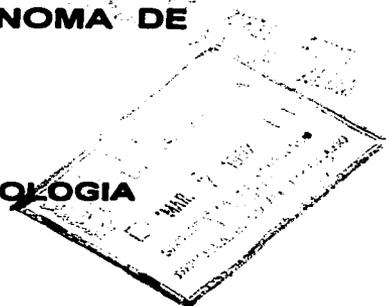


11204 6
21

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA



Efecto de diferentes progestinas en el endometrio de mujeres postmenopáusicas

TESIS

Ernesto
DR. ERNESTO CASTELAZO MORALES

DIRECTOR DE ENSEÑANZA

Para obtener el título de subespecialista en:

BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION HUMANA

PRESENTA:

Dr. Javier Tenorio Ramos

TUTORES:

**Dr. en C. Julieta Ivone Castro Romero
Dr. Javier Santos González**

[Signature]
**C. ANTONIO ESPINOSA DE LOS REYES EL
PROFESOR TITULAR**

[Signature]

México D.F.

1996-1997.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

AL DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

AL DEPARTAMENTO DE CLIMATERIO DEL INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

ALA DIVISION DE BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION DEL INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

AL DEPARTAMENTO DE CONSULTA EXTERNA DEL INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

AL CUERPO DE RESIDENTES DE GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA DEL INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

AL CUERPO DE RESIDENTES DE BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION DEL INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

AL GRUPO DE PACIENTES PARTICIPANTES DE ESTE PROYECTO

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A MIS TUTORES

Dra. Julieta Ivone Castro Romero.

Por su confianza, comprensión, entusiasmo, incansable colaboración y valiosa dirección de esta tesis.

Dr Javier Santos Gonzalez.

Por su confianza, amistad y valiosa asesoría en la realización de este trabajo.

A LOS COLABORADORES DE ESTA TESIS

Biol. Arturo Barrón González.

Dr Arturo Torres Martínez.

Dra Fernanda Rio de la Loza.

Por su desinteresada y valiosa colaboración.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A MIS PADRES

Por su amor, sacrificio, comprensión y apoyo en todo momento.

A MIS HERMANOS

Flor, Marco, Selene y Eddy

Por su apoyo y palabras de aliento.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS

Chema, Jose Luis, Vero, Luis, Jorge, Marco y Raúl

Por su ejemplo, compañerismo y apoyo generoso.

INDICE

Resumen.....	2
Introducción.....	3
Climaterio	
a) Definición.....	4
b) Manejo médico.....	5
Progestinas	
a) Generalidades de las progestinas.....	7
b) Aspectos morfológicos del endometrio humano durante la terapia de reemplazo hormonal.....	9
Apoptosis	
a) Definición.....	10
b) Papel de apoptosis en reproducción.....	13
c) Apoptosis y hormonas esteroideas.....	14
Justificación.....	16
Objetivo general.....	17
Hipótesis.....	17
Metodología.....	18
Diagrama de flujo.....	19
Resultados.....	20
Discusión.....	26
Conclusiones.....	29
Sugerencias.....	29
Bibliografía.....	30
Anexo 1	
Detección molecular in situ de apoptosis.....	37

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Diferencias entre apoptosis y necrosis.....	11
Cuadro 2 Datos generales de las pacientes.....	20
Cuadro 3 Reporte histopatológico de las biopsias.....	23
Cuadro 4 Indice de apoptosis de las biopsias.....	24
Cuadro 5 Perfil hormonal ginecológico de las pacientes.....	25

RESUMEN

Las progestinas han sido ampliamente utilizadas en el tratamiento y control de diferentes procesos biológicos en el campo de la reproducción. La noretisterona es una progestina derivada del 19-nor-testosterona con actividad progestacional que puede metabolizarse *in vivo*, sufriendo una reducción en el anillo A de la molécula. Este cambio en estructura hace que uno de sus metabolitos (5α -NET) adquiera actividad antiprogestacional, la cual ha sido previamente evaluada en modelos animales. En la actualidad esta progestina es utilizada como terapia hormonal de remplazo en mujeres posmenopausicas con buenos resultados en algunas pacientes, sin embargo en otras se llega a presentar amenorrea secundaria a su administración.

Existen evidencias de que la antiprogestina (RU486), induce la muerte celular por apoptosis en las células del endometrio del conejo, por su acción inhibitoria de la acción de progesterona. Es posible entonces suponer que la conversión de NET a su metabolito 5α reducido pudiera estar produciendo el mismo efecto en el endometrio de la mujer.

El presente trabajo fué enfocado a la evaluación de este efecto en un modelo humano, considerando que el endometrio de las mujeres posmenopáusicas mantiene su capacidad de respuesta a estímulos hormonales.

Se estudiaron ocho mujeres, a las cuales se les administró noretisterona por vía oral ó subdérmica, medroxiprogesterona ó progesterona natural de acuerdo a un esquema preestablecido (ver material y métodos).

Nuestro resultados demostraron que NET en sus diferentes vías de administración induce la muerte celular por apoptosis, siendo su efecto mayor sobre las células del estroma, posiblemente a través del bloqueo de la acción protectora de la progesterona. Este efecto fué menos potente en las mujeres que fueron tratadas con medroxiprogesterona y no se observó en las que recibieron la progesterona natural.

Consideramos que hasta ahora no podemos hacer un análisis concluyente, ya que el número de pacientes incluidos en el estudio no es suficiente, sin embargo los datos encontrados son interesantes y apoyan la continuación de este estudio, ya que no existe información en la literatura respecto al efecto de la noretisterona en el proceso de proliferación y muerte celular.

INTRODUCCION.

El uso de progestinas en ginecología obedece a la necesidad de inducir artificialmente un ciclo menstrual normal, frecuentemente con fines de planificación familiar, control del ciclo menstrual, control de sangrado uterino o bien de remplazo hormonal. Generalmente su uso esta asociado con estrógenos, que inducen la proliferación del tejido endometrial, con el fin de antagonizar este efecto y una vez suspendidas ambas hormonas se presente el sangrado menstrual.

El valor de la terapia de remplazo hormonal (TRH) esta bien establecido, los beneficios terapéuticos y profilácticos superan, en la mayoría de las pacientes, los riesgos potenciales. Uno de los principales problemas de la TRH es la falta de adherencia al tratamiento, provocada por el reinicio de sangrado menstrual en aquellas pacientes que conservan el útero.

Existe un arsenal terapéutico que permite utilizar diferentes agentes, por diferentes vías, en diferentes esquemas con el único fin de ofrecer los beneficios de TRH de la manera más cómoda. Sin embargo aún no se cuenta con el esquema de tratamiento ideal que permita los beneficios de la terapia hormonal con un bajo riesgo y que no produzca sangrado en todas aquellas pacientes que conservan el útero, lo que sin duda incrementaría la adherencia al tratamiento.

La búsqueda de un progestágeno ideal en la TRH nos ha llevado a considerar algunos aspectos básicos de la fisiología endometrial, tal es el caso del efecto antiproliferativo de las principales progestinas utilizadas en el mercado para este fin.

A principio de la década de los setenta, algunos estudios de morfología dieron origen al concepto de apoptosis o muerte celular programada como la contraparte reguladora de la proliferación tisular, que tiene algunas características fundamentales que lo hacen totalmente diferente a la muerte producida por necrosis celular. En el endometrio, este proceso esta regulado por el efecto de hormonas esteroides y se puede observar con más frecuencia durante la fase premenstrual del ciclo endometrial, lo cuál indica que la disminución del efecto trófico de las hormonas esteroides induce la muerte celular programada.

La observación puede hacerse mediante el microscopio de luz o bien con técnicas de biología molecular que identifiquen la fragmentación del ácido desoxirribonucleico (DNA.), un indicador del inicio del proceso de apoptosis.

En algunos modelos experimentales en animales la progesterona ejerce un efecto inhibidor de la apoptosis en células endometriales y algunos agentes antiprogestacionales como el RU 486 inducen apoptosis a pesar del efecto trófico de hormonas esteroides. Recientemente se ha encontrado que uno de los metabolitos de noretisterona (5 α -NET) ejerce un efecto antiprogestacional, por lo que es posible que pudiera tener la capacidad de desencadenar apoptosis en células endometriales de la misma manera que el RU 486 (1).

El objetivo de este estudio es establecer si la administración de diferentes progestinas, incluyendo la noretisterona, utilizadas a dosis terapéuticas en mujeres postmenopáusicas, son capaces de producir el mismo efecto antiprogestacional observado en el endometrio de animales de experimentación.

CLIMATERIO

a) Definición

Es la etapa de transición en la vida de la mujer en cuál pierde su capacidad reproductiva y se caracteriza por la pérdida de la función ovárica, es decir, la gónada femenina deja de responder al estímulo hipofisiario y por lo tanto no existe desarrollo folicular.

El síndrome climatérico es aquel conjunto de signos y síntomas que acompañan a esta etapa de la vida, generalmente causados por el estado hipoestrogénico resultado de la falla ovárica. Se debe diferenciar del término menopausia, que únicamente se refiere, al último periodo menstrual, siempre y cuando este se haya presentado un año antes. Por lo tanto para llamar menopausia a un periodo menstrual, debe hacerse de manera retrospectiva.

