

# EPIGENÉTICA DE LA ENDOMETRIOSIS Y SU PERSPECTIVA TERAPÉUTICA EN EL MARCO DE UN SISTEMA INTEGRAL DE ATENCIÓN DE LA INFERTILIDAD: PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN.

Alejandro Leal Esquivel<sup>1</sup>, Fabio Alfaro Albertazzi<sup>2</sup> y José M. Uribe Salazar<sup>1</sup>

## Resumen

La endometriosis es uno de los principales factores asociados a la infertilidad y tiene componentes genéticos y ambientales. La principal contribución genética no parece ser proveniente de cambios genéticos en la secuencia de ADN, sino más bien en la regulación de la expresión génica. Algunos estudios han concluido que la epigenética (modificaciones químicas que permiten o no la transcripción de los genes), está asociada a la endometriosis. Aquí se presenta una propuesta de investigación (estudio de casos y controles) para confirmar la participación de la epigenesis en endometriosis, así como la nutrición de la mujer, su actividad física, salud mental, historia reproductiva y hábitos sexuales. Se sugiere, para que los datos entre los grupos sean comparables, que se considere el momento del ciclo menstrual en que se encuentran las mujeres cuando se toman las muestras, a través de un método de reconocimiento de la fertilidad. Si se comprenden mejor los factores que originan la endometriosis se podrán en un futuro generar nuevas estrategias de prevención y tratamiento, que podrían incorporarse dentro de sistemas integrales de atención de la fertilidad.

## Palabras clave

Endometriosis, epigenética, nutrición, actividad física, salud mental, historia reproductiva, propuesta de investigación

## Abstract

Endometriosis is a major factor involved in infertility and has genetic and environmental components. The main genetic contribution probably occurs through regulation of gene expression, and not through mutations of the DNA sequence. Some studies have shown that epigenetics is related to endometriosis. Here we present a research proposal (a cases-control study) to confirm the association of epigenetics with endometriosis taking into account nutrition, physical activity, mental health, reproductive history and sexual behavior. We propose to consider the phase of the menstrual cycle at the time of the sample collection, as determined by a fertility awareness method. It is hoped that a better

---

<sup>1</sup> Sección de Genética y Biotecnología, Escuela de Biología; Universidad de Costa Rica.

<sup>2</sup> Sección de Ginecología y Obstetricia, Escuela de Medicina; Universidad de Costa Rica.

Esta ponencia ha sido presentada en el IV Congreso Internacional en Reconocimiento de la Fertilidad celebrado en la Universidad Pontificia Bolivariana, dentro del área temática denominada: *Un tratamiento clínico de la infertilidad razonable*.

understanding of endometriosis will result in the development of new strategies for prevention and treatment that could become part of comprehensive fertility care systems.

**Key words**

Endometriosis, epigenetics, nutrition, physical activity, mental health, reproductive history, research proposal

La endometriosis es definida como la presencia ectópica de glándulas endometriales y células estromales fuera de la cavidad uterina, principalmente en los ovarios y las superficies de los órganos internos de la cavidad pélvica (Stilley *et al.* 2012, Chang *et al.* 2013, Jeong 2014). Esta enfermedad es considerada como uno de los desórdenes ginecológicos benignos más comunes que afecta a las mujeres en su edad reproductiva (Campbell & Thomas 2001, Grazia-Porpora *et al.* 2013), la cual puede ocurrir espontáneamente en mujeres y primates-no humanos (Stilley *et al.* 2012). Según diversos estudios realizados en otros países, se presume que la prevalencia de endometriosis entre mujeres asintomáticas va del 2 al 22%, mientras que en mujeres infértiles asciende del 35 al 77% (Hilgers, 2004; Mier-Cabrera *et al.* 2009).

