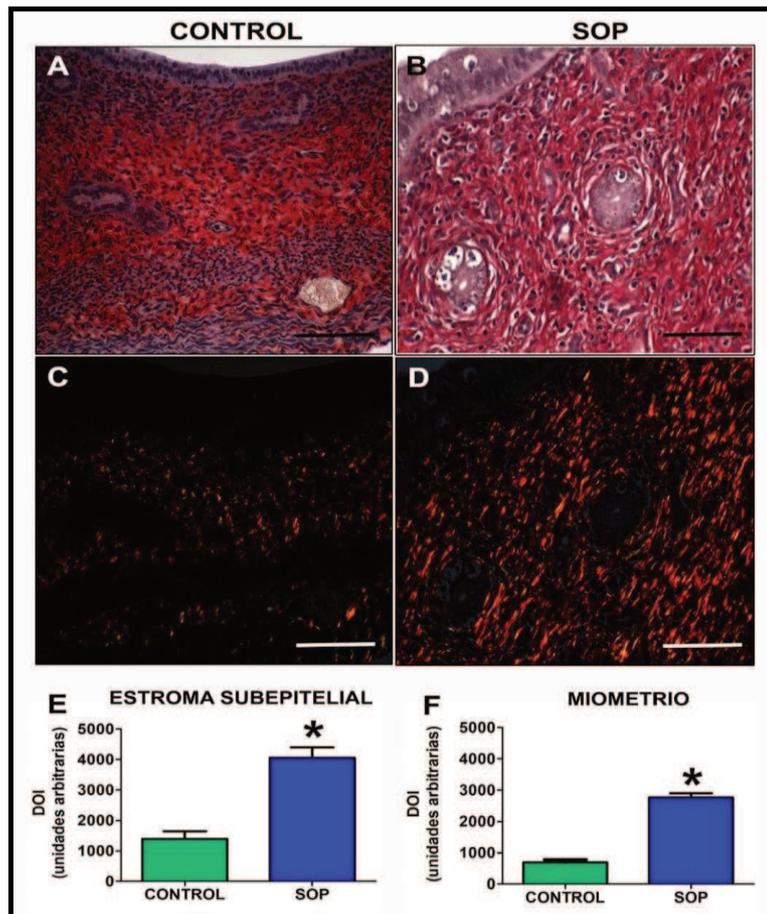


Figura 27. Efecto del SOP en la organización de las fibras de colágeno en el útero de ratas de **DPN41**. Las secciones uterinas fueron estudiadas utilizando la tinción con Picrosirius/Hematoxilina y observando las estructuras birrefringentes de las fibras de colágeno con iluminación convencional (A y B) y microscopía de polarización (C y D) en el mismo campo. Barra de escala: 50 μ m. Cuantificación de fibras de colágeno organizadas en el estroma subepitelial y miometrio (E y F). Cada columna representa la media \pm SEM de 9 a 10 ratas/grupo. Los asteriscos indican diferencias significativas (test de Mann-Whitney, * $p < 0,05$). **DPN41**, día postnatal 41.

1.2.3 Contenido de agua en el útero

Evaluamos si se modificó el espacio extracelular debido a un proceso de edematización y para esto se determinó el contenido de agua en el útero. En la **Tabla 12** muestra los valores de los pesos uterinos (mg/cm). Hubo un aumento del contenido de agua en las ratas **SOP** (**CONTROL** 9,42 + 1,87 mg/cm vs **SOP** 24,49 + 1,39 mg/cm, $p < 0,05$, test de Mann Whitney). Este parámetro fue calculado como (peso húmedo/longitud – peso seco del útero/longitud).

Tabla 12: Peso húmedo y seco del útero (mg/ cm) en ratas **CONTROL** y **SOP** de **DPN41**.

Parámetro	CONTROL	SOP
Peso húmedo	11,8 ± 1,5	30,6 ± 1,3
Peso seco	2,4 ± 0,3	6,1 ± 0,3

Los valores se expresan como media ± SEM de 6-8 ratas/grupo.

Además, se estudió la expresión de AQP como mediadores del transporte de agua dentro del útero. Demostramos que en el útero de rata se expresan varios transcritos de estas proteínas. A excepción de AQP6, AQP1-9 se detectaron en el tejido uterino. Los niveles de ARNm de AQP1, 2, 4, 5 y 9 fueron similares entre los grupos experimentales (**Figura 28**). Sin embargo, en las ratas **SOP** aumentó la expresión del ARNm de AQP3 y 8 y disminuyó la expresión del ARNm de AQP7 (**Figura 28**).

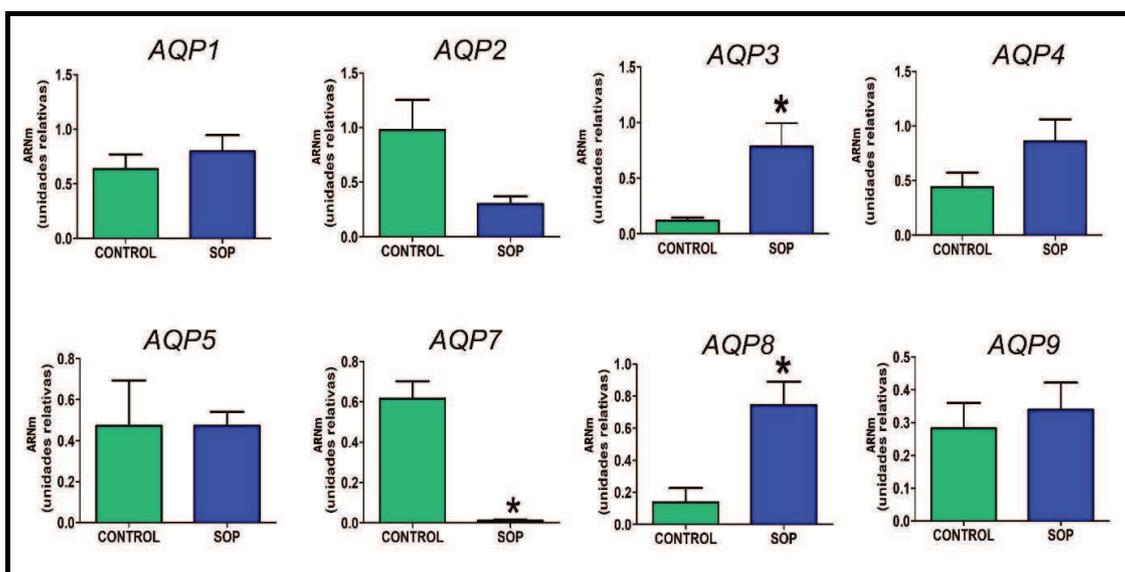


Figura 28. Expresión uterina de los ARNm de AQP1, AQP2, AQP3, AQP4, AQP5, AQP7, AQP8 y AQP9 en los grupos **CONTROL** y **SOP** de **DPN41**. Cada columna representa la media ± SEM de 9 a 10 ratas/grupo. Los asteriscos indican diferencias significativas (test de Mann-Whitney, * p<0,05). **AQP**: acuaporina; **DPN41**: día postnatal 41.

Considerando que el útero es un órgano hormonodependiente y que los procesos regulados por las hormonas esteroideas ocurren a través de la unión a sus receptores específicos, estudiamos la presencia de los RA y RE-α en el útero de los animales experimentales.

1.2.4 Receptores de hormonas esteroideas: RA y RE- α

La **Figura 28** muestra fotomicrográficas representativas de la inmunomarcación del RA en cortes histológicos de útero de ratas **CONTROL** y **SOP**. La expresión del RA se indujo después del tratamiento con DHEA. En el epitelio luminal y glandular, la proteína fue localizada principalmente en el citoplasma, mientras que en el estroma subepitelial y miometrio, la marcación fue nuclear (**Figura 28**). La expresión proteica del RE- α fue similar entre los grupos experimentales (**Tabla 13**).

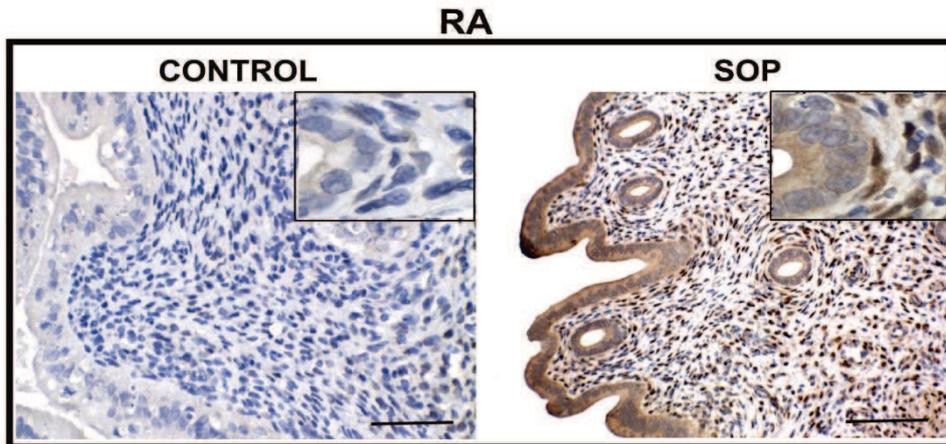


Figura 29: Expresión del RA en el útero de ratas **CONTROL** y **SOP** de **DPN41**. Fotomicrográficas representativas de secciones uterinas inmunmarcadas para el RA de los grupos **CONTROL** (A) y **SOP** (B). Barra de escala: 100 μ m. Las imágenes amplificadas muestran el patrón de marcación del RA en epitelio glandular y estroma subepitelial. RA: receptor de andrógeno. **DPN41**: día postnatal 41.

Tabla 13: Niveles de expresión del RE- α en estroma subepitelial y miometrio de útero de ratas **CONTROL** y **SOP** en **DPN41**.

Compartimento	CONTROL	SOP
Estroma subepitelial	2,0 \pm 0,6	1,4 \pm 0,3
Miometrio	0,6 \pm 0,2	0,9 \pm 0,2

Los valores se expresan como media \pm SEM de 8 ratas/grupo. Test de Mann-Whitney. La proteína se cuantificó por DOI (densidad óptica integrada). Las unidades se expresan como unidades relativas adimensionales.

Teniendo en cuenta que el SOP se presenta con exceso de niveles séricos de andrógenos y que el RA fue inducido en el útero de estos animales, nos preguntamos cuáles de los cambios observados en el útero de animales con **SOP** son mediados por los andrógenos. Para ello agregamos un grupo experimental (grupo **SOP+FLU**) en el que se estudiaron los parámetros antes descritos. Estos resultados se comentan a continuación.

1.3 Efectos de la inhibición del RA sobre el útero ratas con SOP

En ratas **SOP+FLU** se evaluaron los ciclos estrales, los niveles séricos de T y la histomorfología ovárica.

1.3.1 Ciclos estrales, histología ovárica y perfil endócrino

Las ratas de los grupos **SOP** y **SOP+FLU** no ciclaron presentando ausencia de estro y diestros prolongados con leucocitos en sus extendidos vaginales. Los niveles séricos de T fueron más altos en estos dos grupos en comparación con las ratas con vehículo (**Figura 30A**). Los ovarios de las ratas de los grupos **SOP** y **SOP+FLU** exhibieron una apariencia hinchada con folículos quísticos (**Figura 30B-C**). Estos resultados demuestran que el SOP fue inducido por el tratamiento con DHEA y que la FLU no alteró esta condición.

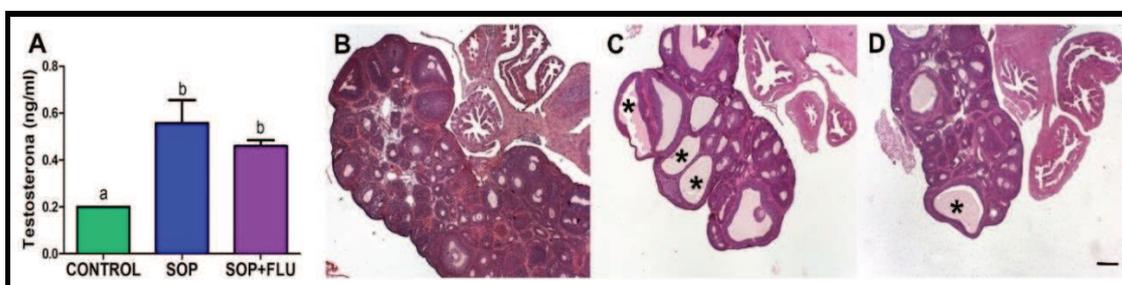


Figura 30: Niveles séricos de T e histología ovárica en ratas **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU** de **DPN41** (A). El gráfico de barras muestra los niveles séricos de T. Cada columna representa la media \pm SEM de 6-7 ratas/ grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis seguido del post-test de comparación Múltiple de Dunn). Fotomicrografías representativas de ovarios teñidos con H-E de ratas **CONTROL** (B), **SOP** (C) y **SOP+FLU** (D). Los asteriscos indican la formación de folículos quísticos. **DPN41**: día postnatal 41. Barra de escala: 200 μ m.

En la **Tabla 14** se presentan los valores séricos de E2 y P4 para todos los grupos experimentales. No hay diferencias significativas en los niveles séricos de estas hormonas entre grupos experimentales en **DPN41**.

Tabla 14: Niveles séricos de E2 y P4 en animales **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU** en **DPN41**.

Hormonas	CONTROL	SOP	SOP+FLU
E2 (pg/mL)	66 \pm 4	56,8 \pm 3,8	56,3 \pm 2,5
P4 (ng/mL)	9,9 \pm 2,1	6,9 \pm 2,3	4,4 \pm 2,4

Los valores se expresan como media \pm SEM de 8 ratas/grupos. Test de Kruskal-Wallis.

1.3.2 Histomorfología uterina

En el análisis histomorfológico observamos cambios uterinos entre los animales **SOP** y **CONTROLES** (Sección 1.2.1 de **Resultados**). Además de los parámetros previamente mencionados, se estudiaron anomalías uterinas en ratas **CONTROLES**, **SOP** y **SOP+FLU**.

1.3.2.1 Anormalidades uterinas

La histología uterina del grupo **CONTROL** mostró un epitelio luminal columnar simple, glándulas tubulares revestidas con epitelio cúbico simple, rodeadas por un estroma endometrial estratificado y dos capas típicas de miometrio (**Figura 31A**). El análisis de la histomorfología uterina de los grupos **SOP** y **SOP+FLU** demostró la presencia de diferentes lesiones: focos de endometrio con estratificación del epitelio luminal (**Figura 31B-C**), lúmenes intraepiteliales que presentaban tinción PAS positiva (**Figura 31D**), formación de glándulas intraepiteliales (**Figura 31E**) y pólipos (**Figura 31F**).

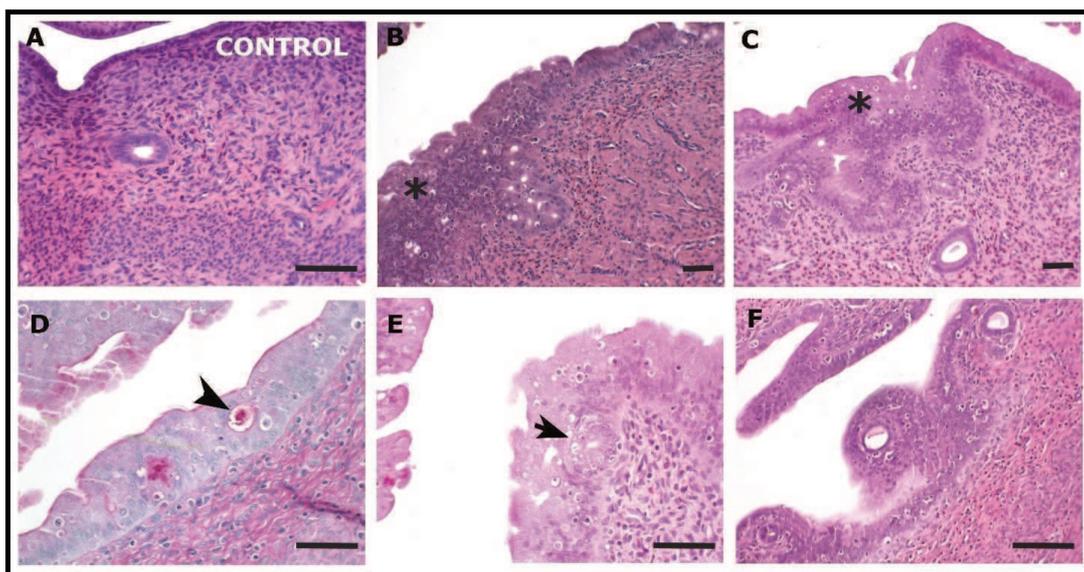


Figura 31. Anomalías en el epitelio luminal del útero de ratas **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU** de **DPN41**. Las secciones uterinas fueron teñidas con H-E (A-C) y (E-F) y con PAS (D). Se identificaron las siguientes anomalías: endometrio con focos de estratificación del epitelio luminal (asterisco, B y C), lúmenes intraepiteliales (punta de flecha, D), formación de glándulas intraepiteliales (flecha negra, E) y Pólipos (F). **DPN41**: día postnatal 41. Barra de escala: 50 μ m.

La **Tabla 16**, muestra la incidencia de anomalías en el epitelio luminal. Se observó un aumento de anomalías en el epitelio luminal en las ratas **SOP** y **SOP+FLU** respecto a los **CONTROLES**.

Tabla 16: incidencia de anomalías en el epitelio luminal uterino de ratas **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU**.

ANORMALIDADES EN EPITELIO LUMINAL			
Anormalidades	CONTROL	SOP	SOP+FLU
Anomalías en epitelio luminal [†]	2/7 (28,6%) ^a	11/11 (100%) ^b	7/8 (87,5%) ^b
Epitelio luminal estratificado	0/7 (0%) ^a	8/11 (72,7%) ^b	5/8 (62,5%) ^b
Lumen intraepitelial (PAS positivos)	0/7 (0%) ^a	8/11 (72,7%) ^b	7/8 (87,5%) ^b
Glándula intraepitelial	2/7 (28,6%) ^a	10/11 (90,9%) ^b	7/8 (87,5%) ^b
Pólipos	0/7 (0%) ^a	8/11 (72,7%) ^b	5/8 (62,5%) ^b

†: este parámetro tiene en cuenta la presencia de al menos 1 de las anomalías detalladas en la tabla. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$, Test de Fisher).

Con relación a la histología de las glándulas uterinas en el grupo **SOP** y **SOP+FLU** se observaron varias anomalías: glándulas quísticas (Figura 32B), conglomerados de glándulas (Figura 32C-D), glándulas con metaplasia (Figura 32E) y glándulas con atipia celular (Figura 32F).

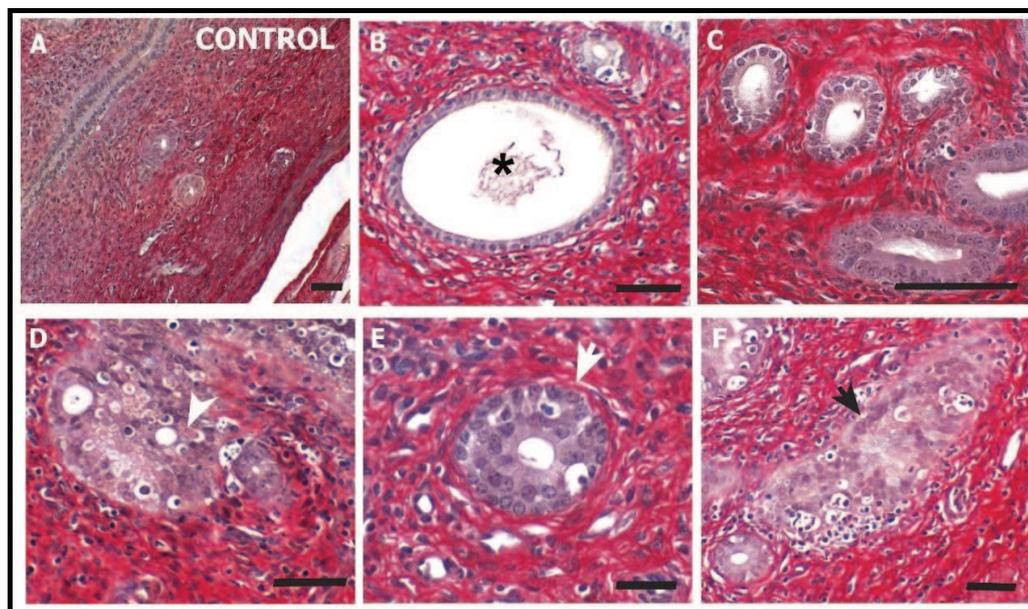


Figura 32. Anormalidades glandulares en el útero de ratas **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU** de **DPN41**. Las fotomicrografías son secciones uterinas teñidas con Pícosirius-Hematoxilina. Se identificaron las siguientes anomalías glandulares: glándulas quísticas, dilatadas y/o tortuosas (asterisco, B), conglomerados de glándulas (punta de flecha blanca C) y glándula con glándulas hijas D), glándula con metaplasia (flecha blanca, E) y glándulas con atipia celular (flecha negra, D y F). **DPN41**: día post natal 41. Barra de escala: 50 μ m.