El cuadro clínico de climaterio incluye una gran diversidad de síntomas, estos se presentan agrupados en etapas evolutivas que dependen del tiempo transcurrido de la falla ovárica, inicialmente los trastornos menstruales, los síntomas vasomotores, los síntomas psicológicos y algunos sexuales nos indican que la función ovárica esta comprometida. Una vez instalada esta, se presentan síntomas relacionados con atrofia tisular, secundaria a la falta de estímulo trófico

de los estrógenos, en una etapa posterior se presentan además cambios que se han considerado como secundarios al proceso de envejecimiento.

Los niveles hormonales encontrados en pacientes climatéricas se deben a la atresia sufrida por una gran cantidad de folículos durante este periodo. Las mujeres presentan niveles decrecientes de estradiol y un aumento paulatino de sus niveles séricos de FSH y LH (2, 3). La elevación en la FSH se debe a una respuesta folicular deficiente, caracterizada por una baja tasa de producción de estrógenos y de inhibina (4), sin embargo, los mecanismos por los cuales se llega a esta pobre respuesta aún no se conocen.

La principal fuente de estrógenos circulantes durante esta época es la aromatización periférica de andrógenos (5, 6), pero existe otra fuente de producción de hormonas esteroideas localizado en las células del parénquima ovárico, demostrado por estudios in vitro, mediante la expresión de aromatasas citocromo P450 (7), aún cuando en ellas predomina la producción de testosterona (8).

Las células del estroma de mujeres postmenopáusicas mantienen una cantidad normal de receptores para hormona luteinizante (LH), sin embargo los receptores para FSH se encuentran disminuidos, esto debido a la caída en los niveles de estrógenos séricos en estas pacientes (8).

Durante la etapa postmenopáusica la concentración sérica de estrona es mayor a la de estradiol, contrario a lo que sucede en las mujeres en edad reproductiva. Así mismo el sulfato de estrona (metabolismo del estradiol y de la estrona), también se encuentra disminuido , pero se encuentra en su forma inactiva. (9).

La postmenopausia también se asocia con una disminución en la producción ovárica de testosterona, obtenida durante este periodo, a partir de la androstenediona (10).

b) Manejo médico.

El manejo de este tipo de pacientes básicamente consiste en diagnosticar tempranamente enfermedades crónico-degenerativas y enfermedades neoplásicas, el tratamiento de los síntomas propios del climaterio, en dar apoyo psicológico y quizá lo más importante prevenir las enfermedades cardiovasculares y la osteoporosis que requiere del trabajo de un grupo multidisciplinario que se encargue de cumplir con los objetivos antes mencionados. En cuanto a la prevención de enfermedades cardiovasculares y la pérdida acelerada de masa

ósea, se sugiere el consumo de una dieta rica en calcio, baja en fibra y grasas, la suplementación alimenticia de calcio, el cambio de estilos de vida nocivos, ejercicio y TRH.

La terapia de remplazo hormonal ha mostrado ser de gran utilidad en el tratamiento de la sintomatología propia del climaterio temprano, así como en la prevención de complicaciones cardiovasculares y óseas (11 - 17).

El remplazo hormonal consiste básicamente en suplementar a las mujeres con dosis terapéuticas de estradiol, ya que es el responsable de la mayoría de efectos benéficos de la TRH, excepto por los efectos hiperplásicos y neoplásicos sobre endometrio(18, 19). Pero en los últimos años se ha observado que en aquellas pacientes que conservan el útero, esta terapia debe complementarse con el uso de algunas progestinas capaces de contrarrestar los efectos del estradiol.

Para que esto ocurra las progestinas deben administrarse más de 12 días, a dosis variables dependiendo de la potencia del compuesto utilizado (20, 21, 22), con lo cual se ha probado se disminuye la incidencia de patología endometrial(23-29).

El papel de la TRH en el desarrollo de cáncer de mama es controvertido y en algunos estudios se ha encontrado una relación directa entre la dosis y el tiempo de administración con el desarrollo de la neoplasia(30-32), aparentemente, el riesgo se incrementa a partir de los 15 años de uso(33) o bien cuando se toman 1.25 mg diarios (34). Además los estudios a largo plazo sugieren que existe un discreto incremento del riesgo de padecer cáncer de mama en los sujetos que recibieron TRH, sin embargo se reporta una mayor sobrevida en estas pacientes.

El principal problema de la TRH no son los riesgos, si no la falta de adherencia al tratamiento por parte de las pacientes, siendo el principal motivo de abandono del tratamiento, el reinicio de los sangrados menstruales. Esto se demuestra con estudios como el de Hemminki y colaboradores (35) en el cual continuaban con el tratamiento después de un año de observación el 43% de pacientes con útero intacto, contra el 79% de pacientes histerectomizadas. Otros autores (36, 37) han encontrado datos similares. En el mercado existen ya algunos esquemas de tratamiento que solucionan parcialmente este problema y que consisten en la administración de 17 beta estradiol (2mg) y Acetato de noretisterona (1 mg).

Los compuestos con efecto estrogénico más utilizados en el mercado con fines de remplazo hormonal, son de origen natural (estrógenos equinos conjugados y el 17beta estradiol), administradas por diferentes vías y con la ventaja de que al administrarse por vía parenteral se evitan el efecto de primer paso en el hígado, en donde teóricamente pueden afectar la síntesis de factores de coagulación y aumentar los substratos de renina.

El 17 beta estradiol por vía transdérmica tiene una adecuada absorción, es tan efectiva como la administración oral en el control de sintomatología climatérica, afecta los factores de coagulación y la síntesis de substratos de renina, pero sin repercusiones clínicas importantes. Además incrementa la concentración de lipoproteínas de alta densidad (HDL), disminuyen lipoproteínas de baja densidad (LDL) y colesterol total(38 - 40), lo que disminuye el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Otras vías parenterales muestran efectos y concentraciones del medicamento variables, las cuales las pone en desventaja con la antes descrita(39, 41-45).

Los compuestos con efectos progestacionales pueden ser naturales o sintéticos, estos en general tienen efectos adversos sobre el metabolismo de lípidos, por lo que es necesario utilizar la dosis mínima suficiente que induzca la transformación secretoria del endometrio en ciclos secuenciales de tratamiento, que evite el efecto proliferativo de estrógenos en un esquema de tratamiento continuo. La dosis diaria de progestinas capaz de transformar el epitelio glandular del endometrio, en esquemas cíclicos de tratamiento, para el acetato de medoroxiprogesterona es de 10 mg, para el acetato de noretisterona de 1.0 mg y para progesterona micronizada de 200 a 300 mg(20). Como antes se menciono, estos compuestos deben ser administrados por periodos mayores a 12 días para disminuir a 0% las posibilidades de hiperplasia endometrial o cualquier otro problema a este nivel.

PROGESTINAS

a) Generalidades de las progestinas

Las hormonas esteroideas tienen efecto sobre las células epiteliales y del estroma en el endometrio, los estrógenos inducen proliferación celular y la progesterona inhibe el crecimiento y promueve su diferenciación. Este estímulo hormonal esta sujeto a una regulación local que se lleva a cabo mediante citocinas y factores de crecimiento.

El papel del cuerpo lúteo (sintetizador de progesterona) en el establecimiento y mantenimiento del embarazo es de vital importancia. Los efectos progestacionales incluyen la preparación endometrial que permite la implantación y contribuyen al mantenimiento del embarazo a través de diferentes mecanismos como la inhibición de la contractilidad del miometrio, protección inmunológica al embrión, mantenimiento del crecimiento y la plasticidad uterina.

El efecto de la progesterona en las células del epitelio endometrial disminuye el efecto proliferativo de los estrógenos a través de la inhibición de la síntesis de receptores para estrógenos y del incremento en la actividad de las enzimas que convierten al estradiol en metabolitos menos activos (24, 25, 26). En las células del estroma, la actividad progestacional más importante consiste en la conversión decidual de estas células (46, 47, 48).

Existen algunos agentes sintéticos desarrollados a partir de precursores de progesterona o derivados de la testosterona que tienen efectos progestacionales, a los que se les conoce como progestinas, estos han sido utilizados en el tratamiento de algunos padecimientos ginecológicos o bien en métodos de planificación familiar y en el remplazo hormonal de pacientes postmenopáusicas. Su metabolismo, actividad biológica y potencia en su efecto dependen de su estructura química.

La *progesterona* nativa es una hormona esteroide compuesta por el grupo pregnano, consta de 21 carbonos, con dos grupos cetona en el carbono 3 y 20, y con doble ligadura en los carbonos 4-5. La absorción por vía oral es deficiente, con una dosis de 100 mg, solo se encuentra en sangre el 25% de la dosis durante el pico máximo de concentración. El metabolismo y la eliminación de la progesterona oral es rápido y su máxima concentración se encuentra a las 4 hrs. Esta misma rapidez con que se absorbe, metaboliza y elimina, sucede con la administración rectal y vaginal (49).

Los principales metabolitos son el pregnandiolo-3 α -glucurónido y la 17-hidroxiprogestrona. La eliminación es preferentemente por heces (50 a 60%) mientras que por orina solo se elimina el 10%, el cual aumenta con el tiempo de uso del medicamento. La acción de la progesterona sobre el núcleo de las células se efectúa a través de un receptor específico, que facilita su ingreso al núcleo en donde se encuentran los elementos de respuesta a progesterona en el DNA (49).