Existen diversas teorías para tratar de explicar el desarrollo de endometriosis. La más aceptada es la denominada “menstruación retrógrada”, la cual consiste en un reflujo del fluido menstrual a través de las trompas de Falopio hacia la cavidad abdominal (Mier-Cabrera *et al.* 2009, Capobianco & Rovere-Querini 2013). Los fragmentos de endometrio, entonces, se adhieren a las estructuras interiores del abdomen, particularmente las paredes del peritoneo y los ovarios, para comenzar la formación de lesiones endometriósicas (Capobianco & Rovere-Querini 2013). Los métodos para el diagnóstico de endometriosis, si no se toman muestras histológicas, tienen apenas una sensibilidad del 50% en los casos con un desarrollo mínimo o leve (Montgomery *et al.* 2008). Por lo tanto, actualmente al sospechar que se padece de endometriosis se analizan muestras de tejidos provenientes de las lesiones y se categoriza el grado de desarrollo como mínimo (etapa I), leve (etapa II), moderado (etapa III) y severo (etapa IV), basados en el tamaño total de las lesiones, presencia de adhesiones, localización y cantidad de parches endometriósicos (Montgomery *et al.* 2008, Johnson & Hummelshoj 2013). Sin embargo, es reconocido que el progreso en las diferentes etapas puede no estar correlacionado con los síntomas que experimentan las pacientes, donde pacientes en las etapas más leves pueden experimentar síntomas severos (Johnson & Hummelshoj 2013).

Las mujeres con endometriosis suelen presentar síntomas de dolor en la región pélvica-abdominal, dismenorrea, dispareunia, mucho sangrado en la menstruación, dolor pélvico no-menstrual, dolor al ovular, disquecia, disuria y fatiga crónica (Nnoaham *et al.* 2011, Johnson & Hummelshoj 2013). También, se ha asociado el desarrollo de endometriosis con sub-fertilidad de las pacientes (Capobianco & Rovere-Querini 2013, Johnson & Hummelshoj 2013, Ouchi *et al.* 2013). Se ha identificado una fuerte asociación entre la severidad de la enfermedad y el impacto en la fertilidad de la paciente, probablemente debido a daños en trompas de Falopio, presencia de endometriomas ováricos, inflamación pélvica, posible reducción en la calidad de los oocitos y reducción en su recepción por el endometrio (Johnson & Hummelshoj 2013).

Además, diversos estudios han encontrado una relación de la presencia de endometriosis con la aparición de cáncer ovárico, con un desarrollo de carcinomas en 5-10% de los casos de mujeres con endometriomas ováricos (Prowse *et al.* 2006). Entonces, a pesar de ser considerada una enfermedad benigna, esta podría derivar en un tumor, por su crecimiento sin control, incremento de vascularización, invasión de tejidos y metástasis (Prowse *et al.* 2006).

Todos estos síntomas y padecimientos asociados con la endometriosis aumentan sustancialmente el costo económico social, además de reducir la productividad personal y calidad de vida de las mujeres afectadas (Johnson & Hummelshoj 2013). Estimaciones recientes de los costos para la remoción de lesiones ocasionadas por endometriosis son de alrededor de 17.3 billones de dólares anuales solo en Estados Unidos (Stilley *et al.* 2012), por lo que el desarrollo de estrategias de prevención, diagnóstico temprano y técnicas de tratamiento son necesarias. Actualmente en diversos países, incluido Costa Rica, la extracción de las lesiones ocasionadas por la endometriosis representa el tratamiento principal para la enfermedad, pues se ha demostrado que es la terapia vigente más eficaz (Fambrini *et al.* 2013). Sin embargo, al mismo tiempo, esta puede ocasionar daños severos en los tejidos ováricos y las reservas de ovarios en las pacientes (Fambrini *et al.* 2013). Además, se ha demostrado una elevada recurrencia de endometriosis en mujeres sometidas a cirugía antes de los 32 años de edad y entre los 5 años después de realizada la operación (Ouchi *et al.* 2013). Más recientemente, se han desarrollado pseudo-terapias hormonales (utilizando hormonas artificiales) que buscan reducir los niveles de estrógenos circulantes para reducir el desarrollo y vascularización de los parches endometriósicos, pero los resultados obtenidos no han sido del todo satisfactorios, donde en su mayoría solamente han logrado disminuir los síntomas (Grazia-Propora *et al.* 2013, Dunselman *et al.* 2014).