En la **Tabla 17** se puede observar que la incidencia de anomalías glandulares fue mayor en los grupos **SOP** y **SOP+FLU**. En las ratas **SOP** y **SOP+FLU** hubo un

aumento en la incidencia de glándulas con atipia celular. Además, en el grupo **SOP+FLU** aumentó el porcentaje de glándulas quísticas con respecto al **CONTROL** sin alcanzar diferencias respecto a los animales del grupo **SOP**.

Tabla 17: Incidencia de anomalías en glándulas uterinas de ratas **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU**.

ANORMALIDADES EN EPITELIO GLANDULAR			
Anormalidades	CONTROL	SOP	SOP+FLU
Anomalías en epitelio glandular †	0/7 (0%) ^{ab}	10/11 (90,9%) ^b	8/8 (100%) ^b
Glándulas quística	0/7 (0%) ^a	5/11 (45,5%) ^{ab}	5/8 (62,5%) ^b
Conglomerados de glándulas y GGH	0/7 (0%) ^a	5/11 (45,5%) ^a	4/8 (50%) ^a
Glándulas con metaplasia	0/7 (0%) ^a	2/11 (18,2%) ^a	3/8 (37,5%) ^a
Glándulas con atipia celular	0/7 (0%) ^a	6/11 (54,5%) ^b	8/8 (100%) ^b

†: este parámetro tiene en cuenta la presencia de al menos 1 de las anomalías detalladas en la tabla. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$, Test de Fisher). **GGH**: glándulas con glándulas hijas.

1.3.2.2 Parámetros histomorfométricos

En el grupo **SOP**, la altura epitelial, la densidad glandular y el espesor del estroma subepitelial y el miometrio aumentaron, mientras que la densidad de núcleos del estroma subepitelial y miometrio disminuyeron (**Tabla 18**). Las ratas **SOP+FLU** demostraron un menor aumento del espesor miometrial respecto al grupo **SOP**.

Tabla 18: Análisis morfométrico de secciones uterinas de ratas de los grupos **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU** en **DPN41**.

Parámetro	CONTROL	SOP	SOP+FLU
Altura del epitelio luminal (μm)	21,9 \pm 2,2 ^a	44,2 \pm 5,2 ^b	8,4 \pm 3,8 ^b
Densidad de glándulas (%)	2,3 \pm 0,2 ^a	2,7 \pm 0,1 ^b	3,1 \pm 0,3 ^b
Espesor del estroma subepitelial (μm)	52,9 \pm 16,4 ^a	294,4 \pm 33,1 ^b	258,6 \pm 40,1 ^b
Espesor del miometrio (μm)	145,1 \pm 13,8 ^a	360,5 \pm 32,9 ^b	230,6 \pm 16,3 ^c
Densidad de núcleos en estroma subepitelial (%)	40,7 \pm 5,5 ^a	25,8 \pm 1,3 ^b	28,5 \pm 1,7 ^b
Densidad de núcleos en miometrio (%)	40,1 \pm 1,9 ^a	19,6 \pm 2,0 ^b	2,1 \pm 1,2 ^b

Los valores se expresan como media \pm SEM de 8 animales/grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($p \leq 0,05$, test de Kruskal-Wallis seguido de prueba de comparación múltiple de Dunn).

1.3.2.3 Estudio de la matriz extracelular

Las ratas **SOP** presentaron un aumento en la organización de las fibras de colágeno (**Figura 33D-E**) mostrando una mayor área ocupada por estructuras con alta birrefringencia en el estroma subepitelial y el miometrio (**Figura 33A-B**). Por el contrario, en el grupo **SOP+FLU** la organización de las fibras de colágeno en ambos compartimentos uterinos fue menor a la del grupo **SOP** (**Figura 33C**) y semejante a la del **CONTROL** (**Figura 33A**).

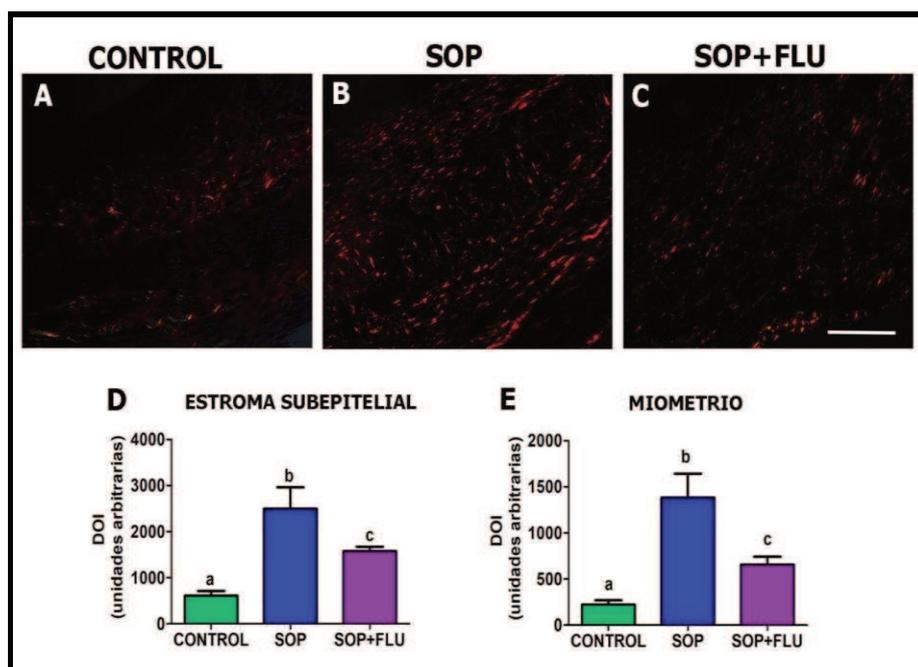


Figura 33. Efectos de la inhibición del RA sobre la organización de las fibras de colágeno en el útero de ratas de los grupos **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU** en **DPN41**. Fotomicrografías de secciones uterinas teñidas con Picosirius/Hematoxilina (A-C). Sobre estas secciones se estudió la organización de las fibras de colágeno utilizando luz polarizada. Barra de escala: 100 μ m. Cuantificación de las fibras de colágeno birrefringentes en estroma subepitelial uterino y miometrio (D-E). Cada columna representa la media \pm SEM de 5–7 ratas/grupo. Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos ($p \leq 0,05$, test de Kruskal-Wallis seguido de prueba de comparación múltiple de Dunn).

En la **Tabla 19** muestra los valores de los pesos uterinos (mg/cm). El estudio del contenido de agua uterino demostró que en los grupos **SOP** y **SOP+FLU** fue similar y mayor en comparación con el **CONTROL** (**CONTROL**: $9,17 \pm 1,43$ mg/cm, **SOP**: $24,49 \pm 1,03$ mg/cm y **SOP+FLU**: $23,65 \pm 1,21$ mg/cm, $p < 0,05$, test de Kruskal-Wallis seguido de prueba de comparación múltiple de Dunn)

Tabla 19 Peso húmedo y seco del útero (mg/ cm) de ratas **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU** en **DPN41**.

Parámetro	CONTROL	SOP	SOP+FLU
Peso húmedo	11,8 ± 1.5	30,6 ± 1.3	29,6 ± 1.4
Peso seco	2,4 ± 0,3	6,1 ± 0,3	5,9 ± 0,4

Los valores se expresan como media ± SEM de 6-8 ratas/grupo.

Previamente, habíamos demostrado que la expresión de los ARNm de las AQP 3, 7 y 8 se modificó en el útero de los animales **SOP** (**Sección 1.2.3 de Resultados**). Ahora investigamos si estos cambios en la expresión de los ARNm podrían estar mediados a través del RA y, además, estudiamos la localización celular y cuantificamos la expresión proteica de dichas AQPs.

Como habíamos mencionado, en el grupo **SOP** demostramos mayor expresión del ARNm de AQP3 y 8 y menor expresión de ARNm de AQP7 versus el **CONTROL**. Cuando se administró FLU (grupo **SOP+FLU**) la expresión del ARNm de AQP3 y AQP7 no presentó cambios respecto al grupo **SOP** (**Figura 34**). Por el contrario, la inducción en los niveles de ARNm de AQP8 en las ratas **SOP** no se evidenció en el grupo **SOP+FLU**, detectándose niveles de transcritos comparables al útero del grupo **CONTROL** (**Figura 34**).

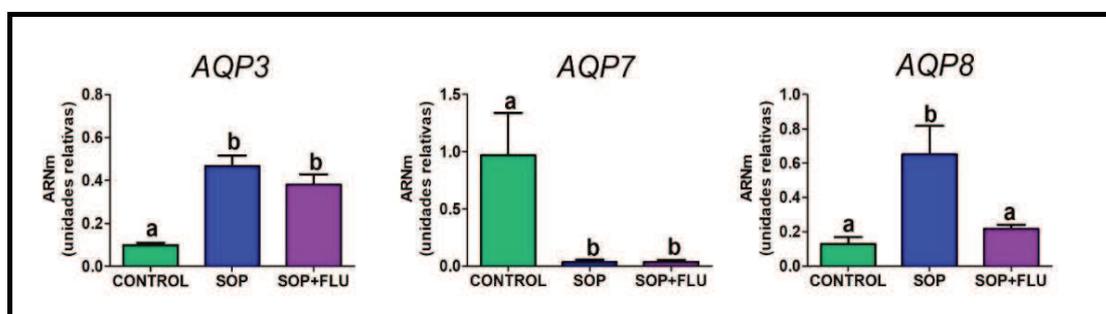


Figura 34. Cuantificación de la expresión de ARNm de AQP3, AQP7 y AQP8 en útero de ratas **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU**. Cada columna representa la media ± SEM de 5–7 ratas/grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunn).

Al estudiar la localización celular y los niveles de expresión de AQP3, 7 y 8 en todos los compartimentos uterinos, utilizando IHQ, se observó que AQP3 y AQP8 se expresaron en el epitelio luminal y glandular, estroma subepitelial y miometrio (**Figura 35A-F** y **M-R**, respectivamente), mientras que AQP7 solo se localizó en el epitelio luminal y glandular en los grupos experimentales (**Figura 35G-L**).

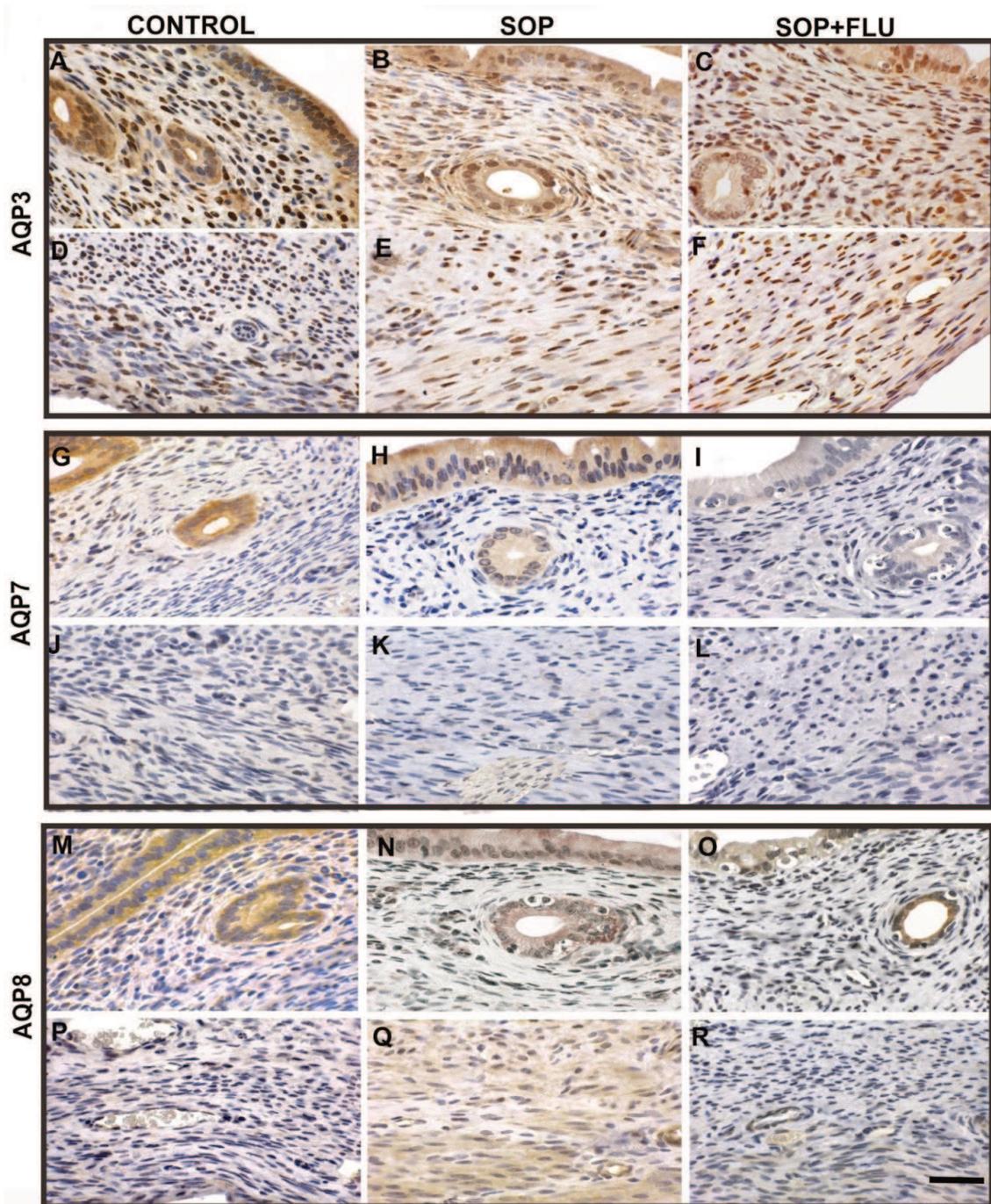


Figura 35. Expresión uterina de *AQP3*, *7* y *8* de ratas de los grupos **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU** en **DPN41**. Las fotomicrografías muestran secciones uterinas inmunomarcadas para *AQP3* (A-C), *AQP7* (G-I) y *AQP8* (M-O) en las células epiteliales y el estroma subepitelial, y para *AQP3* (D-F), *AQP7* (J-L) y *AQP8* (P-R) en el miometrio. **DPN41**: día post natal 41. Barra de escala: 50 μ m.

Cuando cuantificamos la expresión proteica demostramos que los niveles de expresión de *AQP3*, *7* y *8* disminuyó en epitelio luminal del grupo **SOP** y **SOP+FLU** en comparación al **CONTROL** (**Figura 36A, E y G**). La expresión de *AQP7* también disminuyó en epitelio glandular de ambos grupos experimentales (**SOP** y **SOP+FLU**) (**Figura 36F**).

En miometrio, previamente demostramos una inducción de la expresión de AQP8 en las ratas **SOP**, mientras que en el grupo **SOP+FLU** no se observó esa inducción (**Figura 36J**).

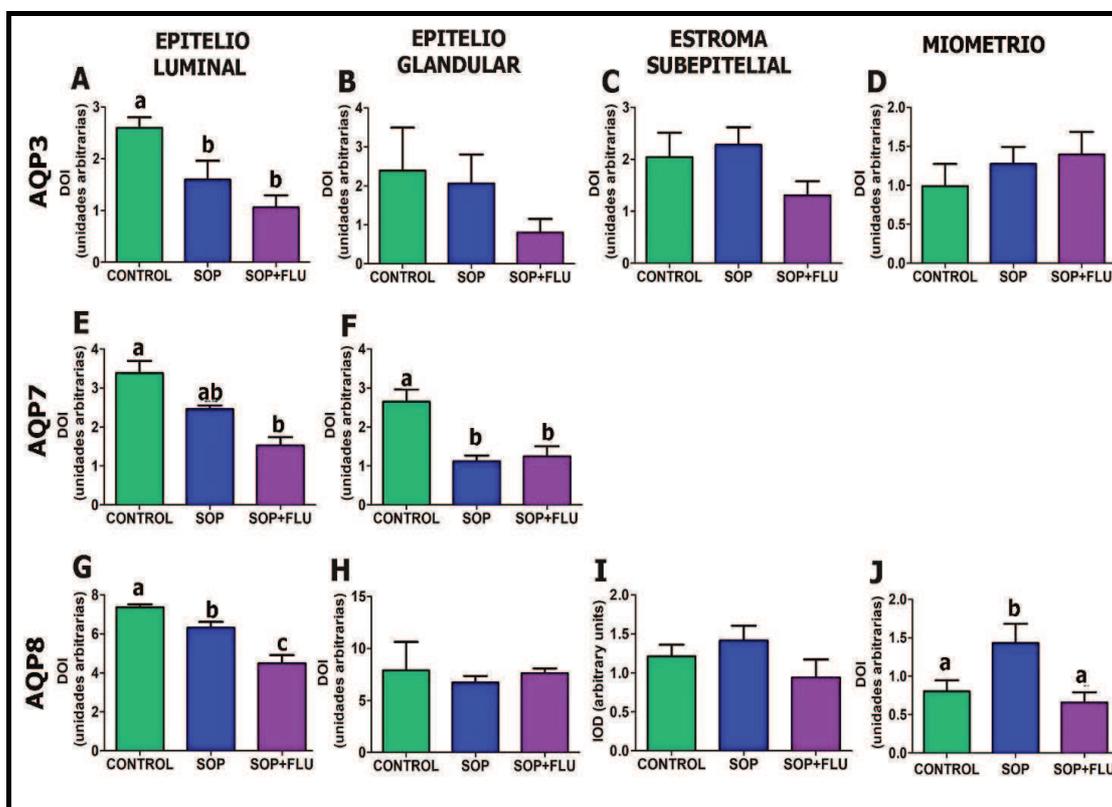


Figura 36. Cuantificación de las proteínas de AQP3, AQP7 y AQP8 en el útero de ratas **CONTROL**, **SOP** y **SOP +FLU** en **DPN41**. Cada columna representa la media \pm SEM de 5–7 ratas/grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunn). **DPN41**: día post natal 41.

1.3.3 Recambio celular, expresión de *PTEN*, *IGF-1* e *IGF-1R*

Se determinó la proliferación celular, el índice de apoptosis y la proporción proliferación/apoptosis en todos los compartimentos uterinos (**Figura 37**). En el grupo **SOP**, la proliferación celular disminuyó en el estroma subepitelial, mientras que la apoptosis aumentó en el epitelio luminal y glandular y miometrio (**Figura 37A-H**). Estos cambios dieron como resultado una menor relación proliferación/apoptosis en el epitelio glandular y estroma subepitelial (**Figura 37J-K**). En ratas del grupo **SOP+FLU**, la apoptosis no fue inducida en el miometrio (**Figura 37H**) y la proliferación celular disminuyó en dicho compartimento, dando como resultado una menor relación proliferación/apoptosis (**Figura 37L**).