La *noretisterona* (17- alfa- etinil-17 beta-hidroxi-4-estene-3-ona), esta constituida de 19 carbonos y es un derivado de la 17 alfa etinil testosterona. Su absorción por vía oral supera a la progesterona nativa y sus principales metabolitos son el 3 β -5 α noretisterona (5 α -NET), 3 β 5 α -NET y 3 α 5 α -NET quienes presentan afinidad variable en la unión a receptores de progesterona. De los metabolitos 5 α reducidos, el 5 α NET tiene una alta afinidad por el receptor de progesterona, siendo el responsable de actividad antiprogestacional en el endometrio de conejas y se sabe que también presenta afinidad por el receptor de testosterona y su excreción se lleva a cabo por heces y orina.

La medroxiprogesterona es un derivado sintético de la 17 hidroxiprogesterona. Su principal uso ha sido como anticonceptivo inyectable de depósito, gracias a la capacidad de ser absorbido lentamente después de la inyección intramuscular en una solución acuosa. Por vía oral su absorción supera a la progesterona nativa, pero no es tan activa como noretisterona, en sangre se une a la albúmina y a la globulina transportadora de corticosteroides. Tiene gran afinidad por el receptor de progesterona y su excreción es también por heces y orina.

b) Aspectos morfológicos del endometrio humano durante la TRH.

Los cambios morfológicos producidos por la acción de las hormonas esteroides pueden ser evaluados por histeroscopia y por microscopia de luz ó electrónica.

En las mujeres postmenopausicas sin tratamiento, se observan diferentes patrones morfológicos de la superficie endometrial característicos, que correlacionan con los hallazgos encontrados por histología. El patrón encontrado con mayor frecuencia (83%) es el atrofico, se caracteriza por presentar una mucosa adelgazada que permite ver la trama vascular subyacente. En el análisis microscópico se encuentran focos aislados de proliferación discreta, alternados con cambios discretos de endometrio secretor y ocasionalmente focos con hiperplasia (50).

Otro patrón encontrado con relativa frecuencia (13%) es el proliferativo. Por histeroscopia e histología se encuentran grandes diferencias con lo observado durante la fase proliferativa del ciclo endometrial de mujeres en etapa reproductiva (50).

El patrón hiperplásico (4%) histeroscopicamente se manifiesta con alteraciones focales, distribuidas de manera irregular, en donde es posible ver prominentes glándulas dentro de un contexto atrofico del estroma e histológicamente la imagen recuerda a lo encontrado en un endometrio disfuncional (50).

Finalmente el patrón secretor por histeroscopia muestra una superficie delgada e irregular; histologicamente se caracteriza por glándulas cortas con patrón secretor con un estroma edematoso y vascularizado (50).

Después de 6 meses de terapia de remplazo hormonal se observan los mismos patrones pero con frecuencias distintas. El patrón atrofico se encontró en 53%, el proliferativo en 15%, el hiperplásico en 15% y el secretor en 17% indicativo de

que el endometrio de mujeres postmenopáusicas es capaz de responder al efecto de TRH (50).

APOPTOSIS

s)Definición

El término apoptosis se deriva del griego y se refiere al suceso en el cual los pétalos dejan la corola de una flor o bien las hojas caen de la copa de los arboles.

Desde hace varias décadas, este término ha sido ampliamente utilizado en el ámbito científico para definir a un fenómeno fisiológico al que también se le conoce como muerte celular programada. Este proceso selectivo de muerte celular en diferentes sistemas biológicos, tiene un importante papel en la homeostasis de tejidos renovables, en la embriogénesis y en la involución de algunos órganos como el timo y la próstata (51, 52, 53).

La apoptosis presenta una serie de características estructurales y moleculares que la hacen diferente a la necrosis (53). Las diferencias específicas entre necrosis y apoptosis son muchas y se encuentran resumidas en el cuadro 1. La apoptosis se refiere a un proceso natural de destrucción celular, regulado por diferentes agentes endocrinos o autócrinos, mientras que el segundo se refiere a un proceso patológico desencadenado siempre por daño celular causado por diferentes factores como hipertermia (54), hipoxia (55), isquemia (56), ataque del complemento (57), alteraciones metabólicas (58), y por trauma directo (59).

Cuadro 1

Diferencias entre necrosis y apoptosis.

Necrosis	Apoptosis
<u>CAMBIOS MORFOLOGICOS</u>	
Perdida de la integridad de la membrana	Constricción de la membrana, pero no perdida de la integridad.
Dispersión de la cromatina	Agregación de la cromatina a la membrana nuclear.
Expansión celular	Condensación celular.
Lisis celular	Formación de cuerpos apoptóticos.
Desintegración de organelas	Organelas intactas.
<u>CAMBIOS BIOQUIMICOS</u>	
Pérdida de la homeostasis	Proceso estrechamente regulado por activación y pasos enzimáticos.
No requiere de energía	Dependiente de energía.
Ruptura al azar del DNA	Ruptura del DNA en mono y oligo nucleosomas.
Fragmentación del DNA prelitica.	Fragmentación del DNA postlitica.
<u>SIGNIFICADO FISIOLÓGICO</u>	
Muerte de grupos celulares	Muerte celular individual
Iniciada por alteraciones no fisiológicas	Inducida por estímulos fisiológicos.
Fagocitosis por macrófagos	Fagocitosis por células adyacentes y macrófagos.
Respuesta inflamatoria	Sin respuesta inflamatoria.

La muerte por necrosis presenta una serie de cambios iniciales que incluyen la expansión del citoplasma y los organelos intracelulares, especialmente las mitocondrias. Estos cambios permiten la disolución de los organelos ruptura de la membrana plasmática, permitiendo la salida del contenido intracelular hacia el espacio extracelular. Tales cambios pueden ser resultado de las alteraciones metabólicas que impiden mantener la permeabilidad selectiva través de la membrana, ya sea por daño directo o por alteración de la bomba de iones (58, 60, 61). Esto produce un ingreso importante de calcio (Ca) que su vez activa a la fosfolipasa localizada en la membrana plasmática causando la disolución de los fosfolípidos que la constituyen (62, 63).

La disolución de membranas lisosomales permite la salida de hidrolasas causando una rápida desintegración celular en las etapas tardías de la necrosis celular (57) y es en este momento cuando ocurre una depresión de los niveles de proteínas, ácido ribonucleico (RNA) y ácido desoxirribonucleico (DNA). El DNA es degradado por su exposición a enzimas proteolíticas que digieren las histonas (64, 65). La necrosis afecta generalmente a grupos celulares y es capaz de inducir un proceso inflamatorio en el tejido dañado.

A diferencia de la necrosis, la muerte celular por apoptosis se presenta en células aisladas, en forma rápida y ocurre por inducción de estímulos fisiológicos o nocivos sin inducir reacciones inflamatorias.

Desde el punto de vista bioquímico, la apoptosis está definida como la degradación del DNA genómico de forma irreversible, la cual se presenta antes de que la célula tenga cambios a nivel de la membrana. Esta degradación en muchos sistemas se lleva a cabo por la activación de una endonucleasa endógena dependiente del calcio y magnesio. Esta enzima rompe el DNA en forma selectiva a nivel de los sitios de unión de los nucleosomas, por lo que se generan fragmentos de diversos tamaños, los cuales pueden ser separados en un gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio. Una imagen característica de la "escalera" de DNA se puede observar en el carril 5 y 6 de la siguiente figura:

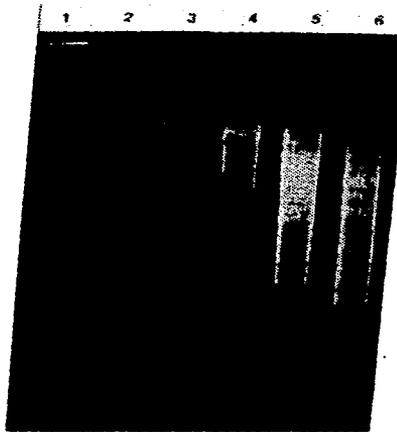


Figura 1.

Carriles: 1,2 y 3. DNA íntegro, sin tratamiento hormonal
Carriles :4, 5 y 6. DNA fragmentado por tratamiento con RU486.

Otro de los métodos para la evaluación de la muerte de una célula por apoptosis es el marcaje in situ de los fragmentos de DNA presentes en el núcleo el, uso de la enzima terminal transferasa y el dioxi-uridin-trifosfato (dUTP) ligado a fluoriseína, con la técnica de TUNEL (ver anexo 1). Una vez hecho el marcaje de las regiones 3'-OH, las células en apoptosis pueden ser analizadas por microscopía de fluorescencia.

b) Papel de la apoptosis en reproducción

En los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de la importancia que tiene la muerte celular por apoptosis en los diferentes procesos de reproducción tanto en animales como en como en el humano. Existen muchas evidencias de que el mantenimiento de la homeostasis celular presente en los

órganos reproductores femeninos se lleva a cabo a través de la regulación del crecimiento, proliferación y muerte celular.

Un ejemplo de ello, es el hecho de que durante el ciclo endometrial existe una importante pérdida de células epiteliales glandulares durante la fase secretora, premenstrual y menstrual (66). Parr y Cois, en 1987 demostraron que durante la implantación temprana una proporción importante de células cercanas al sitio de implantación del blastocisto en la rata, presentan una morfología típica de muerte celular por apoptosis por un mecanismo no conocido (67).

