

Patrón de expresión del receptor de estrógenos α y β en endometriosis experimental en la rata Wistar

GUADALUPE MARTÍNEZ-SALAZAR,^a SUSANA GONZÁLEZ-GALLARDO,^b
ANTONIA HERNÁNDEZ-MIRANDA,^c YURIRIA PAREDES-VIVAS,^d
REBECA GUEVARA-SILVA,^d IVONE CASTRO-ROMERO^e

RESUMEN

Objetivo: Determinar el patrón de expresión del receptor de estrógenos RE- α y RE- β en la endometriosis peritoneal inducido en forma experimental en la rata Wistar.

Material y métodos: Se utilizaron diferentes grupos de ratas hembras con endometriosis inducida en forma experimental en diferentes fases de ciclo estral para determinar el patrón de expresión del RE- α y RE- β , tanto en el tejido sano como el de los implantes por inmunolocalización, usando anticuerpos específicos para cada una de las isoformas.

Resultados: No existe diferencia en el patrón de expresión de los RE α y β entre el tejido endometriótico y el control; sin embargo, en el caso del RE- β el porcentaje de expresión es casi nulo durante las fases de proestro y diestro, tanto en el tejido normal como el de los implantes.

Conclusiones: La expresión del receptor de estrógenos alfa (RE- α) en la endometriosis experimental en la rata está ampliamente documentada, sin embargo, hay poca información de la forma β . En este trabajo demostramos la expresión de la forma β , tanto en el tejido sano como en el endometriótico, por lo cual pensamos que este modelo animal podría ser utilizado como una herramienta para futuros estudios relacionados con esta patología.

PALABRAS GUÍA: Receptor de estrógenos- α , receptor de estrógenos- β , endometriosis peritoneal.

INTRODUCCIÓN

La endometriosis se caracteriza por el crecimiento de tejido endometrial ectópico,

causante de dismenorrea, dispareunia, dolor pélvico e infertilidad. Los focos endometrióticos se forman principalmente en ovarios, peritoneo, ligamento uterosacro y el *septum* rectovaginal.

La incidencia de endometriosis varía de 40 a 60% y en mujeres con infertilidad de 20-30%.¹ A pesar de que la etiología de la endometriosis no se conoce, en la actualidad sigue vigente la teoría de la menstruación retrógrada, la cual señala que células de origen endometrial pasan a la cavidad pélvica y se desarrollan eficientemente formando focos en diferentes tejidos contenidos en la cavidad pélvica.²

^a Investigador Asociado B. Departamento de Bioquímica, INPer

^b MVZ. Responsable del Bioterio del INPer

^c QFB. Adscrito al Depto. de Bioquímica, INPer

^d QBP. Adscrito al Depto. de Microscopía, INPer

^e Jefe del Depto. de Bioquímica y Biología Molecular, INPer

Correspondencia:

Dra. Ivone Castro Romero

Instituto Nacional de Perinatología. (INPer).

Montes Urales 800, Col. Lomas de Virreyes,

México, D.F. CP 11000. Tel. 55 20 99 00, Ext. 342, Fax: 55 20 97 05.

