

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



Expresión del Receptor Activador del Factor Nuclear Kappa β (RANK) en el desarrollo de la endometriosis

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNA: Eulàlia Gregori Garcia

TUTORA UPV: M^º Desamparados Pascual-Ahuir Giner

TUTOR EXTERNO: Raúl Gómez Gallego

Curso Académico: 2018/19

VALENCIA, 5 Julio 2019

ALUMNA: Eulàlia Gregori Garcia

TUTORA UPV: M^a Desamparados Pascual-Ahuir Giner

TUTOR EXTERNO: Raúl Gómez Gallego

LOCALIDAD Y FECHA DE ENTREGA: València, 5 de Julio de 2019

CENTRO DE REALIZACIÓN: Grupo de investigación en Salud de la Mujer -Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, 46010 Valencia

TÍTULO CASTELLANO: Expresión del Receptor Activador del Factor Nuclear Kappa β (RANK) en el desarrollo de la endometriosis.

TÍTULO INGLÉS: RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa β) expression in endometriosis development.

TÍTOL VALENCIÀ: Expressió del Receptor Activador del Factor Nuclear Kappa β (RANK) en el desenvolupament de la endometriosi.

ABSTRACT

The Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa β (RANK) signaling pathway has been revealed as a key element in cell proliferation in hormone-dependent systems. More specifically it has been confirmed as a regulatory factor in breast and endometrial cancers. In that sense and despite the fact that endometriosis is a disease medically defined as benign, it presents similarity with malignant processes, such as the progressive and invasive growth of ectopic endometrial tissue, estrogenic dependence of proliferation, and trend to recur and metastasize, suggesting a shared regulation path with carcinogenic processes. Eutopic endometrium was harvested from healthy women undergoing routine gynecological examinations as control (n=30), and eutopic endometrium (n=40) and ectopic endometrium -ovarian endometriomas- (n=11) were collected during endometriosis surgery. RANK immunohistochemical staining was performed using a human antibody RANK / TNFRSF11A. RANK staining was quantified using Image Pro Plus 6.0 by obtaining the average optical density (IOD) in the delineated areas. The amount of RANK staining was expressed as a logarithm function of the IOD (mean \pm SD) and statistical analysis was performed with SPSS 24.0. Comparisons between group samples were made by ANOVA followed by Turkey post hoc. Statistically significant differences in RANK expression among different group samples were detected. Ovarian endometrioma showed higher expression (2.67 ± 1.36) than eutopic endometrium from women with endometriosis (1.15 ± 0.77) (p value < 0.01), and RANK staining was increased in eutopic endometrium obtained from endometriosis patients compared to eutopic endometrium from healthy women (1.05 ± 0.95) (p value < 0,05). So, the increase of RANK staining in ovarian endometriomas may suggest a possible implication of the receptor in the development of the disease, and could explain why, despite being defined as a benign disease, endometriosis presents similarity with malignant processes. Also, the data collected from compared eutopic endometrium could point out RANK receptor as one of the many factors involved in endometriosis origin. Whether the observed pattern is a cause or a consequence of the disease progression should be explored in further studies.

KEYWORDS: endometriosis, RANK, gynaecology, cancer, endometrium.

RESUMEN

El Receptor Activador del Factor Nuclear Kappa β (RANK) se ha revelado en los últimos años como un elemento clave de la proliferación celular en tejidos con regulación hormono-dependiente, siendo confirmada su participación en la regulación del cáncer de mama y el cáncer endometrial. En la misma línea, a pesar de ser una enfermedad definida médicamente como benigna, la endometriosis presenta en su idiosincrasia características de similitud con procesos de malignidad, como el crecimiento progresivo e invasivo del tejido endometrial de implantación ectópica, la dependencia estrogénica de la proliferación, y la tendencia a recaer y metastatizar, sugiriendo la posibilidad de compartir vías de regulación con procesos cancerígenos. Para el estudio se recogieron muestras de endometrio eutópico procedente de mujeres sanas sometidas a revisión ginecológica rutinaria como control (n=30) y muestras de endometrio eutópico (n=40) y ectópico -endometriomas ováricos- (n=11) de pacientes sometidas a cirugía. Se realizó un análisis inmunohistoquímico para detectar la presencia del receptor RANK utilizando el anticuerpo humano RANK/TNFRSF11A. Para la señalización y cuantificación de la tinción se utilizó el software Image Pro Plus 6.0, obteniendo la densidad óptica -intensidad- para el área seleccionada en cada muestra. Los datos fueron expresados en forma de logaritmo neperiano como media y desviación típica. Los resultados obtenidos presentaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de RANK entre las muestras de endometrioma ovárico (2.67 ± 1.36) y endometrio eutópico de mujeres con endometriosis (1.15 ± 0.77), con un p valor $< 0,01$, y en menor medida, entre el endometrio eutópico de las pacientes en contraste con el endometrio eutópico sano (1.05 ± 0.95) con un p valor $< 0,05$. Por tanto, el incremento de la tinción de RANK observada en las muestras de endometrioma ováricos podría sugerir la implicación del receptor RANK en el desarrollo de la enfermedad, pudiendo explicar porque a pesar de ser definida como una enfermedad benigna, la endometriosis presenta en su lugar de implantación - ovario- características de malignidad. De la misma forma, los resultados observados en la comparación de ambos endometrios eutópicos podría señalar la implicación del receptor RANK como uno de los muchos elementos diferenciadores implicados en el origen de la endometriosis. Si el patrón observado es causa o consecuencia de la progresión de la enfermedad deberá ser investigado en futuros estudios.

PALABRAS CLAVE: endometriosis, RANK, ginecología, cáncer, endometrio.

AGRADECIMIENTOS

Para todos aquellos y aquellas que en algún momento me han brindado su hombro de gigante para llegar más alto.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. La endometriosis.....	1
1.2. ¿Por qué RANK?.....	2
1.3. RANK y el cáncer de mama.....	4
1.4. RANK y el cáncer de endometrio.....	5
1.5. La endometriosis como enfermedad “tumor-like”	7
2. Objetivos	8
3. Materiales y métodos.....	9
3.1. Muestras de tejido y diseño experimental.....	9
3.2. Detección inmunohistoquímica de RANK.....	10
3.3. Cuantificación de la señalización inmunohistoquímica de RANK.....	11
3.4. Análisis estadístico de la expresión de RANK.....	13
4. Resultados	15
5. Discusión.....	24
6. Conclusiones.....	29
7. Referencias bibliográficas.....	30

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La endometriosis.

Con el fin de comprender mejor el objeto de investigación, es importante definir primero la endometriosis como concepto. Así, anatomopatológicamente podremos considerar como tal “la presencia de glándulas endometriales y estroma fuera de su ubicación normal” (1), es decir, fuera del útero, observándose principalmente presencia de tejido endometrial en peritoneo pélvico, pero también en ovarios, fondo de saco y ligamentos uterosacros (1).

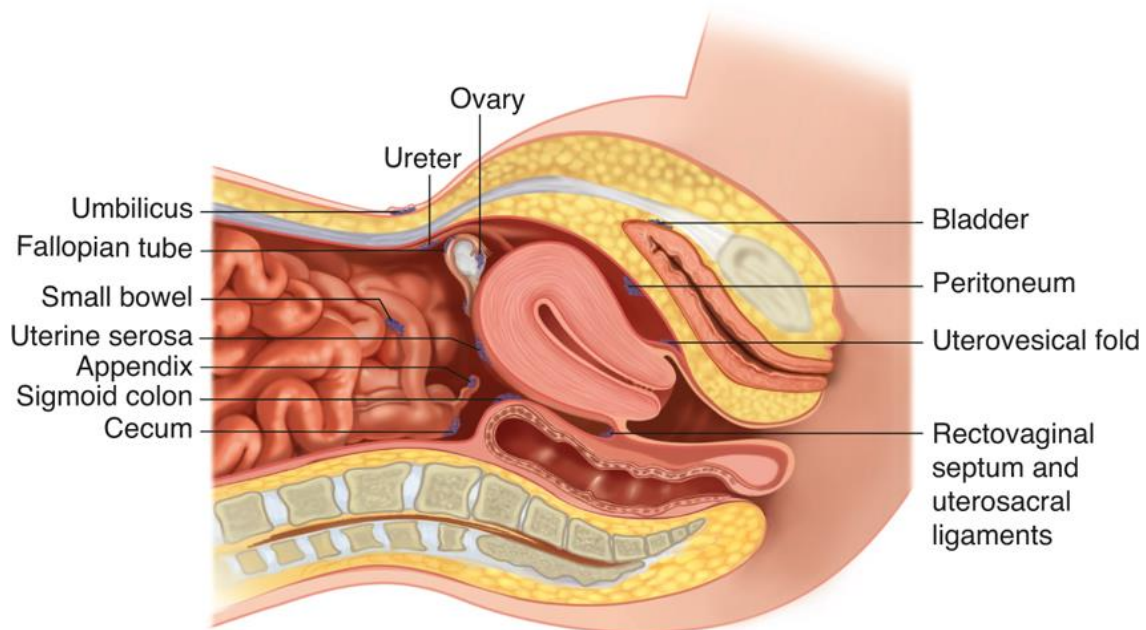


Figura 1. Lugares de posible localización de la endometriosis en abdomen y pelvis (1).

Se trata de una afección ginecológica, dependiente de hormonas, y en consecuencia predominante en mujeres en edad fértil (1), cuya incidencia se calcula aproximadamente en un 10% del total (2).

En cuanto a su presentación clínica, la endometriosis puede ser asintomática pero generalmente se manifiesta con “dolor pélvico crónico y esterilidad” (1). Además muchas mujeres padecen también dismenorrea -dolor cíclico durante la menstruación-, y dispareunia durante el coito, y menos frecuentemente disuria -dolor al miccionar y

disquecia -defecación dolorosa (1).

Al ser una enfermedad basada principalmente en los síntomas, el diagnóstico es difícil, debido “al solapamiento con otros procesos, a la variabilidad sintomática, o a la conciencia generalizada por parte de las mujeres de que es normal que la menstruación duela” (2,18). Así, “esta aceptación de normalidad del dolor menstrual por parte de las mujeres”, puede conllevar un “subdiagnóstico o a un mal etiquetado del proceso, dentro de otras categorías como la dismenorrea idiopática” y “demorar su correcto diagnóstico entre 7 y 8 años desde el inicio de los síntomas” (2,18).

Respecto a las técnicas de confirmación diagnóstica utilizadas, habitualmente se emplea la ecografía transvaginal para detectar endometriomas con un diámetro igual o mayor que 20 mm (1), sin embargo la laparoscopia es el método considerado como *gold standard* del diagnóstico de la endometriosis, con una sensibilidad y especificidad del 95 y 97%, respectivamente (1). Por eso resulta de gran importancia encontrar nuevos métodos de diagnóstico específicos y menos invasivos, que permitan identificar rápidamente la enfermedad, produciendo el menor daño posible.

1.2. ¿Por qué RANK?

Hace aproximadamente 20 años se descubrieron tres nuevos miembros de la superfamilia de factores de necrosis tumoral (TNF): el Receptor Activador del Factor Nuclear Kappa β (RANK), su ligando RANKL, y su receptor señuelo osteoprotegerina (OPG). Una revolución en el mundo de la señalización celular, que permitió, contra todo pronóstico, mejorar el conocimiento de numerosas funciones fisiológicas básicas, ya que el binomio RANK/RANKL controlaba desde “la inmunotolerancia, la organogénesis del sistema inmune, la osteoinmunología, el crecimiento del pelo, y la termoregulación en el sistema nervioso central” (4), hasta “el establecimiento de una glándula mamaria lactante, el desarrollo del cáncer de mama inducido por hormonas o la metástasis ósea” (5).

La primera de estas funciones donde se identificó la importancia del papel de RANK y RANKL fue el recambio óseo. El esqueleto humano es una estructura que se encuentra sujeta a constante transformación, gracias a una perfecta armonía entre la formación y destrucción de tejido, o lo que es lo mismo, entre osteoblastos y osteoclastos (4,5). En ese contexto, la expresión de RANKL en osteoblastos y osteoclastos, inducida por diversos estímulos como la vitamina D3, PGE2, PTH, TNF, IL-1, 11, y 17 y la progesterona, desencadenará la maduración de los precursores de osteoclastos que expresarán RANK en

su membrana. Mientras que la acción del 17 β estradiol en contraste, inducirá la expresión del receptor señuelo OPG, interfiriendo en la unión de ligando y receptor, y evitando así la degradación del hueso (4, 5). Por ese motivo, en mujeres posmenopáusicas, la pérdida de estrógenos producirá una reducción de OPG y, por tanto, un aumento relativo de la actividad de RANKL, lo que en última instancia conducirá a una mayor renovación ósea y osteoporosis (4,5) (Figura 2).