Así mismo en muchas especies, la ovulación y la formación subsecuente del cuerpo lúteo son procesos fisiológicos requieren para iniciar y mantenerse de la proliferación y diferenciación celular, y se ha demostrado que para que el cuerpo lúteo involucone mes con mes, la presencia de muerte celular por apoptosis es de vital importancia, pero a la fecha no se conoce cual es el mecanismo que lleva a esta condición celular.

Otros de los eventos importantes para la reproducción, es la decidualización del endometrio, y se ha visto que la privación de progesterona o el tratamiento con RU 486 induce la apoptosis de las células deciduales, principalmente las localizadas en regiones periféricas y antimesoteliales de la decidua cercano al lumen epitelial, sin embargo aún no se sabe cual es la importancia de este fenómeno, ni los mecanismos moleculares involucrados (68).

c) Apoptosis y hormonas esteroideas

Los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en la inducción y regulación de la muerte por apoptosis en los diferentes órganos de la economía, aún no han sido completamente entendidos y clarificados, sin embargo existe mucha información que señala la influencia de moléculas de origen proteico, como los factores de crecimiento; la activación de los genes que codifican para algunos oncogenes como myc, p53, Bcl2 los cuales ejercen efectos inductores o de protección contra la muerte celular por apoptosis, y por último los factores hormonales, entre los que se encuentran los esteroides (69 y 70).

En la mayoría de los tejidos que son dependientes de las hormonas esteroideas sexuales, como el endometrio, la próstata, el cuerpo lúteo, cuando son privados de la acción hormonal se induce la muerte por apoptosis (70), indicando que las hormonas juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis celular de estos tejidos. Estos hallazgos se apoyan además por

los efectos observados con la administración de la progestina RU 486, un bloqueador del efecto de la progesterona. Se ha demostrado que su administración en conejas adultas induce a las células del epitelio uterino a entrar en apoptosis; efecto que puede ser revertido con la administración de progesterona (1). Estos efectos también han sido demostrados en la rata, pero sin notables efectos sobre las células del estroma (71).

JUSTIFICACION

Existen algunos trabajos que demuestran que metabolitos de noretisterona tienen efectos antiprogestacionales, androgénicos y estrogénicos en animales de experimentación. Este compuesto al igual que medroxiprogesterona y la progesterona natural micronizada se utilizan en el manejo de pacientes postmenopausicas. A la fecha no hay estudios en el Instituto Nacional de Perinatología (INPer) que establezcan la acción de estos compuestos a nivel del endometrio de las usuarias. Se desea con este estudio abrir una nueva línea de investigación enfocados principalmente al estudio de la acción antiprogestacional de algunos compuestos sintéticos de uso frecuente en la clínica.

Este protocolo pretende conocer si hay diferencias en la acción antiprogestacional de los compuestos arriba mencionados sobre el endometrio humano. En caso de encontrarse diferencias, estas nos llevarían a nuevos estudios encaminados a encontrar un esquema de tratamiento que representara ventajas sobre otros en la terapia de remplazo hormonal en la mayoría de pacientes climatéricas no histerctomizadas.

OBJETIVO GENERAL

Establecer si existen diferencias morfológicas y bioquímicas en el endometrio de mujeres postmenopáusicas tratadas con noretisterona, medroxiprogesterona y progesterona micronizada en un esquema cíclico combinado de TRH.

HIPOTESIS

Dado que existe la evidencia de que metabolitos de Noretisterona tienen acción antiprogestacional en endometrio de animales de experimentación, nos permitimos postular que; a dosis utilizadas en un esquema cíclico combinado de tratamiento, la noretisterona tendrá un efecto antiprogestacional sobre el endometrio humano, esto medido a través de cambios morfológicos por microscopía de luz (ausencia de cambios secretorios en glándulas y estroma) y por el grado de apoptosis (medido a través de índice apoptótico).

METODOLOGIA.

Durante el periodo comprendido entre junio a noviembre de 1996 se propuso la inclusión en este proyecto a las pacientes que a su ingreso a la clínica de climaterio del Instituto Nacional de Perinatología (INPer), cumplieran con los siguientes criterios: Sanas, con menopausia espontánea de más de 12 meses de evolución, sin tratamiento de remplazo hormonal en los tres meses previos a su ingreso. A todas se les explicaron los objetivos, procedimientos y riesgos del proyecto y todas firmaron una carta de consentimiento informado.

Se les realizó una historia clínica completa haciendo especial énfasis en descubrir factores de riesgo para osteoporosis, enfermedades cardiovasculares, alteraciones genito-urinarias y para enfermedades neoplásicas de la mama o del endometrio. La exploración física incluyó la toma de una biopsia de endometrio con cánula de Randal de 2 ó 3 mm de diámetro, la cuál se fijó con formaldehído amortiguado al 10% y se envió al departamento de patología para su procesamiento.

Se inició tratamiento durante 2 ciclos, cada esquema de tratamiento con una duración de 4 semanas cada uno, entre ambos se dejó una semana de descanso. En ambos ciclos se les indicó un solo esquema de tratamiento, este consistió en administrar 17 beta estradiol por vía transdérmica, en parches de 50 mg, dos veces por semana durante las 4 semanas de tratamiento y durante las últimas dos semanas se les indicó de manera aleatoria las siguientes dosis de progestinas, conformándose los diferentes grupos de estudio: Grupo A: Acetato de medroxiprogesterona (Provera 5 mg. Upjon de, S.A. de C.V.) 10 mg al día por vía oral; Grupo B: Acetato de noretisterona (Primolut Nor 5mg. Shering Mexicana, S.A. de C.V.) 10 mg al día por vía oral; Grupo C: Acetato de noretisterona (Estracomb TTS. Byk Gulden, S.A. de C.V.) 30mg dos veces por semana vía transdérmica y Grupo D: Progesterona micronizada (Utrogestan 100 mg. Fustery, S.A. de C.V.) 200 mg diarios por vía oral.

La biopsia de endometrio postratamiento se tomó el día 21 del ciclo, es decir 7 días después de haber iniciado la ingesta de progestinas. Igual que la biopsia tomada al inicio del estudio fué fijada y enviada al departamento de patología para su procesamiento, según se indica en el anexo 1. Una vez preparada la muestra se enviaron 4 cortes subsecuentes de 4 a 5 micras para la clasificación histológica por el patólogo y para la realización de la técnica de marcaje (TUNEL) en el departamento de bioquímica.

DIAGRAMA DE FLUJO

SELECCION DE PACIENTES



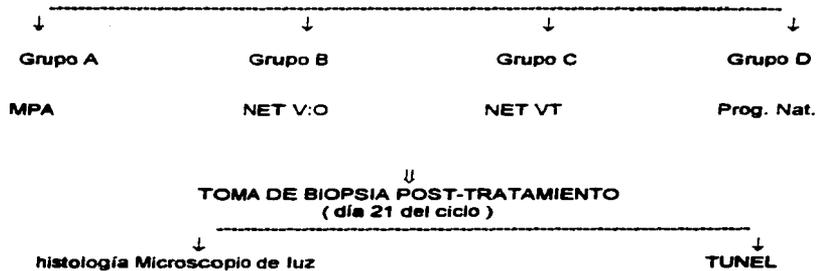
Historia clínica y toma de biopsia de endometrio basal



TRATAMIENTO



17 beta estradiol en parches durante 4 semanas
Y una progestina las ultimas 2 semanas
Durante 2 ciclos, con una semana de descanso



RESULTADOS

Se incluyeron en el estudio a 8 pacientes con una edad promedio de 52.1 (rango de 48 a 62), sin patología de base, con 5.2 años de menopausia en promedio (rango de 3 a 10) e índice de masa corporal de 24.8 (rangos de 22 a 28), la paridad fué similar (Ver cuadro 2).

Cuadro 2

DATOS GENERALES

Caso	Grupo	Edad	Paridad	IMC
1	A	51	G4-P4	22.2
2	A	52	G7-P5-A2	26.2
3	B	56	G5-P2-C3	24.8
4	B	50	G3-P5	25.5
5	C	48	G7-P3-A4	22.3
6	C	48	G2-P1-A1	24.0
7	D	62	G3-P2-A1	26.2
8	D	50	G2-C2	28.0

G= No. de gestaciones
IMC= índice de masa corporal.

P= partos

C= cesáreas

A= abortos

Por razones técnicas únicamente obtuvimos 7 biopsias de endometrio, de las cuales una fué tomada antes de iniciar el tratamiento y 6 post-tratamiento (Una del grupo A, dos del grupo B, dos del grupo C y una del grupo D). La muestra pre-tratamiento correspondió al caso 2 y las muestras post-tratamiento correspondieron a las pacientes 1, 3, 4, 5, 6 y 7.

Debido a la pequeña cantidad de pacientes reclutadas en el estudio y de las muestras obtenidas se decidió hacer la descripción cada una de las biopsias post-tratamiento de manera individual para después verlos integrados en cuadros comparativos.