Correo electrónico: jicastro@mail.ssa.gob.mx

Recibido: 2 de diciembre de 2002

Aceptado: 16 de diciembre de 2002

La endometriosis es considerada como una patología cuyas lesiones son dependientes del estímulo estrogénico, y existen diferentes estudios encaminados al estudio de la expresión de este receptor en la endometriosis ovárica en humanos que han demostrado la existencia de un reducido número de receptores (RE- α) para este esteroide, comparado con el tejido sano.^{3,4} Recientemente, Matsuzali, *et al.*⁵ caracterizaron la expresión del RNAm del receptor de estrógenos RE- α y RE- β en pacientes con endometriosis ovárica, demostrando una expresión predominante del receptor α (100%) en células epiteliales y del estroma, tanto en las lesiones como en los controles; sin embargo, el RE- β solamente se pudo detectar en 63% (12/19) de los quistes ováricos endometriósicos. A pesar de que estos estudios son altamente sugestivos de una expresión diferencial de este receptor, entre el tejido sano y el endometriósico, estos resultados sólo se pueden extrapolar a la endometriosis ovárica, y no así a los focos localizados en otros compartimientos, tales como el peritoneo, cuyo entorno hormonal y de otros factores relacionados con el crecimiento celular son diferentes; por lo que en el presente trabajo nos propusimos evaluar el patrón de expresión de este receptor en sus dos formas (α y β) en diferentes fases del ciclo estral. Elegimos este modelo debido a que nos permite controlar eficientemente el ciclo estral por medio de frotis vaginales, lo cual a veces, no es fácil de lograr en humanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 16 ratas hembras tipo Wistar, de 216 a 330 g de peso (10 a 12 semanas de edad), las cuales se mantuvieron en condiciones de 45 a 50% de humedad, a una temperatura ambiental de 23 ± 1 °C, con ciclos de luz/obscuridad de 14/10 y con 12 ciclos de intercambio de aire por hora, agua filtrada y alimento comercial LAB DIET 5001, PMI administrados *ad libitum*.

Grupos

Previo a la cirugía, a cada hembra se le tomó un frotis vaginal para determinar la fase del

ciclo estral y se dividieron en cuatro grupos de cuatro animales en cada uno, quedando agrupados de la siguiente manera: Proestro (Grupo I), Estro (Grupo II), Metaestro (Grupo III) y Diestro (Grupo IV). El cuerno uterino izquierdo del propio animal se utilizó como control de tejido sano.

Cirugía

Previo a la cirugía, todos los animales se pesaron con el fin de calcular la dosis de anestésico [Hidrocloruro de xilacina (ROM-PUN, Lab. Bayer, 20 mg/mL) y ketamina (IMALGEN 1000, Merial México, S.A. de C.V., ketamina base 100 mg/mL)].

La cirugía se realizó con la hembra en posición de decúbito dorsal, fijando los cuatro miembros, y posterior al rasurado general y la antisepsia del abdomen, se procedió a la incisión sobre la línea media del abdomen (1.5 cm), abarcando piel, tejido celular y músculo cutáneo. El epiplón e intestinos se desplazaron hacia la región craneal para localizar el cuerno derecho del útero, el cual fue disecado y colocado posteriormente en una caja de Petri estéril, conteniendo solución salina fisiológica a 37 °C. En estas condiciones se procedió a realizar un corte en el cuerno por su parte lateral, exponiendo completamente el endometrio, se midió y se seccionó para obtener fragmentos de 2 x 2 mm, los cuales fueron implantados en la pared del peritoneo (dos implantes en cada flanco) y finalmente se cerró la cavidad abdominal (Vernon, 1985).⁹

Después de la cirugía, el estado de salud posquirúrgico de las hembras fue evaluado durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo se mantuvieron en las condiciones de higiene y alimentación descritos anteriormente. El día del sacrificio de todos los animales (40 días posteriores a la cirugía) se realizó otro frotis vaginal para registrar la fase del ciclo estral.

La muerte fue realizada por dislocación cervical y posteriormente se procedió a retirar los implantes. En cada animal se recuperaron cuatro implantes cuyas dimensiones fueron medidas y registradas además del cuerno uterino izquierdo que sirvió como control.



Posteriormente, fueron fijados con formol neutro 4% e incluidas en parafina para su análisis microscópico y de inmunohistoquímica. Todos los procedimientos utilizados para el manejo de los animales fueron hechos tomando en cuenta las disposiciones de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-Z00-1999).⁶

Inmunohistoquímica

Cortes de tejido de 4 micras de grosor fueron desparafinadas con diferentes alcoholes e incubadas en un *buffer* de citratos (ácido cítrico 0.1 M y citrato de sodio 0.1 M, pH 6.0) a 95 °C durante 35 minutos y se dejaron a enfriar a temperatura ambiente, durante 20 min. Posteriormente, se incubaron durante 10 minutos en 0.3% de peróxido de hidrógeno, se lavó con agua corriente y se le adicionó albúmina al 1% en solución salina de fosfatos (PBS) durante 60 minutos. Pasado este tiempo, fueron adicionados el primer anticuerpo (50 µL/corte) a una dilución de 1:75 (RE-α) y 1:1000 (RE-β), incubados a 37 grados en horno seco durante 60 minutos y lavados con TBS (Tris-Base 0.05 M y cloruro de sodio 0.1 M).