La endometriosis es considerada como una enfermedad multifactorial compleja (Montgomery *et al.* 2008). La fisiopatología de la enfermedad incluye factores hormonales, anatómicos, genéticos, inmunes e inflamatorios que pueden aumentar el riesgo de desarrollar la enfermedad (Missmer *et al.* 2010). Se estima que hasta un 90% de las mujeres en edad reproductiva sufre cierta cantidad de menstruaciones retrógradas normalmente, pero sólo en una porción se desarrolla la enfermedad (Stilley *et al.* 2012). Debido a esto, el proceso de desarrollo de la enfermedad incluye una combinación de menstruación retrógrada, anormalidades eutópicas del endometrio como alteración en la secreción de ciertas proteínas, expresión de diversos genes y anormalidades en el sistema inmune (Stilley *et al.* 2012). La contribución genética en el desarrollo de endometriosis ha sido ampliamente estudiada, donde se han identificado mayores tasas de endometriosis entre parientes de casos diagnosticados al compararlos con los respectivos controles (Campbell & Thomas 2001, Stefansson *et al.* 2002 Treloar *et al.* 2002, Montomegery *et al.* 2008). Se ha evidenciado que el riesgo de padecer la enfermedad puede ser hasta 2.34 veces mayor entre hermanas de una mujer afectada en comparación con el riesgo general de la población (Montgomery *et al.* 2008).

La búsqueda de variantes genéticas que contribuyan con enfermedades complejas es difícil, ya que el aporte de genes individuales es pequeño, muchos genes colaboran para el aumento de riesgo de desarrollar la enfermedad y este riesgo puede

ser modificado por el ambiente (Montgomery *et al.* 2008). Los estudios para encontrar genes candidatos que contribuyan al desarrollo de endometriosis ha resultado en alrededor de 76 genes cuyas modificaciones se han asociado con un aumento en la susceptibilidad de desarrollar la enfermedad (Montgomery *et al.* 2008). Estos genes candidatos incluyen genes de las vías de desintoxicación, vías de síntesis de hormonas sexuales y citoquinas, moléculas involucradas en procesos de adhesión y regulación del ciclo celular (Falconer *et al.* 2007, Montgomery *et al.* 2008). Estudios a nivel de genoma han identificado mutaciones en *loci* potenciales para el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, mutaciones genéticas en los *loci* candidatos por sí solos no han logrado explicar completamente la herencia de la enfermedad en estudios poblacionales, debido a que en muchas ocasiones se trata de mutaciones puntuales con una prevalencia muy baja en la población. Por lo tanto, se ha sugerido que variaciones en el ácido desoxirribonucleico (ADN) como tal, no explican totalmente el desarrollo de la enfermedad (Stilley *et al.* 2012).

Este vacío en la identificación de patrones de herencia y genes candidatos en el padecimiento de endometriosis, ha dado espacio para el desarrollo de un campo de mucho interés actualmente, el análisis epigenético (Stilley *et al.* 2012). La epigenética es definida tradicionalmente como información heredable durante la división celular aparte de la secuencia del ADN (Feinberg 2007). Esto incluye el estudio de las alteraciones, como modificaciones de las histonas o las bases nitrogenadas citosinas, que afectan la expresión de los genes, debido a la modificación en el grado de condensación del ADN y acceso de la maquinaria transcripcional (Stilley *et al.* 2013). Diversos estudios han apuntan a que en la enfermedad de endometriosis, lo que prevalece de manera común entre las pacientes es una desregulación de varios genes (Wu *et al.* 2006, Pelch *et al.* 2009, Guo 2010), lo que provoca un linaje celular con ciertos cambios que están fuera del ADN y son las marcas epigenéticas las que mantienen estos cambios, provocando el desarrollo de la enfermedad (Guo 2010).