Caso 1

Corresponde a una paciente de 51 años, la cuál recibió 17 beta estradiol y acetato de medroxiprogesterona a la dosis previamente descrita en la sección de metodología. El reporte histopatológico de la biopsia fue: *Endometrio proliferativo* y las imágenes de la técnica de marcaje de núcleos en apoptosis se muestran en la **figura 1**. En la fig. 1A se muestra el control positivo con el objetivo 40 x, las marcas de fluoreceína (indicadoras de células en apoptosis) en el estroma están señaladas con flechas negras y el epitelio con una cabeza de flecha. Este marcaje se genera como consecuencia de la acción de la DNAsa 1 y a la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal que incorpora al DNA fragmentado moléculas fluorescentes en los sitios de corte. La fig. 1B corresponde al control negativo, en que no existen marcas de fluoreceína ya que no se agrega la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal y la figura 1C se muestra un corte de tejido problema, es decir, que recibió tratamiento hormonal; en donde se puede observar los núcleos marcados en el estroma endometrial en una pequeña cantidad. Los datos numéricos por campo están registrados en la **tabla 5**.

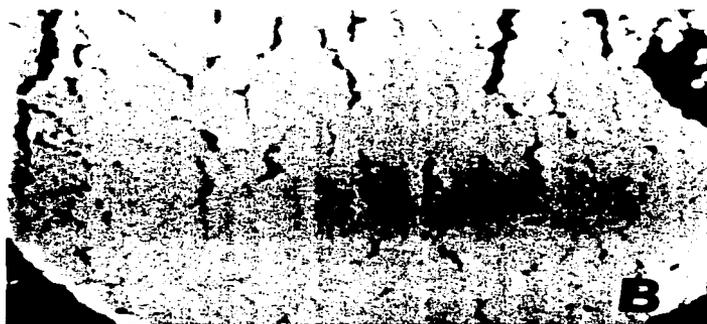
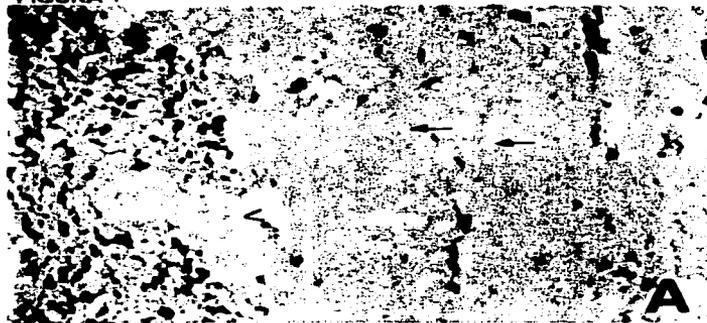
Caso 3

Se trata de una paciente de 52 años, manejada con 17 beta estradiol y noretisterona por vía oral. El reporte histopatológico de la biopsia corresponde al de un *endometrio secretor irregular* y las imágenes del marcaje de DNA con fluoreceína de los cuerpos apoptóticos se muestran en la figura 2. La figura 2A: muestra el control positivo con el objetivo 100 x, obsérvense los núcleos marcados tanto en el epitelio (cabeza de flecha) como en el estroma (flechas). 2B: muestra el control negativo sin marcas en estroma ni epitelio endometriales y 2C: muestra el problema con algunos núcleos marcados de predominio estromal.

Caso 4

Corresponde a una paciente de 50 años que recibió tratamiento con 17 beta estradiol y noretisterona por vía oral; El reporte de patología muestra un *endometrio proliferativo* y la figura 3 muestra los controles positivo (1A) y negativo

CASO No. 1
FIGURA 1



CASO No.3
FIGURA 2



CASO No.4
FIGURA 3



(1B) del estudio con la técnica de TUNEL (3A y 3B respectivamente). En la figura 3C se evidencian una gran cantidad de núcleos marcados en el estroma (Flechas), en tanto que el epitelio sólo se marcó en forma discreta (cabezas de flechas).

Caso 5

Se trata de una paciente de 48 años, la cual recibió noretisterona por vía transdérmica, además del 17 beta estradiol, El reporte histopatológico correspondió a endometrio proliferativo. Los controles positivo y negativo del estudio de DNA se muestran en las figuras 4A y 4B. En la figura 4C se muestran dos núcleos marcados con líneas rectas y una imagen que por su tamaño y forma fue considerada como un artefacto (Background) el cual se señala con una cabeza de flecha.

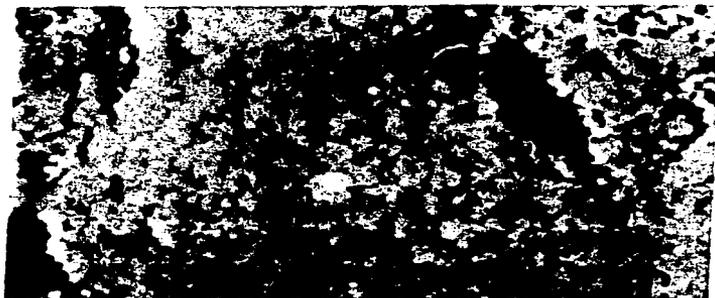
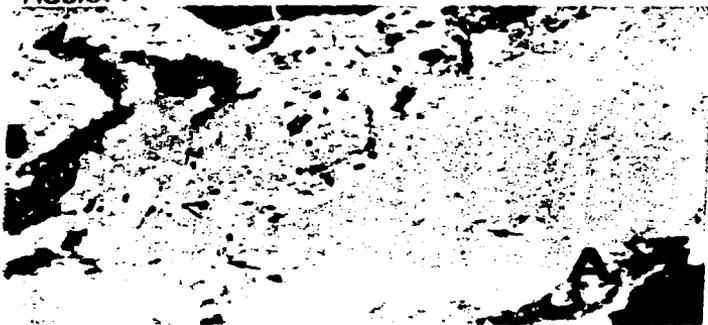
Caso 6

Corresponde a una paciente de 48 años que recibió NET en parches combinados con 17 beta estradiol. El reporte histopatológico mostró un endometrio proliferativo y las imágenes con el estudio del DNA se muestran en la figura 5. Los núcleos en apoptosis del estroma se señalan con una línea recta y los del epitelio con una cabeza de flecha.

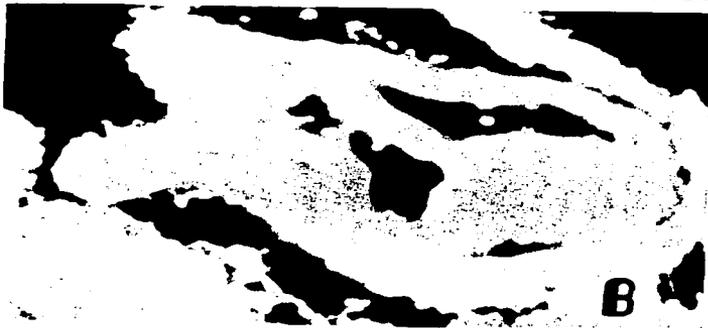
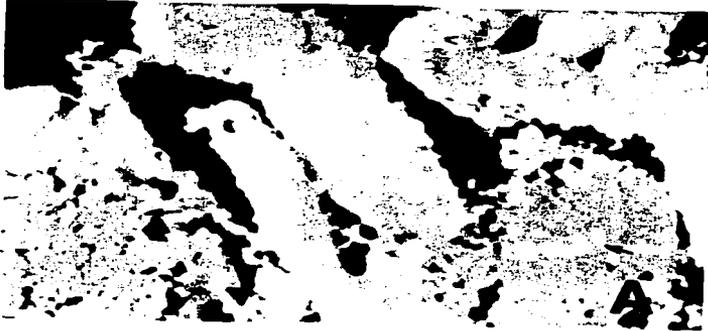
Caso 7

Se trata de una paciente de 62 años, tratada con progesterona micronizada y 17 beta estradiol. El reporte histopatológico correspondiente a endometrio proliferativo. En el control positivo del estudio de integridad del DNA (figura 6A) se marcan intensamente núcleos del epitelio y más discretamente los del estróma. Al igual que el control positivo, el problema (figura 6C), también mostró una mayor cantidad de núcleos en apoptosis, pero principalmente en el epitelio y no así en el estroma.

CASO No.5
FIGURA 4



CASO No. 8
FIGURA 5



CASO No. 7
FIGURA 6



Los reportes histopatológicos de las biopsias enviadas al servicio de patología se incluyen en el cuadro 3. Obsérvese que de las biopsias pre-tratamiento (identificadas como biopsia 1) solamente una fue suficiente para hacer diagnóstico (12.5%). En comparación con el 87.5% de las biopsias post-tratamiento (biopsia 2). De estas el 85.7% correspondieron a endometrio proliferativo. Sólo 1 de 7 fue secretor irregular y correspondió a una paciente tratada con noretisterona.

Cuadro 3.

REPORTE HISTOPATOLOGICO

Caso	Biopsia 1	Biopsia 2
1	Moco	E. Proliferativo
2	E. Atrófico	Muestra Insuficiente
3	Muestra insuficiente	E. Secretor Irregular
4	" "	E. Proliferativo
5	" "	E. Proliferativo
6	Moco	E. Proliferativo
7	Moco	E. Proliferativo
8	Moco	E. Proliferativo

El índice de apoptosis calculó en base al número de núcleos marcados con fluoresceína por campo óptico con el objetivo de 40x. En el **cuadro 4** se muestran el número de núcleos marcados en los distintos compartimientos endometriales y el número de campos contados de cada una de las muestras. En las pacientes que no fueron tratadas con noretisterona (1y7) el índice apoptótico en el estroma fue menor a la unidad, en cambio en las muestras de las pacientes tratadas con noretisterona (3, 4, 5 y 6) el índice apoptótico, del mismo compartimiento, fue casi igual o mayor que la unidad. En el epitelio endometrial, el índice apoptótico fue menor a la unidad en todos los casos. Sin embargo en 3 de 4 pacientes tratadas con NET este índice fue mayor al encontrado en las pacientes tratadas con acetato de medroxiprogesterona y progesterona natural. En todas las muestras el índice apoptótico fue mayor en el compartimiento estromal que en el epitelial, excepto en la muestra correspondiente al caso 7 en el que el índice de apoptosis fue mayor en el epitelio (0.31 vs 0.03).