La detección de ambas formas del receptor se realizó con un anticuerpo monoclonal RE-α anti-humano de ratón (DAKO M-7047, clone 1D5) y un policlonal anti-RE-β Y19 de cabra. (Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA), respectivamente. En el caso del RE-β las laminillas fueron analizadas con un sistema comercial [Sistema Estreptavidina-biotina-HRP y Diaminobenzidina (DAB) ; LSAB system, DAKO, CA, USA] y para el RE-α usamos el kit comercial Vectastain ABC kit elite (PK-6102 Mouse IgG, Vector Lab. Inc. CA, USA). Todas las muestras fueron contrateñidas con hematoxilina de Harris (0.4%) durante cinco minutos, montadas con el medio de montaje acuoso Faramount (DAKO, CA, USA).

Por último, todas las laminillas fueron evaluadas por dos observadores, en un microscopio óptico (40 X). El porcentaje de células teñidas se calculó a partir de la evaluación de 200 células por laminilla y el total de células positivas se estimó en una escala de 0 a 4 de acuerdo con el método

descrito por Benítez-Bribiesca y cols,⁷ quienes asignan los siguientes valores: 0 = no teñido; 1+ = > 25% de células teñidas; 2+ = 50% de células teñidas; 3+ = 75% células teñidas; y 4+ = > 75% de células teñidas.

Radioinmunoanálisis (RIA) para estradiol

Una muestra de sangre intracardiaca fue tomada el mismo día de la muerte de los animales; posteriormente, se hizo la extracción de los esteroides del suero con dietiléter y por último se midió la concentración de estradiol por radioinmunoanálisis.⁸ El anticuerpo utilizado en este ensayo fue el siguiente: anti-estradiol 17β (ICN Biomedical Inc., CA, USA) el cual cruza con estriol (2.4%), estradiol 17α (1.3%) y estrona (1.3%). La hormona marcada utilizada fue el [2,4,6,7-³H-(N)]-estradiol (Actividad específica: 70-115 Ci/(2.96-4.25 Bq)/mmoL), (New England, Boston, MA). La hormona marcada sin unir fue separada con carbón-dextrán. El coeficiente de variación intra e interensayo fue de 5 y 11%, respectivamente.

Análisis estadístico

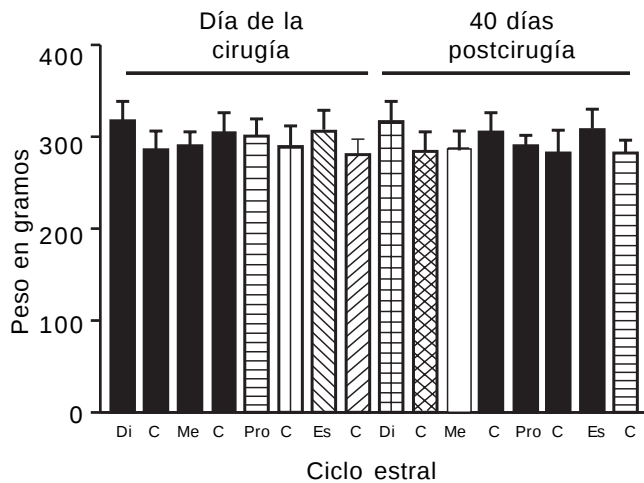
Las diferencias entre los diferentes grupos se realizó mediante un análisis de ANOVA de una sola vía, y la prueba estadística de Turkey, considerando una alfa de 0.05. El análisis se hizo con el programa Graph Pad Prism, 2.01.