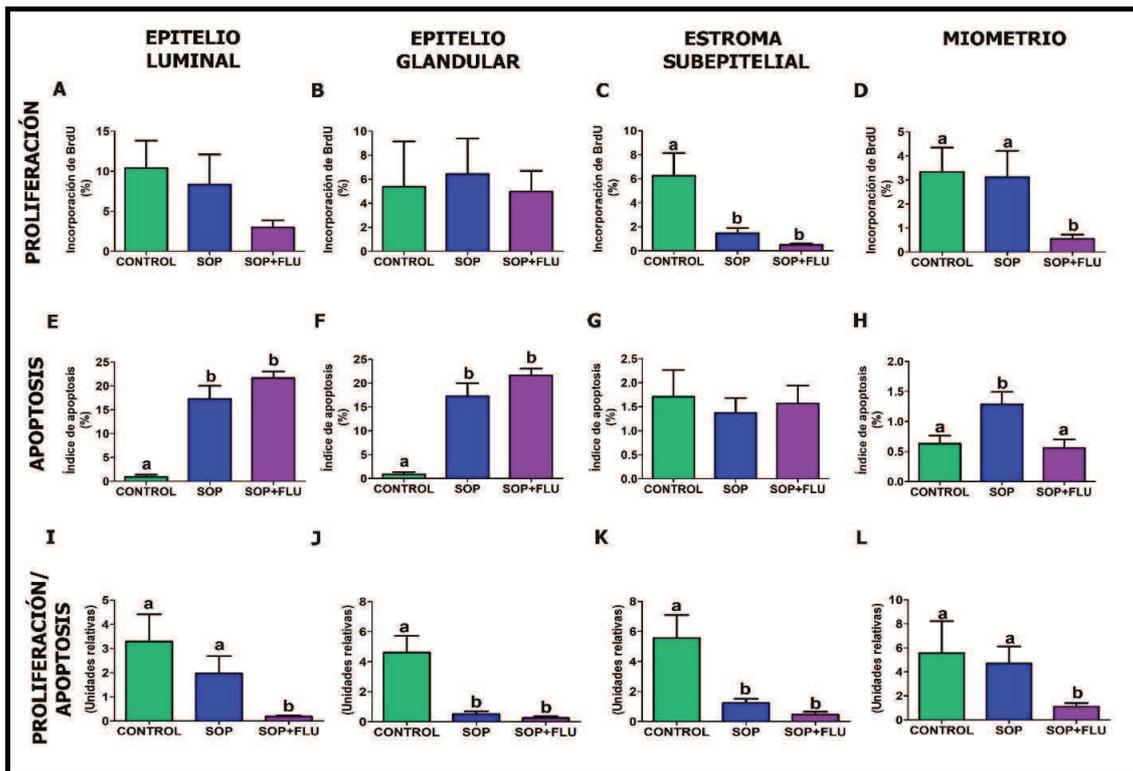


Figura 37. Cuantificación de la proliferación celular (incorporación de BrdU, A-D), índice de apoptosis (E-H) y relación proliferación/apoptosis (I-L), en todos los compartimentos uterinos de ratas **CONTROL**, **SOP** y **SOP +FLU** en **DPN41**. Cada columna representa la media \pm SEM de 5–7 ratas/grupo. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunn. **DPN41**: día post natal 41).

Para evaluar si PTEN está implicada en la regulación de la proliferación celular investigamos su expresión en todos los compartimentos uterinos. Para ello, generamos un anticuerpo policlonal anti-PTEN (como ya se mencionó en la **Sección 2.6 de Materiales y Métodos**). La caracterización del antisero se muestra en la **Figura 38A y B**. En el ensayo de Western-blot, se detectó una banda específica de 55 kDa en muestras de útero utilizando el antisero anti-PTEN (**Figura 38A**). Por IHQ se demostró inmunomarcación de PTEN en las células del estroma subepitelial y del miometrio. Esta marcación estuvo ausente cuando el suero-PTEN se pre-incubó con el péptido PTEN-GST utilizado como inmunógeno, demostrando su especificidad (**Figura 38B**).

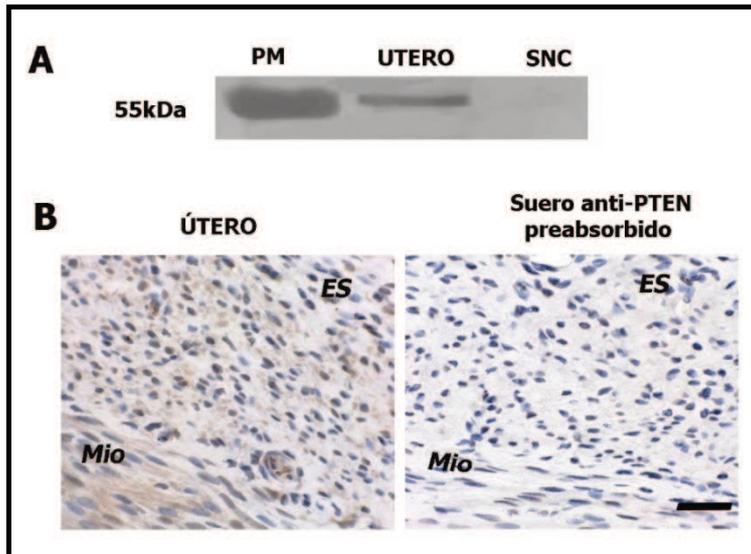


Figura 38. Caracterización del antisero-PTEN utilizando Western blot e IHQ en el útero de rata. Resultados del Western blot (A). Se detectó la proteína PTEN (55kDa), SNC: el control negativo se realizó reemplazando el anticuerpo primario con suero de conejo no inmune. La inmunorreactividad del anticuerpo se evaluó mediante IHQ en el útero (B). Fotomicrografías representativas que muestran la inmunomarcación de PTEN en estroma subepitelial y miometrio (imagen izquierda) y la ausencia de inmunotinción luego de preabsorber el antisero obtenido con el antígeno PTEN-GST (imagen derecha). Barra de escala: 50 μ m. **ES**: estroma subepitelial, **Mio**: miometrio, **PM**: patrón de peso molecular. **SNC**: suero normal de conejo. **IHQ**: inmunohistoquímica.

La cuantificación de la expresión de PTEN en el epitelio luminal, estroma subepitelial y en miometrio demostró que la proteína disminuye en las ratas **SOP**. La expresión en el epitelio glandular fue similar entre ambos grupos experimentales. En las ratas **SOP+FLU** se observaron similares resultados que el grupo **SOP** (Figura 39B).

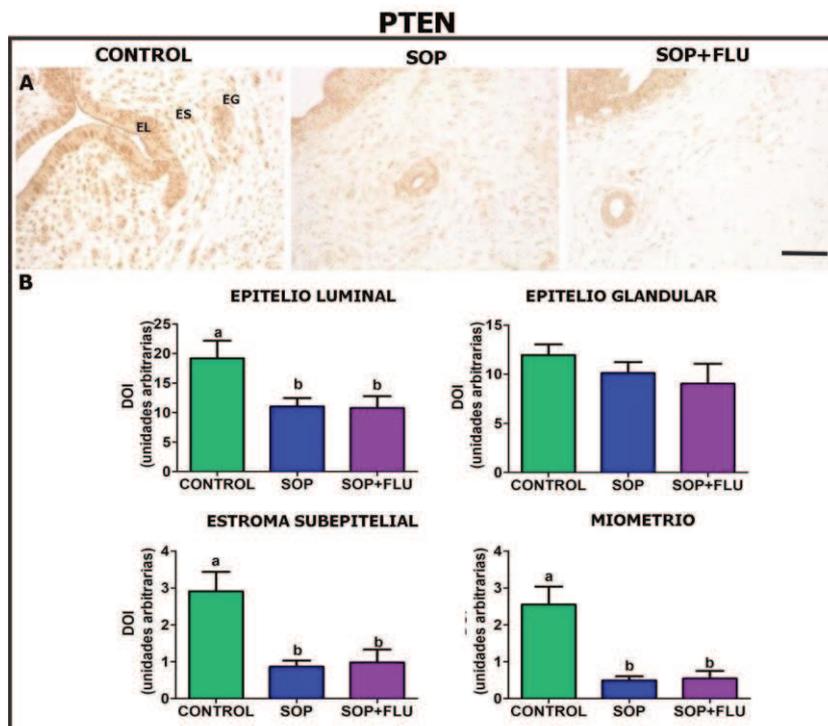


Figura 39. Expresión de PTEN en el útero de ratas de los grupos **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU** en **DPN41**. Las fotomicrografías muestran cortes uterinos inmunomarcados para PTEN. Las imágenes se obtuvieron de secciones sin contracolorar con H-E (A-C). Barra de escala: 50 μ m. Cuantificación de la expresión de PTEN en todos los compartimentos uterinos (B). Cada columna representa la media \pm SEM de 5–7 ratas/grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunn). **EL**: epitelio luminal; **ES**: estroma subepitelial; **EG**: epitelio glandular; **DPN41**: día post natal 41.

También se estudió la expresión IGF-1 y IGF-1R como posibles mediadores de la proliferación celular. La expresión del ARNm de IGF-1 fue mayor en las ratas **SOP** y **SOP+FLU**; mientras que la expresión del ARNm de IGF-1R fue mayor sólo en ratas **SOP+FLU** (**Figura 40**).

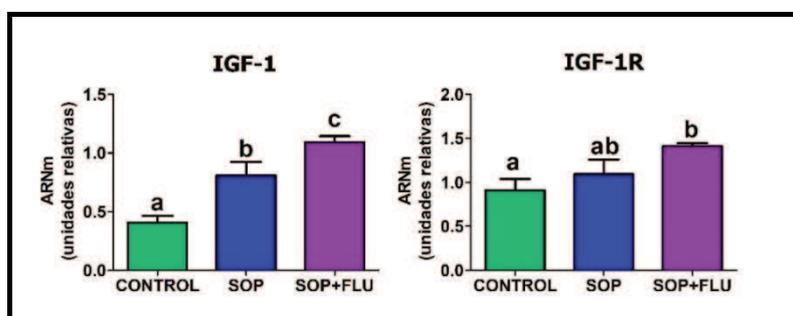


Figura 40. Cuantificación de la expresión de ARNm de IGF1 e IGF-1R en útero de ratas **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU** en **DPN41**. Cada columna representa la media \pm SEM de 5–7 ratas/grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$; ANOVA seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni). **DPN41**: día post natal 41.

1.3.4 Expresión de moléculas relacionadas con la diferenciación celular uterina

Los genes WNT5a, WNT7a, β -catenina y HOXA10 están implicados en el desarrollo del tracto reproductor femenino, así como también, en procesos de diferenciación uterina. En la **Figura 41** se resume el patrón de expresión proteica y los cambios en la expresión del ARNm de dichos genes que hemos obtenido. Las proteínas WNT5a, WNT7a y HOXA10 se expresaron en todos los compartimentos uterinos. Mientras que la expresión de β -catenina sólo se observó en la membrana celular de las células del epitelio luminal y glandular (**Figura 41I-K**).

El ARNm de WNT5a disminuyó en las ratas del grupo **SOP** y un efecto similar ocurrió en el grupo **SOP+FLU** (**Figura 41D**). La expresión de WNT7a fue similar entre los tres grupos experimentales (**Figura 41H**). Por otro lado, la expresión de β -catenina en **SOP** aumentó en comparación al grupo **CONTROL**; sin embargo, en el grupo **SOP+FLU** no hubo diferencias en la expresión de β -catenina respecto a los otros grupos. Respecto a la expresión de HOXA10, se puede observar que en las ratas del grupo **SOP**, fue

similar al grupo **CONTROL**. Sin embargo, en el grupo **SOP+FLU** ocurrió una disminución del HOXA10 respecto a los otros grupos experimentales (**Figura 41P**).

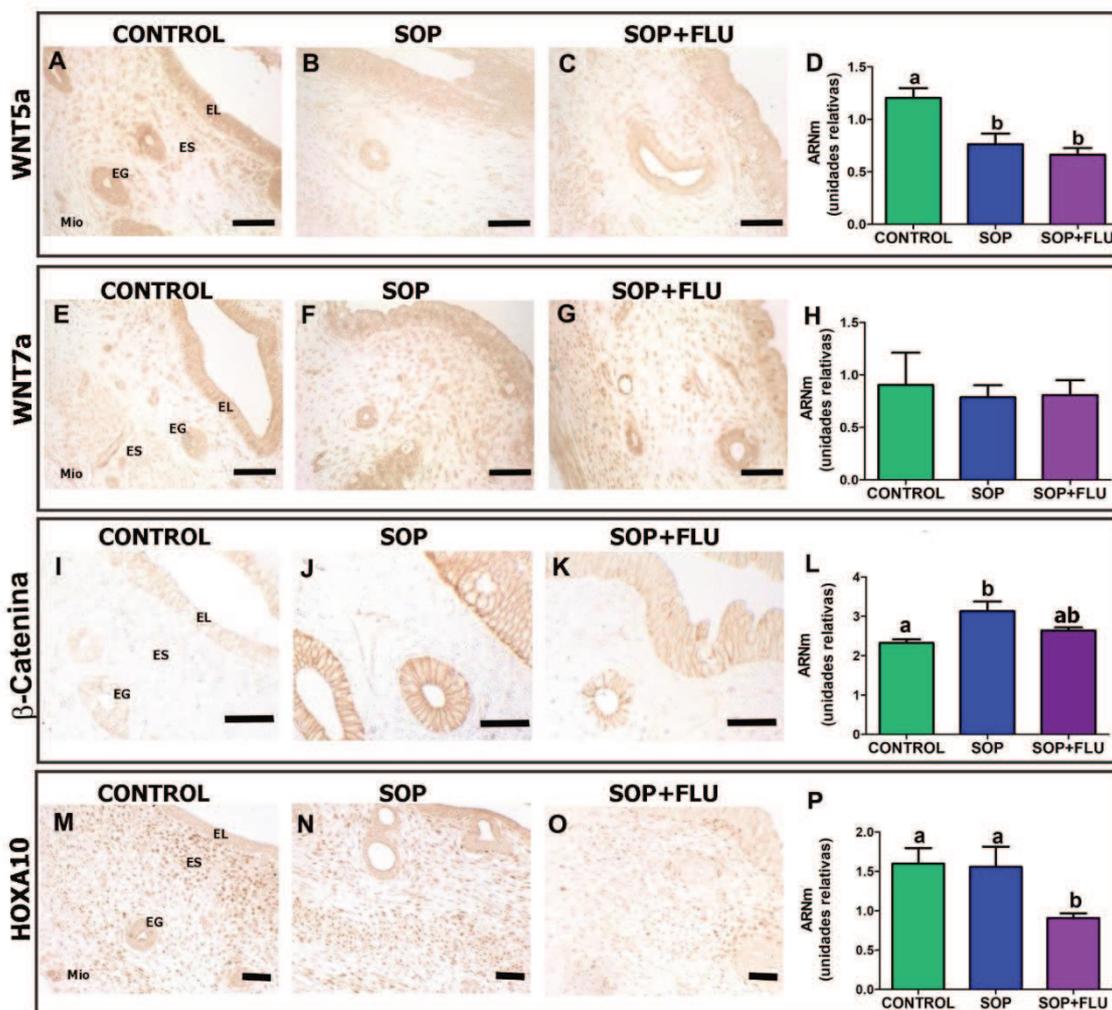


Figura 41: Expresión de WNT5a, 7a, β -catenina y HOXA10 en el útero de ratas pertenecientes a los grupos **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU** en **DPN41**. Las fotomicrografías muestran secciones uterinas inmunomarcadas para (A-C) WNT5a, (E-G) WNT7a, (I-K) β -catenina y (M-O) HOXA10 en ratas **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU**. Las imágenes se obtuvieron de secciones sin contracolorar con H-E. Barra de escala: 50 μ m. **EL**: epitelio luminal, **EG**: epitelio glandular, **ES**: estroma subepitelial y **Mio**: miometrio. Cuantificación de la expresión del ARNm de las moléculas estudiadas (D, H, L y P). Cada columna representa la media \pm SEM de 5-7 ratas/grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunn). **DPN41**: día post natal 41.

1.3.5 Enzimas involucradas en el metabolismo de esteroides

En el tejido uterino podría existir un desbalance en los niveles de hormonas esteroideas en las ratas **SOP**, debido a modificaciones en la expresión de enzimas esteroideogénicas. Para evaluar el estado endócrino a nivel tisular, se estudió la expresión de las enzimas implicadas en la esteroideogénesis uterina. Los transcritos de: StAR, 3 α -HSD, 3 β -HSD1,2,3 y 5 y 3 β -HSD7, 5 α -R1, P450arom, P450(2d4), 17 β -HSD1, 17 β -HSD2, 17 β -HSD3 y 17 β -HSD4 y STS mostraron niveles detectables y

cuantificables en todos los grupos experimentales, mientras que fue indetectable la expresión de 5 α -R2 y P450(17 α) (**Figura 42**). La expresión de StAR disminuyó en las ratas **SOP** como en las **SOP+FLU**. En los animales del grupo **SOP**, se observó un aumento de la expresión de P450arom, 17 β -HSD2 y 5 α -R1 mientras que en los animales del grupo **SOP+FLU** no se observó el aumento de P450arom (**Figura 42**).

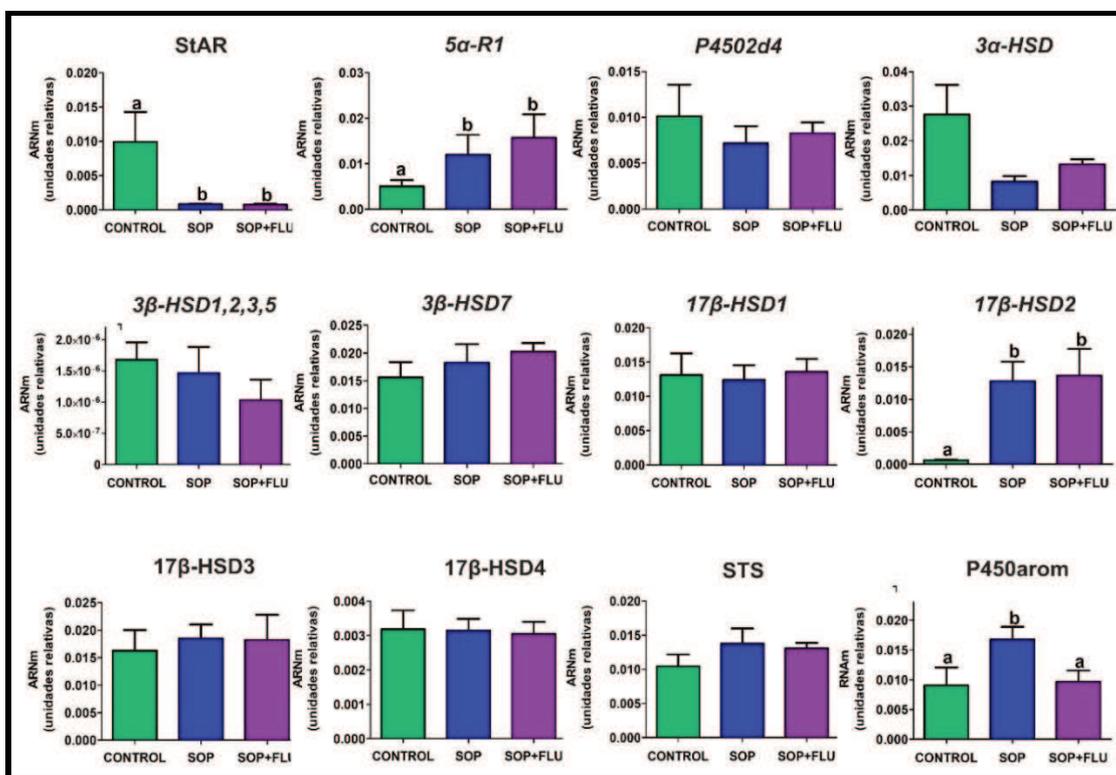


Figura 42. Cuantificación del ARNm de enzimas esteroidogénicas en útero de ratas **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU** en **DPN41**. Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunn). Los valores fueron representados como la media \pm SEM de 5-7 ratas/grupo. **DPN41**: día post natal 41.

Debido a que el ARNm de la enzima P450arom se modificó en los animales SOP, pero no en los animales **SOP+FLU**, evaluamos la presencia de la proteína por IHQ. Se observó inmunomarcación en epitelio luminal, epitelio glandular, miometrio, y en menor medida en el estroma subepitelial uterino (**Figura 43**).

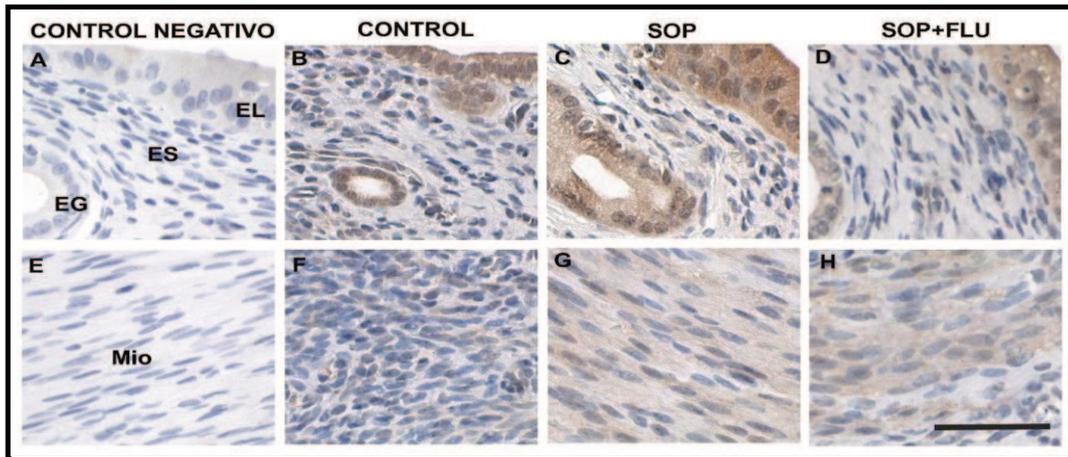


Figura 43. Expresión de P450arom en el útero de ratas de los grupos **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU** en **DPN41**. Fotomicrografías representativas de secciones uterinas mostrando la inmunomarcación de P450arom en epitelio luminal (**EL**) y glandular (**EG**), estroma subepitelial (**ES**) (A-D) y miometrio (**Mio**) (E-H). Barra de escala 50 μ m. **DPN41**: día post natal 41.