Recientes investigaciones han asociado la endometriosis con patrones de metilación o acetilación modificados, que podrían resultar en cambios en los niveles de expresión de ciertas proteínas involucradas con el desarrollo de la enfermedad (Fambrini *et al.* 2013). La presencia de una elevada cantidad de macrófagos peritoneales, células de sistema inmune u hormonas en el fluido peritoneal podrían afectar el estado de metilación del genoma del embrión, feto en desarrollo o mujer adulta (Hill *et al.* 1988, Stilley *et al.* 2012). Las marcas epigenéticas establecidas durante la gametogénesis o proceso de gestación pueden persistir durante el desarrollo de la mujer, lo cual podría incrementar el riesgo de padecer endometriosis (Stilley *et al.* 2012). Interesantemente, se ha descubierto que estas marcas epigenéticas en el genoma pueden ser reversibles ante ciertas condiciones ambientales, como dieta o ejercicio, pero también pueden ser agravadas, con hábitos como el fumado o un aumento de estrés (Jaenisch & Bird 2003).

En los últimos años, se han desarrollado diversos estudios que analizan el estado de metilación de secuencias reguladoras de genes asociados con vías candidatas, que aumenten el riesgo a desarrollar endometriosis (Wu *et al.* 2005, Fambrini *et al.* 2013). Un análisis del gen *HOXA10* identificó patrones de hipermetilación en las regiones promotoras del gen en pacientes con endometriosis (Fambrini *et al.* 2013). Esta

metilación aberrante podría ser la respuesta a la expresión anormal del gen *HOXA10* durante la fase secretoria en mujeres con endometriosis (Szczepańska *et al.* 2010, Fambrini *et al.* 2012). Este gen pertenece a la familia de genes *HOX*, caracterizados por tener la secuencia *homeobox*, la cual corresponde a genes involucrados en el desarrollo temprano del embrión (Kim *et al.* 2007). El gen *HOXA10* ha sido identificado como un factor de transcripción de diversas vías asociadas con el desarrollo temprano del sistema reproductor (Kim *et al.* 2007). En mujeres adultas, este gen se expresa normalmente en el endometrio y se ha logrado demostrar que tiene un patrón dinámico de expresión temporal a través del ciclo menstrual, aumentando en la fase secretoria inducido por la progesterona, para cumplir un importante papel en el proceso de implantación del óvulo fecundado (Taylor 2000, Stilley *et al.* 2012, Fambrini *et al.* 2013). Debido a estar involucrado con procesos de implantación, se ha sugerido que este gen podría estar asociado con la implantación del tejido endometrial durante el desarrollo de la endometriosis. Por lo tanto, ha surgido mucho interés en confirmar estos patrones de metilaciones aberrantes en las secuencias reguladoras de este gen. Además, es vital analizar el estado de otros genes candidatos que formen parte de algún proceso que se haya identificado como crucial para el desarrollo de la enfermedad, como los receptores de las hormonas sexuales o ciertos factores esteroidogénicos, entre otros (Fambrini *et al.* 2013).

La enfermedad de endometriosis ha sido catalogada como una enfermedad predominantemente desarrollada y mantenida por desórdenes en hormonas sexuales (Xue *et al.* 2007, Nie *et al.* 2010, Stilley *et al.* 2012). Los receptores de las hormonas sexuales cumplen una función muy importante para el desarrollo normal de un ciclo menstrual, debido a la importancia de que las hormonas ingresen a las células correspondientes y cumplan su función (Stilley *et al.* 2012). Diversos estudios han confirmado que el desarrollo de la enfermedad de endometriosis es dependiente de las hormonas progesterona y estrógeno (Smid-Koopman *et al.* 2005, Wu *et al.* 2006, Stiley *et al.* 2012). La progesterona es una hormona sexual involucrada principalmente en procesos de desarrollo y diferenciación de tejidos reproductivos (Smid-Koopman *et al.* 2005). Existe evidencia de patrones de metilación diferencial en el promotor de la isoforma B del receptor de progesterona (*PR-B*) en el endometrio de mujeres con endometriosis, en comparación con controles, a nivel de proteínas y ácido ribonucleico mensajero (ARNm) (Wu *et al.* 2006, Nie *et al.* 2010, Stilley *et al.* 2012). Un estudio identificó patrones de hipermetilación en los promotores de *PR-B* en el 66% de las pacientes con endometriosis, mientras que el 0% de las mujeres controles presentó alguna hipermetilación (Nie *et al.* 2010). Esta metilación aberrante podría responder a la expresión mayoritaria de la isoforma A del receptor de la progesterona en la zona eutópica del endometrio en pacientes con endometriosis, en comparación con la expresión de ambas isoformas (A y B) en controles (Wu *et al.* 2006). Esta regulación negativa de *PR-B* podría ser la consecuencia de que la endometriosis se asocie con una resistencia a la progesterona, por lo que se utiliza como tratamiento el consumo de esta hormona para aliviar el dolor y suprimir la inflamación (Wu *et al.* 2006).