Cuadro 4.

INDICE DE APOPTOSIS

Caso	Biopsia 2	Estroma Marcas / Campos (marca por campo)	Epitelio Marcas / Campos (marca por campo)
1	E.Prolif.	28/37 (0.75)	3/13 (0.23)
2	M.Insuf.	-----	-----
3	E.Sec.l.	26/24 (1.08)	2/3 (0.66)
4	E.Prolif	59/36 (1.63)	3/6 (0.50)
5	E.Prolif	29/19 (1.52)	7/9 (0.77)
6	E.Prolif	38/39 (0.97)	2/15 (0.13)
7	E.Prolif	1/32 (0.03)	10/32 (0.31)
8	Moco	-----	-----

Todas las pacientes tenían niveles de gonadotropinas coriónicas, tomadas al ingreso al INPer , mayores de 17 U/ml. En el cuadro 5 se muestran los valores absolutos de cada una de ellas.

Cuadro 5.

PERFIL GINECOLOGICO

CASO	FSH U/ml	LH U/ml
1	28	26
2	32	27
3	31	30
4	35	35
5	25	20
6	23	19
7	53	50
8	38	35

DISCUSION

El trabajo experimental de esta tesis fue orientado a la evaluación del efecto de algunas progestinas como la medroxiprogesterona y la noretisterona, así como de la progesterona natural sobre el tejido uterino. Como modelo experimental se usaron mujeres posmenopáusicas entre 48 y 62 años de edad, que no hubieran recibido ningún tratamiento hormonal de remplazo en los tres meses previos al ingreso al estudio. Esta selección se hizo basándonos en el hecho de que sabe que el útero de estas mujeres mantiene la capacidad de responder al estímulo hormonal externo y que tres meses es suficiente para que desaparezcan los efectos generados por la acción de diferentes esteroides previamente administrados.

Debido a la presencia de algunos problemas en la captación de las pacientes, así como en la toma de las biopsias (tejido insuficiente), principalmente en la correspondiente a la primera toma sin tratamiento, el número de muestras es insuficiente para hacer un análisis estadístico hasta este corte y por lo tanto las conclusiones no son totalmente concluyentes. Sin embargo los resultados encontrados hasta este corte son interesantes y se discutirán en este documento.

Las progestinas sintéticas han sido ampliamente utilizadas como agentes anticonceptivos y en la regulación de la fertilidad de las mujeres en edad reproductiva, así como terapia hormonal de remplazo en mujeres posmenopáusicas. En este último caso los resultados obtenidos con el uso combinado con estradiol ha sido altamente satisfactorio, tanto en términos de prevención de la osteoporosis como en la regulación de los ciclos menstruales en la mujer.

Entre las progestinas más utilizadas en el mercado, se encuentra la medroxiprogesterona, la cual ejerce un efecto progestacional puro, y la noretisterona (NET) que presenta efectos progestacionales importantes, pero además puede adquirir efectos diferentes al metabolizarse. Entre dichos efectos se encuentra el bloqueo de la acción de la progesterona (5α -NET), actividad estrogénica ($3\beta 5\alpha$ -NET) y efectos androgénicos ($3\alpha 5\alpha$ -NET) (Chavez y col, 1985)

Estos hallazgos han sido claramente demostrados en modelos no humanos (rata, conejo) y desde el punto de vista funcional se sabe que la administración tanto de 5α -NET como de $3\beta 5\alpha$ inhibe el proceso de implantación y la gestación en estos animales. Así mismo se demostró que la administración de dosis altas de NET provoca una disminución en el número de sitios de implantación en la coneja,

cuando se le compara con los los animales que no recibieron ningún tratamiento (Castro y Col, 1995). Algunos datos histológicos de tejido uterino tomado de los animales tratados con estos compuestos señalan que existe dos tipos de daño celular: muerte por lisis y células en apoptosis (Alzaldúa y cols. 1996. Tesis).

En base a los datos anteriores, surge la idea de llevar a cabo este estudio bajo la hipótesis de que estos mismos efectos pudieran estarse presentando en el endometrio de la mujer, aún cuando no se conoce si efectivamente noretisterona se reduce a sus metabolitos en el endometrio o en algún otro tejido, como el hígado. Por tal motivo se decidió utilizar vías de administración de noretisterona y comparar sus efectos.

Una de las formas técnicas que usamos en este trabajo para medir la actividad anti-progestacional de noretisterona fue la evaluación de sus efecto sobre la inducción de la muerte celular por apoptosis, a través del sistema de marcaje *in situ* conocido como TUNEL, cuyo fundamento es la incorporación de una molécula fluorescente a las cadenas de DNA fragmentadas en el núcleo de las células, cuya muerte por apoptosis fue inducida por agentes hormonales u otros factores.

Esta demostrado que la antipogestina conocida como RU486, es capaz de inducir la muerte celular por apoptosis en el endometrio de la coneja ovariectomizada (Rotello y col, 1992) y que la administración de progesterona fue capaz de inhibir esta acción. El hecho de que 5α -NET ejerce un efecto antiprogestacional similar al RU486, hace posible la suposición de que este metabolito pudiera funcionar como un inductor de la apoptosis en el tejido uterino de las mujeres incluidas en nuestro estudio.

Como se puede ver en las figura 3C,4C,5C,6C y en el cuadro 6 , la administración de noretisterona en el esquema utilizado como terapia de remplazo indujo la muerte por apoptosis en los cuatro casos revisados hasta, y no se observó diferencia en cuanto a la vía de administración. Este mismo efecto se observó con el tratamiento con medroxiprogesterona (fig 2c) pero su acción indujo un 43% (0.75 núcleos por campo) menos de núcleos en apoptosis si lo comparamos con la noretisterona (1.3 núcleos por campo). Estos efectos son contrarios a los observados con la progesterona, la cual no indujo este tipo de proceso (0.03 núcleos por campo)(fig 1C). Estos mismos porcentajes se observaron tanto en las células epiteliales como del estroma. Sin embargo, cuando se compara entre ambos tipos celulares y el mismo tratamiento, el número de núcleos marcados fue en todos los tratamientos siempre mayor en las células del estroma, excepto con progesterona las células del estroma no se ven afectadas.

Aún cuando no es posible concluir en forma determinante, estos resultados preliminares son sugestivos de que al menos NET a la dosis administrada tiene la capacidad de generar cambios a nivel celular, principalmente las de tipo estromal en tanto que la progesterona esta jugando un papel protector. El mecanismo por el cual se lleva a cabo esta acción aún no esta completamente establecido, sin embargo, el caso de progesterona se sabe que este esteroide ejerce un efecto protector de la muerte celular por apoptosis, a través de la inducción de un gene que codifica para la expresión del protooncogen Bcl2, el cual funciona como un agente inhibidor de la muerte celular en varios tejidos.

El hecho de que la NET a través de su metabolismo puede ejercer un efecto bloqueador de la acción progesterona, similar al ejercido por el RU486, hace suponer que los efectos observados en el endometrio de las mujeres que fueron tratadas con este compuesto se podrían llevar a cabo por el bloqueo del efecto protector de progesterona.

En relación a las diferencias encontradas entre ambos grupos celulares, es interesante apuntar, que nuestros resultados son congruentes con lo reportado previamente por Moulton y cols. 1997. Estos autores demostraron que cuando un tejido decidual de la rata, se deja en ausencia de progesterona ó es tratada con RU486, se induce la muerte celular por apoptosis en un numero importante de células deciduales en crecimiento. Esto podría explicar el mayor número de núcleos en apoptosis en las células del estroma inducido por el tratamiento con NET.

En cuanto al efecto observado en el endometrio de la mujer tratada con medroxiprogesterona, consideramos que un solo caso no es válido para sacar conclusiones y que es necesario complementar el estudio con un número de muestra mayor. Sin embargo pareciera como si la dosis administrada no es suficiente para ejercer una protección contra la muerte celular como lo hace la progesterona natural.

Con todos estos resultados consideramos, que a pesar de no ser concluyentes, si sugieren la posibilidad de que la noretisterona es capaz de ejercer efectos sobre el endometrio, induciendo la muerte celular por apoptosis en un grupo de células, tanto epiteliales como del estroma. Sin embargo es necesario continuar con el estudio, ya que esto podría ser en parte, una explicación a los efectos observados previamente en modelos animales, como la inhibición de la gestación, el proceso de implantación, a través de someter al útero en un estado desfasado de maduración con respecto al del blastocisto. Esto podría explicar también el porque encontramos al útero en etapa proliferativa, después de tantos días de tratamiento, cuando esperaríamos que el efecto progestacional lo llevara a la etapa secretora. Además, podría ayudar a entender algunos de los problemas

Aún cuando no es posible concluir en forma determinante, estos resultados preliminares son sugestivos de que al menos NET a la dosis administrada tiene la capacidad de generar cambios a nivel celular, principalmente las de tipo estromal en tanto que la progesterona esta jugando un papel protector. El mecanismo por el cual se lleva a cabo esta acción aún no esta completamente establecido, sin embargo, el caso de progesterona se sabe que este esteroide ejerce un efecto protector de la muerte celular por apoptosis, a través de la inducción de un gene que codifica para la expresión del protooncogen Bcl2, el cual funciona como un agente inhibidor de la muerte celular en varios tejidos.