En la **Figura 44** se muestran los resultados de la expresión de P450arom en los compartimentos uterinos. En ratas **SOP**, la expresión de P450arom aumentó en el epitelio luminal, mientras que en los animales tratados con el antagonista del RA hubo cantidades similares al grupo **CONTROL**. En el epitelio glandular de las ratas **SOP+FLU**, la expresión de P450arom uterina disminuyó en comparación con las ratas **SOP** (**Figura 43**). La expresión de P450arom en el estroma subepitelial fue similar entre los grupos experimentales. En el miometrio, se observa un aumento de la expresión de dicha enzima en el grupo **SOP** pero que no fue estadísticamente significativa.

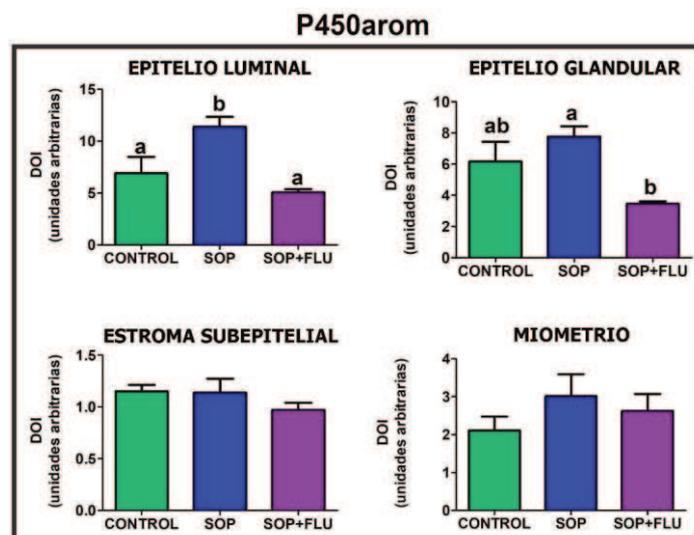


Figura 44. Cuantificación de P450arom en epitelio luminal y glandular, estroma subepitelial y miometrio en los grupos **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU** en **DPN41**. Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunn). Los valores fueron representados como la media \pm SEM de 5-7 ratas/grupo. **DPN41**: día post natal 41.

1.3.6 Receptores de hormonas esteroideas: RE- α , RA y RP

La expresión proteica del RP fue similar entre los grupos experimentales, tanto en el estroma subepitelial (**CONTROL**: $0,39 \pm 0,09$, **SOP**: $0,52 \pm 0,12$ vs **SOP+FLU**: $0,33 \pm 0,09$) como en el miometrio (**CONTROL**: $0,50 \pm 0,21$, **SOP**: $0,70 \pm 0,15$ vs **SOP+FLU**: $0,49 \pm 0,11$).

La expresión de ARNm del RE- α también fue similar entre los grupos experimentales (**Figura 45A**). La expresión de la proteica del RE- α fue similar entre las ratas de los grupos **CONTROL** y **SOP** disminuyó en el grupo **SOP+FLU** tanto en el estroma subepitelial como en el miometrio (**Figura 45B-C**).

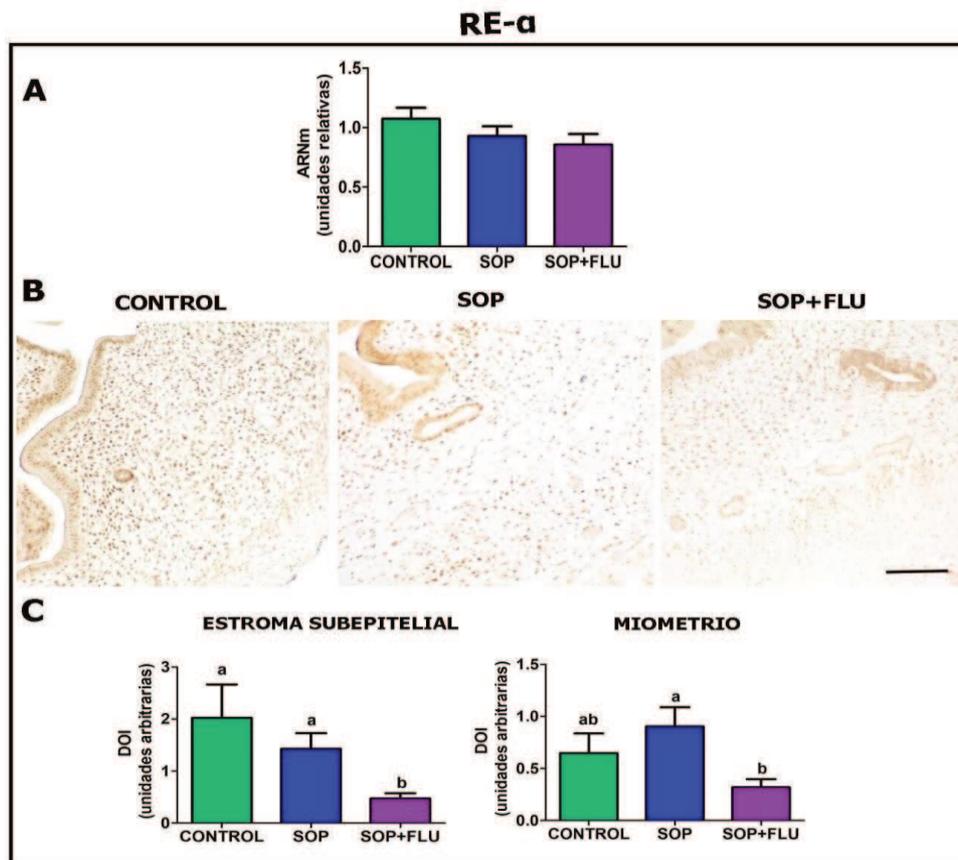


Figura 45. Expresión de RE- α en el útero de ratas de los grupos **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU** en **DPN41**. Cuantificación de la expresión del ARNm de RE- α en los grupos **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU** (A). Fotomicrografías de secciones uterinas inmunomarcadas para RE- α (B). Las imágenes se obtuvieron de secciones uterinas sin contracolorar con H-E. Cuantificación de la expresión proteica del RE- α en el estroma subepitelial y miometrio de ratas **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU** de **DPN41** (C).) Cada columna representa la media \pm SEM de 7–8 ratas/grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunn). **DPN41**: día post natal 41. Barra de escala: 100 μ m.

Por otro lado, la expresión del ARNm del RA fue mayor en el grupo **SOP** en comparación al **CONTROL**. En el grupo **SOP+FLU** la expresión de este mensajero fue similar al **CONTROL** (**Figura 46A**).

Al analizar la expresión de la proteína, observamos que en el estroma subepitelial, la expresión del RA fue similar al del ARNm (**Figura 45C**). En el miometrio, las ratas **SOP** demostraron mayor expresión proteica del RA (**Figura 46C**), mientras que en el grupo **SOP+FLU** no se obtuvieron diferencias significativas respecto a los otros dos grupos.

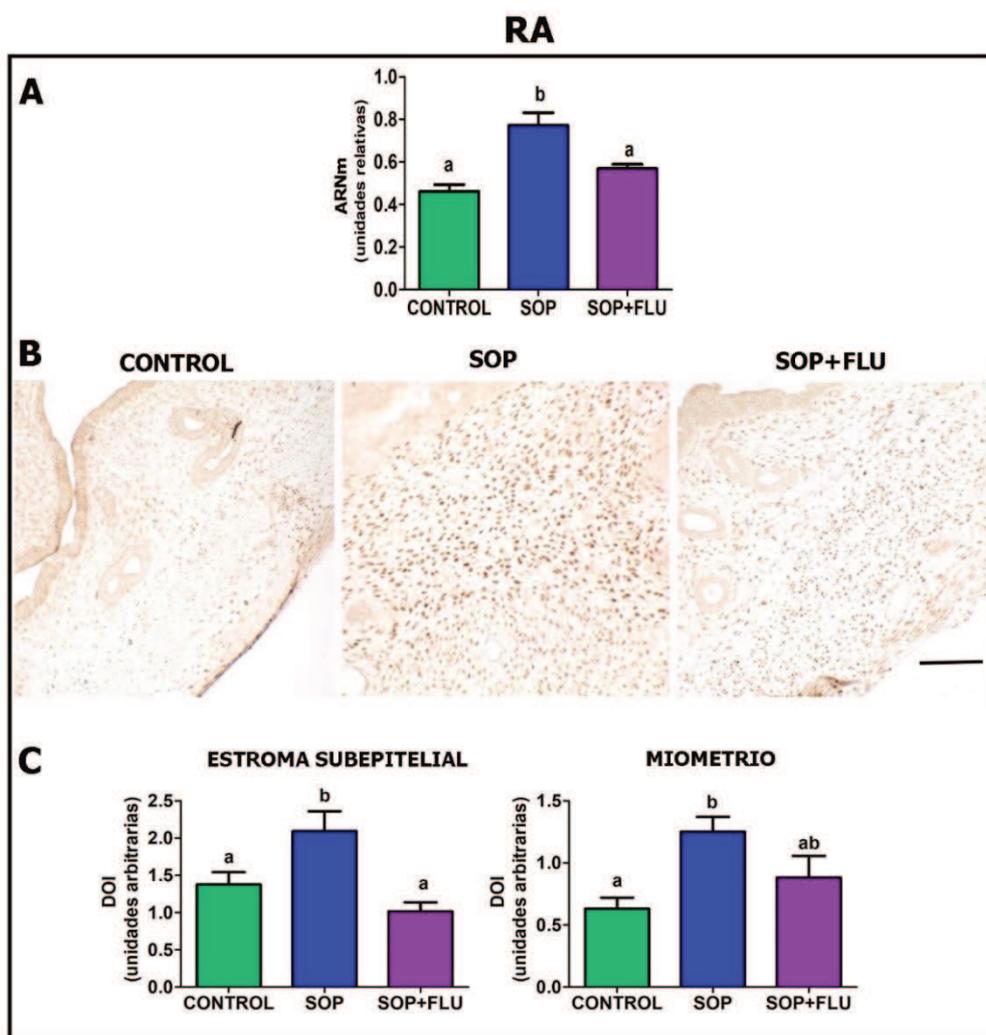


Figura 46. Expresión de RA en el útero de ratas de los grupos **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU** en **DPN41**. Cuantificación de la expresión de RA en animales de los grupos **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU** (A). Cada columna representa la media \pm SEM de 5–7 ratas/grupo. Fotomicrografías de secciones uterinas inmunomarcadas para RA (B). Las imágenes se obtuvieron de secciones uterinas sin contracolorar con H-E. Cuantificación de la expresión proteica del RA en el estroma subepitelial y miometrio en los grupos **CONTROL**, **SOP** y **SOP+FLU** de **DPN41** (C). Cada columna representa la media \pm SEM de 7–8 ratas/grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunn). **DPN41**: día post natal 41. Barra de escala: 100 μ m.

2. SOP E HISTO-FUNCIONALIDAD UTERINA A LARGO PLAZO

2.1. Fertilidad de la rata en DG18

La eficiencia reproductiva de las hembras **SOP** fue evaluada mediante la determinación del número de sitios de implantación, de reabsorciones fetales, ovocitos ovulados (cuerpos lúteos, CL) y el porcentaje de hembras preñadas al **DG18**. En la **Figura 47** se resumen estos resultados, no observándose cambios en los grupos estudiados.

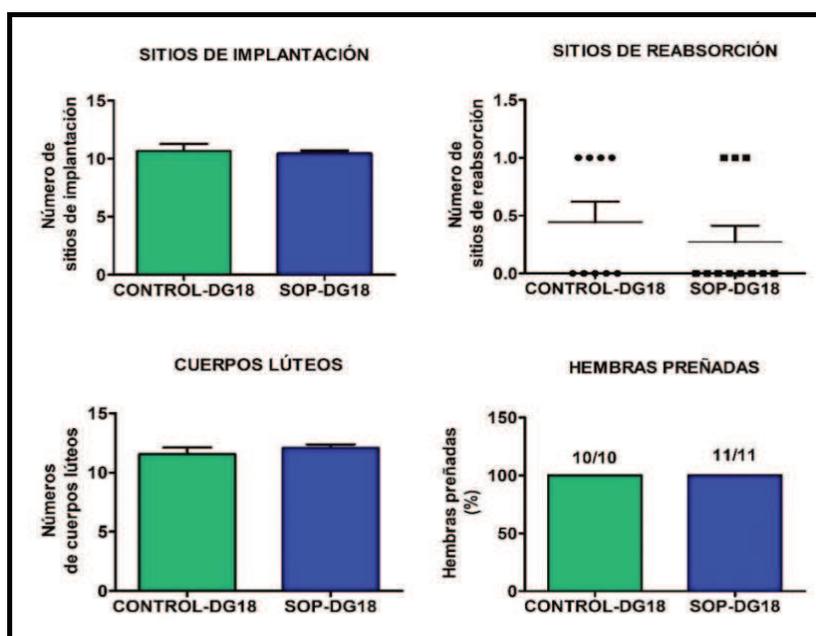


Figura 47. Efecto del SOP sobre la eficiencia reproductiva de ratas **CONTROL-DG18** y **SOP-DG18**. Cada columna representa la media \pm SEM de 10-11 ratas/grupo; (* $p < 0.05$, prueba U de Mann-Whitney o test de Fisher). **DG**: día gestacional.

2.2. Anomalías uterinas

2.2.1 Perfil hormonal de rata hembra de 18-24 meses

La **Tabla 20** muestra los valores de hormonas esteroideas séricas. En el 77.8% de las ratas **CONTROL-AM** se pudieron determinar valores de E2, mientras que en **SOP-AM** fue el 100% y, además, presentaron valores más altos. La P4 fue detectable en el 100% de las ratas **CONTROL-AM** y **SOP-AM**; sin mostrar diferencias. En cuanto a los niveles séricos de T, un 33,3 y 11,1% de los animales del grupo **CONTROL-AM** y **SOP-AM** tuvieron valores detectables y estos fueron similares.

Tabla 20: Hormonas esteroideas séricas en **CONTROL-AM** y **SOP-AM** con SOP durante la etapa peripuberal.

HORMONA	LD	nº de muestras detectables/ nº total de muestras (%)			
		Media ± SEM			
		CONTROL-AM	SOP-AM	CONTROL-AM	SOP-AM
E2 (pg/mL)	5 pg/mL	7/9 (77,8%)	9/9 (100%)	10,7 ± 2,7	17,6 ± 1,9 *
P4 (ng/mL)	0,03 ng/mL	9/9 (100%)	9/9 (100%)	33,1 ± 9,2	29,4 ± 9,5
T (ng/mL)	0,025 ng/mL	3/9 (33,3%)	1/9(11,1%)	0,04 ± 0,01	0,03

LD: límite de detección; comparado respecto al grupo **CONTROL-AM**. Para analizar el % de muestras detectables se utilizó el test de la probabilidad exacta de Fisher. *: indica diferencia significativa, $p < 0,05$. Para los valores séricos de E2 y P4 se utilizó la prueba U de Mann-Whitney de 9 ratas/grupo).

2.2.2 Evaluación histológica del tejido uterino en rata adulta mayor

El seguimiento de los ciclos estrales de estas hembras (18-24 meses), demostró que al sacrificio estaban en diestro vaginal. Esto fue evidenciado por la visualización de abundante cantidad de leucocitos en los extendidos vaginales.

Al analizar la histología uterina, el epitelio luminal de **CONTROL-AM** y **SOP-AM** presentaba características propias de falta de estimulación esteroidea; es decir un epitelio simple cilíndrico simple, en algunos casos con células cúbicas (**Figura 47A**). También se observaron algunas alteraciones como: epitelio con estructura papilar (**Figura 47B**), lúmenes intraepiteliales (**Figura 47C**) con marcación PAS positivo, glándulas intraepiteliales (**Figura 47D**), zonas con epitelio luminal estratificado (**Figura 47E**) y pólipos (**Figura 47F**).

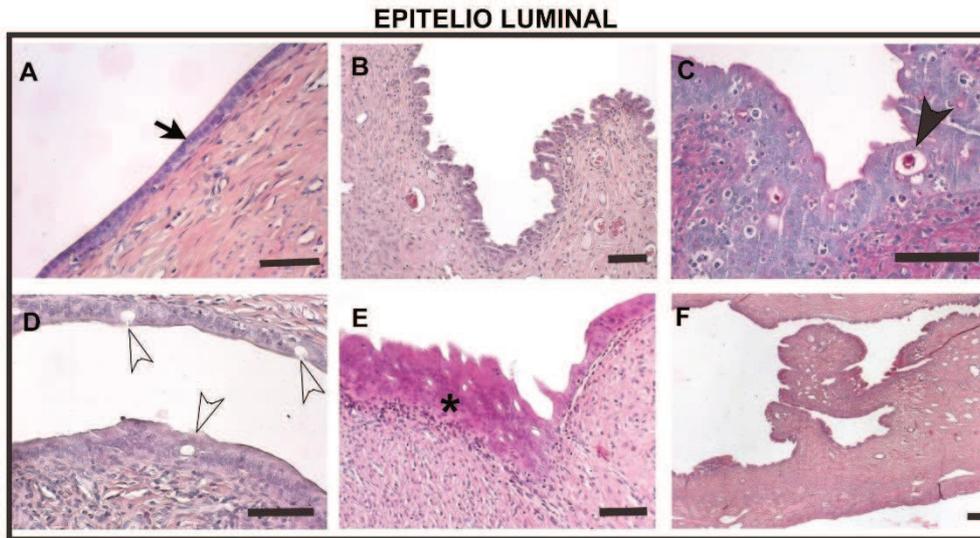


Figura 47. Anormalidades encontradas en el epitelio luminal uterino de ratas de los grupos **CONTROL-AM** y **SOP-AM**. Las fotomicrografías muestran secciones uterinas teñidas con H-E y PAS. A) Epitelio luminal de un animal control (asterisco). Se identificaron las siguientes alteraciones en el epitelio luminal: Epitelio papilar (B), lúmen intraepitelial que muestran marcación PAS positivo (punta de flecha negra, C), D) glándula intraepitelial (punta de flecha blanca), epitelio luminal estratificado (E) y Pólipo (F). Barra de escala: 50 μ m.

Cuando se analizó el compartimento glandular también se observaron alteraciones: conglomerados de glándulas (**Figura 48B**), glándulas con glándulas hijas, **Figura 48F-C**), glándulas con alteraciones celulares (núcleos hipocrómicos (**Figura 48D**) / núcleos hiperocrómicos (**Figura 48E**) y atipia (**Figura 48F**)), glándulas con metaplasia (**Figura 48G**), glándulas quísticas (**Figura 47G**) y glándulas vacuoladas (**Figura 47I**), presentando un epitelio simple, núcleos bien marcados y vacuolas citoplasmáticas.