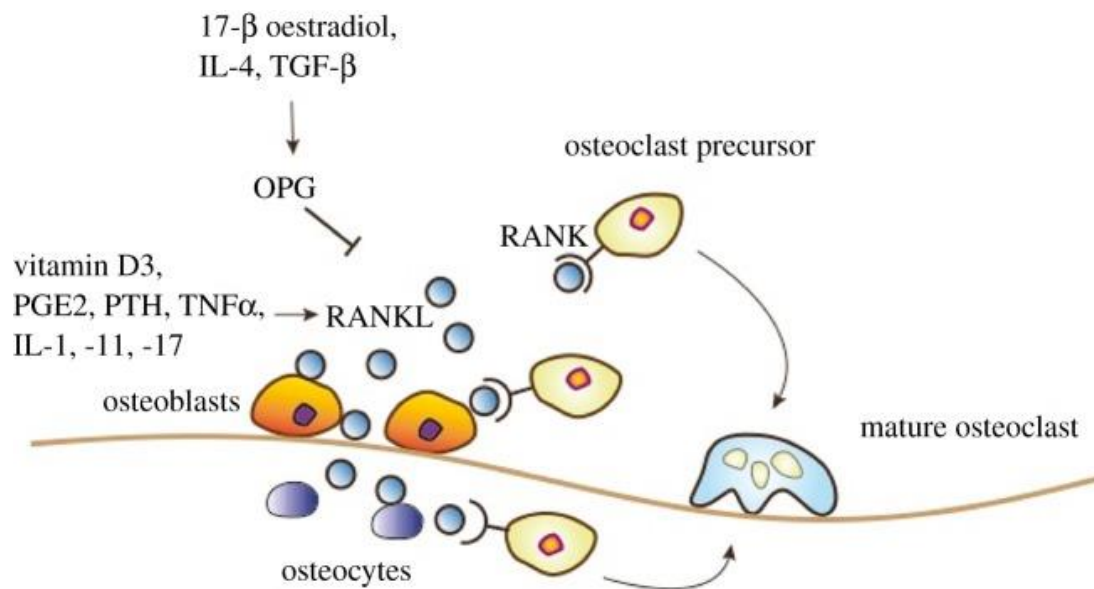


Figura 1: Osteoclastogénesis mediada por la vía RANK/RANKL (4).

Por otro lado, una de las funciones más sorprendentes de RANK y RANKL será su papel en el desarrollo de la glándula mamaria durante el embarazo. Fisiológicamente, “la glándula mamaria se encuentra organizada en dos tipos de células principales, el linaje luminal y el mioepitelial. A su vez, las células luminales se pueden subdividir en células ductales y alveolares, siendo las principales responsables de la secreción mamaria de líquidos y nutrientes, mientras que las células del linaje mioepitelial, también llamadas células basales, guían la leche a través del árbol epitelial.” (8). Dentro de este último grupo, se encuentran las células madre mamarias, que son capaces de generar todo tipo de células, y reconstruir de nuevo una glándula mamaria al completo con incluso mayor desarrollo y producción de leche en el embarazo. Lo significativo de esta información es que todas estas células epiteliales –luminales y basales- expresan de forma constitutiva el receptor RANK en su superficie, de modo que la acción de la progesterona, así como de las progestinas y la prolactina, produce en las células luminales -con receptores para la progesterona- la expresión de RANKL, que se une de forma autocrina y paracrina a células luminales y basales respectivamente, desencadenando en estas últimas la cascada IKKalfa-

INFKB-Cyclin D1, que estimula la proliferación y expansión de las células madre de la glándula mamaria (4,5) (Figura 3).

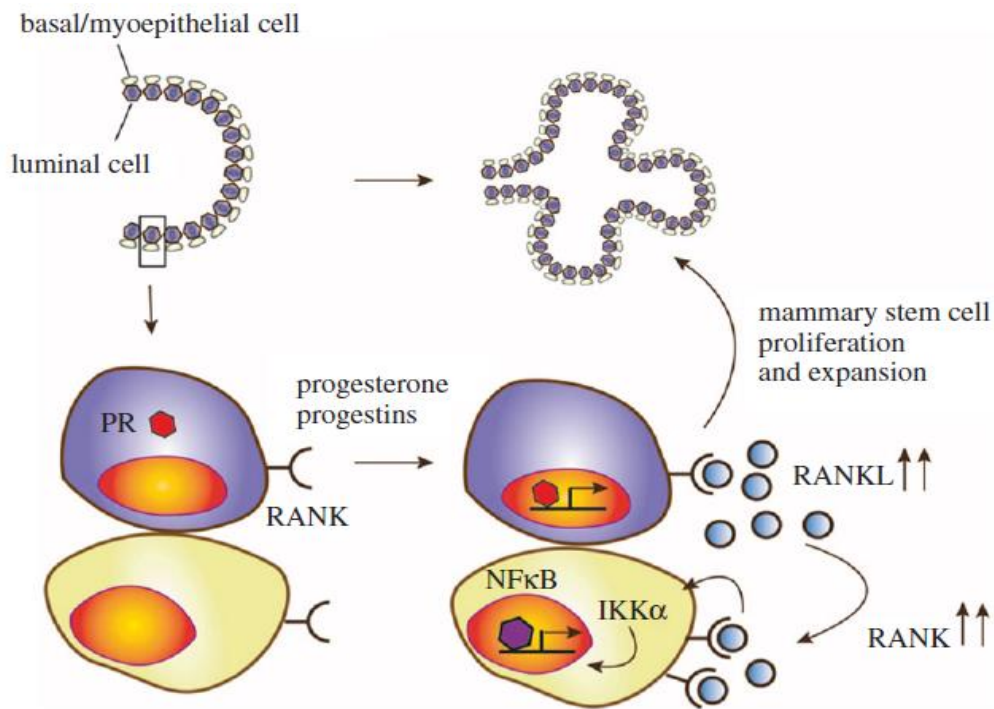


Figura 3: Expansión de células madre mamarias mediada por RANK / RANKL (4)

1.3. RANK y el cáncer de mama.

En este punto, el hecho de que se descubriera el papel de RANK y RANKL en la regulación de la proliferación de las células epiteliales en las glándulas mamarias, sumado a que la expresión de RANKL en la glándula mamaria era inducida por progesterona, y que tanto la progesterona como la prolactina no solo habían sido implicadas en el desarrollo normal de la glándula mamaria sino también en cambios malignos de la mama, alertó sobre la posibilidad de que la expresión de RANK y el cáncer de mama estuvieran relacionados (5).

Una hipótesis que se reforzó en 2003, gracias al Women Study y el Women's Health Initiative Study, donde se descubrió la relación entre el uso de progesterona y el aumento de riesgo de cáncer de mama en mujeres menopáusicas tratadas con THS, al advertir un aumento significativo del riesgo de cáncer de mama en mujeres que usaban terapia de reemplazo hormonal con estrógeno más progesterona (THS combinada), versus las mujeres que solo usaban THS con estrógenos.(4,5)

Y que se confirmó posteriormente mediante el estudio de ratones modificados genéticamente. En este caso, la supresión de la expresión del receptor RANK en células mamarias epiteliales en un ambiente proclive a la proliferación celular, con administración de progestina sintética (MPA) y un agente lesivo de ADN (DMBA), reducía de forma significativa la cantidad de tumores mamarios expresados en ratones mutantes en comparación con ratones de tipo silvestre (4,5,6). Mientras que la sobreexpresión de RANK en la glándula mamaria expuesta a MPA/DMBA, desarrollaba una mayor sensibilidad al desarrollo de cáncer de mama en la misma comparativa y una reducción de la incidencia de tumores con el bloqueo de RANKL, obteniéndose así resultados que evidenciaban la función del binomio RANK/RANKL como factores clave en la regulación de tumores mamarios hormonalmente inducidos (4,5,6).

En ese contexto y con el fin de comprender mejor el funcionamiento de los cánceres mamarios, primero será necesario diferenciar entre los tumores mamarios positivos y los tumores mamarios negativos para los receptores de estrógenos, y segundo, conocer su relación con las mutaciones genéticas más estudiadas: BRCA-1 y BRCA-2. Así, al combinar las dos características tendremos que el 77% de los tumores mamarios relacionados con la mutación BRCA-2 serán ER (+), mientras que la gran mayoría de tumores producidos por BRCA-1 serán triple negativo para receptores de estrógeno (4). Siendo en este último caso donde se relacionará de nuevo a RANK y RANKL con la progesterona. Las células basales mamarias mutadas acumularán numerosos daños nucleares que al no poder ser reparados, activarán a NFkB, que sintetizará RANKL como respuesta a la progesterona, produciendo una expansión de dichas células (4).

1.4. RANK y el cáncer de endometrio

Atendiendo a la mayor proporción de mujeres afectadas por cáncer de mama que hombres -1%-, y a la importancia de los estrógenos y la progesterona en las remodelaciones sufridas en el endometrio en respuesta a las hormonas producidas por el ovario, el endometrio surge como nuevo foco de atención en la investigación de la relación de RANK y el cáncer.

En estudios realizados por este mismo grupo se demuestra que el endometrio, cuyo tejido se encuentra formado por una capa de epitelio luminal columnar, apoyado sobre un estroma celular con presencia de glándulas tubulares, expresa en su morfología normal el combo RANKL/RANK, y que en los casos donde existe tumor endometrial hay una mayor expresión de RANK, en correlación con el grado de tumoración. (10,11,3).

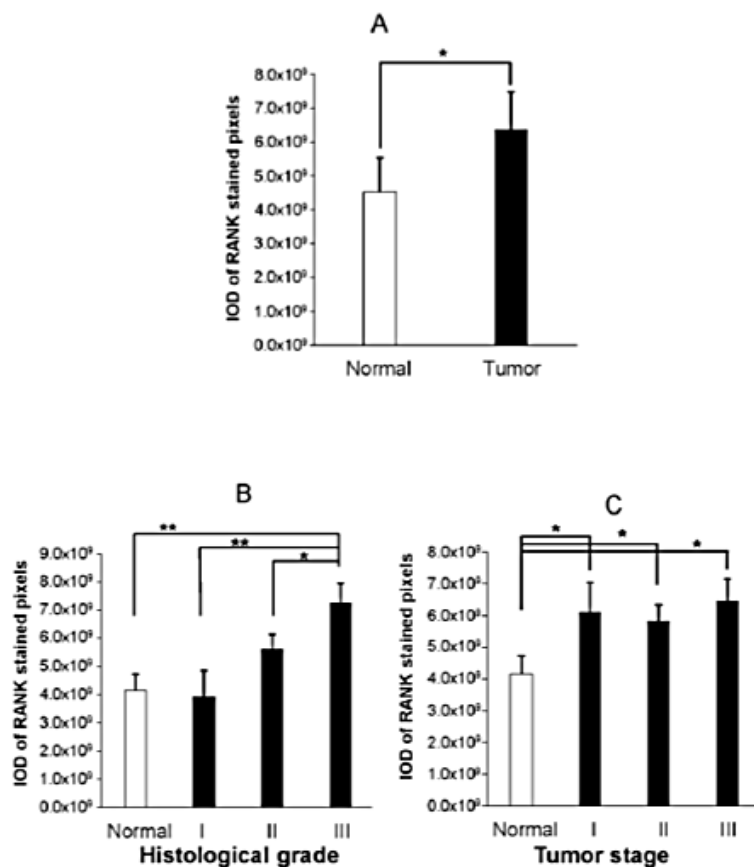


Figura 4: Comparación de la expresión de RANK en endometrio normal y cáncer endometrial (3).

Un descubrimiento corroborado más tarde por Wang et al (2015), donde se determinó que una mayor sobreexpresión de RANK en el cáncer de endometrio se asociaba a “invasión miometrial y metástasis en los nódulos linfáticos”, inhibiéndose su acción in vivo e in vitro mediante la administración de MPA, un derivado de la progesterona. Además el mismo grupo, identificó también los mecanismos responsables mediante los cuales RANK y RANKL regularían el comportamiento de las células tumorales: la vía AKT/B-caterin/snail. (9,14).

Así, saber que la presencia de RANK en el endometrio es una realidad fisiológica y un riesgo cancerígeno, pondrá de manifiesto la importancia de seleccionar el endometrio como objeto de mayor investigación.