RESULTADOS

Efecto de la técnica quirúrgica

En primer lugar, encontramos que el peso de los animales fue muy homogéneo entre las diferentes fases del ciclo estral en cada grupo y no se observó un incremento estadísticamente significativo en el peso de los animales a los 40 días postoperados, comparado con el registrado el día de la cirugía. Las diferencias en peso entre los grupos, se calculó mediante análisis de ANOVA y la prueba estadística de Turkey, no encontrándose diferencias significativas entre los diferentes tratamientos quirúrgico ($p > 0.05$), ni entre las diferentes fases del ciclo estral intragrupo ($p > 0.05$) (Figura 1).

Figura 1
Peso* de las ratas antes y después de la cirugía



* Peso en gramos de los diferentes grupos experimentales: Diestro (Di), Control Diestro (C), Metaestro (Me), Control Metaestro (C), Proestro (Pro), Control proestro (C), Estro (Es), Control Estro (C). Los resultados se expresan como promedio $\pm$ DE en dos experimentos de seis animales por cada uno de los grupos.

Tabla 1
Tamaño de los implantes de endometrio en el peritoneo después de 40 días postcirugía

Fase del ciclo estral	Mediana (mm x mm)	Intervalos (mm x mm)
Diestro	5 x 5	(9x3)-(2x2)
Metaestro	3 x 3	(8x5)-(2x2)
Proestro	3 x 3	(8x5)-(2x2)
Estro	4 x 3	(9x5)-(2x2)

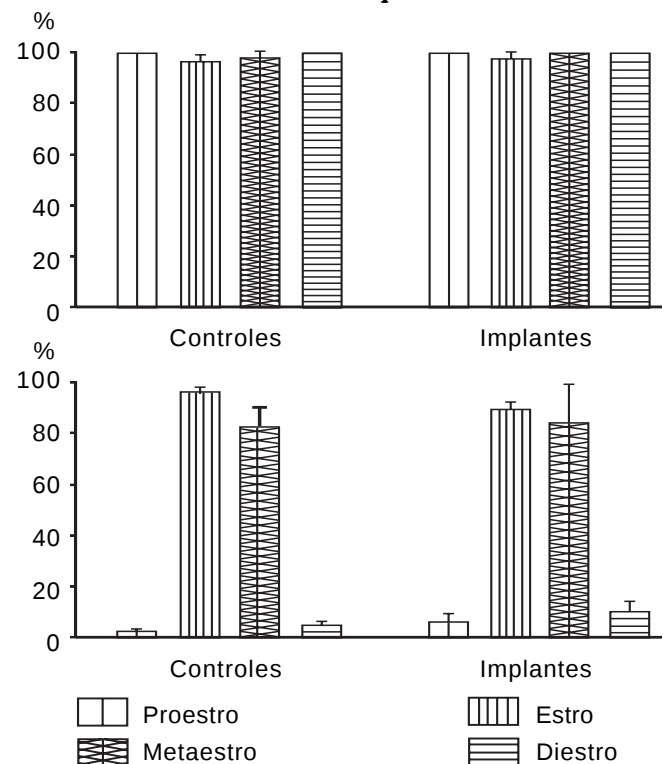
Por otro lado, en la tabla 1 se muestra el tamaño alcanzado por los implantes de tejido uterino en las diferentes fases del ciclo estral de los animales estudiados. Si consideramos la mediana, en todos los casos el tamaño del implante fue mayor al inicial (2 mm x 2 mm), pero cuando comparamos entre grupos, el tamaño fue mayor para las fases de diestro y estro; sin embargo, los intervalos encontrados entre cada grupo fueron similares. Histológicamente, no se encontraron diferencias importantes entre los implantes y el tejido

correspondiente al cuerno uterino que se utilizó como control. En ambos cortes se encontró tejido del estroma, epitelio endometrial y glandular sin alteraciones.