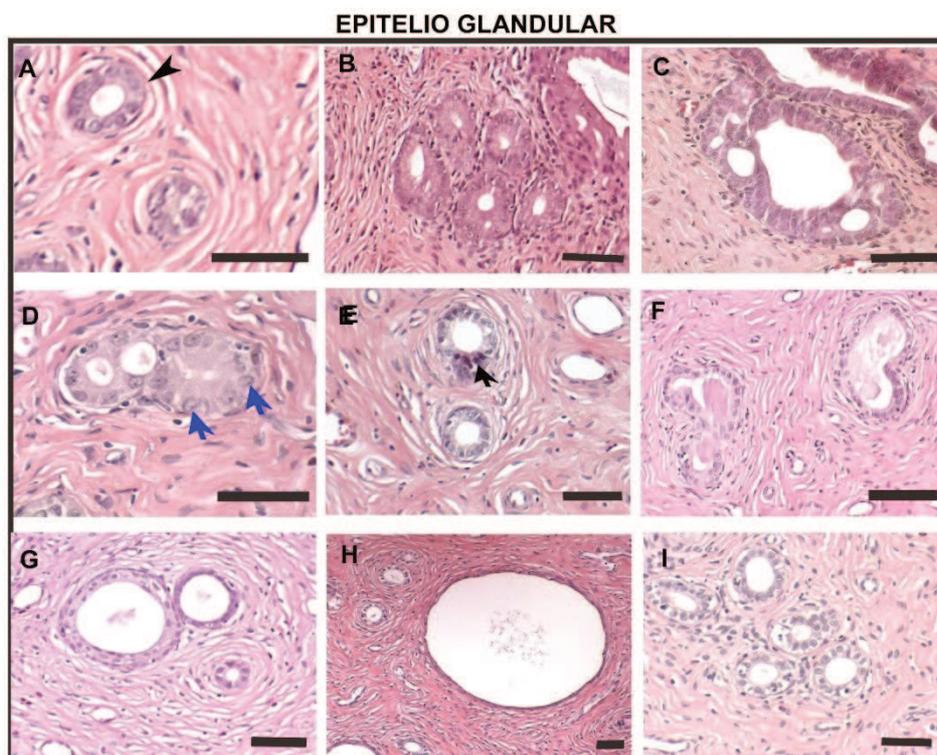


Figura 48. Anormalidades glandulares en el útero de ratas **CONTROL-AM** y **SOP-AM** a los cuales se les indujo el SOP durante la etapa peripuberal. Las fotomicrografías muestran secciones uterinas teñidos H-E: glándula normal (punta de flecha negra, A). Se identificaron las siguientes anormalidades glandulares: conglomerados de glándulas (I y B), glándulas con glándulas hijas (C y D), glándulas con alteraciones celulares: núcleos hipocrómicos (flechas azules, D), núcleo hiperocrómico (flechas negras, E) y con atipia (F), respectivamente; glándula con metaplasia (G), glándulas quísticas (H), glándulas vacuoladas (I). Barra de escala: 50 µm.

En el epitelio luminal la incidencia de lúmenes intraepiteliales, glándulas intraepiteliales y focos hiperplásicos fue mayor en los animales **SOP-AM** (Tabla 21). La incidencia de epitelio papilar y pólipos fue similar en ambos grupos. En el epitelio glandular las glándulas vacuolares fueron menor que en los animales **SOP-AM**. En cambio, la incidencia de glándulas con metaplasia, glándulas con glándulas hijas, conglomerados, glándulas quísticas y glándulas con atipia fue similar entre ambos grupos.

Tabla 21. Efectos del SOP a largo plazo sobre el útero.

ALTERACIONES EN EPITELIO LUMINAL		
Anormalidades	CONTROL-AM	SOP-AM
Epitelio papilar	1/13 (7,7 %)	2/15(13,3 %)
Pólipos	5/13 (38,5 %)	4/15 (26,6 %)
Lúmen intraepitelial	0/13 (0 %)	6/15 (40,0%) *
Glándulas intraepiteliales	2/13 (15,4 %)	10/15 (66,7 %) *
Epitelio luminal estratificado	1/13 (7,7 %)	8/15 (53,3 %) *
ALTERACIONES EN EPITELIO GLANDULAR		
Metaplasia	13/13 (100 %)	15/15 (100 %)
GGH	10/13 (76,9 %)	13/15 (86,7 %)
Conglomerados	13 /13 (100 %)	15/15 (100 %)
Glándulas quísticas	12/13 (92,3 %)	13/15 (86,7 %)
Glándulas con atipia y/o otras alteraciones	11/12 (91, 7 %)	13/15 (86,7 %)
Glándulas vacuoladas	12/13 (92,3 %)	6/15 (40 %) *

Los resultados son expresados como número de ratas afectadas con una determinada alteración relativizado con el total de ratas por grupo. Entre paréntesis se indica el porcentaje de animales que presentó cada lesión epitelial. * indica diferencia significativa respecto al grupo **CONTROL-AM** (*, p<0,05, Test de Fisher de 12-15 ratas/ grupo. **AM**: animal adulto mayor; **GGH**: glándulas con glándulas hijas.

V- DISCUSIÓN

1. EFECTOS DEL SOP EN EL ÚTERO

En el presente trabajo de tesis doctoral, se desarrolló un modelo experimental de rata para inducir el ambiente hiperandrogenizado que caracteriza al SOP e investigar sus efectos en el útero. Además, se utilizó este modelo de SOP junto con la administración de FLU (antagonista del RA). para conocer cuáles de los efectos son mediados a través del RA.

Los resultados obtenidos demostraron que el SOP fue inducido con éxito en los grupos **SOP** y **SOP+FLU**. Ambos grupos presentaron niveles séricos altos de T y quistes foliculares en los ovarios. Las ratas fueron estudiadas alrededor del **DPN41** siendo tomadas las muestras en el diestro vaginal. Los niveles de P4 en todos los grupos experimentales fueron similares a los **CONTROLES**, posiblemente debido a la gran dispersión de los valores obtenidos. Los animales **SOP** y **SOP+FLU** no presentaron ciclicidad estral lo que podría sugerir una ovulación alterada, siendo ésta otra característica del síndrome. A pesar de observarse quistes foliculares en el ovario, los niveles séricos de E2 fueron similares entre los grupos experimentales, siendo la hiperandrogenemia la principal modificación hormonal a nivel sistémico.

Cuando se analizó la histomorfología uterina se observó una mayor incidencia de anomalías en el epitelio luminal y glandular. En el epitelio luminal demostramos diferentes tipos de anomalías: estratificación del epitelio luminal, presencia de lúmenes intraepiteliales, glándulas intraepiteliales y pólipos. Los focos de estratificación epitelial se asocian con una hiperplasia epitelial, ya que se pueden observar más de una capa de células. Incluso se han identificado glándulas dentro de este compartimento epitelial. Los lúmenes intraepiteliales, otra anomalía descrita en los animales con SOP, fue previamente demostrada en ratas tratadas con andrógenos aromatizables (Demacopulo & Kreimann, 2019; Mobini Far et al., 2007). Demacopulo and Kreimann (2019) demostraron que estos lúmenes se asociaron con un aumento de la expresión de una proteína denominada Ezrin en las células que delimitaban los lúmenes. Esta proteína es esencial en la determinación de la forma, polaridad, adhesión, motilidad y transducción de señales celulares (Ren et al., 2009). Se ha descrito que interviene en la progresión y metástasis de tumores hormonodependientes de cuello uterino, próstata y mama (Xi & Tang, 2020), (Chuan et al., 2006). En el epitelio glandular las anomalías observadas fueron: glándulas quísticas, glándulas con metaplasia y con atipias celulares, conglomerados de glándulas y glándulas con glándulas hijas. Las glándulas quísticas son consideradas lesiones benignas mientras que el resto de las estructuras se las ha considerado como lesiones pre-neoplásicas (Dixon et al., 2014). Estas anomalías glandulares han sido descritas en animales adultos (mayores de 1 año de edad) y su incidencia aumentó

cuando animales adultos normales recibieron un tratamiento con E2 (Vigizzi et al., 2015). En conjunto, las hiperplasias epiteliales sumado a la formación de lúmenes intraepiteliales y las lesiones glandulares que hemos observado aportan evidencias del mayor riesgo de desarrollar neoplasias endometriales en las mujeres con SOP.

Estudios previos han demostrado que los andrógenos promueven el crecimiento y la diferenciación uterina en roedores (J. P. Choi et al., 2015; Nantermet et al., 2005). Utilizando diferentes modelos animales se observó que el tratamiento con andrógenos (aromatizables y no aromatizables) aumentó el peso uterino, el área endometrial y área miometrial acompañado por una disminución en la densidad de células (J. P. Choi et al., 2015; Nantermet et al., 2005; Simitsidellis et al., 2016). Además, ratones hembra deficientes del RA poseen el área uterina total más delgadas en comparación con los ratones control (J. P. Choi et al., 2015; Walters et al., 2009). Estos resultados indican que los andrógenos promueven el crecimiento uterino a través del RA. De acuerdo con estos antecedentes, en el presente trabajo observamos en los animales con **SOP** un aumento de la altura del epitelio luminal, de la densidad de glándulas y del espesor del estroma subepitelial y miometrial, en asociación con una disminución de la densidad celular en ambos compartimientos del estroma uterino. Cuando analizamos si estos efectos eran mediados por el RA, demostramos que el cambio en el espesor del miometrio fue regulado por este receptor. Además, este resultado sugiere que la vía mediada por el RA regula diferencialmente los compartimientos estromales del útero.

Debido a que los animales con SOP presentaban un mayor espesor del estroma uterino y una disminución de la densidad celular, estudiamos el espacio extracelular. Demostramos que los animales **SOP** presentaban una mayor organización de las fibras de colágeno tanto en el estroma subepitelial como miometrial, evidenciando cambios en la matriz extracelular. Este efecto sería mediado por el RA ya que el aumento de la organización del colágeno fue menor en los animales con **SOP+FLU**. Estudios previos han demostrado que las hormonas esteroideas modifican la síntesis, degradación y organización estructural de las moléculas de colágeno (Koob & Jeffrey, 1974; Pastore et al., 1992; Takamoto et al., 1998). En coincidencia con nuestros resultados, se demostró que en el estroma uterino de ratas androgenizadas aumentó la cantidad de colágeno organizado y el área ocupada por colágeno birrefringente (Lobl & Maenza, 1975; Zhang et al., 2013). Por otra parte, Ji et al. (2008) observaron que en ratas tratadas con DHT disminuyó la resistencia cervical (menor organización de las fibras de colágeno) en la etapa final del embarazo, mientras que el tratamiento con FLU inhibió este efecto. Este último trabajo difiere con nuestros resultados en cuanto a los efectos de los andrógenos sobre la organización de las fibras de colágeno en el cuello uterino; lo que podría deberse a que el cérvix y el útero son órganos con

estructura similar, pero con funciones diferentes y en nuestro caso no evaluamos las hembras en el momento del parto. Sin embargo, en ambos estudios está claro que los andrógenos regulan la remodelación del colágeno y su metabolismo a través de RA. Por otra parte, el grado de abundancia de colágeno y su organización en gruesos haces junto al aumento del entrecruzamiento de las fibras de colágeno modifica las propiedades biofísicas del microambiente tisular, promoviendo el desarrollo de tumores de rápido crecimiento en tejido mamario (Kass et al., 2007; Levental et al., 2009; Northey et al., 2017). Teniendo en cuenta que las mujeres con SOP tienen mayor riesgo de desarrollar hiperplasia endometrial y cáncer de útero, la mayor organización de colágeno en los animales con SOP podría contribuir al desarrollo de estas patologías.

Otro parámetro vinculado con el espacio extracelular uterino que estudiamos fue el contenido de agua. Se ha sugerido que el movimiento transcelular y transepitelial de agua y de otras moléculas pequeñas (urea, glicerol, NH_3) es regulado por las AQPs (Chinigarzadeh et al., 2016; Jablonski et al., 2003; Salleh et al., 2015). Los esteroides sexuales modifican la expresión de AQPs. La expresión de AQP2 aumentó en ratas que recibieron E2 mientras que los niveles de ARNm de AQP1, 5 y 7 se incrementó en ratas tratadas con T y estos efectos fueron antagonizados por FLU (Jablonski et al., 2003; Salleh et al., 2015). En este trabajo de tesis demostramos que el útero de las hembras **CONTROL** expresó las AQP1 a AQP9 con excepción de AQP6 y que los animales con **SOP** mostraron un aumento del contenido de agua uterino en asociación con una disminución de AQP7 y un aumento de AQP3 y 8. Si bien, en los animales con **SOP+FLU** aumentó el contenido de agua, no se observó el aumento de la expresión de AQP8 respecto a los **CONTROLES**, demostrando que esta proteína estaría regulada a través del RA y que AQP8 y/o el RA no estarían regulando el movimiento de agua dentro del útero. Estudios previos han descrito que AQP8 desempeña un papel relevante en la espermatogénesis de ratones y la flutamida suprime su expresión (Huhtaniemi, 2018; Oduwole et al., 2018). Además, en biopsias de ovario de mujeres con SOP se observó que aumentó la expresión de AQP8 en asociación con una mayor atresia folicular e índice de apoptosis en células de la granulosa (Jablonski et al., 2004; Su et al., 2010). En este mismo sentido se ha descrito que la inhibición de la AQP2 en carcinomas endometriales humanos atenuó la migración, la adhesión y la invasión de células del carcinoma; aportando evidencias de que las AQPs no sólo modulan el movimiento del agua, sino que también pueden participar en otras funciones celulares (Nico & Ribatti, 2010; Verkman et al., 2008; Zou et al., 2011).

Como se mencionó previamente, no solo se observaron cambios en el espacio extracelular uterino de los animales con SOP, sino también en el compartimiento celular.

Se conoce que en el útero, los Eg regulan la proliferación celular y la apoptosis a través del RE- α presente en el estroma uterino (Kurita et al., 2001; Winuthayanon et al., 2010). En relación a los efectos de los andrógenos, Zhang et al. (2004) demostraron que el benzoato de DHT induce proliferación de células de músculo liso y del epitelio uterino. Por el contrario, en estudios *in vitro* con células de endometrio humano y estudios *in vivo* con ratas, se demostró que la T y la DHEA disminuyen la proliferación de células estromales (Plaza-Parrochia et al., 2014; Qin et al., 2016). Terada et al. (1990) demostraron que la administración de DHT reduce el índice de apoptosis en epitelio luminal y glandular sin afectar el índice de apoptosis en el estroma uterino. Nuestros resultados demostraron que la proliferación celular disminuyó en el estroma subepitelial y aumentó el índice de apoptosis en los epitelios y en miometrio de las ratas con **SOP**. Cuando inhibimos el RA disminuyó la proliferación celular y el índice de apoptosis en el miometrio respecto a los animales **SOP**, demostrando que el recambio celular en el miometrio estaría regulado a través del RA. Para investigar los mecanismos celulares responsables de estos cambios evaluamos la expresión de IGF-1 y PTEN. El IGF-1 es un mitógeno que al unirse a su receptor (IGF-1R), activa cascadas de señales promoviendo la proliferación celular y además posee efectos antiapoptóticos (Sato et al., 2002). Se sabe que la proliferación de células epiteliales y miometriales está mediada por IGF-1 y que los andrógenos inducen su expresión (Kowalski et al., 2004; Sahlin et al., 1994) (Sahlin et al., 1994; Simitsidellis et al., 2016). Por otra parte, PTEN es un potente gen supresor tumoral (Bermudez Brito et al., 2015). Los defectos genéticos y la reducción o pérdida de la expresión de PTEN son frecuente en cáncer de endometrio (Mutter et al., 2000; Peiró et al., 2003; Salvesen et al., 2001). También se ha descrito que en células de la granulosa derivadas de rata y de mujeres con SOP, la expresión de PTEN está disminuida en asociación con un aumento de la expresión de microARNs (He et al., 2019; Zhao et al., 2017). En el presente trabajo de tesis demostramos que la expresión del ARNm de IGF-1 aumentó en los animales con SOP y esto no fue mediado por el RA debido a que en los animales con **SOP+FLU** también se observó este aumento. En los animales **SOP+FLU** se observó un aumento de la expresión de su receptor (IGF-1R), sobre la cual no tenemos explicación. Respecto a PTEN, demostramos una disminución de su expresión en los animales **SOP** y **SOP+FLU**. Si bien estos resultados no fueron temporalmente asociados con una mayor proliferación celular; sugerimos que la mayor expresión de IGF-1 y la menor expresión de PTEN estarían involucrados en el control de la proliferación debido a que en estos animales demostraron focos hiperplásicos en el epitelio luminal y una mayor densidad de glándulas. Estas modificaciones uterinas estarían indicando que las células proliferaron para poder observarse dichos cambios en los epitelios. Consideramos que el momento en el que

evaluamos la proliferación y/o el tiempo de administración de BrdU podrían haber sido inadecuados o insuficientes para evidenciar el cambio en la proliferación de los epitelios.

Otras moléculas que podrían estar involucradas en el control de la proliferación celular del útero son WNT5a y HOXA10. El WNT5a regula la proliferación celular del estroma uterino y HOXA10 lo hace con las células miometriales (Ciarmela et al., 2008; Rider et al., 2016). Estudios *in vitro* demostraron que la P4 regula la proliferación de celulares estromales uterinas modulando la expresión de WNT5a (Rider et al., 2016). Por otro lado, un estudio *in vitro* de Ciarmela et al. (2008) demostró que el tratamiento con activina-A, disminuyó la expresión del ARNm de HOXA10 y la proliferación de células PHM1 (en inglés *Pregnant Human Myometrial 1*). En acuerdo con estos resultados en los animales con **SOP** y **SOP+FLU** observamos una disminución de la expresión del ARNm de WNT5a en asociación con una menor proliferación del estroma subepitelial y menor expresión del ARNm de HOXA10 junto con menor proliferación del miometrio.

Como se viene mencionando a lo largo de la tesis, los procesos estudiados son hormonodependientes y podrían estar regulados por cambios en las concentraciones séricas de las hormonas, cambios en su biodisponibilidad tisular y/o en la expresión de receptores hormonales. A nivel sistémico ya mencionamos que los animales con SOP presentaron un aumento de los niveles de T. Respecto a la disponibilidad tisular de los esteroides se sabe que la misma es regulada por la actividad de enzimas esteroidogénicas. Estudios previos observaron que células endometriales de mujeres con SOP presentaron una mayor expresión de 17 β -HSD1 y 17 β -HSD2 y menor actividad de la enzima estrógeno sulfotransferasa (transforma Eg a estrógenos sulfatados) (Bacallao et al., 2008; Leon et al., 2008; Margarit et al., 2010). La expresión de la enzima P450arom mostró resultados contradictorios. Algunos autores reportaron que p450arom no fue detectable en el endometrio de mujeres con y sin SOP (Bacallao et al., 2008; Leon et al., 2008). Por el contrario, Zhao et al. (2014) observaron una mayor expresión de esta enzima en endometrio de mujeres con SOP. Los resultados de esta tesis demostraron que en ambos grupos de animales con **SOP** y **SOP+FLU**, la síntesis *de novo* de esteroides podría estar disminuida debido a una menor expresión de StAR (proteína que transporta el colesterol al interior de la mitocondria) y que, además, se modificó el metabolismo de los esteroides en el útero. En coincidencia con los resultados de Margarit et al. (2010) y Zhao et al. (2014) observamos un aumento de la expresión de las enzimas 17 β -HSD2, 5 α -R1 y P450arom, siendo ésta última enzima regulada a través del RA debido a que no se observó un aumento de su expresión en los animales con **SOP+FLU**. La mayor expresión de las enzimas P450arom y 5 α -R1 en los animales **SOP**, sugieren que podrían encontrarse altos niveles tisulares de Eg y DHT, así como bajos niveles de P4.

Con relación a la presencia de receptores hormonales demostramos que en los animales con **SOP** aumentó la expresión proteica del RA. Cuando los animales fueron tratados con el antagonista del RA no se modificó la expresión del RA, sugiriendo que los andrógenos regulan la expresión de su propio receptor. La expresión proteica del RE- α disminuyó en el estroma uterino cuando se inhibió el RA, sugiriendo una rápida degradación del ARNm o mayor inestabilidad de la proteína por el tratamiento con FLU. En acuerdo con este resultado, Knapczyk-Stwora et al. (2011) reportaron que cerdos tratados con FLU en el período neonatal, disminuyó la expresión del RE- α en el estroma uterino. Nuestros resultados apoyan lo descrito por Knapczyk-Stwora et al. (2011), sugiriendo que la expresión uterina de este receptor es regulada a través del RA. En ratones hembras a las que se inactivó la expresión génica del RE- α y fueron tratadas con DHT no se observó cambios en el crecimiento uterino (Nantermet et al., 2005). Esto indicaría la existencia de conexiones entre las vías de señalización de ambos receptores.

En síntesis, la hiperandrogenemia asociada al SOP desreguló la expresión del RA y el metabolismo tisular de hormonas esteroideas en el útero. Estas modificaciones en el microambiente endócrino promovieron importantes cambios en la histomorfología uterina, evidenciados por el aumento de anomalías epiteliales, de la altura del epitelio luminal y la densidad de glándulas. Las modificaciones epiteliales podrían generarse a través de las vías de IGF-1 y/o PTEN. También describimos un aumento del espesor del estroma uterino que fue acompañado por una reducción de la densidad celular. Estos efectos se asociaron con una disminución de la proliferación celular, posiblemente mediados por WNT5a y HOXA10, y con modificaciones del espacio extracelular evidenciadas por un aumento de la organización del colágeno y del contenido de agua. Tomados en su conjunto, estos resultados demuestran que el SOP altera el ambiente endocrino y la histomorfología uterina siendo responsables de alteraciones funcionales y favoreciendo el desarrollo de lesiones.