1.5. La endometriosis como enfermedad “tumor-like”

A pesar de que la endometriosis se trata de una enfermedad definida médicamente como benigna, presenta en su lugar de implantación características de similitud con procesos malignos, como el crecimiento progresivo e invasivo del tejido endometrial ectópico, la dependencia estrogénica de la proliferación, y la tendencia a recidivar y metastatizar, sugiriendo la posibilidad de compartir vías de regulación con procesos

Además, el hecho de que la enfermedad se desarrolle en mujeres en edad reproductiva y revierta su desarrollo tras la menopausia o una ovariectomía, indicará que el establecimiento y el crecimiento de los implantes ectópicos dependerá de la influencia de las hormonas ováricas en el tejido anómalo, al igual que el endometrio fisiológico, y los cánceres mamarios y endometrial antes descritos (17).

La explicación más aceptada sobre el mecanismo de desarrollo de la endometriosis será la presencia de menstruación retrógrada, lo que supondrá según Sampson, que “durante la menstruación normal, los desechos menstruales, incluidas las células endometriales eutópicas viables, los factores de crecimiento y las citocinas, podrían viajar de forma retrógrada a través de las trompas de Falopio hacia la cavidad pélvica, donde estas células podrían invadir y proliferar en los tejidos circundantes”. Un hecho que además quedaría probado por la similitud histológica entre ambos tejidos (15,17)

Sin embargo, la menstruación retrógrada será un fenómeno que se producirá en el 90% de las mujeres en edad fértil, desarrollando solamente endometriosis en 1 de cada 10 de ellas, por lo que habrá que tener en cuenta otros factores en la adhesión y crecimiento de lesiones endometriósicas tales como “el aumento de la exposición a los desechos menstruales (aumento del flujo menstrual, menor duración del ciclo), endometrio eutópico anormal, ambiente peritoneal alterado, vigilancia inmunológica reducida o aumento de la capacidad angiogénica” (17).

Teniendo en cuenta esta información, y atendiendo a la relación establecida previamente entre los cánceres mamario y endometrial y el incremento en la expresión de RANK, el objetivo principal de este trabajo será intentar descubrir si una mayor presencia del receptor RANK en el endometrio, tendrá un papel fundamental en el desarrollo de la endometriosis y si como tal, podrá servir en un futuro como un biomarcador diagnóstico no invasivo de la enfermedad. En la misma línea, como objetivo secundario se estudiará también si la expresión de RANK formará parte de los elementos de anormalidad diferencial

entre los endometrios precursores de la enfermedad y los sanos, y si como tal actuará como un posible factor implicado en la adhesión y crecimiento de las lesiones endometriósicas, con el fin de aportar luz sobre porque el desarrollo de la enfermedad se dará en 1 de cada 10 mujeres, siendo la menstruación retrógrada frecuente en el 90%.

2. OBJETIVOS

- Objetivo principal: Investigar la relación entre las características de similitud de la endometriosis con procesos de malignidad y el desarrollo de cánceres en mama y endometrio a través de la expresión de RANK.
 - Comprobar si el tejido endometrial ectópico en ovario expresa un incremento de RANK
 - Cuantificar y comparar la expresión de RANK entre muestras procedentes de endometrios sanos, endometrios eutópicos de mujeres afectadas por la enfermedad y lesiones endometriales en ovario -endometriomas ováricos.
 - Identificar si la toma de anticonceptivos orales supone una diferencia en la expresión de RANK entre endometrios de mujeres sanas y afectadas por endometriosis
- Objetivo secundario: Analizar la diferencia de expresión de RANK como un posible elemento de anormalidad diferencial de los endometrios precursores de la enfermedad frente a los sanos.
 - Cuantificar y comparar la diferencia de expresión de RANK entre endometrios sanos y endometrios eutópicos procedentes de mujeres diagnosticadas de endometriosis.
 - Establecer si existe diferencia en la expresión de RANK entre fase proliferativa y secretora del ciclo menstrual entre endometrios sanas y endometrios eutópicos procedentes de mujeres afectadas por endometriosis.
 - Identificar si la toma de anticonceptivos orales supone una diferencia en la expresión de RANK en endometrios eutópicos sanos y con endometriosis.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Muestras de tejido y diseño experimental

Para investigar el valor de la expresión de RANK como indicador del desarrollo y presencia de endometriosis, se recogieron primero muestras de aspirado endometrial de mujeres sanas en revisión rutinaria, y de mujeres sometidas a cirugía en el Hospital Clínic de Valencia. De la misma forma, se obtuvo tejido procedente de los endometriomas ováricos extirpados a las pacientes durante las intervenciones, previo consentimiento informado de las mismas. Posteriormente, las muestras se procesaron mediante un protocolo corto de deshidratación con alcoholes ascendentes y xiloles -30' a RT cada uno-, inclusión en parafina -una hora a 60º en estufa-, y montaje con moldes en bloque térmico y parafina líquida, en el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Clínic de Valencia.

Para la selección de las muestras de aspirado endometrial incluidas en el estudio, se estableció como principal criterio la conservación y apariencia (color amarillo-parduzco) de las muestras, desechando todas aquellas que a simple vista contuvieran elementos que pudieran interferir en los resultados del estudio, tales como necrosis o restos de sangre. Una vez escogidas las mejores muestras, se buscaron las lesiones ováricas parejas procedentes de la misma paciente, con el fin de cotejar el tejido endometrial tanto en origen como ectópico. A su vez, se elaboró un plan de muestras para identificar los aspirados endometriales y las lesiones del estudio, y clasificarlos según su tipología: control/muestra/lesión, estadio del ciclo menstrual: proliferativo/secretor, -a partir de los datos de la fecha de la última regla conocida (FUR)-, y toma de anticonceptivos orales.

Para la primera parte del estudio, donde se compararon los endometrios de mujeres control sanas con pacientes afectadas por la enfermedad, se dividieron las muestras obtenidas en un número de cristales que permitiera la optimización del estudio y la eliminación de posibles errores experimentales, resultando en una distribución de tres muestras por cada porta, salvo dos casos, con un total de 30 muestras control divididas en 10 portaobjetos (A-J), y 40 muestras de pacientes con endometriosis repartidas en 14 (A-N). Las muestras se devastaron y cortaron a 4 micras mediante un micrótopo giratorio Thermo Scientific HM 325, organizándose posteriormente siguiendo el orden descrito en el plan anterior, y secando *overnight* en estufa a 37 grados.

De la misma forma, para la segunda parte del estudio, donde se analizaron las lesiones ectópicas de las pacientes sometidas a intervención, se realizaron tres tandas de cortes seriados de 10 micras de grosor y tinción con hematoxilina-eosina de las muestras seleccionadas. Tras la observación microscópica se descartaron aquellas muestras que a pesar de cumplir con el criterio diagnóstico de endometriosis, no presentaban tejido epitelial endometrial distinguible, resultando finalmente en 11 muestras de las 19 iniciales, divididas en 8 cristales, con uno o dos cortes por cada uno, dependiendo del tamaño muestral: **B, C, E, F-G, I-J, M-N, O-P** y **Q**. A continuación, y siguiendo el mismo protocolo que en el experimento anterior, las muestras definitivas se cortaron a 4 micras y secaron nuevamente en estufa a 37° *overnight*, dejándolas preparadas para el estudio inmunohistoquímico.

3.2. Detección inmunohistoquímica de RANK

La tinción inmunohistoquímica de RANK se realizó en el tejido de las muestras preparadas mediante el uso de un anticuerpo humano RANK / TNFRSF11A (MAB6831 - R & amp; D Systems Inc, MN, EE. UU.) acoplado a un sistema de detección Dako (Glostrup, Dinamarca) REAL © EnVision © Peroxidasa / DAB +, Rb / Mo (número de catálogo K500711-). Los experimentos piloto se realizaron con muestras de endometrio normal con el fin de optimizar la concentración de anticuerpo RANK y los procedimientos de paso de IHC relacionados

Las secciones fueron desparafinadas por incubación en un horno a 60 °C durante 60 min, rehidratándose a continuación de forma rutinaria mediante baños de xiloles (histoclear) y etanoles descendentes, 5 minutos cada uno. Tras ello, la recuperación del antígeno se realizó sumergiendo los portaobjetos en una solución Dako Low Retrieval (tampón de citrato a pH 6), y calentando a posteriori en el autoclave del laboratorio a 121°C (presión de 1,9 bar) durante 2 min. Las muestras se cercaron con PAP-PEN y lavaron con PBS para eliminar los restos del mismo. La peroxidasa endógena se inactivó incubando los portaobjetos en la “Peroxidase Solution” del Kit de Dako, a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente se lavó concienzudamente con PBS. Como paso final de la primera parte del estudio inmunohistoquímico, los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo primario RANK, diluido 1: 400, en el “Antibody Diluent” de Dako a 4° durante toda la noche. A la mañana siguiente, los portaobjetos se lavaron nuevamente con PBS y se incubaron durante 20 min a RT con el “HRP-Link” de Dako siguiendo las instrucciones del fabricante, con el fin de amplificar la señal. Previo lavado minucioso con PBS, la detección del HRP se reveló usando 3, 3'-diaminobenzideno del DAB Peroxidase substrate Kit SK-4100 de Vector

Laboratories. Para ello se combinaron 2'5 mL de H₂O destilada, 2 gota de buffer, 2 gotas de DAB y 1 gota de peroxidasa, y se utilizó un vórtex para conseguir la mezcla adecuada. Finalmente, las muestras de tejido se contratiñeron usando Hematoxilina de Harris de nueva adquisición, por lo que los portaobjetos solamente se mantuvieron en las cubetas durante 30 segundos, para evitar un exceso de tinción. Tras el lavado con agua corriente y destilada, las muestras se deshidrataron con etanoles descendentes y xiloles -3 minutos cada uno-, y se procedió al montaje de las mismas utilizando el medio de montaje "Coverquick 1000" de VWR Chemicals, pipetas Pasteur desechables y cubreobjetos. Finalmente, los portaobjetos se dejaron reposar durante toda la noche.

3.3. Cuantificación de la señalización inmunohistoquímica de RANK

Las diferentes secciones de las muestras fueron fotografiadas con un aumento de 10x, para poder apreciar en su plenitud el conjunto de la imagen, y realizar correctamente el análisis descriptivo y cuantitativo de la señalización de RANK.

En la primera parte del estudio, específicamente para fines de cuantificación, se fotografiaron cuatro campos aleatorios que representaran significativamente la totalidad de las muestras. Para ello se utilizó el sistema de análisis de imágenes Leica Application Suite LAS 4.8, vinculado al microscopio LEICA DMI300B de la Unidad de Microscopía Confocal de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina, utilizando como criterios de configuración de la cámara: Exposición:8,49ms, ganancia 1,5x, saturación 2,00 y Gamma 0,60.

En la segunda parte del experimento, y debido a la variabilidad de tejidos contenidos en las muestras procedentes de endometriomas ováricos, se advirtió la necesidad de diferenciar previamente el estroma endometrial y el estroma ovárico de los cortes para poder responder a la definición patológica de endometriosis -la presencia de glándulas endometriales y estroma fuera de su ubicación normal-, y homogeneizar así el área de las muestras a comparar -epitelio y estroma-, en el endometrio eutópico y ectópico de las mujeres diagnosticadas con la enfermedad. En ese sentido, se procedió a realizar una tinción inmunohistoquímica de las muestras procedentes de endometriomas ováricos con el anticuerpo CD10, con señal para estroma endometrial pero no ovárico. El procedimiento fue ejecutado amablemente por la Unidad de Anatomía Patológica del Hospital Clínic de Valencia, junto a un escaneado de las muestras resultantes. A continuación, se delimitaron las zonas correspondientes a las lesiones endometriosis comparando de forma paralela las imágenes escaneadas de la tinción inmunohistoquímica con CD10 y RANK. Para

garantizar la representación correcta de la enfermedad, se fotografiaron las zonas con presencia de tejido epitelial asociado a tejido estromal endometrial previamente identificadas.

A la hora de realizar la cuantificación posterior de las fotografías, la densidad de la tinción de RANK se estimó como una función de la distribución de RANK y la señalización de intensidad. Para tales propósitos, el área de interés teñida de marrón (RANK) de cada imagen, se destacó mediante el uso de la herramienta de segmentación del software de análisis Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics Inc. Silver Spring, MD), concretamente, a través de la opción basada en el histograma de la imagen. Para determinar la expresión de RANK en el sistema de color HSI se testaron, modificaron y finalmente establecieron unos parámetros capaces de detectar la tinción inmunohistoquímica de forma similar en todos los tipos de muestras, correspondiendo a: H=0-36, S=90-255 e I=0-178 para RANK y H=0-255, S=0-255, I=175-255 para el *background* o espacio en blanco, obteniendo la densidad óptica -intensidad- de cada píxel individual, incluido en el área de interés descrita en la imagen (IOD).