Expresión del RE α y β por inmunohistoquímica

En la figura 2 (parte superior) se muestra que la expresión del receptor de estrógenos α en el tejido uterino control y el implantado en el peritoneo fue del 100%, no existieron diferencias entre las diferentes fases del ciclo estral en estos animales. Por otro lado, en el caso del RE- β (Figura 2, parte inferior) se observa que la expresión de esta isoforma fue significativamente mayor en las fases de estro y metaestro, comparado con la encontrada en las fases de diestro y proestro ($p = 0.001$). Sin embargo, este mismo patrón se observó, tanto en el tejido control, como el implantado en el peritoneo.

Figura 2
Expresión del receptor de estrógenos por inmunohistoquímica



* Forma α (arriba) y β (abajo). Los resultados se expresan como promedio $\pm$ DE.



Concentraciones de estradiol sérico

En la figura 3 se muestran la concentración de estradiol presente en los diferentes grupos de animales, a los que se les implantó el cuerno uterino o tejido adiposo en el peritoneo. Los datos representan los valores obtenidos en sangre obtenida 40 días después de la cirugía, el mismo día de la toma del tejido implantado. Observamos que el patrón del contenido en suero de este esteroide no es el mismo entre el grupo de animales que fueron implantados con tejido adiposo o con el cuerno uterino; sin embargo, luego del análisis de ANOVA y la prueba de Turkey, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos quirúrgicos ($p > 0.05$) ni entre las diferentes fases del ciclo estral intragrupo ($p > 0.05$).

Discusión

Uno de los problemas para el estudio de la endometriosis en los seres humanos es la dificultad para obtener, tanto el tejido normal como el endometriósico, en las diferentes fases del ciclo menstrual, por las implicaciones éticas que esto conlleva. Por lo anterior, se hace necesario contar con un modelo experimental

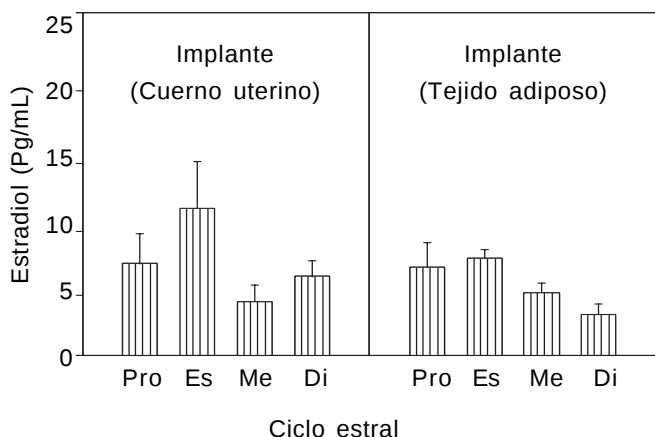
en animales, los cuales deben de ser de fácil manejo y de bajo costo. Aun cuando estamos conscientes de que el modelo en chimpancés, es, tal vez, el mejor modelo animal, los experimentos son muy costosos, por lo que la inducción de endometriosis en la rata Wistar ha sido considerado como un modelo alternativo.

En el presente trabajo decidimos utilizar el modelo de endometriosis experimental descrito previamente por Vernon y cols. (1985),⁹ quien autoimplantó cortes de tejido uterino de aproximadamente 2 mm de tamaño en el peritoneo. Con esta técnica encontramos que al cabo de 40 días el tejido implantado estaba bien vascularizado, en forma de quiste, el cual contenía un fluido seroso de color amarillo. El tamaño promedio de los focos endometriósicos fue similar a lo reportado por Vernon, siendo mayores cuando los tejidos fueron implantados en la fase de diestro; sin embargo, los rangos fueron muy similares para todos los grupos. Histológicamente, las principales diferencias encontradas entre el tejido uterino control y el implante fueron que en este último el tejido estaba rodeado de tejido conectivo en el sitio de unión al peritoneo, así como la presencia de grandes cantidades de linfocitos y células endometriales libres (datos no mostrados).