2. SOP E HISTO-FUNCIONALIDAD UTERINA

2.1 SOP y fertilidad

El SOP se ha asociado con problemas de fertilidad, dificultad para alcanzar la preñez debido a la anovulación, abortos espontáneos y/o partos prematuros. Incluso en las mujeres con ovulación inducida ocurren fallas en el proceso de implantación y riesgo de partos prematuros (Palomba et al., 2010; Rees et al., 2016; Shang et al., 2012). En esta tesis estudiamos diferentes parámetros de fertilidad en el modelo animal de ratas con SOP. Nuestros resultados demostraron que los animales con SOP tuvieron ciclos estrales

regulares a los 90 días de edad. Además, las hembras quedaron preñadas sin problemas y no se observaron alteraciones en el número de fetos implantados ni pérdidas post-implantación. Debido a que los animales fueron sacrificados antes del parto; no podemos descartar que se pueda presentar algún problema durante este proceso. Se sabe que el tiempo de parto, la elasticidad del cérvix y la contractilidad del miometrio son procesos que controlan la expulsión de los fetos y que son regulados, entre otras hormonas, por los andrógenos (Ji et al., 2008; Liu et al., 2013). En nuestro modelo experimental de SOP demostramos importantes cambios en la remodelación del colágeno y otras modificaciones histomorfológicas principalmente en el miometrio que podrían afectar el proceso de parto. Para dar respuesta a esto, es necesario diseñar estudios específicos que permitan estudiar el mecanismo del parto y el miometrio durante la gestación, ya que el modelo utilizado de SOP no afectó la fertilidad y el proceso de implantación.

2.2 SOP y anomalías uterinas en ratas adultas mayores

El SOP constituye un factor de riesgo para el desarrollo de hiperplasia y cáncer endometrial. El desarrollo de lesiones uterinas benignas y/o malignas están asociadas a cambios en el ambiente endocrino (Cornel et al., 2019; Gibson et al., 2014). En esta tesis estudiamos el perfil hormonal y la histopatología uterina en animales adultos con SOP. Demostramos un incremento en los niveles séricos de E2 y presencia de anomalías uterinas en el compartimiento luminal y glandular del útero. En el epitelio luminal se observó una mayor incidencia de lúmenes intraepiteliales, glándulas intraepiteliales y estratificación del epitelio luminal. Estas alteraciones también fueron observadas en ratas ovariectomizadas luego del tratamiento con E2 y expuestas a un herbicida a base de glifosato (Guerrero Schimpf et al., 2018). Por lo tanto, podemos sugerir que la mayor incidencia de estas lesiones uterinas en nuestros animales con SOP podría deberse a un mayor estímulo estrogénico. Además, teniendo en cuenta que algunas de las alteraciones en el epitelio luminal se presentaron en los animales peripuberales con SOP, se podría sugerir que el síndrome aceleraría la aparición de estas anomalías uterinas.

En el compartimiento glandular observamos la presencia de glándulas con metaplasia y glándulas quísticas las cuales han sido asociados con procesos de envejecimiento en ratas adultas de edad avanzada (Vigeezii, 2016). Si bien aquí no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de las lesiones sería necesario realizar un análisis de la multiplicidad de estas lesiones, teniendo en cuenta que este parámetro aumenta cuando los animales son expuestos a compuestos con actividad estrogénica (Vigeezii, 2016). También se podrían alcanzar diferencias estadísticamente significativas aumentando el número de animales experimentales, aunque experimentos con animales de edad avanzada demandan mucho tiempo.

En conjunto, los resultados de este trabajo de tesis aportan nuevas evidencias que contribuyen a una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a las alteraciones uterinas morfológicas asociadas al SOP (a corto y largo plazo).

VI- RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Resultados y conclusiones

En este trabajo de tesis investigamos los efectos del SOP sobre la histofuncionalidad uterina en animales de 41 días de edad, adultas preñadas y adultas mayores. En animales de 41 días se estudiaron los efectos del síndrome a corto plazo, mientras que en las hembras adultas se estudiaron los efectos a largo plazo sobre la fertilidad e incidencia de anomalías uterinas. En los animales de 41 días se estudió, además, qué efectos fueron mediados por el RA.

Resumiendo:

- En animales de 41 días de edad:
 - El SOP fue inducido con éxito en el modelo desarrollado, presentando altos niveles de andrógenos séricos y quistes foliculares en los ovarios.
 - Los animales con SOP presentaron un aumento de anomalías en el epitelio luminal y compartimiento glandular del útero.
 - Se modificó la histoarquitectura uterina, evidenciado por un aumento de la altura del epitelio luminal, la densidad de glándulas y el espesor del estroma subepitelial y miometrio. Estos cambios se asociaron con una menor densidad de células estromales.
 - Se observaron modificaciones en el espacio extracelular. Estas modificaciones incluyeron una mayor organización de las fibras de colágeno y aumento del contenido de agua en animales con SOP. El cambio en el contenido de agua se asoció con una menor expresión de AQP7 y un aumento de AQP3 y 8, siendo AQP8 regulada por el RA.
 - El compartimiento celular también se modificó. Hay una disminución de la proliferación en el estroma subepitelial, y un aumento de la apoptosis en los epitelios y miometrio. Los cambios en la proliferación de los epitelios no se asociaron temporalmente con los cambios en la expresión de IGF-1 y PTEN. Sin embargo, estas moléculas podrían estar asociadas con la hiperplasia epitelial y la mayor densidad de glándulas observada en estos animales. Los cambios en el estroma subepitelial y miometrio se asociaron con modificaciones en la expresión de WNT5a y HOXA10, respectivamente.
 - El SOP modificó el microambiente endocrino del útero. Se alteró el metabolismo de esteroides observándose una disminución de la expresión del ARNm de StAR y un aumento de la expresión de 5α -R1, 17β -HSD2 y P450arom, siendo P450arom regulada a través del RA. Además, se observaron cambios en la expresión de los receptores hormonales demostrándose un aumento de la expresión de RA. La

Resultados y conclusiones

inhibición del RA con FLU reguló negativamente la expresión de este receptor e incluso disminuyó la expresión estromal del RE- α .

-La inhibición del RA induce efectos diferenciales dependiendo el compartimiento tisular estudiado; siendo el miometrio uno de los compartimentos principalmente regulado a través de este receptor.

- En animales adultos:

-La fertilidad no fue afectada en los animales con SOP.

-Los animales con SOP presentaron una mayor incidencia de anomalías uterinas las que se asociaron con altos niveles sérico de E2. Se observaron lúmenes intraepiteliales, glándulas intraepiteliales y estratificación del epitelio. Estas mismas alteraciones fueron observadas en animales con SOP de 41 días de edad, lo que podría sugerir un adelantamiento en la aparición de estas lesiones.

Los resultados de este trabajo de tesis aportan nuevas evidencias que contribuyen a una mejor comprensión de los mecanismos que subyacen al desarrollo de alteraciones uterinas asociadas al SOP.

CONCLUSIONES

- El SOP induce cambios en el microambiente endocrino del útero.
- Los cambios en el estado endocrino asociados al SOP alteran la expresión de genes que regulan la proliferación celular y el espacio extracelular uterino, promoviendo el desarrollo de alteraciones histomorfológicas.
- Las modificaciones inducidas por el SOP en el miometrio son reguladas por el RA de manera directa, o indirectamente a través de la expresión del RE- α .
- El SOP no afecta la fertilidad en nuestro modelo experimental.
- Los altos niveles de E2 inducidos por el SOP en animales adultos podrían ser los responsables de la mayor incidencia de anomalías uterinas.
- La presencia de anomalías uterinas a temprana edad podría considerarse lesiones precursoras de otras patologías observadas en mujeres con SOP, como ser hiperplasias y tumores endometriales.

VII- BIBLIOGRAFÍA

- Adesanya, O. O., Zhou, J., Samathanam, C., Powell-Braxton, L., & Bondy, C. A. (1999). Insulin-like growth factor 1 is required for G2 progression in the estradiol-induced mitotic cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(6), 3287-3291. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.3287>
- Agre, P., & Kozono, D. (2003). Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Lett*, *555*(1), 72-78. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)01083-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)01083-4)
- Ahrens-Fath, I., Politz, O., Geserick, C., & Haendler, B. (2005). Androgen receptor function is modulated by the tissue-specific AR45 variant. *FEBS J*, *272*(1), 74-84. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2004.04395.x>
- Anagnostis, P., Tarlatzis, B. C., & Kauffman, R. P. (2018). Polycystic ovarian syndrome (PCOS): Long-term metabolic consequences. *Metabolism*, *86*, 33-43. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.09.016>
- Aplin, J. D., Fazleabas, A., Glasser, S. R., & Giudice, L. (2008). *The Endometrium: Molecular, cellular and clinical perspectives*.
- Ashby, J., Odum, J., & Foster, J. (1997). Activity of raloxifene in immature and ovariectomized rat uterotrophic assays. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *25*(3), 226-231.
- Astwood, E. B. (1939). CHANGES IN THE WEIGHT AND WATER CONTENT OF THE UTERUS OF THE NORMAL ADULT RAT. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, *126*(1), 162-170. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1939.126.1.162>
- Atkins, F. M., & Clark, R. A. (1987). Mast cells and fibrosis. *Arch Dermatol*, *123*(2), 191-193.
- Bacallao, K., Leon, L., Gabler, F., Soto, E., Romero, C., Valladares, L., & Vega, M. (2008). In situ estrogen metabolism in proliferative endometria from untreated women with polycystic ovarian syndrome with and without endometrial hyperplasia. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *110*(1-2), 163-169. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.03.031>
- Bartol, F. F., Wiley, A. A., Floyd, J. G., Ott, T. L., Bazer, F. W., Gray, C. A., & Spencer, T. E. (1999). Uterine differentiation as a foundation for subsequent fertility. *J Reprod Fertil Suppl*, *54*, 287-302.
- Bermudez Brito, M., Goulielmaki, E., & Papakonstanti, E. A. (2015). Focus on PTEN Regulation. *Front Oncol*, *5*, 166. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00166>
- Björnström, L., & Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol*, *19*(4), 833-842. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0486>
- Bosman, F. T., & Stamenkovic, I. (2003). Functional structure and composition of the extracellular matrix. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, *200*(4), 423-428.
- Bosquiazzo, V. L., Vigezzi, L., Muñoz-de-Toro, M., & Luque, E. H. (2013). Perinatal exposure to diethylstilbestrol alters the functional differentiation of the adult rat uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *138*, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.02.011>
- Cermik, D., Selam, B., & Taylor, H. S. (2003). Regulation of HOXA-10 expression by testosterone in vitro and in the endometrium of patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, *88*(1), 238-243. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021072>
- Charalampakis, V., Tahrani, A. A., Helmy, A., Gupta, J. K., & Singhal, R. (2016). Polycystic ovary syndrome and endometrial hyperplasia: an overview of the role of bariatric surgery in female fertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, *207*, 220-226. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.10.001>

- Chen, C. Y., Chen, J., He, L., & Stiles, B. L. (2018). PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 338. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00338>
- Chi, M. M., Schlein, A. L., & Moley, K. H. (2000). High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor. *Endocrinology*, 141(12), 4784-4792. <https://doi.org/10.1210/endo.141.12.7816>
- Chinigarzadeh, A., Muniandy, S., & Salleh, N. (2016). Estradiol, progesterone and genistein differentially regulate levels of aquaporin (AQP)-1, 2, 5 and 7 expression in the uteri of ovariectomized, sex-steroid deficient rats. *Steroids*, 115, 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.08.007>
- Choi, Desai, R., Zheng, Y., Yao, M., Dong, Q., Watson, G., . . . Simanainen, U. (2015). Androgen actions via androgen receptor promote PTEN inactivation induced uterine cancer. *Endocr Relat Cancer*, 22(5), 687-701. <https://doi.org/10.1530/erc-15-0203>
- Choi, J. P., Zheng, Y., Skulte, K. A., Handelsman, D. J., & Simanainen, U. (2015). Development and Characterization of Uterine Glandular Epithelium Specific Androgen Receptor Knockout Mouse Model. *Biology of Reproduction*, 93(5), 120. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.132241>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1), 156-159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
- Chuan, Y. C., Pang, S. T., Cedazo-Minguez, A., Norstedt, G., Pousette, A., & Flores-Morales, A. (2006). Androgen induction of prostate cancer cell invasion is mediated by ezrin. *J Biol Chem*, 281(40), 29938-29948. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602237200>
- Ciarmela, P., Wiater, E., & Vale, W. (2008). Activin-A in myometrium: characterization of the actions on myometrial cells. *Endocrinology*, 149(5), 2506-2516. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0692>
- Cikos, S., Bukovska, A., & Koppel, J. (2007). Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Mol Biol*, 8, 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-113>
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127(3), 469-480. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018>
- Compagnone, N. A., & Mellon, S. H. (2000). Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol*, 21(1), 1-56. <https://doi.org/10.1006/frne.1999.0188>
- Contrò, V., Basile, J. R., & Proia, P. (2015). Sex steroid hormone receptors, their ligands, and nuclear and non-nuclear pathways. *AIMS Molecular Science*, 2(3), 294-310. <https://doi.org/10.3934/molsci.2015.3.294>
- Cornel, K. M. C., Bongers, M. Y., Kruitwagen, R. P. F. M., & Romano, A. (2019). Local estrogen metabolism (intracrinology) in endometrial cancer: A systematic review. *Molecular and cellular endocrinology*, 489, 45-65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.10.004>
- Couse, J. F., & Korach, K. S. (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev*, 20(3), 358-417. <https://doi.org/10.1210/edrv.20.3.0370>
- Craig, S. S. (1981). Effect of age upon uterine response to deciduagenic stimulus. *Acta Anat (Basel)*, 110(2), 146-158. <https://doi.org/10.1159/000145424>
- Cunha, G. R. (1976). Stromal induction and specification of morphogenesis and cytodifferentiation of the epithelia of the Mullerian ducts and urogenital sinus during development of the uterus and vagina in mice. *J Exp Zool*, 196(3), 361-370. <https://doi.org/10.1002/jez.1401960310>
- Curtis Hewitt, S., Goulding, E. H., Eddy, E. M., & Korach, K. S. (2002). Studies using the estrogen receptor alpha knockout uterus demonstrate that implantation but

- not decidualization-associated signaling is estrogen dependent. *Biol Reprod*, 67(4), 1268-1277. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.4.1268>
- Daikoku, T., Hirota, Y., Tranguch, S., Joshi, A. R., DeMayo, F. J., Lydon, J. P., . . . Dey, S. K. (2008). Conditional loss of uterine Pten unfaithfully and rapidly induces endometrial cancer in mice. *Cancer research*, 68(14), 5619-5627.
- Dehm, S. M., Schmidt, L. J., Heemers, H. V., Vessella, R. L., & Tindall, D. J. (2008). Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Res*, 68(13), 5469-5477. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-0594>
- Demacopulo, B., & Kreimann, E. L. (2019). Bisphenol S increases EZRIN expression and the detrimental effects induced by dehydroepiandrosterone in rat endometrium. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 483, 64-73. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.01.006>
- Diao, H. L., Su, R. W., Tan, H. N., Li, S. J., Lei, W., Deng, W. B., & Yang, Z. M. (2008). Effects of androgen on embryo implantation in the mouse delayed-implantation model. *Fertil Steril*, 90(4 Suppl), 1376-1383. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.07.1341>
- Dinicola, S., Unfer, V., Facchinetti, F., Soulage, C. O., Greene, N. D., Bizzarri, M., . . . Wdowiak, A. (2021). Inositols: From Established Knowledge to Novel Approaches. *Int J Mol Sci*, 22(19). <https://doi.org/10.3390/ijms221910575>
- Dixon, D., Alison, R., Bach, U., Colman, K., Foley, G. L., Harleman, J. H., . . . Yoshida, M. (2014). Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse female reproductive system. *J Toxicol Pathol*, 27(3-4 Suppl), 1s-107s. <https://doi.org/10.1293/tox.27.1S>
- Do Rego, J. L., Seong, J. Y., Burel, D., Leprince, J., Luu-The, V., Tsutsui, K., . . . Vaudry, H. (2009). Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Front Neuroendocrinol*, 30(3), 259-301. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.05.006>
- Dumesic, D. A., & Lobo, R. A. (2013). Cancer risk and PCOS. *Steroids*, 78(8), 782-785. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2013.04.004>
- Elia, E. M., Belgorosky, D., Faut, M., Vighi, S., Pustovrh, C., Luigi, D., & Motta, A. B. (2009). The effects of metformin on uterine tissue of hyperandrogenized BALB/c mice. *Mol Hum Reprod*, 15(7), 421-432. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap033>
- Erkinheimo, T. L., Saukkonen, K., Narko, K., Jalkanen, J., Ylikorkala, O., & Ristimäki, A. (2000). Expression of cyclooxygenase-2 and prostanoid receptors by human myometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(9), 3468-3475. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.9.6809>
- Freeman, M. E. (2006). Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. In (E Knobil, JD Neill Academic Press, St Louis ed., pp. 2327-2388).
- Fusi, L., Purohit, A., Brosens, J., Woo, L. W., Potter, B. V., & Reed, M. J. (2008). Inhibition of steroid sulfatase activity in endometriotic implants by STX64 (667Coumate): a potential new therapy. *ScientificWorldJournal*, 8, 1325-1327. <https://doi.org/10.1100/tsw.2008.164>
- Gibson, D. A., Simitsidellis, I., Collins, F., & Saunders, P. T. (2014). Evidence of androgen action in endometrial and ovarian cancers. *Endocr Relat Cancer*, 21(4), T203-218. <https://doi.org/10.1530/erc-13-0551>
- Giudice, L. C. (2006). Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 20(2), 235-244. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2006.03.005>
- Gong, L., Zhang, W., Yuan, Y., Xing, X., Li, H., & Zhao, G. (2018). miR-222 promotes invasion and migration of ovarian carcinoma by targeting PTEN. *Oncol Lett*, 16(1), 984-990. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8743>

- Guerrero Schimpf, M., Milesi, M. M., Luque, E. H., & Varayoud, J. (2018). Glyphosate-based herbicide enhances the uterine sensitivity to estradiol in rats. *J Endocrinol*. <https://doi.org/10.1530/joe-18-0207>
- Gunin, A. G., Mashin, I. N., & Zakharov, D. A. (2001). Proliferation, mitosis orientation and morphogenetic changes in the uterus of mice following chronic treatment with both estrogen and glucocorticoid hormones. *J Endocrinol*, 169(1), 23-31. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1690023>
- Guzeloglu-Kayisli, O., Kayisli, U. A., Al-Rejjal, R., Zheng, W., Luleci, G., & Arici, A. (2003). Regulation of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) expression by estradiol and progesterone in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(10), 5017-5026. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030414>
- Haim, S., Shakhar, G., Rossene, E., Taylor, A. N., & Ben-Eliyahu, S. (2003). Serum levels of sex hormones and corticosterone throughout 4- and 5-day estrous cycles in Fischer 344 rats and their simulation in ovariectomized females. *J Endocrinol Invest*, 26(10), 1013-1022. <https://doi.org/10.1007/bf03348201>
- Hall, J. M., Couse, J. F., & Korach, K. S. (2001). The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem*, 276(40), 36869-36872. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100029200>
- Halme, J., & Woessner, J. F., Jr. (1975). Effect of progesterone on collagen breakdown and tissue collagenolytic activity in the involuting rat uterus. *J Endocrinol*, 66(3), 357-362. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0660357>
- Hayashi, K., Yoshioka, S., Reardon, S. N., Rucker, E. B., III, Spencer, T. E., DeMayo, F. J., . . . MacLean, J. A., II. (2010). WNTs in the Neonatal Mouse Uterus: Potential Regulation of Endometrial Gland Development1. *Biol Reprod*, 84(2), 308-319. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088161>
- He, T., Sun, Y., Zhang, Y., Zhao, S., Zheng, Y., Hao, G., & Shi, Y. (2019). MicroRNA-200b and microRNA-200c are up-regulated in PCOS granulosa cell and inhibit KGN cell proliferation via targeting PTEN. *Reprod Biol Endocrinol*, 17(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0505-8>
- Hewitt, S., & Korach, K. (2008). Estrogen-regulated genes in the endometrium. In (pp. 162-175). <https://doi.org/10.3109/9780203091500.012>
- Hewitt, S. C., Kissling, G. E., Fieselman, K. E., Jayes, F. L., Gerrish, K. E., & Korach, K. S. (2010). Biological and biochemical consequences of global deletion of exon 3 from the ER alpha gene. *FASEB J*, 24(12), 4660-4667. <https://doi.org/10.1096/fj.10-163428>
- Hoeger, K. M., Dokras, A., & Piltonen, T. (2021). Update on PCOS: Consequences, Challenges, and Guiding Treatment. *J Clin Endocrinol Metab*, 106(3), e1071-e1083. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa839>
- Hsueh, A. J., Erickson, G. F., & Lu, K. H. (1979). Changes in uterine estrogen receptor and morphology in aging female rats. *Biol Reprod*, 21(4), 793-800. <https://doi.org/10.1095/biolreprod21.4.793>
- Huet-Hudson, Y. M., Andrews, G. K., & Dey, S. K. (1989). Cell type-specific localization of c-myc protein in the mouse uterus: modulation by steroid hormones and analysis of the periimplantation period. *Endocrinology*, 125(3), 1683-1690. <https://doi.org/10.1210/endo-125-3-1683>
- Huhtaniemi, I. (2018). MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Hormonal regulation of spermatogenesis: mutant mice challenging old paradigms. *Eur J Endocrinol*, 179(3), R143-r150. <https://doi.org/10.1530/eje-18-0396>
- Jablonski, E. M., McConnell, N. A., Hughes, F. M., Jr., & Huet-Hudson, Y. M. (2003). Estrogen regulation of aquaporins in the mouse uterus: potential roles in uterine water movement. *Biol Reprod*, 69(5), 1481-1487. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.019927>
- Jablonski, E. M., Webb, A. N., McConnell, N. A., Riley, M. C., & Hughes, F. M., Jr. (2004). Plasma membrane aquaporin activity can affect the rate of apoptosis