Sin embargo, y debido a que el programa de análisis Image Pro Plus utiliza una escala de colores opuesta al método de tinción usado en el estudio -marrón-, donde el valor numérico más elevado -255- equivale al color más claro -blanco-, y el valor más bajo -0-, se asocia a un color más oscuro, y con el fin de que la comprensión lectora y el análisis estadístico resultara más sencillo, al corresponder el aumento de la densidad óptica (IOD) correspondiera a una mayor expresión de RANK, se procedió a invertir a posteriori el valor IOD obtenido en Microsoft Excel. Para ello se dividió el Total IOD de cada imagen por el Área total de RANK para determinar la OD INVERTIDA. Posteriormente, la OD INVERTIDA se restó a 256, consiguiendo así la OD REAL, que esta vez sí, al multiplicarla por el área de RANK, indicó el IOD total real.

A su vez, y previo al cálculo del dato estadístico de interés, se corrigió también el área total de tejido. Para que la expresión de RANK fuera cuantificada correctamente en relación con el total de la muestra estudiada, se eliminaron las zonas blancas, etiquetadas como *background* en el *software*. Para ello, al total de píxels de la imagen completa o a la selección del área de estudio, según el tipo de muestra, se restó el área vacía, obteniendo como resultado final el área total de la muestra. Una vez realizadas todas las modificaciones oportunas, se calculó la Media total de IOD REAL de cada una de las muestras, dividiendo el Total IOD real por el Área Real de cada una de las imágenes.

Ejemplo:

LESIÓN B-1	Objects	Total Area	Total IOD	Total Count (adjust)	Total Density (max)	OD INVERTIDA (TOTAL IOD/AREA TOTAL)
RANK	2837	697328	66845620	2877,6504	66845620	95,85965285
BACKGROUND	832	320290	64333600	848,96899	64333600	

OD REAL (256-OD INVERTIDA)	TOTAL IOD REAL (AREA * OD REAL)	AREA TOTAL PIXELS	AREA REAL (AREA TOTAL PIXELS - AREA BACKGROUND)
160,1403472	111670348		
		2628388	2308098

TOTAL IOD REAL /AREA REAL	MEDIA IOD REAL POR MUESTRA	MEDIA IOD TODAS MUESTRAS	LN MEDIA IOD TODAS MUESTRAS (4)
48,38197858	49,9494997	18,60757658	2,923568841

Figura 5: Cálculo de la Media total de la densidad óptica (IOD) real de la tinción de RANK

3.4. Análisis estadístico de la expresión de RANK

El análisis estadístico se realizó con SPSS 23.0, y los resultados se expresaron como media \pm DE y diferencia de medias en forma de logaritmo neperiano.

Como variables de estudio de la primera parte del experimento se definieron por separado: el tipo de muestra -control (1)/ endometriosis (2)-, la fase del ciclo menstrual -proliferativa (1)/secretora(2)-, y la toma de anticonceptivos orales -No (0)/ Sí (1). A continuación, se agruparon en una sola variable el tipo de muestra y la fase del ciclo menstrual como: Control-Proliferativa (11)/Control-Secretora (12), y Endometriosis-Proliferativa (21)/ Endometriosis-Secretora (22), y el tipo de muestra y la toma o no de anticonceptivos orales -Control-No (10)/ Control-Sí (11), Endometriosis-No (20)/ Endometriosis-Sí (21). Además, dado que teóricamente el endometrio de las mujeres en tratamiento con anticonceptivos orales sufre una transformación atrófica que lo asimila a las características de la fase secretora, se crearon dos nuevas variables para comparar la expresión de RANK en ellas. Primero se añadió una nueva etiquetas “atrófica” a la variable de fase del ciclo menstrual, resultando las agrupaciones de la siguiente forma: Control-Proliferativa(11)/ Control-Secretora (12)/ Control-Atrófica (13)/ Endometriosis-Proliferativa (21)/Endometriosis-Secretora(22)/ Endometriosis-Atrófica (23). Y segundo, se procedió a recatalogar a aquellas mujeres consumidoras de anticonceptivos orales como mujeres en fase secretora.

En la segunda parte del experimento, se añadió a las variables antes descritas el valor correspondiente a los datos procedentes de los endometriomas ováricos: 3 -Lesión- para el tipo de muestra, 31 y 32 -Lesión-Proliferativa (31)/ Lesión-Secretora (32)- para la combinación del tipo de muestra y la fase del ciclo menstrual, y 30 y 31 -Lesión-No (30)/Lesión-Sí (31), para el tipo de muestra junto a la toma de anticonceptivos.

Con el fin de conocer el tipo de pruebas a utilizar para analizar los datos obtenidos mediante el programa Image Pro Plus se procedió a realizar una valoración de la distribución de las muestras mediante pruebas de bondad de ajuste de normalidad, utilizando tanto la detección a simple vista en el gráfico Q-Q normal de Nota, como las pruebas de significación de Shapiro Wilks Smirnov para datos menores de 50 en cada tipo de muestra. Dada la amplia distribución de los valores de la Media del IOD Total para muestras de endometrio control y endometrio eutópico se procedió a ejecutar una transformación logarítmica de los datos para alcanzar una distribución gaussiana de normalidad, y permitir así utilizar análisis paramétricos de mayor robustez.

Para comparaciones únicas, es decir, aquellas diferencias de expresión de RANK entre el tipo de muestras de endometrio -control y endometrio eutópico de pacientes con endometriosis-, el tipo de fase del ciclo menstrual o la toma de anticonceptivos oral o no, se empleó la prueba t de Student. Mientras que para comparaciones múltiples, tanto de los casos donde se agruparon las variables tipo de muestra y fase del ciclo, y tipo de muestra y toma de anticonceptivos de la primera parte, como para las comparaciones de la expresión de RANK en los diferentes tipos de muestra, fases del ciclo menstrual y toma de anticonceptivos tras la inclusión de los valores procedentes de los endometriomas ováricos, se realizó un ANOVA seguido del análisis post hoc HSD Turkey. Se seleccionó este tipo de pruebas de contraste de hipótesis específicamente porque es el más potente en los casos donde la hipótesis es simple, es decir, cuando la diferencia de medias implica un promedio de medias, y exhaustiva, donde se realizan todas las comparaciones posibles entre los pares de medias que tiene el diseño de investigación (23).

Además de forma extraordinaria se realizaron pruebas T de Student de muestras independientes para contrastar la diferencia estadística de expresión de RANK obtenida en la toma de anticonceptivos orales dentro del mismo grupo de endometrio eutópico, y pruebas t de Student de muestras relacionadas para observar la diferencia de presentación de RANK en las muestras parejas de endometrio eutópico y ectópico. Por último, se utilizó una bi-variante de Pearson para analizar la presencia de correlación entre las diferentes variables. La significancia estadística se definió como $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

En las imágenes tomadas con microscopía óptica se observó expresión de RANK en las glándulas endometriales delineando el espacio luminal, tanto en el endometrio control de mujeres sanas como en el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis. No se identificó tinción en las células estromales, como puede comprobarse en las siguientes imágenes:

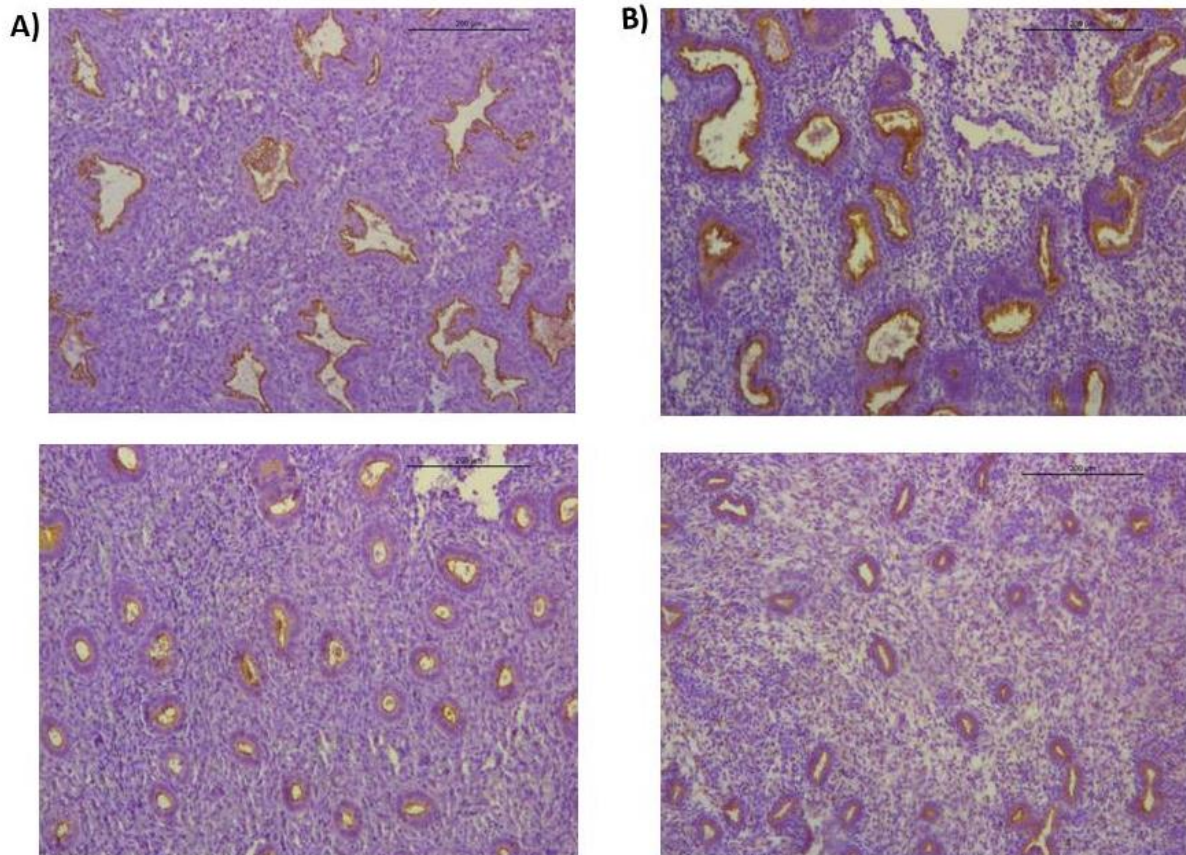


Figura 6: Imágenes representativas de la expresión de RANK observada en microscopía óptica de las muestras de endometrio eutópico en pacientes sanas control (A) y de endometrio eutópico procedente de pacientes con endometriosis (B)

En cualquier caso, para una evaluación estadística de la expresión de RANK se procedió a la cuantificación de las muestras mediante la utilización de los programas Image Pro Plus y SPSS.

Los resultados de la valoración inicial de la distribución de los datos mostraron tanto a simple vista en el gráfico Q-Q normal de Nota, como en la pruebas de significación de Shapiro Wilks Smirnov para datos menores de 50 en cada tipo de muestra, una distribución

no gaussiana para las muestras de endometrio control y endometrio eutópico con (p valor= 0,000 y 0,001, < 0,05, respectivamente), mientras que para las muestras de endometriosis ectópica, si se observó una distribución normal (p valor= 0,104 > 0,05). Con el fin de unificar todas las muestras y acercarlas a la normalidad se procedió a realizar una transformación logarítmica de los datos y utilizar en consecuencia test paramétricos de análisis.

Así, en la comparación de la expresión de RANK en el aspirado endometrial de mujeres sanas -control- (n=30), y mujeres con endometriosis (n=40), realizada mediante un análisis t de Student, la media y desviación estándar fueron de $1,047744314 \pm 0,9478614740$ y $1,545915900 \pm 0,7764727520$, respectivamente, observándose diferencia significativa entre ambas con un p valor de $0,018 < 0,05$. (Figuras 2 y 3). Por el contrario, al equiparar de forma genérica las muestras de las mujeres según la fase del ciclo menstrual, determinada a partir del día de la última regla indicada por la paciente (FUR), las medias y desviaciones estándar fueron de $0,972980561 \pm 1,025821495$ para las proliferativas (n=18) y $1,514155117 \pm 0,921937900$ para las secretoras (n=18), no siendo significativas entre ellas (p valor= $0,105 > 0,05$).