Por su parte, la hormona estrógeno participa en el crecimiento y desarrollo de tejidos reproductivos, como el útero y los ovarios (Silva *et al.* 2011). A pesar de que aún no se han realizado estudios del estado de metilación de los promotores de los genes

que codifican para sus receptores, sí se ha confirmado una asociación del desarrollo de endometriosis con una disminución en la expresión endometrial de la isoforma  $\beta$  del receptor de estrógeno (*ER- $\beta$* ) (Hapangama *et al.* 2008). Además, se ha reportado que la disminución de *ER- $\beta$*  provoca un aumento en la proliferación celular (Stettner *et al.* 2007, Hapangama *et al.* 2008). Por lo tanto, la disminución de *ER- $\beta$*  podría estar promoviendo la proliferación del tejido endometrial fuera de la cavidad uterina, lo cual favorecería que se desarrolle la endometriosis. Debido a esto, resulta fundamental el análisis del estado epigenético de *PR-B* y *ER- $\beta$* , para discernir si una metilación aberrante es la causa de su expresión disminuida en las mujeres afectadas en comparación con controles.

La invasión de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina es un prerrequisito para la formación de lesiones endometriósicas, pero este proceso requiere la creación de nuevos vasos sanguíneos a partir de tejidos adyacentes (angiogénesis) para su desarrollo (Capobianco & Rovere-Querini 2013). Esta formación de vasos sanguíneos se origina a través del brote de vascularización adyacente y la incorporación de precursores endoteliales circulantes a los sitios de vascularización, para asegurar el transporte de oxígeno, nutrientes, excreción de catabolitos y el mantenimiento del balance de fluidos (Capobianco & Rovere-Querini 2013). La citoquina IL-1 se encuentra presente en diversas patologías humanas, debido a que regula diversos procesos de inflamación, angiogénesis, hematopoyesis y cognición (Akoum *et al.* 2007, Peters *et al.* 2012). Se ha encontrado que fluido peritoneal de mujeres con endometriosis presenta niveles elevados de IL-1, la cual podría mediar el proceso de inflamación y ser un componente clave en la manifestación de la enfermedad (Peters *et al.* 2012). Esta citoquina IL-1 posee varios receptores celulares, entre los cuales está su receptor tipo II (IL1R2), el cual funciona como un inhibidor de la IL-1 al secuestrarla e impedir que ingrese a las células (Guay *et al.* 2011). Estudios han identificado una expresión reducida del gen *IL1R2* en tejido endometrial extrauterino, por lo que es posible que esta reducción de IL1R2 esté asociada con el desarrollo de la enfermedad (Akoum *et al.* 2007, Peters *et al.* 2012). Además, un estudio realizado en ratones demostró que la aplicación exógena de IL1-R2 (hslL-1R2) redujo la angiogénesis y disminuyó la cantidad de lesiones endometriósicas (Khoufache *et al.* 2012, Peters *et al.* 2012). Por este motivo, el gen *IL1R2* es un candidato importante para un análisis epigenético, con el objetivo de identificar si su expresión disminuida es consecuencia de un silenciamiento por patrones de metilación aberrantes.