El hecho de que la NET a través de su metabolismo puede ejercer un efecto bloqueador de la acción progesterona, similar al ejercido por el RU486, hace suponer que los efectos observados en el endometrio de las mujeres que fueron tratadas con este compuesto se podrian llevar a cabo por el bloqueo del efecto protector de progesterona.

En relación a las diferencias encontradas entre ambos grupos celulares, es interesante apuntar, que nuestros resultados son congruentes con lo reportado previamente por Moulton y cols. 1997. Estos autores demostraron que cuando un tejido decidual de la rata, se deja en ausencia de progesterona ó es tratada con RU486, se induce la muerte celular por apoptosis en un numero importante de células deciduales en crecimiento. Esto podría explicar el mayor número de núcleos en apoptosis en las células del estroma inducido por el tratamiento con NET.

En cuanto al efecto observado en el endometrio de la mujer tratada con medroxiprogesterona, consideramos que un solo caso no es válido para sacar conclusiones y que es necesario complementar el estudio con un número de muestra mayor. Sin embargo pareciera como si la dosis administrada no es suficiente para ejercer una protección contra la muerte celular como lo hace la progesterona natural.

Con todos estos resultados consideramos, que a pesar de no ser concluyentes, si sugieren la posibilidad de que la noretisterona es capaz de ejercer efectos sobre el endometrio, induciendo la muerte celular por apoptosis en un grupo de células, tanto epiteliales como del estroma. Sin embargo es necesario continuar con el estudio, ya que esto podría ser en parte, una explicación a los efectos observados previamente en modelos animales, como la inhibición de la gestación, el proceso de implantación, a través de someter al útero en un estado desfasado de maduración con respecto al del blastocisto. Esto podría explicar también el porque encontramos al útero en etapa proliferativa, después de tantos días de tratamiento, cuando esperaríamos que el efecto progesteracional lo llevara a la etapa secretora. Además, podría ayudar a entender algunos de los problemas

encontrados en los programas de fertilización in vitro, en mujeres que son previamente tratadas con noretisterona, bajo estos esquemas.

CONCLUSIONES

- 1. La administración de progesterona natural no induce la muerte celular por apoptosis en el endometrio de la mujer posmenopáusica.**
- 2. Contrario a lo esperado, el tratamiento de las mujeres en estudio con medroxiprogesterona no ejerce un efecto protector contra la muerte celular por apoptosis, tanto en las células epiteliales como del estroma.**
- 3. La noretisterona es capaz de inducir la muerte celular por apoptosis, principalmente de las células del estroma, posiblemente por sus efectos antiprogestacional previamente en el conejo.**

Sugerencias

- 1. Continuar con la captación de pacientes, para poder ser analizado por estadística.**
- 2. Mejorar la toma de muestra, primordialmente en la primera toma.**

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Rotello RJ, Lieberman RC, Ronald BL y Gerchenson LE. Characterization of uterine epithelium Apoptotic cell death kinetics and regulation by progesterone and RU 486. **Am J Pathol 1992;140:499-456.**
- 2.- Sherman BM, West JH y Korenman SG. The menopausal transition: analysis of LH, FSH, estradiol and progesterone concentrations during menstrual cycles of older women. **J Clin Endocrinol Metab 1976;42:629-636.**
- 3.- Richardson SJ y Nelson JF. Follicular depletion during the menopausal transition. **Ann NY Acad Sci 1990;592:13-20.**
- 4.- Longcope C, Franz C, Morello C, y cols. Steroid and gonadotropins levels in women during peri-menopausal years. **Maturitas 1986;8:189-196.**
- 5.- Siiteri PK y Mac Donald PC. Role of extraglandular estrogen in the human endocrinology. En: Greep RO, Astwood E, eds. Hand-boock of physiology: Endocrinology, 2 (1). Washington, DC: **American Physiology Society: 1973:615-629.**
- 6.- Longcope C. The significance of steroid productionby peripheral tissues. En: Scholler R. De. Endocrinology of the ovary. Paris: Editions **SEPE: 1973:615-629.**
- 7.- Insker SE y Brodie AMH. Expression of aromatase cytochrome P 450 in premenopausal and postmenopausal human ovaries: an immunocytochemical study. **J Clin Metab 1991;73:171-177.**
- 8.- Dennefors BJ, Janson PO, Knutson F, y cols. Steroid production and responsiveness to gonadotropin in isolated stromal tissue of human postmenopausal ovaries. **Am J Obstet Gynecol1980;136: 997-1002.**
- 9.- Santen RJ, Leszczynski D, Tilson-Mallet N, y cols. Enzimatic control of estrogen production in human breast cancer: relative significance of aromatasa versus sulfatasa pathway. **Ann NY Acad Sci 1986;464:126-137.**
- 10.- Judd HL, Judd GE, LucasWE, y cols. Endocrine function of the postmenopausal ovary: Concentration of androgens and estrogens in ovarian and peripheral blood. **J Clin Endocrinol Metab 1974;39:1020-1024.**

- 11.- Weiss NS, Ure CL, Ballard JH, Williams AR y Daling JR. Decreased risk of fractures of the hip and lower forearm with postmenopausal use of estrogen. *N Engl J Med* 1980;303:1195-1198.
- 12.- Christiansen C, Christiansen MS, McNair P, Hagen C, Stocklund K y Transbol IB. Prevention of early postmenopausal bone loss: controlled 2 year study in 315 normal females. *Eur J Clin Invest* 1980;10:273-279.
- 13.- Consensus development conference: prophylaxis and treatment of osteoporosis. *BMJ* 1987;295:214-215.
- 14.- Paganini-Hill A, Ross RK y Henedersen BE. Postmenopausal oestrogen treatment and stroke: a prospective study. *BMJ* 1988;297:519-522.
- 15.- Hendersen BE, Paganini-Hill A y Ross RK. Estrogen replacement therapy and protection from acute myocardial infarction. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:312-317.
- 16.- Pettitti DB, Perlman JA y Sidney S. Noncontraceptive estrogens and mortality: long-term follow up of women in the Walnut Creek study. *Obstet Gynecol* 1987;70:289-293.
- 17.- Stampfer MJ, Willett WC, Colditz GA, Rosner B, Speizer FE y Hennekens CH. A prospective study of postmenopausal estrogen therapy and coronary heart disease. *N Engl J Med* 1985;313:1044-1049.
- 18.- Smith DC, Prentice R, Thompson DJ y Herrman WL. Association of exogenous estrogen and endometrial carcinoma. *N Engl J Med* 1975;293:1164-1167.
- 19.- Jick H, Watkins RN, Hunter RJ, Dinan BJ, Madsen S, Rothman KJ, y cols. Replacement estrogens and endometrial cancer. *N Engl J Med* 1979;300:218-222.
- 20.- Whitehead MI, Hillard TC y Ckook D. The role and use of progestogens. *Obstet Gynecol* 1990;75:59S-76S.
- 21.- Hirvonen E, Malkonen M y Manninen V. Effects of different progestins on lipoproteins during postmenopausal replacement therapy. *N Engl J Med* 1981;304:560-563.
- 22.- Lane G, Siddle NC, Ryder TA, Pryse-Davies J, King RGB y Whitehead MI. Is a Provera the ideal progestogen for addition to postmenopausal estrogen therapy? *Fertil Steril* 1986;45:345-352.

- 23.- Gambrell RD Jr. Prevention of endometrial cancer with progestogens. **Maturitas 1986;8:159-168.**
- 24.- Hsueh AJW, Peck EJ y Clark JH. Control of uterine estrogen receptor levels by progesterone. **Endocrinology 1976;98:438-444.**
- 25.- Whitehead MI, Townsend PT, Pryse-Davies J, Ryder JA y King RJB. Effects of estrogens and progestins on the biochemistry and morphology of the postmenopausal endometrium. **N Engl J Med 1981;305:1599-1605.**
- 26.- Gerschenson LE, Berliner J y Yang JJ. Diethylstilbestrol and progesterone regulation of cultured rabbit endometrial cell growth. **Cancer Res 1974;34:2873-2880.**
- 27.- Whitehead MI, King RBJ y Campbell S. Endometrial histology and biochemistry in climacteric women during oestrogen and oestrogen/progestogen therapy. **J R Soc Med 1979;72:322-327.**
- 28.- Studd JWW y Thom MH. Oestrogen and endometrial cancer. En: **Progress in Obstetrics and Gynaecology. Studd JWW, de. Vol. 1:162-198.** Churchill-Livingstone. Edinburgh.
- 29.- Negele F, O'connor H, Baskett TF, Daviles A, Mohamed H y Magos AL. Histeroscopy in women with abnormal uterine blending on hormone replacement. **Fertil Steril 1996;65:1145-1150.**
- 30.- Hoover R, Gray LA, Cole P y MacMahon B. Menopausal estrogen and breast cancer. **N Engl J Med 1976;295:401-405.**
- 31.- Brinton RA, Hoover R y Fraumeni JF Jr. Menopausal estrogens and breast cancer risk: an expanded case - control study. **Br J Cancer 1986; 54:825-832.**
- 32.- La Vecchia C, DeCarli A, Parazzini F, Gentile A, Liberati C y Franceschi S. Noncontraceptive estrogen and the risk of breast cancer in women. **Int J Cancer 1986;38:853-858.**
- 33.- Steiberg KK, Thacker SB, Smith J, Stroup DF, Zack MM, Flanders WD y cols. A meta analysis of the effect of estrogen replacement therapy on the risk of breast cancer. **JAMA 1991;265:1985-1990.**
- 34.- Dupont WD y Page DL. Menopausal estrogen replacement therapy and breast cancer. **Arch Intern Med 1991;151:67-72.**