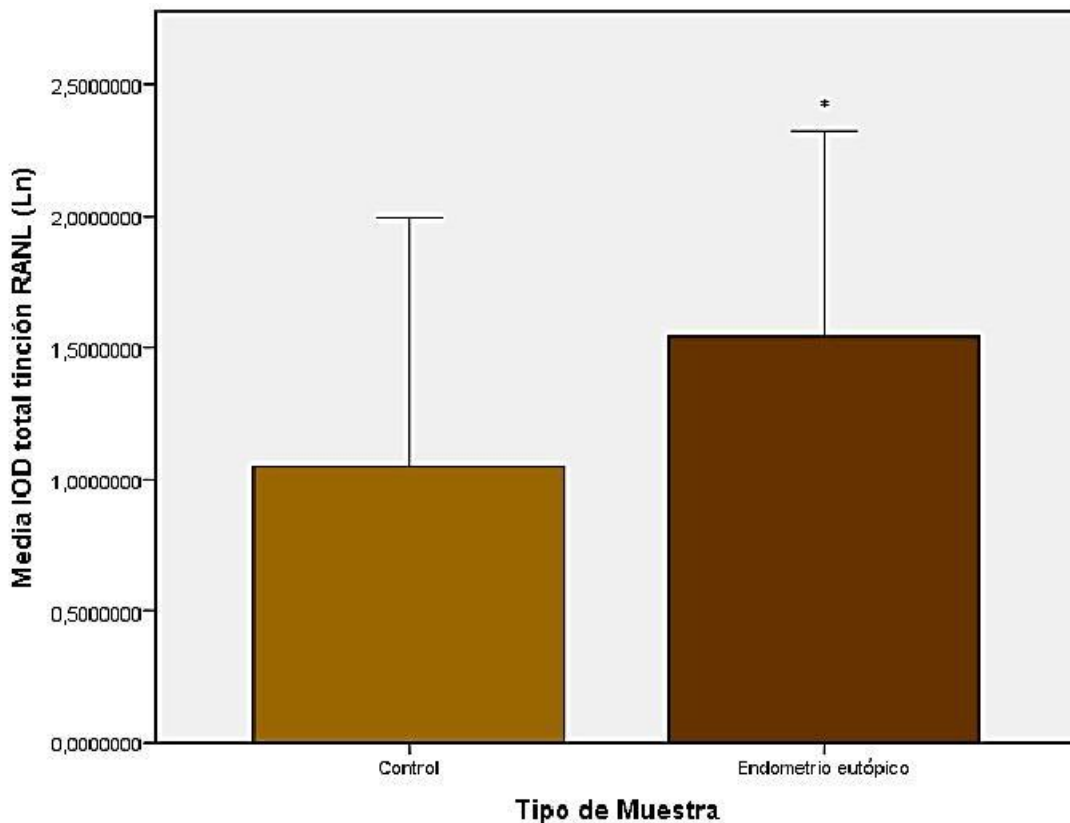


Figura 7: Representación en barras de la diferencia de medias del logaritmo de la media de total IOD real de tinción RANK de las muestras para cada uno de los tipos a estudio (Control/Endometrio eutópico). * p valor < 0,05 en la comparación expresión RANK control vs endometrio eutópico.

Con el fin de profundizar más los efectos de los anticonceptivos orales en la expresión de RANK, y reducir al máximo los posibles factores de confusión en la comparación de los estadios proliferativo y secretor, se procedió a valorar las muestras atendiendo a la transformación producida en el endometrio por la toma de anticonceptivos orales. Así, se procedió a comparar los datos obtenidos en tres fases. En una primera parte se realizó un análisis t de Student entre las mujeres en fase proliferativa y secretora eliminando aquellas en tratamiento hormonal oral anticonceptivo, tanto de tipo control como endometriosis. En el caso de los controles, la falta de información sobre la fecha de la última regla de algunas mujeres, y la toma o no de anticonceptivos orales, produjo una drástica reducción del número de datos que cumplían los criterios establecidos. De ese modo, solamente pudo compararse 8 muestras proliferativas sin tratamiento anticonceptivo, y 10 muestra en fase secretora, no obteniendo significación estadística alguna (p valor de 0,585).

En una segunda parte, se realizó un test ANOVA de comparación múltiple seguido de un análisis post hoc HSD Turkey con la variable de toma de anticonceptivos orales en relación con el tipo de muestra, control o endometriosis y con la fase del ciclo menstrual. En el primer caso los resultados obtenidos en la comparación de medias fue 1,47685368 para las muestras control que no tomaban anticonceptivos orales ($n=13$) y 0,9026286410 para las control que sí tomaban ($n=30$), siendo la diferencia de medias de 0,9556155390 con un p valor de $0,013 < 0,05$. De la misma forma, las medias para las muestras de endometrio eutópico de pacientes con endometriosis reflejaron medias de 1,672904405 en los casos donde no se tomaban anticonceptivos orales ($n=27$) y 1,369850563 en los casos que sí ($n=7$), siendo la diferencia de medias de 0,3251496180 y un p valor de $0,992 > 0,005$.

En el segundo caso, en la comparación de la toma de anticonceptivos con la fase del ciclo menstrual, inicialmente se etiquetó el endometrio de aquellas mujeres en tratamiento anticonceptivo como atrófico, donde se obtuvieron medias de las muestras control de 1,444274040 para la fase proliferativa ($n=5$), 0,919707615 para la fase secretora ($n=2$) y 0,520869829 para la reclasificación atrófica ($n=13$), y medias para las muestras de endometrio eutópico en pacientes con endometriosis de 1,190947023 para la fase proliferativa ($n=6$), 1,804776375 para la fase secretora ($n=11$) y 1,5779571042 para la atrófica ($n=7$). encontrando solamente significación estadística entre las pacientes control atróficas, es decir, aquellas sanas tomando anticoncepción, y las pacientes con endometriosis en fase secretora, con una diferencia de medias de -1,28390655 y un p valor = $0,006 < 0,05$.

A continuación, y atendiendo a la literatura sobre los efectos de los anticonceptivos orales en el endometrio, donde se observan características similares a la fase secretora, se volvió a recatalogar las muestras atróficas como secretoras, procediendo a la suma de sus datos, obteniendo medias para las muestras control de 1,444274040 para las proliferativas (n=5) y 0,620650357 para las secretoras (n=15), y para las muestras de endometrio eutópico de pacientes con endometriosis de 1,190947023 para la fase proliferativa (n=6) y 1,610941575 para las secretoras (n=16), encontrando diferencias significativas entre las mismas muestras anteriores con una diferencia de medias entre las controles secretoras (n=15) y las endometriosis secretoras (n=16) de -0,990291218 y un p valor = 0,008 >0,05.

En cuanto a los datos obtenidos en relación a la toma de anticonceptivos orales y el valor de RANK, se obtuvieron valores para la media y la desviación estándar de $1,605069891 \pm 0,7538532850$ en mujeres sin tratamiento (n=41), y $0,891415254 \pm 0,9073835140$ para las mujeres con contracepción (n=20), mostrando de nuevo significación estadística (p valor=0,002 < 0,05). (Figura 8)

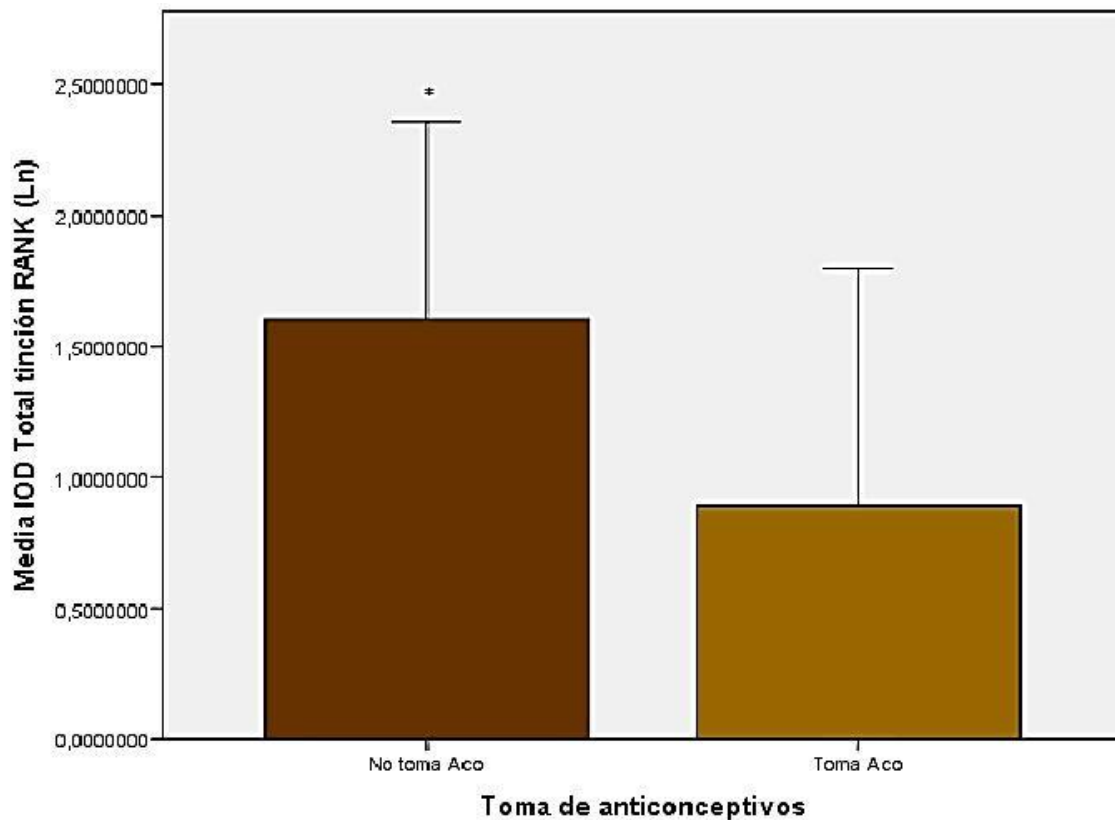


Figura 8: Representación en cajas de la diferencia de medias del logaritmo de la media de total IOD real de tinción RANK de las muestras en relación con la toma de anticonceptivos (No toma/Toma). * p valor < 0,05 en la comparación de la expresión de RANK entre la toma y la no toma de anticonceptivos orales.

Por ello, se ampliaron los resultados mediante el análisis con un test ANOVA de comparación múltiple seguido del análisis post hoc HSD Turkey para la toma de anticonceptivos orales en relación con el tipo de muestra, control o endometriosis. El producto obtenido confirmó la significación del tratamiento con anticonceptivos (p valor ANOVA= $0,00 < 0,05$). Las medias obtenidas para las muestras control fueron de 1,476485368 para las que no tomaban anticonceptivos orales ($n=13$) y 0,520869829 para las que sí ($n=13$), y para las muestras de endometrio eutópico de mujeres afectas por la enfermedad de 1,672904405 en la no toma de anticonceptivos ($n=27$) y 1,369850563 para la toma ($n=7$). Materializándose las diferencias en el escrutinio post-hoc posterior como aquellas establecidas entre los casos control que no tomaban anticonceptivos orales, y las que sí, con una diferencia de medias de -0,955615539 y un p valor de 0,013, entre las controles que tomaban tratamiento anticonceptivo y las mujeres enfermas de endometriosis que no tomaban, con una diferencia de medias de -1,15203458 y un p valor de 0,000, y con las mismas controles que tomaban anticoncepción y las mujeres afectadas por la enfermedad que también tomaban con una diferencia de medias de -1,05870121 y p valor de $0,024 < 0,05$ (Figura 9).