Los procesos de invasión, adhesión y crecimiento de células endometriales fuera de la cavidad uterina está regulada por diversos factores, donde uno que se ha considerado como clave es NME1, el cual proviene de la familia de genes no-metastásicos 23 (NME) (Chang *et al.* 2013, Li *et al.* 2013). En un estudio se identificó que una disminución de NME1 puede promover la angiogénesis de células endometriales, por lo que se sugiere que una disminución de NME1 está involucrada en el aumento de angiogénesis en la cavidad abdominal y la formación de lesiones asociadas con endometriosis (Chang *et al.* 2013). En mujeres con endometriosis se ha identificado una disminución de la expresión de *NME1* en tejido endometrial ectópico proveniente de las lesiones endometriósicas, en comparación con tejido endometrial eutópico de mujeres controles y con endometriosis (Li *et al.* 2013). También, el silenciamiento de *NME1* provocó un aumento en la expresión de *VEGF* y *IL-8* (Chang *et al.* 2013). Estos genes

expresan el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y quimiocina (IL-8), respectivamente, las cuales están asociadas con el desarrollo de endometriosis a través de la vascularización y crecimiento de los tejidos endometriales fuera de la cavidad uterina (Capobianco & Rovere-Querini 2013). Además, un estudio reportó que cuando se da un silenciamiento de *NME1* en ratones, el índice de invasión de tejido fuera de la cavidad uterina disminuyó significativamente (Li *et al.* 2013). Por estas razones, es importante un análisis epigenético del gen *NME1*, para buscar si existe algún patrón de metilación aberrante que pueda estar ocasionando su silenciamiento en mujeres con endometriosis.

Los patrones de metilación aberrantes en el ADN identificados en diversas enfermedades, incluida la endometriosis, pueden estar influenciados por diversos factores ambientales, incluida la dieta, nutrición, fumado, entre otros (Fambrini *et al.* 2013). Reportes de literatura sugieren que el estrés oxidativo juega un papel en el desarrollo y progreso de la endometriosis, donde una alta concentración en la peroxidación de lípidos podría aumentar el crecimiento y adhesión de tejido endometrial (Ngo *et al.* 2009, Mier-Cabrera *et al.* 2009). Un estudio sobre la relación entre el consumo de antioxidantes (vitaminas y minerales) en mujeres con endometriosis, identificó que en mujeres a las cuales se les aplicó una dieta alta en antioxidantes se logró disminuir los marcadores de estrés oxidativos en la sangre periférica (Mier-Cabrera *et al.* 2009). También, factores como la contractibilidad del músculo liso, niveles de estrógenos, inflamación y metabolismo de prostaglandinas, que contribuyen con el desarrollo de endometriosis, pueden ser influenciados por la dieta (Missmer *et al.* 2010). Se ha identificado una menor tasa de diagnóstico de endometriosis en mujeres con un alto consumo de ácidos grasos de cadena larga omega 3, mientras que el consumo de grasas y una dieta alta en grasa animal pueden estar asociados con un aumento en el riesgo de padecer la enfermedad (Missmer *et al.* 2010). Existen otros factores que no han sido asociados directamente con la endometriosis, sin embargo, se han relacionado con un aumento en los patrones de metilación generales del genoma. Uno de los factores más mencionados en la literatura es el fumado, el cual altera el estado de metilación global del genoma, posiblemente alterando la expresión de diversos genes (Breitling *et al.* 2011). El ejercicio agudo es otro hábito que se ha reportado altera los patrones generales de metilación de promotores en el genoma (Barrés *et al.* 2012). En ratones, se ha evidenciado que incluso condiciones de estrés pueden alterar los patrones de metilación en los organismos (Meaney & Szyf 2005). Debido a esta flexibilidad de los patrones de metilación del genoma ante factores ambientales, resulta importante analizar si algunos de estos factores están aumentando el riesgo de silenciamiento de genes involucrados con la endometriosis a través de patrones de hipermetilación en ciertos genes críticos para el desarrollo de la enfermedad.