- but is inhibited after apoptotic volume decrease. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286(4), C975-985. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00180.2003>
- Jang, M., Lee, M. J., Lee, J. M., Bae, C. S., Kim, S. H., Ryu, J. H., & Cho, I. H. (2014). Oriental medicine Kyung-Ok-Ko prevents and alleviates dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovarian syndrome in rats. *PLoS One*, 9(2), e87623. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087623>
- Jeong, J. W., Lee, H. S., Franco, H. L., Broaddus, R. R., Taketo, M. M., Tsai, S. Y., . . . DeMayo, F. J. (2009). beta-catenin mediates glandular formation and dysregulation of beta-catenin induces hyperplasia formation in the murine uterus. *Oncogene*, 28(1), 31-40. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.363>
- Ji, H., Dailey, T. L., Long, V., & Chien, E. K. (2008). Androgen-regulated cervical ripening: a structural, biomechanical, and molecular analysis. *Am J Obstet Gynecol*, 198(5), 543.e541-549. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.11.012>
- Jiang, N. X., & Li, X. L. (2021). The Disorders of Endometrial Receptivity in PCOS and Its Mechanisms. *Reprod Sci*. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00629-9>
- Junqueira, L. C., & Junqueira, L. M. (1983). *Técnicas básicas en citología e histología* (R. A. (Eds.) Livraria Santos. Com. Imp. Ltda, Ed.).
- Kamenov, Z., Kolarov, G., Gateva, A., Carlomagno, G., & Genazzani, A. D. (2015). Ovulation induction with myo-inositol alone and in combination with clomiphene citrate in polycystic ovarian syndrome patients with insulin resistance. *Gynecological Endocrinology*, 31(2), 131-135. <https://doi.org/10.3109/09513590.2014.964640>
- Kass, L., Erler, J. T., Dembo, M., & Weaver, V. M. (2007). Mammary epithelial cell: influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(11), 1987-1994. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.06.025>
- Kass, L., Ramos, J. G., Ortega, H. H., Montes, G. S., Bussmann, L. E., Luque, E. H., & Muñoz de Toro, M. (2001). Relaxin has a minor role in rat mammary gland growth and differentiation during pregnancy. *Endocrine*, 15(3), 263-269.
- Katoh, M. (2005). WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol Rep*, 14(6), 1583-1588.
- Kim, E.-J., Jang, M., Choi, J. H., Park, K. S., & Cho, I.-H. (2018). An Improved Dehydroepiandrosterone-Induced Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Post-pubertal Improve PCOS's Features [Methods]. *Frontiers in Endocrinology*, 9(735). <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00735>
- Kimoto, T., Ishii, H., Higo, S., Hojo, Y., & Kawato, S. (2010). Semicomprehensive analysis of the postnatal age-related changes in the mRNA expression of sex steroidogenic enzymes and sex steroid receptors in the male rat hippocampus. *Endocrinology*, 151(12), 5795-5806. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0581>
- Klotz, D. M., Hewitt, S. C., Ciana, P., Raviscioni, M., Lindzey, J. K., Foley, J., . . . Korach, K. S. (2002). Requirement of estrogen receptor-alpha in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk. *J Biol Chem*, 277(10), 8531-8537. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109592200>
- Knapczyk-Stwora, K., Durlej, M., Bilinska, B., & Slomczynska, M. (2011). Immunohistochemical studies on the proliferative marker Ki-67 and estrogen receptor alpha (ERalpha) in the uterus of neonatal and immature pigs following exposure to flutamide. *Acta Histochem*, 113(5), 534-541. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2010.05.008>
- Kohn, A. D., & Moon, R. T. (2005). Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium*, 38(3-4), 439-446. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.022>
- Kong, S., Zhang, S., Chen, Y., Wang, W., Wang, B., Chen, Q., . . . Wang, H. (2012). Determinants of uterine aging: lessons from rodent models. *Sci China Life Sci*, 55(8), 687-693. <https://doi.org/10.1007/s11427-012-4356-1>

- Konings, G., Brentjens, L., Delvoux, B., Linnanen, T., Cornel, K., Koskimies, P., . . . Romano, A. (2018). Intracrine Regulation of Estrogen and Other Sex Steroid Levels in Endometrium and Non-gynecological Tissues; Pathology, Physiology, and Drug Discovery. *Front Pharmacol*, 9, 940. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00940>
- Koob, T. J., & Jeffrey, J. J. (1974). Hormonal regulation of collagen degradation in the uterus: inhibition of collagenase expression by progesterone and cyclic AMP. *Biochim Biophys Acta*, 354(1), 61-70.
- Kowalski, A. A., Vale-Cruz, D. S., Simmen, F. A., & Simmen, R. C. (2004). Uterine androgen receptors: roles in estrogen-mediated gene expression and DNA synthesis. *Biol Reprod*, 70(5), 1349-1357. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.024786>
- Kubli-Garfias, C., López-Fiesco, A., Pacheco-Cano, M. T., Ponce-Monter, H., & Bondani, A. (1980). In vitro effects of androgens upon the spontaneous rat uterine contractility. *Steroids*, 35(6), 633-641. [https://doi.org/10.1016/0039-128x\(80\)90088-4](https://doi.org/10.1016/0039-128x(80)90088-4)
- Kurita, T. (2011). Normal and abnormal epithelial differentiation in the female reproductive tract. *Differentiation*, 82(3), 117-126. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.04.008>
- Kurita, T., Lee, K. J., Cooke, P. S., Lydon, J. P., & Cunha, G. R. (2000). Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor and lactoferrin by progesterone in the mouse uterus. *Biol Reprod*, 62(4), 831-838. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.4.831>
- Kurita, T., Wang, Y. Z., Donjacour, A. A., Zhao, C., Lydon, J. P., O'Malley, B. W., . . . Cunha, G. R. (2001). Paracrine regulation of apoptosis by steroid hormones in the male and female reproductive system. *Cell Death Differ*, 8(2), 192-200. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400797>
- Kyrou, I., Karteris, E., Robbins, T., Chatha, K., Drenos, F., & Randeva, H. S. (2020). Polycystic ovary syndrome (PCOS) and COVID-19: an overlooked female patient population at potentially higher risk during the COVID-19 pandemic. *BMC Med*, 18(1), 220. <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01697-5>
- Labrie, F., Luu-The, V., Lin, S. X., Simard, J., & Labrie, C. (2000). Role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid formation in peripheral intracrine tissues. *Trends Endocrinol Metab*, 11(10), 421-427. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(00\)00342-8](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(00)00342-8)
- Lamande, S. R., & Bateman, J. F. (1999). Procollagen folding and assembly: The role of endoplasmic reticulum enzymes and molecular chaperones. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 10(5), 455-464. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/scdb.1999.0317>
- Lee, M. J., Jang, M., Bae, C. S., Park, K. S., Kim, H. J., Lee, S., . . . Cho, I. H. (2016). Effects of Oriental Medicine Kyung-Ok-Ko on Uterine Abnormality in Hyperandrogenized Rats. *Rejuvenation Res*, 19(6), 456-466. <https://doi.org/10.1089/rej.2015.1787>
- Lee, Y. R., Chen, M., & Pandolfi, P. P. (2018). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(9), 547-562. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0015-0>
- Leiderman, S., & Fernández, G. (2011). Especialistas en Endocrinología Ginecológica y de la Reproducción. Miembros del Grupo Arkhën, gru-po de Asistencia, Docencia e Investigación en Medicina. E-mail: info@arkhen.com.ar.
- Leon, L., Bacallao, K., Gabler, F., Romero, C., Valladares, L., & Vega, M. (2008). Activities of steroid metabolic enzymes in secretory endometria from untreated women with Polycystic Ovary Syndrome. *Steroids*, 73(1), 88-95. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2007.09.003>
- Leppert, P. C., Jayes, F. L., & Segars, J. H. (2014). The extracellular matrix contributes to mechanotransduction in uterine fibroids. *Obstet Gynecol Int*, 2014, 783289. <https://doi.org/10.1155/2014/783289>

- Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., . . . Weaver, V. M. (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*, 139(5), 891-906. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.027>
- Li, B., Lu, Y., Wang, H., Han, X., Mao, J., Li, J., . . . Song, B. (2016). miR-221/222 enhance the tumorigenicity of human breast cancer stem cells via modulation of PTEN/Akt pathway. *Biomed Pharmacother*, 79, 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.01.045>
- Li, X., Guo, Y. R., Lin, J. F., Feng, Y., Billig, H., & Shao, R. (2014). Combination of Diane-35 and Metformin to Treat Early Endometrial Carcinoma in PCOS Women with Insulin Resistance. *J. Cancer*, 5(3), 173-181. <https://doi.org/10.7150/jca.8009>
- Li, X., & O'Malley, B. W. (2003). Unfolding the action of progesterone receptors. *J Biol Chem*, 278(41), 39261-39264. <https://doi.org/10.1074/jbc.R300024200>
- Li, X., Pei, B., Wang, H., Tang, C., Zhu, W., & Jin, F. (2018). Effect of AQP-5 silencing by siRNA interference on chemosensitivity of breast cancer cells. *Onco Targets Ther*, 11, 3359-3368. <https://doi.org/10.2147/ott.s160313>
- Lim, H., Ma, L., Ma, W. G., Maas, R. L., & Dey, S. K. (1999). Hoxa-10 regulates uterine stromal cell responsiveness to progesterone during implantation and decidualization in the mouse. *Mol Endocrinol*, 13(6), 1005-1017. <https://doi.org/10.1210/mend.13.6.0284>
- Lindsay, L. A., & Murphy, C. R. (2007). Aquaporins are upregulated in glandular epithelium at the time of implantation in the rat. *J Mol Histol*, 38(1), 87-95. <https://doi.org/10.1007/s10735-007-9083-8>
- Liu, L., Li, Y., Xie, N., Shynlova, O., Challis, J. R., Slater, D., . . . Dong, X. (2013). Proliferative action of the androgen receptor in human uterine myometrial cells-- a key regulator for myometrium phenotype programming. *J Clin Endocrinol Metab*, 98(1), 218-227. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-2451>
- Lobl, R. T., & Maenza, R. M. (1975). Androgenization: alterations in uterine growth and morphology. *Biol Reprod*, 13(3), 255-268.
- Lohmiller, J. J., & Swing, S. P. (2006). Chapter 6 - Reproduction and Breeding. In M. A. Suckow, S. H. Weisbroth, & C. L. Franklin (Eds.), *The Laboratory Rat (Second Edition)* (pp. 147-164). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012074903-4/50009-1>
- Lopes, I. M., Baracat, M. C., Simoes Mde, J., Simoes, R. S., Baracat, E. C., & Soares, J. M., Jr. (2011). Endometrium in women with polycystic ovary syndrome during the window of implantation. *Rev Assoc Med Bras (1992)*, 57(6), 702-709.
- López-Martínez, S., Campo, H., de Miguel-Gómez, L., Faus, A., Navarro, A. T., Díaz, A., . . . Cervelló, I. (2021). A Natural Xenogeneic Endometrial Extracellular Matrix Hydrogel Toward Improving Current Human in vitro Models and Future in vivo Applications [Original Research]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.639688>
- Lu, K. H., Hopper, B. R., Vargo, T. M., & Yen, S. S. (1979). Chronological changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretions in aging female rats displaying different reproductive states. *Biol Reprod*, 21(1), 193-203. <https://doi.org/10.1095/biolreprod21.1.193>
- Lubahn, D. B., Moyer, J. S., Golding, T. S., Couse, J. F., Korach, K. S., & Smithies, O. (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(23), 11162-11166. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.11162>
- Lye, S. J., Mitchell, J., Nashman, N., Oldenhof, A., Ou, R., Shynlova, O., & Langille, L. (2001). Role of mechanical signals in the onset of term and preterm labor. *Front Horm Res*, 27, 165-178. <https://doi.org/10.1159/000061025>
- Makieva, S., Saunders, P. T., & Norman, J. E. (2014). Androgens in pregnancy: roles in parturition. *Hum Reprod Update*, 20(4), 542-559. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu008>

- Maliqueo, M., Benrick, A., & Stener-Victorin, E. (2014). Rodent models of polycystic ovary syndrome: phenotypic presentation, pathophysiology, and the effects of different interventions. *Semin Reprod Med*, 32(3), 183-193. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1371090>
- Manabe, Y., Sakaguchi, M., & Nakajima, A. (1981). Initiation of uterine contractions by purely mechanical stretching of the uterus at midpregnancy. *Int J Biol Res Pregnancy*, 2(2), 63-69.
- Margarit, L., Taylor, A., Roberts, M. H., Hopkins, L., Davies, C., Brenton, A. G., . . . Gonzalez, D. (2010). MUC1 as a discriminator between endometrium from fertile and infertile patients with PCOS and endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 95(12), 5320-5329. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0603>
- Marshall, G., Luque, M. J., Gonzalez, A., D'Apemont, I., Musante, G., & Tapia, J. L. (2012). Center variability in risk of adjusted length of stay for very low birth weight infants in the Neocosur South American Network. *J Pediatr (Rio J)*, 88(6), 524-530. <https://doi.org/doi:10.2223/JPED.2234>
- Mellon, S. H., Griffin, L. D., & Compagnone, N. A. (2001). Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Res Brain Res Rev*, 37(1-3), 3-12. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(01\)00109-6](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(01)00109-6)
- Mericskay, M., Kitajewski, J., & Sassoon, D. (2004). Wnt5a is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus. *Development*, 131(9), 2061-2072. <https://doi.org/10.1242/dev.01090>
- Miller, C., & Sassoon, D. A. (1998). Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. *Development*, 125(16), 3201-3211. <https://doi.org/10.1242/dev.125.16.3201>
- Mobini Far, H. R., Agren, G., Lindqvist, A. S., Marmendal, M., Fahlke, C., & Thiblin, I. (2007). Administration of the anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate to female rats causes alterations in the morphology of their uterus and a reduction in reproductive capacity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 131(2), 189-197. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2006.07.037>
- Moggetti, P. (2016). Insulin Resistance and Polycystic Ovary Syndrome. *Curr Pharm Des*, 22(36), 5526-5534. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160720155855>
- Mohd Mokhtar, H., Giribabu, N., Kassim, N., Muniandy, S., & Salleh, N. (2014). Testosterone decreases fluid and chloride secretions in the uterus of adult female rats via down-regulating cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) expression and functional activity. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 144 Pt B, 361-372. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.08.007>
- Molinari, F., & Frattini, M. (2014). Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer [Review]. *Front Oncol*, 3. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00326>
- Montes, G. S., & Luque, E. H. (1988). Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat (Basel)*, 133(3), 192-199.
- Morgan, C. F. (1963). Temporal Variations in the Collagen, Noncollagen Protein and Hexosamine of the Uterus and Vagina. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 112(3), 690-694. <https://doi.org/10.3181/00379727-112-28142>
- Mueller, S., & Korach, K. (2005). Mechanisms of Estrogen Receptor-Mediated Agonistic and Antagonistic Effects. In (Vol. 3, pp. 545-545). https://doi.org/10.1007/10690734_1
- Mutter, G. L., Lin, M. C., Fitzgerald, J. T., Kum, J. B., Baak, J. P., Lees, J. A., . . . Eng, C. (2000). Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst*, 92(11), 924-930.
- Nakajima, T., Tanimoto, Y., Tanaka, M., Chambon, P., Watanabe, H., Iguchi, T., & Sato, T. (2015). Neonatal Estrogen Receptor β Is Important in the Permanent Inhibition of Epithelial Cell Proliferation in the Mouse Uterus. *Endocrinology*, 156(9), 3317-3328. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1012>

- Nantermet, P. V., Masarachia, P., Gentile, M. A., Pennypacker, B., Xu, J., Holder, D., . . . Ray, W. J. (2005). Androgenic induction of growth and differentiation in the rodent uterus involves the modulation of estrogen-regulated genetic pathways. *Endocrinology*, *146*(2), 564-578. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1132>
- Nelson, J. F., Felicio, L. S., Osterburg, H. H., & Finch, C. E. (1981). Altered profiles of estradiol and progesterone associated with prolonged estrous cycles and persistent vaginal cornification in aging C57BL/6J mice. *Biol Reprod*, *24*(4), 784-794. <https://doi.org/10.1095/biolreprod24.4.784>
- Nico, B., & Ribatti, D. (2010). Aquaporins in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Lett*, *294*(2), 135-138. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.02.005>
- Northey, J. J., Przybyla, L., & Weaver, V. M. (2017). Tissue Force Programs Cell Fate and Tumor Aggression. *Cancer Discov*, *7*(11), 1224-1237. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-16-0733>
- Oduwole, O. O., Peltoketo, H., Poliandri, A., Vengadabady, L., Chrusciel, M., Doroszko, M., . . . Huhtaniemi, I. T. (2018). Constitutively active follicle-stimulating hormone receptor enables androgen-independent spermatogenesis. *J Clin Invest*, *128*(5), 1787-1792. <https://doi.org/10.1172/jci96794>
- Ogasawara, Y., OKAMOTO, S., KITAMURA, Y., & MATSUMOTO, K. (1983). Proliferative Pattern of Uterine Cells from Birth to Adulthood in Intact, Neonatally Castrated, and/or Adrenalectomized Mice, Assayed by Incorporation of [125I]Iododeoxyuridine*. *Endocrinology*, *113*(2), 582-587. <https://doi.org/10.1210/endo-113-2-582>
- Ojeda, S. R., & Skinner, M. K. (2006). CHAPTER 38 - Puberty in the Rat. In J. D. Neill (Ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)* (pp. 2061-2126). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50043-9>
- Oliveira, G. B. d., Vale, A. M. d., Santos, A. C. d., Moura, C. E. B. d., Rocha, H. A. d. O., & Oliveira, M. F. d. (2015). Composition and significance of glycosaminoglycans in the uterus and placenta of mammals. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *58*, 512-520.
- Ostinelli, G., Laforest, S., Denham, S. G., Gauthier, M. F., Drolet-Labelle, V., Scott, E., . . . Tchernof, A. (2022). Increased adipose tissue indices of androgen catabolism and aromatization in women with metabolic dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab*. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgac261>
- Palomba, S., Falbo, A., Russo, T., Tolino, A., Orto, F., & Zullo, F. (2010). Pregnancy in women with polycystic ovary syndrome: the effect of different phenotypes and features on obstetric and neonatal outcomes. *Fertil Steril*, *94*(5), 1805-1811. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.10.043>
- Párrizas, M., Saltiel, A. R., & LeRoith, D. (1997). Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem*, *272*(1), 154-161. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.1.154>
- Pastore, G. N., DiCola, L. P., Dollahon, N. R., & Gardner, R. M. (1989). The Effect of Estradiol on Collagen Structure and Organization in the Immature Rat Uterus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *191*(1), 69-77. <https://doi.org/10.3181/00379727-191-42891>
- Pastore, G. N., Dicola, L. P., Dollahon, N. R., & Gardner, R. M. (1992). Effect of estrilol on the structure and organization of collagen in the lamina propria of the immature rat uterus. *Biol Reprod*, *47*(1), 83-91. <https://doi.org/10.1095/biolreprod47.1.83>
- Peiró, G., Lohse, P., Mayr, D., & Diebold, J. (2003). Insulin-like growth factor-I receptor and PTEN protein expression in endometrial carcinoma. Correlation with bax and bcl-2 expression, microsatellite instability status, and outcome. *Am J Clin Pathol*, *120*(1), 78-85. <https://doi.org/10.1309/c1ka-h1pr-l1ub-w798>