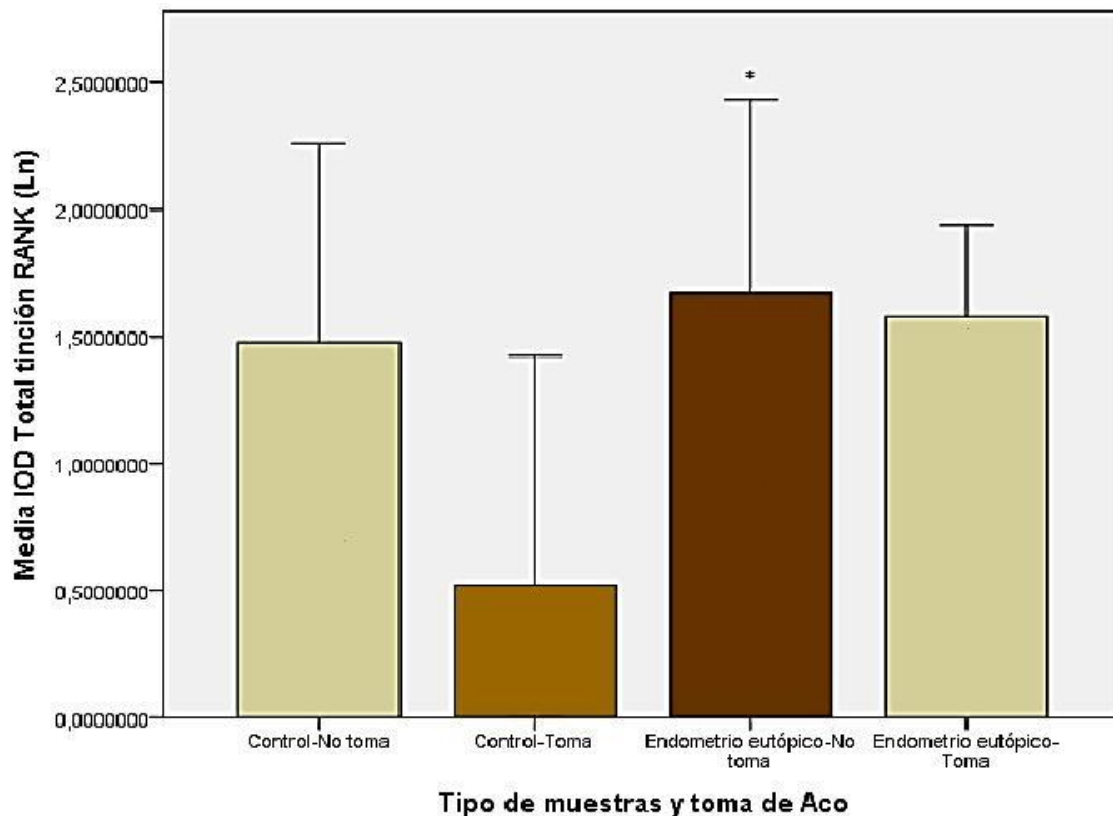


Figura 9: Representación en barras de la diferencia de medias del logaritmo de la media de total IOD real de tinción RANK de las muestras para la relación entre cada uno de los tipos a estudio (Control/Endometrio eutópico) y la toma de anticonceptivos oral (No toma/ Toma). * p valor $< 0,005$

en la comparación de la expresión de RANK entre las muestras control que toman Aco y las muestras de endometrio eutópico que no toman.

Debido a la presencia de una importante diferencia en el número de casos en tratamiento con anticonceptivos orales (n=7) y sin tratamiento (n=27) dentro del grupo de muestras de endometriosis eutópicas, se procedió a realizar una prueba t de Student dentro del propio grupo para evitar la influencia de los resultados procedentes de las muestras control, con un n mucho mayor, en la significación de la expresión de RANK en endometrio eutópico. En ese sentido los resultados obtenidos en el análisis t de Student no revelaron diferencias significativas de forma general entre aquellas mujeres que tomaban anticonceptivos orales y aquellas que no, con medias de 1,579571042 y 1,672904405, respectivamente. A su vez, tampoco se obtuvieron diferencias al tratar de equiparar las n y realizar pruebas t de Student comparando subgrupos de 7 casos aleatorios de mujeres sin tratamiento con los 7 únicos casos de mujeres en tratamiento del grupo. En las cuatro comparativas las medias para los casos en tratamiento versus no tratamiento no fueron significativas presentando medias de: 1,579571042 vs. 1,733989743, 1,583532324 vs. 1,579571042, 1,579571042 vs. 1,280932703, y 1,579571042 vs. 2,074124792.

En cuanto a la segunda fase del experimento, el objetivo principal del estudio, se comparó la presencia y cantidad de RANK entre las muestras control y las muestras del endometrio eutópico de pacientes afectadas por la enfermedad, con las muestras procedentes de las lesiones endometrióticas en ovario propiamente dichas, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

En las imágenes tomadas con microscopía óptica de los endometriomas ováricos la expresión de RANK presentó un patrón de distribución tanto epitelial como estromal. En el componente epitelial la tinción fue además de luminal, citoplasmática, mientras que en el estroma la tinción se manifestó de forma difusa formando bandas subepiteliales. Además, se observó expresión citoplasmática intensa en los macrófagos presentes en el estroma, como puede observarse en la recopilación de imágenes recogida a continuación:

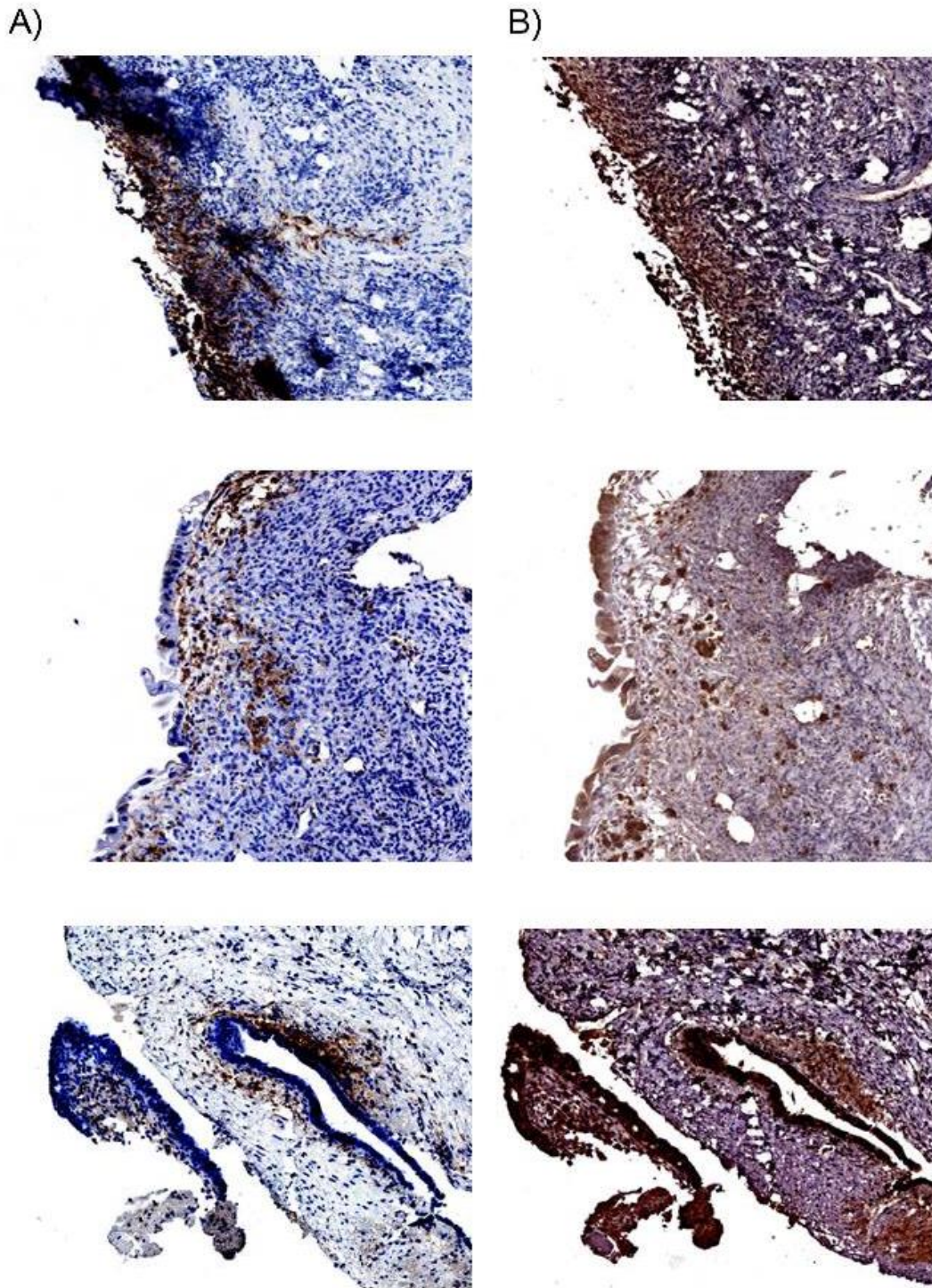


Figura 10. Comparación histológica de presencia de tejido endometrial y ovárico en muestras de lesiones ectópicas en ovario teñidas con anticuerpo CD10 (A) y anticuerpo RANK (B). La tinción CD10 (A) -con señal para estroma endometrial pero no ovárico- se utilizó para diferenciar el estroma endometrial del estroma ovárico en los cortes y responder a la definición patológica de endometriosis -presencia de glándulas endometriales y estroma fuera de su ubicación normal-, y homogeneizar las muestras de endometrio sano y eutópico con epitelio y estroma, y las muestras de endometrioma ovárico, en la cuantificación de tinción de RANK (B).

En cuanto a la evaluación estadística de la expresión de RANK se procedió como en el experimento anterior a la cuantificación de los resultados obtenidos mediante la utilización de los programas Image Pro Plus y SPSS, con medias de $1,047744314 \pm 0,9478614740$ para las muestras control (n=30), $1,1545915900 \pm 0,7764727520$ para endometrio eutópico (n=40) y $2,678507366$ pixels para muestras de endometriomas ováricos (n=11). Siendo la diferencia de medias de relevancia entre las mujeres sanas -control- y las mujeres afectadas de endometriosis a nivel ovárico con endometrioma ovárico de $-1,63076305$ con un p valor de $0,000 < 0,05$, y entre el endometrio eutópico y el endometrio ectópico de mujeres afectadas por la enfermedad de $-1,132591467$, con un p valor de $0,043$.

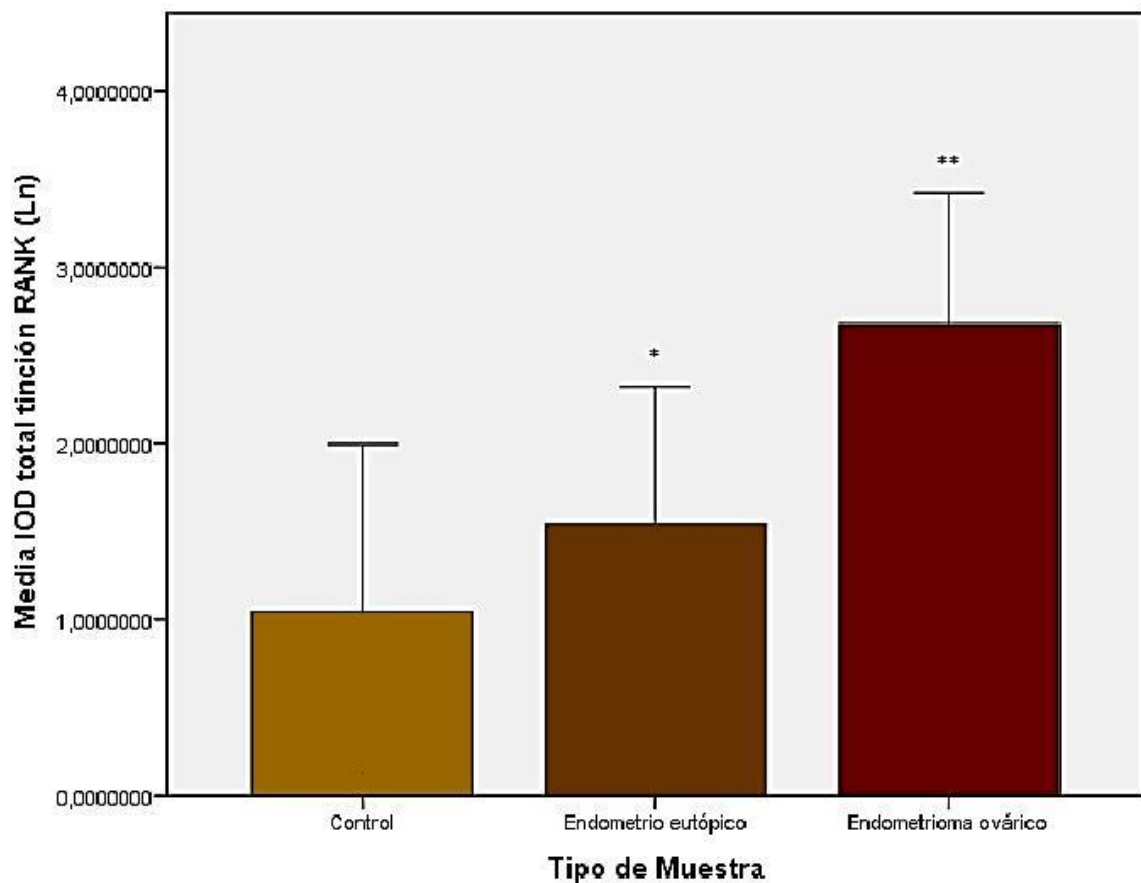


Figura 11: Representación en barras de la diferencia de medias del logaritmo de la media de total IOD real de tinción RANK de las muestras para cada uno de los tipos a estudio (Control/Endometrio eutópico/ Lesión ectópica). ** p valor < 0.01 en la comparación de la expresión de RANK entre las muestras control y las muestra de endometrioma ovárico.