Es importante resaltar que el análisis de una enfermedad multifactorial tan compleja como la endometriosis, involucra considerar todos estos aspectos y patrones de la vida cotidiana de las mujeres en riesgo o afectadas por la enfermedad y su posible asociación con la manifestación y desarrollo del padecimiento. Actualmente, muchos esfuerzos de investigación se concentran en el desarrollo de algún tratamiento o droga que regule la expresión de ciertos genes asociados con la endometriosis, como el agente desmetilante 5-Azacitidina (5-ac) o la droga N-acetilcisteína (NAC) (Fambrini *et al.* 2013,

Grazia-Propora *et al* 2013). El agente desmetilante 5-ac se propone puede revertir los patrones de metilación aberrante que silencian genes importantes en la invasión, expansión, adhesión y crecimiento del tejido endometrial fuera del útero (Fambrini *et al.* 2013). Por su parte, la NAC ha logrado disminuir efectivamente el tamaño y la cantidad de endometriomas, logrando un mejor resultado que los tratamientos hormonales actuales (Grazia-Propora *et al.* 2013). Ciertamente, el desarrollo efectivo de tratamientos para el control de la endometriosis, depende de una correcta identificación de los patrones epigenéticos en estos y otros genes candidatos, los cuales serían el blanco en los tratamientos.

### **Justificación de un estudio de epigenética de la endometriosis**

Una vez considerada toda esta información del estado actual del estudio de la endometriosis y sus posibles factores asociados, resulta necesario obtener mayor conocimiento acerca del estado epigenético de las secuencias reguladoras de genes clave en los diferentes procesos de la enfermedad. Se plantea un estudio para analizar el estado de metilación de los genes involucrados en la recepción de hormonas sexuales (*PR-B* y *ER-β*), el proceso de implantación del tejido endometrial (*HOXA10*) y vascularización de los quistes (*IL1R2* y *NME1*), los cuales son procesos críticos para el desarrollo de la enfermedad, y hasta la fecha no se han estudiado de manera simultánea.

A pesar de que se conoce la participación de los genes escogidos en este proyecto con la patogénesis de la enfermedad, los estudios que han relacionado los patrones de metilación con la endometriosis son limitados, los cuales no han sido replicados y cuentan con tamaños de muestra pequeños, inferiores a 32 mujeres entre casos y controles (Cuadro 1). Sin embargo, aún con tamaños de muestra reducidos, los estudios previos ya han logrado identificar ciertos patrones, por lo que en el presente proyecto se planea aumentar considerablemente estos tamaños de muestra para confirmar los resultados previos con mayor poder. Además, una diferencia sustancial del presente estudio con los previos, es la introducción de otros factores al análisis de los patrones epigenéticos de los genes. Esto debido a que se pretende obtener la mayor cantidad de información acerca de hábitos, estilos de vida, antecedentes familiares, factores ambientales, entre otros, que sea posible, para realizar el análisis pertinente e identificar si alguno de estos factores está aumentando el riesgo de padecer la enfermedad.

Una vez que se haya determinado si hay factores que aumenten el riesgo de endometriosis, se podría proceder a identificar si estos mismos son los que están influyendo sobre los patrones de metilación observados. Los resultados de esta investigación podrían dar bases a futuros estudios que tengan como objetivo conocer en forma precisa el aumento de riesgo que podrían significar ciertos estilos de vida, así como estrategias de prevención y tratamiento. Finalmente, se planea estudiar los patrones de metilación de los genes *IL1R2* y *NME1*, que aunque han sido relacionados con endometriosis, todavía se desconoce si en esta relación la epigenética está involucrada.



Cuadro 1. Estudios de análisis de metilación en genes relacionados con endometriosis. Se indican el tamaño de muestra utilizado tanto en casos como controles, la procedencia del tejido analizado, el porcentaje de metilación en casos y controles, la probabilidad asociada a la comparación entre casos y controles, y su referencia respectiva.