Con relación a la expresión del receptor de estrógenos, se ha visto que en condiciones normales, el RNAm del RE- α en el útero es más abundante, en tanto que la expresión del RE- β es muy baja.¹⁰ Sin embargo, en la endometriosis los diferentes estudios realizados en humanos reportan resultados controversiales. Algunos de ellos muestran que existe una menor concentración de este receptor en el tejido endometriósico, comparado con el normal;^{4,11-14} pero otros muestran lo contrario,¹⁵ y algunos más no encuentran diferencias entre ambos tipos de tejido.¹⁶ Pensamos que esta controversia pudiera deberse, en gran medida, a que no existe homogeneidad al momento en que se realiza la obtención de los tejidos, ya que es muy difícil que las mujeres se encuentren en la misma fase del ciclo y con el mismo grado de endometriosis, además de la gran variabilidad en las características del foco endometriósico.

Figura 3

Concentración de los niveles de estradiol sérico* en los animales con endometriosis



* Concentración de estrógenos en suero:

Proestro (Pro), Estro (Es), Metaestro (Me), Diestro (Di).

Los resultados se expresan como el promedio $\pm$ DE en dos experimentos de seis animales por cada uno de los grupos.

Es por ello que, para este estudio, decidimos tratar de controlar estas variables, utilizando un modelo animal. Bajo nuestras condiciones experimentales encontramos que no existe diferencia en el patrón de expresión del receptor de estrógenos α entre el tejido uterino normal (cuerno izquierdo) y el de los implantados en peritoneo y en ambos casos se encontró el mismo porcentaje de expresión en las diferentes fases del ciclo estral. En relación con la forma β , demostramos que la expresión de esta isoforma, en ambos tejidos, dependió de la fase del ciclo estral en la cual se encontraban los animales, pero no así en las concentraciones de estradiol sérico.

Estos resultados concuerdan con los hallazgos previamente informados por Ortega y cols. (1994),¹⁷ quienes utilizando un modelo similar al nuestro, no encontraron diferencias en la concentración de este receptor en el tejido implantado y el normal; sin embargo, la técnica utilizada por estos autores (unión al ligando) no discrimina entre las diferentes isoformas del receptor.

Por otro lado, nuestros resultados muestran una predominancia en la expresión de la isoforma α del receptor de estrógenos, sobre la forma β , de la misma manera que lo observado por otros investigadores en la endometriosis ovárica humana, sin embargo, ellos sí encuentran diferencias entre las diferentes fases del ciclo menstrual para ambos receptores. Esto sugiere que, tal vez, el entorno en el cual se desarrolla el tejido endometrial es de vital importancia para la expresión del receptor de estrógenos, ya que como demostramos

en la rata, éste no depende de las concentraciones séricas, y, tal vez, en caso de la endometriosis ovárica, el tejido está más expuesto a las hormonas secretadas por el propio ovario, lo cual no sucede con la endometriosis peritoneal.

Con estos resultados en conjunto podemos concluir que, a diferencia de lo reportado en humanos, el desarrollo del tejido endometrial en la cavidad peritoneal en la rata Wistar no modifica la expresión del receptor de estrógenos y que la expresión del RE- β no depende de las concentraciones séricas de estradiol. El hecho de no haber encontrado diferencias entre grupos sugiere dos cosas: 1) que 40 días de permanencia del tejido uterino en el peritoneo no es suficiente para que las células se diferencien y puedan observarse cambios importantes en la transcripción del gene que codifica para este receptor; y 2) este modelo no es el apropiado para el estudio de este receptor. Nosotros nos inclinamos por la primera posibilidad y creemos que es necesario incrementar el tiempo de duración del implante. Por otro lado, sería importante realizar este tipo de experimento en donde el implante se haga en la cavidad pélvica para inducir la endometriosis ovárica.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marta Romano Pardo y a Elizabeth Hernández del Departamento de Fisiología y Biofísica del CINVESTAV, por su ayuda desinteresada en la revisión de este manuscrito y apoyo técnico, respectivamente.



ABSTRACT

Objective: To determine the pattern of the estrogen receptors ER- α and ER- β expression in a surgical-induced endometriosis in the Wistar rat.