- 35.- Hemminki E, Brambilla DJ, Mac Kinlay SM y Posner JG. Use of estrogen among middle-aged Massachusetts women. **DICP 1991;25:418-23.**
- 36.- Hahn RG, Nachtigall RD y Davis TC. Compliance difficulties with progestin supplemented replacement therapy. **J Fam Pract 1984;18:411.**
- 37.- Wren BG y Brown L. Compliance with hormonal replacement therapy. **Maturitas 1991;13:17-21.**
- 38.- Chetkowski RJ, Meldrum DR, Steingold KA, Randle D, Lu JK, Eggena P y cols. Biological effects of transdermal estradiol. **N Engl J Med 1986;314:1615-1620.**
- 39.- Stanczyk FZ, Shoupe D, Nunez V, Macias-Gonzalez P, Vijod MA y Lobo RA. A randomized comparison of nonoral estradiol delivery in postmenopausal women. **Am J Obstet Gynecol 1988;159:1540-1546.**
- 40.- Stevenson JC, Cust MP, Ganger KF, Hillard TC, Lees B y Whitehead MI. Effects of transdermal versus oral hormone replacement therapy on bone density in spine and proximal femur in postmenopausal women. **Lancet 1990;335:265-269.**
- 41.- Chanez JF, Lignieres B, Marty JP y Wepierre J. Influence of the size of the area of treatment on percutaneous absorption of estradiol in the rat. **Skin Pharmacol 1989;2:15-21.**
- 42.- Bukman MT, Johnson J, Ellis H, Srivastava L y Peake GH. Differential lipemic and proteinemic response to oral ethinil estradiol and parenteral estradiol cypionate. **Metabolism 1980;29:803-805.**
- 43.- Lobo RA, March CM, Goebelsmann U, Krauss RM y Mishell DR. Subdermal estradiol pellets following hysterectomy and oophorectomy. **Am J Obstet Gynecol 1980;138:714-719.**
- 44.- Mishel DR Jr, Moore DE, Roy S, Brenner PF y Page MA. Clinical performance and endocrine profiles with contraceptives vaginal rings contains a combination of estradiol and D-norgestrel. **Am J Obstet and Gynecol 1978;130:55-62.**
- 45.- Riggs LA, Hermann H y Yen SSC. Absorption of estrogens from vaginal creams. **N Engl J Med 1978;298:195-197.**

- 46.- Tseng L y Gurpide E. Induction of human endometrial estradiol dehydrogenase by progestins. **Endocrinology** 1975;97:825-833.
- 47.- Tseng L y Lu HC. Stimulation of arylsulfotransferase activity by progestins in human endometrium in vitro. **J Clin Endocrinol Metab** 1981;53:418-421.
- 48.- Irwin JC, Kirk D, King RJB, Quigley MM y Gwatkin RBL. Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an in vitro model for decidualization. **Fertil Steril** 1989;52:761-768.
- 49.- Whitehead MI, Townsend PT, Collins WP y Campbell S. Absorption and metabolism of oral progesterone. **BMJ** 1980;825-827.
- 50.- De Cecco L, Grebaldi D, Cristoforoni P, Ferraiolo A, Remorgida V, Barachini P y Felcheri E. Morphological aspects of human endometrium during hormone replacement therapy. **Ann NY Acad Sci** 1992;734:263-270.
- 51.- Kerr JFR, Wyllie AH y Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer** 1972;26:239-257.
- 52.-Wyllie AH. Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. En Bowen ID, Lockshin RA. de. Cell death in biology and pathology. **Champran & Hall, London:9-34.**
- 53.- Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JFR. Patterns of cell death. **Methods Archiev Exp Pathol** 1988;13:18-54.
- 54.- Brukley IK. A light and electron microscopic study of thermally injured cultured cells. **Lab Invest** 1972;26:201-209.
- 55.- Laiho KU, Berezesky IK y Trump BF. The role of calcium in cell injury: Study in Erlich ascites tumor cells following injury whit anoxia and organic mercurials. **Surv Synth Pathol Res** 1983;2:170-183.
- 56.- Borges M, Shu LG, Xhonneux R, Toné F y Van Overloop P. Changes in ultrastructure and Ca⁺⁺ distribution in the isolated working rabbit heart after ischemia: a time-related study. **Am J Pathol** 1987;126:92-102.
- 57.- Hawkins HK, Ericsson JLE, Biberfeld P y Trump BF. Lysosome and phagosome stability in lethal cell injury: morfologic tracer studies in cell injury due to inhibition of energy metabolism, immune cytolysis, and photosensitization. **Am J Pathol** 1972;88:225-288.

58.- Trump BF, Berezsky IK, Sato T, Laiho KU, Phelps PC y DeClaris N. Cell calcium, cell injury and cell death. **Environ Health Perspect** 1984;57:281-287.

59.- Trump BF y Bulger RE. Studies of cellular injury in isolated flounder tubules. I. Correlation between morphology and function of control tubules and observations of autophagocytosis and mechanical cell damage. **Lab Invest** 1967;16:453-482.

60.- Trump BF, Berezsky IK y Cowley RA. The cellular and subcellular characteristics of acute and chronic injury with emphasis on the role of calcium. En: Cowley RA, Trump BF de. Pathophysiology of shock, anoxia and ischemia. **Williams & Wilkins, Baltimore, MD: 6-46.**

61.- Schanne FAX, Kane AB, Young EE y Farber JL. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. **Science** 1979;208:700-702.

62.- Chein KR, Abrams J, Serrini A, Martin JT y Farber JL. Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver injury. **J Biol Chem** 1978;253:4809-4817.

63.- Smith MW, Collan Y, Khang MW y Trump BF. changes in mitochondrial lipids of rat kidney during ischemia. **Biochim Biophys Acta** 1980;618:192-201.

64.- Afanas'ev VN, Korol' BA, Mantsygin YA, Nelipovich PA, Pechatnikov VA y Umansky SR. Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death. **FEBS Lett** 1986;194:347-350.

65.- Duvall E y Wyllie AH. Death and cell. **Imminol Today** 1986;7:115-119.

66.- Hopwood D y Levison DA. Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. **J Pathol** 1976;119:159-166.

67.- Parr EL, Tung HG y Parr MB. Apoptosis as the mode of uterine epithelial cells death during embryo implantation in mice and rats. **Biology and Reproduction** 1987;36:211-225.

68.- Moulton BC, Motz J, Cerdoncillo C, Akcali KC y Khan SA. Progesterone withdrawal and RU-486 treatment stimulate apoptosis in specific uterine decidual cells. **Cell Death and Differentiation** 1997;4:76-81.

69.- Thompson EB. Apoptosis and Steroid Hormones. **Mol Endothol** 1994;8:665-673.

70.- Rumpel E, Michna H y Kuhnel W. Morphology of the uterus after long treatment with progesterone antagonist. **Ann of Anatomy 1993;175:141-149.**

71.- Tabibzadeh S. Signals and molecular pathway involved in apoptosis, with special emphasis on human endometrium. **Hum Reprod Update 1995;1:303-323.**

72.- Gavrieli Y, Sherman Y y Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol 1992;3:493-501.**

Anexo 1

DETECCION MOLECULAR "IN SITU " DE APOPTOSIS

Fijación: La muestra se fijó en formol neutro (Paraformaldehido 4% en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4) durante 20 hrs.

Preparación de cortes: La muestra fijada se cortó del bloque de parafina con un espesor de 4 a 5 micras, estos se montaron laminillas sialinizadas (3 amino propiltrióxilano 2%). La desparafinación y rehidratación se realizó de acuerdo con la técnica habitual para estudio histopatológico.

Se agregó proteinasa K (20 mg/ml en 10 mM tris-HCL pH 7.8) durante 20 minutos a 37 GC, para realizar la digestión proteolítica. Después se lavó con PBS 0.1 M pH 7.4.

Se agregaron 50 microlitros de mezcla TUNEL (tdt-mediated d-UtP nick end labeling) y se incubó en cámara húmeda durante 60 minutos a 37 GC. Después se lavó con PBS en 3 ocasiones.

La preparación se contrastó con azul tripan (1%) y se lavó dos veces con PBS.

Se montó con glicerol y cubreobjetos para ser observada al microscopio de fluorescencia con el objetivo 40x.

Controles:

Negativo: Estos se prepararon de la misma manera que los cortes problema, excepto por que estos se incubaron con 50 microlitros de la mezcla de nucleótidos marcados, sin la enzima deoxinucleotidiltransferasa terminal.

Positivo: Estos una vez rehidratados se incubaron con DNasa 1 (1 mg/ml) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se siguió con el mismo procedimiento.