- Penning, T. M., Ma, H., & Jez, J. M. (2001). Engineering steroid hormone specificity into aldo-keto reductases. *Chem Biol Interact*, 130-132(1-3), 659-671. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(00\)00257-x](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(00)00257-x)
- Perusquía, M., García-Yañez, E., Ibáñez, R., & Kubli-Garfias, C. (1990). Non-genomic mechanism of action of delta-4 and 5-reduced androgens and progestins on the contractility of the isolated rat myometrium. *Life Sci*, 47(17), 1547-1553. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(90\)90183-r](https://doi.org/10.1016/0024-3205(90)90183-r)
- Piltonen, T. T. (2016). Polycystic ovary syndrome: Endometrial markers. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 37, 66-79. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2016.03.008>
- Plaza-Parrochia, F., Bacallao, K., Poblete, C., Gabler, F., Carvajal, R., Romero, C., . . . Vega, M. (2014). The role of androst-5-ene-3beta,17beta-diol (androstenediol) in cell proliferation in endometrium of women with polycystic ovary syndrome. *Steroids*, 89, 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.07.008>
- Powers, J. B. (1970). Hormonal control of sexual receptivity during the estrous cycle of the rat. *Physiology & Behavior*, 5(8), 831-835. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384\(70\)90167-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384(70)90167-8)
- Purohit, A., Fusi, L., Brosens, J., Woo, L. W., Potter, B. V., & Reed, M. J. (2008). Inhibition of steroid sulphatase activity in endometriotic implants by 667 COUMATE: a potential new therapy. *Hum Reprod*, 23(2), 290-297. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem308>
- Qin, A., Qin, J., Jin, Y., Xie, W., Fan, L., Jiang, L., & Mo, F. (2016). DHEA improves the antioxidant capacity of endometrial stromal cells and improves endometrium receptivity via androgen receptor. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 198, 120-126. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.01.016>
- Ramos, J. G., Varayoud, J., Bosquiazzo, V. L., Luque, E. H., & Munoz-de-Toro, M. (2002). Cellular turnover in the rat uterine cervix and its relationship to estrogen and progesterone receptor dynamics. *Biol Reprod*, 67(3), 735-742. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12193379>
- Ramos, J. G., Varayoud, J., Kass, L., Rodriguez, H., Costabel, L., Munoz-De-Toro, M., & Luque, E. H. (2003). Bisphenol a induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology*, 144(7), 3206-3215. <https://doi.org/10.1210/en.2002-0198>
- Rees, D. A., Jenkins-Jones, S., & Morgan, C. L. (2016). Contemporary Reproductive Outcomes for Patients With Polycystic Ovary Syndrome: A Retrospective Observational Study. *J Clin Endocrinol Metab*, 101(4), 1664-1672. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2682>
- Ren, L., Hong, S. H., Cassavaugh, J., Osborne, T., Chou, A. J., Kim, S. Y., . . . Khanna, C. (2009). The actin-cytoskeleton linker protein ezrin is regulated during osteosarcoma metastasis by PKC. *Oncogene*, 28(6), 792-802. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.437>
- Rider, V., Talbott, A., Bhusri, A., Krumsick, Z., Foster, S., Wormington, J., & Kimler, B. F. (2016). WINGLESS (WNT) signaling is a progesterone target for rat uterine stromal cell proliferation. *J Endocrinol*, 229(2), 197-207. <https://doi.org/10.1530/joe-15-0523>
- Ring, A., Kim, Y. M., & Kahn, M. (2014). Wnt/catenin signaling in adult stem cell physiology and disease. *Stem Cell Rev*, 10(4), 512-525. <https://doi.org/10.1007/s12015-014-9515-2>
- Roh, C. R., Oh, W. J., Yoon, B. K., & Lee, J. H. (2000). Up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in human myometrium during labour: a cytokine-mediated process in uterine smooth muscle cells. *Mol Hum Reprod*, 6(1), 96-102. <https://doi.org/10.1093/molehr/6.1.96>
- Rossetti, M. F., Varayoud, J., Moreno-Piovan, G. S., Luque, E. H., & Ramos, J. G. (2015). Environmental enrichment attenuates the age-related decline in the mRNA expression of steroidogenic enzymes and reduces the methylation state

- of the steroid 5alpha-reductase type 1 gene in the rat hippocampus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 412, 330-338. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.024>
- Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). (2004). *Hum Reprod*, 19(1), 41-47. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh098>
- Roy, S., Mahesh, V. B., & Greenblatt, R. B. (1962). Effect of dehydroepiandrosterone and delta4-androstenedione on the reproductive organs of female rats: production of cystic changes in the ovary. *Nature*, 196, 42-43. <https://doi.org/10.1038/196042a0>
- Rudmann, D. G., Cohen, I. R., Robbins, M. R., Coutant, D. E., & Henck, J. W. (2005). Androgen dependent mammary gland virilism in rats given the selective estrogen receptor modulator LY2066948 hydrochloride. *Toxicol Pathol*, 33(6), 711-719. <https://doi.org/10.1080/01926230500343902>
- Sahlin, L., Norstedt, G., & Eriksson, H. (1994). Androgen regulation of the insulin-like growth factor-I and the estrogen receptor in rat uterus and liver. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 51(1-2), 57-66.
- Salleh, N., Baines, D. L., Naftalin, R. J., & Milligan, S. R. (2005). The hormonal control of uterine luminal fluid secretion and absorption. *J Membr Biol*, 206(1), 17-28. <https://doi.org/10.1007/s00232-005-0770-7>
- Salleh, N., Mokhtar, H. M., Kassim, N. M., & Giribabu, N. (2015). Testosterone Induces Increase in Aquaporin (AQP)-1, 5, and 7 Expressions in the Uteri of Ovariectomized Rats. *J Membr Biol*, 248(6), 1097-1105. <https://doi.org/10.1007/s00232-015-9823-8>
- Salvesen, H. B., MacDonald, N., Ryan, A., Jacobs, I. J., Lynch, E. D., Akslen, L. A., & Das, S. (2001). PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Int J Cancer*, 91(1), 22-26. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(20010101\)91:1<22::aid-ijc1002>3.0.co;2-s](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20010101)91:1<22::aid-ijc1002>3.0.co;2-s)
- Sambrook, & Russell. (2001). *Molecular Cloning: a laboratory manual 3rd Edition*. CSHL Press.
- Sanches, J. C., Jones, C. J., Aplin, J. D., Iozzo, R. V., Zorn, T. M., & Oliveira, S. F. (2010). Collagen fibril organization in the pregnant endometrium of decorin-deficient mice. *J Anat*, 216(1), 144-155. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01170.x>
- Sanderson, P. A., Critchley, H. O., Williams, A. R., Arends, M. J., & Saunders, P. T. (2017). New concepts for an old problem: the diagnosis of endometrial hyperplasia. *Hum Reprod Update*, 23(2), 232-254. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw042>
- Sato, T., Wang, G., Hardy, M. P., Kurita, T., Cunha, G. R., & Cooke, P. S. (2002). Role of systemic and local IGF-I in the effects of estrogen on growth and epithelial proliferation of mouse uterus. *Endocrinology*, 143(7), 2673-2679. <https://doi.org/10.1210/endo.143.7.8878>
- Satokata, I., Benson, G., & Maas, R. (1995). Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice. *Nature*, 374(6521), 460-463. <https://doi.org/10.1038/374460a0>
- Shafiee, M. N., Seedhouse, C., Mongan, N., Chapman, C., Deen, S., Abu, J., & Atiomo, W. (2016). Up-regulation of genes involved in the insulin signalling pathway (IGF1, PTEN and IGFBP1) in the endometrium may link polycystic ovarian syndrome and endometrial cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 424, 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.01.019>
- Shang, K., Jia, X., Qiao, J., Kang, J., & Guan, Y. (2012). Endometrial abnormality in women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Sci*, 19(7), 674-683. <https://doi.org/10.1177/1933719111430993>

- Shi, Y. H., Tuokan, T., Lin, C., & Chang, H. (2014). Aquaporin 8 involvement in human cervical cancer SiHa migration via the EGFR-Erk1/2 pathway. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(15), 6391-6395. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.15.6391>
- Shynlova, O., Tsui, P., Jaffer, S., & Lye, S. J. (2009). Integration of endocrine and mechanical signals in the regulation of myometrial functions during pregnancy and labour. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 144 Suppl 1, S2-10. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2009.02.044>
- Simitsidelis, I., Gibson, D. A., Cousins, F. L., Esnal-Zufiaurre, A., & Saunders, P. T. (2016). A Role for Androgens in Epithelial Proliferation and Formation of Glands in the Mouse Uterus. *Endocrinology*, 157(5), 2116-2128. <https://doi.org/10.1210/en.2015-2032>
- Słomczyńska, M., Duda, M., Burek, M., Knapczyk, K., Czaplicki, D., & Koziorowski, M. (2008). Distribution of androgen receptor in the porcine uterus throughout pregnancy. *Reprod Domest Anim*, 43(1), 35-41. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00849.x>
- Smith, M. S., Freeman, M. E., & Neill, J. D. (1975). The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*, 96(1), 219-226. <https://doi.org/10.1210/endo-96-1-219>
- Spencer, T. E., Dunlap, K. A., & Filant, J. (2012). Comparative developmental biology of the uterus: insights into mechanisms and developmental disruption. *Mol Cell Endocrinol*, 354(1-2), 34-53. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.035>
- Spiess, K., Teodoro, W., & Zorn, T. (2007). Distribution of Collagen Types I, III, and V in Pregnant Mouse Endometrium. *Connect Tissue Res*, 48, 99-108. <https://doi.org/10.1080/03008200601166194>
- Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J. L., Brothers, G. M., Mirtsos, C., Sasaki, T., . . . Mak, T. W. (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*, 95(1), 29-39.
- Su, W., Qiao, Y., Yi, F., Guan, X., Zhang, D., Zhang, S., . . . Ma, T. (2010). Increased female fertility in aquaporin 8-deficient mice. *IUBMB Life*, 62(11), 852-857. <https://doi.org/10.1002/iub.398>
- Takamoto, N., Leppert, P. C., & Yu, S. Y. (1998). Cell death and proliferation and its relation to collagen degradation in uterine involution of rat. *Connect Tissue Res*, 37(3-4), 163-175.
- Terada, N., Yamamoto, R., Takada, T., Taniguchi, H., Terakawa, N., Li, W., . . . Matsumoto, K. (1990). Inhibitory effect of androgen on cell death of mouse uterine epithelium. *J Steroid Biochem*, 36(4), 305-310.
- Thorpe, J. B., Burgess, P. S., Sadkowski, M., & deCatanzaro, D. (2013). Estrogen-progesterone balance in the context of blastocyst implantation failure induced by predator stress. *Psychoneuroendocrinology*, 38(12), 3048-3056. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.09.001>
- Trotman, L. C., Wang, X., Alimonti, A., Chen, Z., Teruya-Feldstein, J., Yang, H., . . . Pandolfi, P. P. (2007). Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell*, 128(1), 141-156. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.040>
- Tuckerman, E. M., Okon, M. A., Li, T., & Laird, S. M. (2000). Do androgens have a direct effect on endometrial function? An in vitro study. *Fertil Steril*, 74(4), 771-779. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11020522>
- van der Horst, P. H., Wang, Y., van der Zee, M., Burger, C. W., & Blok, L. J. (2012). Interaction between sex hormones and WNT/ β -catenin signal transduction in endometrial physiology and disease. *Mol Cell Endocrinol*, 358(2), 176-184. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.06.010>
- van der Kwast, T. H., Dommerholt, H. B., van Vroonhoven, C. C., & Chadha, S. (1994). Androgen receptor expression in the cervix of androgen-treated female-to-male transsexuals: association with morphology and chain-specific keratin

- expression. *Int J Gynecol Pathol*, 13(2), 133-138.
<https://doi.org/10.1097/00004347-199404000-00006>
- Varayoud, J., Ramos, J. G., Bosquiazzo, V. L., Lower, M., Munoz-de-Toro, M., & Luque, E. H. (2011). Neonatal exposure to bisphenol A alters rat uterine implantation-associated gene expression and reduces the number of implantation sites. *Endocrinology*, 152(3), 1101-1111.
<https://doi.org/10.1210/en.2009-1037>
- Varayoud, J., Ramos, J. G., Munoz-de-Toro, M., & Luque, E. H. (2014). Long-lasting effects of neonatal bisphenol A exposure on the implantation process. *Vitam Horm*, 94, 253-275. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800095-3.00010-9>
- Verkman, A. S., Hara-Chikuma, M., & Papadopoulos, M. C. (2008). Aquaporins--new players in cancer biology. *J Mol Med (Berl)*, 86(5), 523-529.
<https://doi.org/10.1007/s00109-008-0303-9>
- Vigezzi, L., Bosquiazzo, V. L., Kass, L., Ramos, J. G., Munoz-de-Toro, M., & Luque, E. H. (2015). Developmental exposure to bisphenol A alters the differentiation and functional response of the adult rat uterus to estrogen treatment. *Reprod Toxicol*, 52, 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.01.011>
- Vigezzii, L., Bosquiazzo, V.L., Luque E.H. (2016). *Efectos de la exposición perinatal a bajas dosis de bisfenol a sobre el desarrollo y funcionalidad del tracto reproductor femenino* [PhD THESIS, UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL. FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS (FBCB)]. FACULTAD DE BIOQUIMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS.
- Virolle, T., Adamson, E. D., Baron, V., Birle, D., Mercola, D., Mustelin, T., & de Belle, I. (2001). The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. *Nat Cell Biol*, 3(12), 1124-1128.
<https://doi.org/10.1038/ncb1201-1124>
- Vladic-Stjernholm, Y., Vladic, T., Blesson, C. S., Ekman-Ordeberg, G., & Sahlin, L. (2009). Prostaglandin treatment is associated with a withdrawal of progesterone and androgen at the receptor level in the uterine cervix. *Reprod Biol Endocrinol*, 7, 116. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-116>
- vom Saal, F. S. (1994). Natural history and mechanisms of reproductive aging in humans, laboratory rodents, and other selected vertebrates. *Physiology of reproduction*, 2, 1213-1314.
- Wada-Hiraike, O., Hiraike, H., Okinaga, H., Imamov, O., Barros, R. P., Morani, A., . . . Gustafsson, J. A. (2006). Role of estrogen receptor beta in uterine stroma and epithelium: Insights from estrogen receptor beta-/- mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(48), 18350-18355. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608861103>
- Walters, K. A., McTavish, K. J., Seneviratne, M. G., Jimenez, M., McMahon, A. C., Allan, C. M., . . . Handelsman, D. J. (2009). Subfertile female androgen receptor knockout mice exhibit defects in neuroendocrine signaling, intraovarian function, and uterine development but not uterine function. *Endocrinology*, 150(7), 3274-3282. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1750>
- Wang, F., Feng, X. C., Li, Y. M., Yang, H., & Ma, T. H. (2006). Aquaporins as potential drug targets. *Acta Pharmacol Sin*, 27(4), 395-401.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00318.x>
- Wang, X., Wu, S. P., & DeMayo, F. J. (2017). Hormone dependent uterine epithelial-stromal communication for pregnancy support. *Placenta*, 60 Suppl 1(Suppl 1), S20-s26. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.07.003>
- Wang, Y., Romigh, T., He, X., Tan, M. H., Orloff, M. S., Silverman, R. H., . . . Eng, C. (2011). Differential regulation of PTEN expression by androgen receptor in prostate and breast cancers. *Oncogene*, 30(42), 4327-4338.
<https://doi.org/10.1038/onc.2011.144>
- Watson, P. A., Chen, Y. F., Balbas, M. D., Wongvipat, J., Socci, N. D., Viale, A., . . . Sawyers, C. L. (2010). Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(39), 16759-16765.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1012443107>

- Westwood, F. R. (2008). The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol*, 36(3), 375-384. <https://doi.org/10.1177/0192623308315665>
- Wilson, C. M., & McPhaul, M. J. (1996). A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues. *Mol Cell Endocrinol*, 120(1), 51-57. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(96\)03819-1](https://doi.org/10.1016/0303-7207(96)03819-1)
- Winuthayanon, W., Hewitt, S. C., Orvis, G. D., Behringer, R. R., & Korach, K. S. (2010). Uterine epithelial estrogen receptor alpha is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(45), 19272-19277. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013226107>
- Xi, M., & Tang, W. (2020). Knockdown of Ezrin inhibited migration and invasion of cervical cancer cells in vitro. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 34, 2058738420930899.
- Xia, S. J., Hao, G. Y., & Tang, X. D. (2000). Androgen receptor isoforms in human and rat prostate. *Asian J Androl*, 2(4), 307-310.
- Yip, K. S., Suvorov, A., Connerney, J., Lodato, N. J., & Waxman, D. J. (2013). Changes in mouse uterine transcriptome in estrus and proestrus. *Biol Reprod*, 89(1), 13. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.107334>
- Yoest, K. E., Cummings, J. A., & Becker, J. B. (2019). Ovarian Hormones Mediate Changes in Adaptive Choice and Motivation in Female Rats [Original Research]. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00250>
- Yu, H. F., Chen, H. S., Rao, D. P., & Gong, J. (2016). Association between polycystic ovary syndrome and the risk of pregnancy complications: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 95(51), e4863. <https://doi.org/10.1097/md.0000000000004863>
- Yuan, Y. D., & Foley, G. (2002). Female Reproductive System. In (Vol. 2, pp. 847-894). <https://doi.org/10.1016/B978-012330215-1/50044-2>
- Zehravi, M., Maqbool, M., & Ara, I. (2021). Depression and anxiety in women with polycystic ovarian syndrome: a literature survey. *Int J Adolesc Med Health*, 33(6), 367-373. <https://doi.org/10.1515/ijamh-2021-0092>
- Zhang, J., Sun, Y., Liu, Y., Sun, Y., & Liao, D. J. (2004). Synergistic effects of androgen and estrogen on the mouse uterus and mammary gland. *Oncol Rep*, 12(4), 709-716.
- Zhang, X., Zhang, C., Shen, S., Xia, Y., Yi, L., Gao, Q., & Wang, Y. (2013). Dehydroepiandrosterone induces ovarian and uterine hyperfibrosis in female rats. *Hum Reprod*, 28(11), 3074-3085. <https://doi.org/10.1093/humrep/det341>
- Zhang, Y., Hu, M., Yang, F., Zhang, Y., Ma, S., Zhang, D., . . . Billig, H. (2021). Increased uterine androgen receptor protein abundance results in implantation and mitochondrial defects in pregnant rats with hyperandrogenism and insulin resistance. *J Mol Med (Berl)*, 99(10), 1427-1446. <https://doi.org/10.1007/s00109-021-02104-z>
- Zhao, H., Zhou, D., Chen, Y., Liu, D., Chu, S., & Zhang, S. (2017). Beneficial effects of Heqi san on rat model of polycystic ovary syndrome through the PI3K/AKT pathway. *Daru*, 25(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s40199-017-0188-7>
- Zhao, P. L., Zhang, Q. F., Yan, L. Y., Huang, S., Chen, Y., & Qiao, J. (2014). Functional investigation on aromatase in endometrial hyperplasia in polycystic ovary syndrome cases. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(20), 8975-8979. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.20.8975>
- Zhu, C., Jiang, Z., Bazer, F. W., Johnson, G. A., Burghardt, R. C., & Wu, G. (2015). Aquaporins in the female reproductive system of mammals. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 20, 838-871. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25553483>
- Zou, L. B., Zhang, R. J., Tan, Y. J., Ding, G. L., Shi, S., Zhang, D., . . . Huang, H. F. (2011). Identification of estrogen response element in the aquaporin-2 gene that mediates estrogen-induced cell migration and invasion in human endometrial

Bibliografía

- carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 96(9), E1399-1408. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-0426>
- Zurvarra, F. M., Salvetti, N. R., Mason, J. I., Velazquez, M. M., Alfaro, N. S., & Ortega, H. H. (2009). Disruption in the expression and immunolocalisation of steroid receptors and steroidogenic enzymes in letrozole-induced polycystic ovaries in rat. *Reprod Fertil Dev*, 21(7), 827-839. <https://doi.org/10.1071/rd09026>