Además, para afinar mejor los resultados, se procedió a comparar la variación de RANK en los endometrios eutópicos y ectópicos procedentes de las mismas pacientes (n=7) utilizando una prueba t de Student de muestras relacionadas. Los resultados obtenidos mostraron medias de 1,5871 para las muestras de endometrio eutópico, y 2,9607 para el endometrio ectópico, estableciendo entre ellos una diferencia de medias de -1,37355.

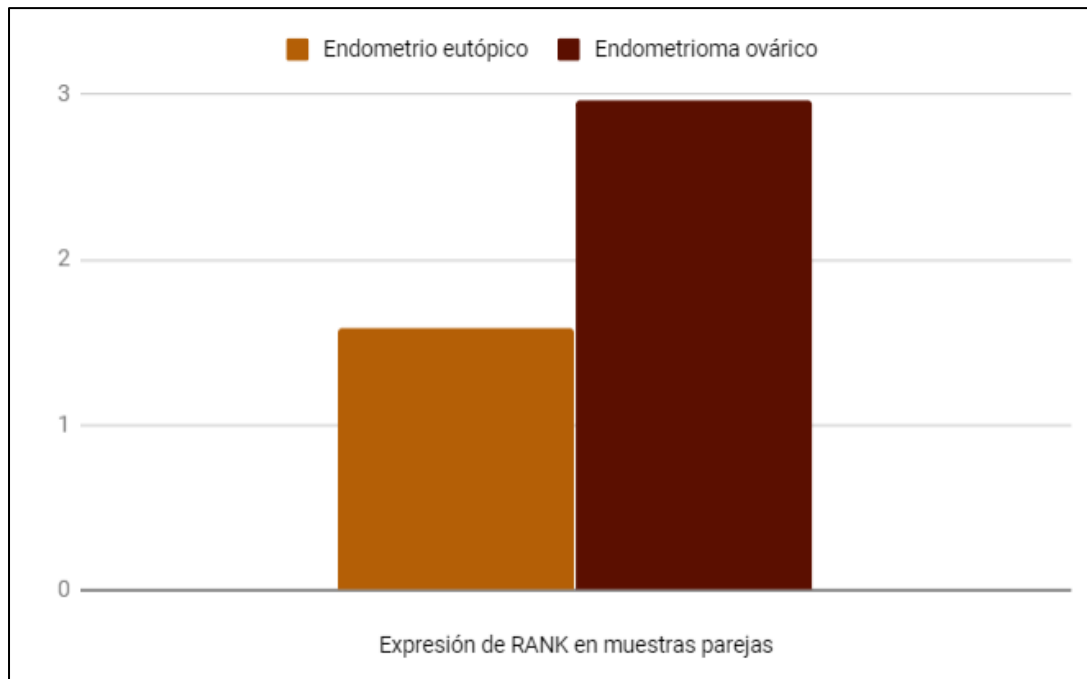


Figura 12: Expresión de RANK en muestra parejas de endometrio eutópico y endometrioma ovárico de las mismas pacientes (n=7).

Además la aplicación de la bi-variante de Pearson para muestras normalmente distribuidas, demostró significación estadística (p valor=0,000 <0,005) con una correlación moderada (0,507, entre 0,40 y 0,60) entre la expresión de RANK y el tipo de muestra.

Por otra parte, en cuanto a la valoración de la fase del ciclo menstrual y la toma de anticonceptivos se repitieron los resultados obtenidos en el experimento anterior. Una diferencia de medias no significativa entre las fases proliferativa (n=22), 1,254899123 y secretora (n=20), 1,734701091 con un p valor de 0,174 > 0,05 y una diferencia de medias en la toma de anticonceptivos significativa con medias de 1,800290993 para la no toma (n=50) y 0,998025656 para la toma (n=21) con un p valor de 0,001 <0,05. Una significación estadística que, sin embargo, y como sucedía en el experimento anterior, se abordó con precaución, dada la considerable diferencia entre el número de casos de mujeres en tratamiento (n=1) y sin tratamiento. (n=9) en los casos de endometrioma ovárico añadidos. En ese sentido, y para tratar de confirmar los resultados obtenidos se procedió también a

realizar un análisis t de Student dentro del propio grupo, resultando en una significación estadística negativa para la diferencia de expresión de RANK en la toma de anticonceptivos orales entre endometriomas ováricos. Con medias de 3,130233622 y 2,689631569, respectivamente y un p valor de 0.613 ($>0,05$).

Finalmente, la aplicación de la bi-variante de Pearson para muestras normalmente distribuidas, demostró significación estadística (p valor=0,001 $<0,005$) y la presencia de correlación negativa y catalogada como escasa (-0,379, entre 0,20 y 0,40) entre la expresión de RANK y la toma de anticonceptivos.

5. DISCUSIÓN

Como se ha descrito previamente en la introducción, el binomio RANK/RANKL se ha revelado en los últimos años como un elemento clave en la explicación de la proliferación celular en diferentes tejidos. Concretamente, en aquellos sistemas con regulación hormono-dependientes, como un mecanismo mediado por la acción de la progesterona como chispa desencadenante de la cascada de reacciones celulares implicadas. En el caso de la mama, RANK y RANKL se encontrarán involucrados en la proliferación y expansión de las células madre a través de la vía IKK α -NF κ B-cyclinD1, que se activará gracias a la unión del ligando RANKL con su receptor RANK en las células basales, como consecuencia de la síntesis de progesterona, las progestinas y la prolactina en la mama (4). Un mecanismo a todas luces proclive al desarrollo de procesos cancerígenos, dada la vinculación de la progesterona y la prolactina no solo con en el desarrollo normal de la glándula mamaria sino también con cambios malignos en ella (6), y la confirmación mediante ratones modificados genéticamente, de la participación de RANK y RANKL como factores clave en la regulación de tumores mamarios hormonalmente inducidos (4).

Por contra, en la literatura sobre el cáncer de endometrio, la proliferación celular y la diferenciación del tejido a adenocarcinoma, se deberán a la presencia de un entorno estrogénico predominante en el endometrio, siendo la progesterona la hormona encargada de disminuir el crecimiento celular (10,11). Sin embargo, y a pesar de actuar de forma inversa a la mama, RANK y RANKL también se encuentran presentes en el tejido endometrial. Sin ir más lejos, en estudios previos realizados por este grupo de investigación, se observó en el endometrio un aumento del receptor RANK en aquellos tejidos malignizados en comparación con casos control sanos (3). Un descubrimiento corroborado más tarde por Wang et al (2015), donde se determinó que la sobreexpresión de RANK en el

cáncer de endometrio se inactivaba mediante la administración de MPA, un derivado de la progesterona (9). Además el mismo grupo, identificó el desarrollo de metástasis en el endometrio a través de la vía AKT/B-caterin/snail (9), y propuso como teoría de unificación de la mama y el endometrio donde la progesterona tenga un efecto contrario en la expresión de RANK en ambos tejidos, “pudiendo actuar RANKIL como potencial objetivo terapéutico que combine los efectos beneficios en el cáncer endometrial y evite la estimulación en la glándula mamaria” (14).

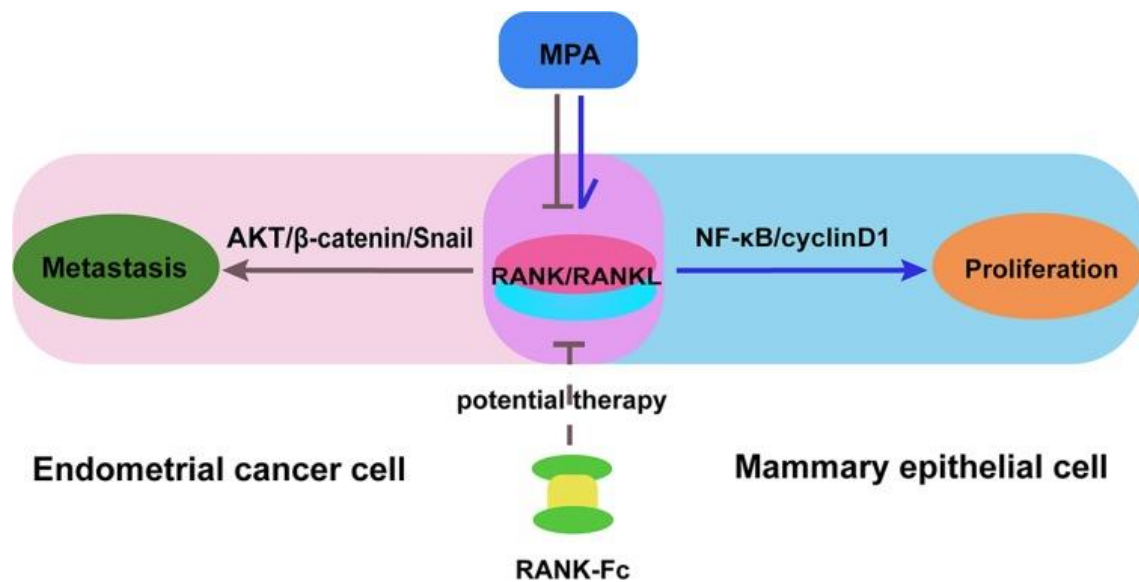


Figura 13: Efectos del acetato de medroxiprogesterona (MPA) y el inhibidor de RANKL (RANK-Fc) en la supresión de la señal RANK/RANKL en diferentes tejidos (14).

En cuanto a la endometriosis a pesar de ser una enfermedad definida médicamente como benigna, presenta en su idiosincrasia características de similitud con procesos de malignidad, como el crecimiento progresivo e invasivo del tejido endometrial de implantación ectópica, la dependencia estrogénica de la proliferación, y la tendencia a recidivar y metastatizar, sugiriendo la posibilidad de compartir vías de regulación con procesos cancerígenos (17).

Además, el hecho de que la enfermedad se desarrolle en mujeres en edad reproductiva y revierta su desarrollo tras la menopausia o una ovariectomía, indicará que el establecimiento y el crecimiento de los implantes ectópicos dependerá de la influencia de las hormonas ováricas en el tejido anómalo, al igual que el endometrio fisiológico, y los cánceres mamarios y endometrial antes descritos (17).

La explicación más aceptada sobre el mecanismo de desarrollo de la endometriosis será la presencia de menstruación retrógrada, lo que supondrá según Sampson, que “durante la menstruación normal, los desechos menstruales, incluidas las células endometriales eutópicas viables, los factores de crecimiento y las citocinas, podrían viajar de forma retrógrada a través de las trompas de Falopio hacia la cavidad pélvica, donde estas células podrían invadir y proliferar en los tejidos circundantes”. Un hecho que además quedaría probado por la similitud histológica entre ambos tejidos (15,17).

Sin embargo, la menstruación retrógrada será un fenómeno que se producirá en el 90% de las mujeres en edad fértil, desarrollando solamente endometriosis en 1 de cada 10 de ellas, por lo que habrá que tener en cuenta otros factores en la adhesión y crecimiento de lesiones endometriósicas tales como “el aumento de la exposición a los desechos menstruales (aumento del flujo menstrual, menor duración del ciclo), endometrio eutópico anormal, ambiente peritoneal alterado, vigilancia inmunológica reducida o aumento de la capacidad angiogénica.” (17)

Atendiendo a la información presentada, el incremento de expresión del receptor RANK en los endometriomas ováricos en comparación con el resto de muestras, sobretodo control, será el descubrimiento más relevante de la investigación. Primero porque las diferencias observadas entre los cortes no solo serán significativas estadísticamente sino que sugerirán una trascendencia biológica al poder apreciarse directamente a través del microscopio óptico, detectándose presencia de RANK tanto en el epitelio como en el estroma de las muestras procedentes de endometriomas ováricos en oposición a las muestras control y de endometrio eutópico donde no se identifica tinción en las células del estroma. Y segundo será importante por su significado, ya que dada la relación establecida entre los cánceres mamario y endometrial y el incremento de la expresión de RANK, la mayor presencia del receptor observada en los endometriomas ováricos podría explicar porque a pesar de ser definida como una enfermedad benigna, la endometriosis presentará en su lugar de implantación características de similitud con procesos malignos, como el crecimiento progresivo e invasivo del tejido endometrial ectópico, la dependencia estrogénica de la proliferación, y la tendencia a recidivar y metastatizar.