Material y methods: Mature cycling rats were used. Experimental peritoneal endometriosis was induced by surgery. ER- α and ER- β expression were detected by immunohistochemistry and serum estradiol content was measured by radioimmunoassay (RIA), using specific antibodies.

Results: There are not statistical differences in the pattern of the ER- α and ER- β expression, between normal and endometriotic tissues. But the expression of the ER- α was higher than ER- β . The receptor expression did not depend from the estradiol content in serum.

Conclusions: The present work documents for the first time the pattern expression of the estrogen receptor beta (ER- β) in peritoneal rat endometriotic tissue, which was not different to the control tissue.

KEY WORDS: *Estrogen receptors- α , estrogen receptors- β , endometriosis.*

REFERENCIAS

1. Farquhar CM. Endometriosis. *Brit Med J* 2000; 320: 1449-52.
2. Gaetje R, Kotzian, Hermann G, Baumann R, Starzinski-Powitz. Invasiveness of endometriotic cells in vitro. *Lancet* 1995; 346: 1463-4.
3. Misao R, Fujimoto J, Nakanishi Y, Tamaya T. Expression of estrogen and progesterone receptors and their mRNA in ovarian endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 1996; 10: 303-10.
4. Bergqvist A, Ferno M. Estrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and endometrium: Comparison according to localization and recurrence. *Fert Steril* 1993; 60: 63-8.
5. Matsuzaki S, Fukaya T, Uehara S, Murakami T, Sasano H, Yajima A. Characterization of messenger RNA expression of estrogen receptor α and β in patients with ovarian endometriosis. *Fert Steril* 2000; 73: 1219-25.
6. Norma Oficial Mexicana NOM-062-Z00-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. México, 1999.
7. Benitez-Bribiesca L, Guevara R, Ruiz MT, Martínez G, Rodríguez-Cuevas S. A simplified histoscore for the estrogen receptor assay in breast cancer. *Path Res Pract* 1992; 188: 461-5.
8. Jaffe BM, Berhrman HR. Methods of hormone radioimmunoassay. New York: Academic Press; 1979.
9. Vernon MW, Wilson EA. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertil Steril* 1985; 44: 684-94.
10. Shughrue PJ, Lane MV, Scrimo PJ, Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha (ER- α) and beta (ER- β) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract. *Steroids* 1998; 63: 498-504.
11. Bergqvist A, Carlstrom K, Jeppsson S, Ljunberg O. Histochemical localization of specific estrogen and progesterone binding in human endometrium and endometriotic tissue. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1984; 123(Suppl.): 155-63.
12. Bergqvist A, Ljunberg O, Skoog L. Immunohistochemical analysis of oestrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and endometrium. *Hum Reprod* 1993; 8: 1915-22.
13. Janne O, Kauppila A, Kokko E, Lanta T, Ronnberg I, Vikhe R. Estrogen and progesterone receptors in endometriosis lesions:

- comparison with endometrial tissue. Am J Obstet Gynecol 1981; 141: 562-6.
14. Tamaya T, Motoyama Ohono Y, Ide N, Tsurusaki T, Okada H. Steroid receptor levels and histology of endometriosis and adenomyosis. Fertil Steril 1979; 31: 396-401.
15. Fujishita A, Nakane P, Koji T, Cavez R, Yamabe T, Ishimaru T, Masuzaki H. Expression of estrogen and progesterone receptors in endometrium and peritoneal endometriosis: an immunohistochemical and *in situ* hybridization study. Fertil Steril 1997; 67: 856-64.
16. Nisolle M, Casanas-Roux F, Donnez J. Immunohistochemical analysis of proliferative activity and steroid receptor expression in peritoneal and ovarian endometriosis. Fertil Steril 1997; 68: 912-9.
17. Ortega-Moreno J. Receptor concentrations for estradiol and progesterone in surgically induced endometriosis in the rat. Eur J Obstet Gynecol 1994; 54: 123-6.