Por otro lado, la significación estadística obtenida en la comparación de las muestras procedentes del aspirado endometrial de mujeres sanas frente al endometrio eutópico procedente de mujeres con endometriosis, llevará también a aceptar la hipótesis alternativa de diferencia entre las muestras, planteando la posibilidad de que el incremento de la expresión de RANK sea uno de los elementos diferenciales entre endometrios precursores

de la enfermedad y endometriosis sanas, que se encontraría implicados en las adhesión y crecimiento de las lesiones, y explicarían porque el desarrollo de la enfermedad se da en 1 de cada 10 mujeres, siendo la menstruación retrógrada frecuente en el 90%. Sin embargo, dado que la diferencia entre las muestras será solamente estadística y no visual, y que habrá un gran número de mecanismos relacionados con la patogénesis de la enfermedad, como la evasión de la inmunovigilancia mediada por el receptor ER β , el inflamosoma NALP3 y la IL-1 (20, 21) o las mutaciones de genes promotores de cáncer (RID1A, PIK3CA, KRAS, and PPP2R1A) (22), la relevancia biológica de los resultados deberá tomarse con cautela y quedar pendiente de nuevos estudios.

En cuanto a las diferencias entre las mujeres en tratamiento con anticonceptivos orales y las que no, los resultados obtenidos en la experimentación presentarán también significación estadística para la correlación negativa entre la toma de los mismos y la reducción de la presencia del receptor en el endometrio.

En ese sentido, si revisamos la información conocida sobre el efecto de los anticonceptivos orales combinados, tanto en la enfermedad, como en el cáncer de mama y el cáncer endometrial, los estudios realizados indicarán la toma de los mismos como un factor de riesgo para el cáncer de mama (10), y un efecto protector para el cáncer colonorrectal, ovárico y endometrial. (10), de forma genérica, independientemente de la variación en su composición (11,12). La explicación plausible se relacionará con el efecto hormonal implicado en la enfermedad, ya que mientras que en el cáncer de mama la progesterona será considerada un precursor de la proliferación celular, en el endometrio será el ambiente estrogénico el que producirá ese mismo efecto.

Concretamente en la endometriosis, el uso de anticonceptivos hormonales combinados se tratará de un tratamiento frecuentemente prescrito en la práctica clínica. Utilizando en un primer momento la combinación de altas dosis de estrógenos y progestágenos, y sustituyendola actualmente por la presencia única de progestágenos en su composición (17). La función que ejercerán estos anticonceptivos en las mujeres afectadas por la enfermedad será inducir un estado de “pseudo-embarazo” y disminuir el fuerte dolor producido por los implantes endometriales. En ese sentido, los progestágenos actuarán de dos formas: una, disminuyendo los receptores estrogénicos en el endometrio, y produciendo una deciduización del estroma y una atrofia glandular de evolución, disminuyendo así la proliferación del tejido y provocando una apoptosis de las células endometriales. Y por otra parte, inhibiendo la liberación de GnRH hipotalámica, suprimiendo

así la función ovárica, y produciendo una anovulación y la reducción del dolor en consecuencia (7,17).

En ese sentido, los resultados obtenidos en el estudio, sobre la reducción significativa de la presencia de RANK en aquellos casos control con toma de anticonceptivos positiva, tendría una posible explicación en la evolución atrófica del tejido y la reducción del número de células endometriales con expresión fisiológica de RANK Y RANKL (10,11,3), como consecuencia de la administración continuada de progestágenos contenidos en la medicación. Sin embargo, en la diferencia de expresión de RANK entre las muestras de endometrio eutópico con y sin tratamiento, donde debería volver a repetirse el patrón, no se hallará significación estadística. Este resultado podría sugerir que al presentar el endometrio un incremento del receptor, la reducción producida por la atrofia del tejido no sería suficiente para producir una significación estadística, sin embargo, para comprobarlo sería necesario realizar nuevos estudios donde la diferencia de la n entre las muestras en tratamiento y las muestras sin tratamiento fuera el mismo y no influyera como factor de confusión en el resultado.

Por último, los resultados obtenidos en el estudio, sobre la reducción significativa de la presencia de RANK en aquellos casos control con toma de anticonceptivos positiva, plantearán la posibilidad de que la evolución atrófica del tejido y la reducción del número de células endometriales con expresión fisiológica de RANK Y RANKL (10,11,3), tenga relación con la administración continuada de progestágenos contenidos en la medicación. En ese sentido, y dada la importancia de comprobar las consecuencias moleculares de la prescripción de anticonceptivos orales para tratar la endometriosis en la práctica clínica, será necesario realizar futuros experimentos con mayor número de muestras de endometrio ectópico y más equilibradas que las presentes en este estudio (N=1 de 11 muestras), para así poder comprobar si existe una réplica de la reducción en la expresión de RANK observada en las muestras control y si esta se podría relacionar con una mayor efectividad del tratamiento frente a la enfermedad.

6. CONCLUSIONES

El incremento significativo de la expresión de la tinción inmunohistoquímica de RANK observada tanto estadística como visualmente entre el endometrio control obtenido de pacientes sanas y el endometrio ectópico -endometrioma ováricos- procedentes de mujeres diagnosticadas de endometriosis, sugerirá una posible implicación del receptor RANK en el desarrollo de la enfermedad. En ese sentido, y teniendo en cuenta la relación establecida previamente entre los cánceres mamario y endometrial y el incremento de la expresión de RANK, los resultados obtenidos podrían explicar porque a pesar de ser definida como una enfermedad benigna, la endometriosis presentará en su lugar de implantación -en este caso el ovario- características de similitud con procesos malignos, como el crecimiento progresivo e invasivo del tejido endometrial ectópico, la dependencia estrogénica de la proliferación, y la tendencia a recidivar y metastatizar.

En la misma línea, la obtención de diferencias significativas obtenidas en la expresión de RANK entre las muestras de endometrios sanos control y endometrios eutópicos procedentes de pacientes con endometriosis, sugerirá la posibilidad de que el incremento de RANK sea considerado uno de los elementos diferenciales entre endometrios precursores de la enfermedad y endometrios sanos, que se encontraría implicados en las adhesión y crecimiento de las lesiones, y explicarían porque el desarrollo de la enfermedad se da en 1 de cada 10 mujeres, siendo la menstruación retrógrada frecuente en el 90%. Sin embargo, dado que la diferencia entre las muestras será solamente estadística y no visual, y que habrá un gran número de mecanismos relacionados con la patogénesis de la enfermedad, como la evasión de la inmunovigilancia mediada por el receptor ER β , el inflamósoma NALP3 y la IL-1 (15,16) o las mutaciones de genes promotores de cancer (RID1A, PIK3CA, KRAS, and PPP2R1A) (17), la relevancia biológica de los resultados deberá tomarse con cautela y quedar pendiente de nuevos estudios.

De la misma forma, dada la importancia de comprobar las consecuencias moleculares de la prescripción de anticonceptivos orales para tratar la endometriosis en la práctica clínica, será necesario realizar futuros experimentos con más muestras de endometrio ectópico, para así poder comprobar si hay una réplica de la reducción en la expresión de RANK en las muestras control y si esta se podría relacionar con una mayor efectividad del tratamiento frente a la enfermedad.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hoffman B, Schorge J, Schaffer J, Halvorson L, Bradshaw K, Cunningham F & Calver L. Williams. Ginecología. México: McGraw-Hill Interamericana Editores; 2012.
2. Informes, estudios e investigación 2013. Guía de atención a las mujeres con endometriosis en el Sistema Nacional de Salud. Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicio Sociales e Igualdad; 2013.
3. Gómez R, Castro A., Martínez J, Rodríguez-García V, Burgués O, Tarín JJ, & Cano A. Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B (RANK) and Clinicopathological Variables in Endometrial Cancer: A Study at Protein and Gene Level. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(7): 1848.
4. Sigl V, Jones, L P & Penninger J M. RANKL/RANK: from bone loss to the prevention of breast cancer. *Open Biol.* 2016; 6(11): 160230.
5. Sigl V & Penninger, J M. RANKL/RANK – From bone physiology to breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014; 25(2): 205–214.
6. Azim H A, Peccatori F A, Brohée S, Branstetter D, Loi S, Viale G & Sotiriou C. RANK-ligand (RANKL) expression in young breast cancer patients and during pregnancy. *Breast Cancer Res.* 2015; 17(1).
7. Dinh A, Sriprasert I, Williams A R & Archer D F. A review of the endometrial histologic effects of progestins and progesterone receptor modulators in reproductive age women. *Contraception.* 2015; 91(5): 360–367.
8. Kim J & Chapman-Davis E. Role of Progesterone in Endometrial Cancer. *Semin Repr Med.* 2012; 28(01): 081–090.
9. Wang J, Sun X, Zhang H, Wang Y & Li Y. MPA influences tumor cell proliferation, migration, and invasion induced by RANKL through PRB involving the MAPK pathway in endometrial cancer. *Curr Oncol Rep.* 2014; 33(2): 799–809.
10. Gierisch J M, Coeytaux R R, Urrutia R P, Havrilesky L J, Moorman P G, Lowery W J & Myers E R. Oral Contraceptive Use and Risk of Breast, Cervical, Colorectal, and

Endometrial Cancers: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013; 22(11): 1931–1943.

11. Marchbanks P A, Curtis K M, Mandel M G, Wilson H G, Jeng G, Folger S G & Spirtas R. Oral contraceptive formulation and risk of breast cancer. *Contraception.* 2012; 85(4): 342–350.

12. Cibula D, Gompel A, Mueck A O, La Vecchia C, Hannaford P C, Skouby S O, Zikan M & Dusek L. Hormonal contraception and risk of cancer. *Hum Reprod Update.* 2010; 16 (6): 631–650,

13. Rossouw J, Manson J, Kaunitz A, & Anderson G. Lessons Learned From the Women's Health Initiative Trials of Menopausal Hormone Therapy. *Obstet Gynecol.* 2013; 121(1):172-6.

14. Wang J, Yao L, Wang L, Sun X, & Wang Y. Clinical prognostic significance and pro-metastatic activity of RANK/RANKL via the AKT pathway in endometrial cancer. *Oncotarget.* 2015; 7(5): 5564-5575.

15. Cho Y J, Lee S H, Park J W, Han M, Park M J & Han S J. Dysfunctional signaling underlying endometriosis: current state of knowledge. *J Mol Endocrinol.* 2018; 60(3): R97–R113.

16. Hsiao K-Y, Wu M-H, & Tsai S-J. Epigenetic regulation of the pathological process in endometriosis. *Reproductive Medicine and Biology.* 2017; 16(4): 314–319.

17. Mehedintu C, Plotogea MN, Ionescu S, Antonovici M. Endometriosis still a challenge. *J Med Life.* 2014; 7(3): 349–357.

18. Facchin F, Barbara G, Saita E, Mosconi P, Roberto A, Fedele L. & Vercellini P. Impact of endometriosis on quality of life and mental health: pelvic pain makes the difference. *J Psychosom Obstet Gynecol.* 2015; 36(4): 135–141.

19. Kiesel L. & Kohl A. Role of the RANK/RANKL pathway in breast cancer. *Maturitas.* 2016; 86: 10–16.

20. Leavy O. Evading immunosurveillance in endometriosis. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15(12): 729–729.
21. Han S J, Jung S Y, Wu S-P, Hawkins S M, Park M J, Kyo S & O'Malley B W. Estrogen Receptor β Modulates Apoptosis Complexes and the Inflammasome to Drive the Pathogenesis of Endometriosis. *Cell.* 2015; 163(4): 960–974.
22. Anglesio M S, Papadopoulos N, Ayhan A, Nazeran T M, Noë, M, Horlings H M & Shih I-M. Cancer-Associated Mutations in Endometriosis without Cancer. *N Engl J Med.* 2017; 376(19): 1835–1848
23. Frías-Navarro D. Diseño entre-grupos univariado unifactorial con $A > 2$: Contraste de hipótesis específicas. [Material de clase]. Universidad de Valencia; 2016.