Gen	Casos/Controles	Tejido en mujeres con endometriosis*	Metilación (casos)	Metilación (controles)	p	Ref.
<i>HOXA10</i>	11/11	Endometrio (eutópico)	13.9% (DE: 2.9%)	9.7% (DE: 2.9%)	0.002	Fambrini <i>et al.</i> 2010
<i>HOXA10</i>	17/15	Endometrio (eutópico)	82%	27%	0.006	Szczepanska <i>et al.</i> 2010)
<i>ESR2</i>	8/8	Endometriótico (ectópico)	12.66%	54.25%	0.0001	Xue <i>et al.</i> 2013
<i>PR-B</i>	8/9	Endometriótico (ectópico)	66% hipermetilados	0% hipermetilados	0.05	Nie <i>et al.</i> 2010

\*El tejido utilizado en el grupo control siempre fue endometrial eutópico.

### Objetivos del estudio

De acuerdo a lo aquí tratado, el objetivo general de la investigación sería analizar el estado de metilación de los genes *PR-B*, *ER-β*, *HOXA10*, *IL1R2* y *NME1* y su asociación con la endometriosis, así como someter a prueba una posible relación con factores de la vida cotidiana de las pacientes.

Los objetivos específicos del estudio serían los siguientes:

1. Comparar el estado de metilación de los genes *PR-B*, *ER-β*, *HOXA10*, *IL1R2* y *NME1* en tejido endometrial de mujeres con endometriosis, con el de mujeres libres de focos de endometriosis identificables, así como con tejido de lesiones endometriósicas de las mismas mujeres afectadas.
2. Determinar si diversos factores (condiciones demográficas, hábitos, antecedentes familiares o factores ambientales) están relacionados con el fenotipo, tanto en mujeres con la enfermedad como en controles
3. Analizar si existe relación entre los factores epigenéticos con el padecimiento de endometriosis, así como la influencia de otros factores.

### Metodología

Mujeres que hayan sido referidas a una laparoscopia diagnóstica de endometriosis van a ser consultadas sobre si desean participar en esta investigación. Aquellas que den su

consentimiento, deberán llenar una encuesta que incluya factores sociodemográficos, nutricionales, de actividad física y de estrés, ansiedad y depresión. Posteriormente se someterán a la laparoscopia. Aquellas que sean diagnosticadas de endometriosis constituirán el grupo probando, las que no, constituirán el grupo control. A las del grupo probando (n=80) se les tomará una biopsia de la lesión endometriósica, así como una biopsia de endometrio. A las del grupo control (n=80) se les tomará solamente una biopsia de endometrio. A la lesión endometriósica se le hará un análisis histológico y se aislará el material genético (ADN). Se obtendrá ADN también del tejido endometrial de ambos grupos. Seguidamente se analizará el perfil de metilación de cada uno de los tejidos. Seguidamente se realizará un análisis de regresión tomando en cuenta las variables epigenéticas, sociodemográficas, nutricionales, de actividad física y de estado de ánimo.

### **Papel de los métodos de reconocimiento de la fertilidad en el estudio**

La expresión genética de las células endometriales es dependiente de la estimulación hormonal, que varía según la fase del ciclo ovárico. También los estados de ánimo pueden ser distintos en distintos momentos del ciclo. Tanto las hormonas sexuales como los estados de ánimo y otros factores podrían intervenir modificando los niveles de metilación de genes implicados en la endometriosis. Por esta razón, es conveniente que todas las mujeres que van a ser muestreadas se encuentren en la misma fase del ciclo, ya sea en la fase proliferativa o en la fase lútea. Los métodos de reconocimiento de la fertilidad son una herramienta útil para determinar con precisión la fase del ciclo en que se encuentra la mujer. La correcta identificación del día pico constituye un signo sumamente útil porque es un signo del evento ovulatorio, que define el paso de una fase a otra.

En el presente estudio se utilizará el modelo Creighton para estimar las fase del ciclo en que la mujer se encuentra, y el día del ciclo en función del día pico se utilizará como una variable más en el análisis de regresión.

### **Perspectivas del estudio**

Este estudio pretende identificar factores etiológicos de la endometriosis, y obtener datos que permitan conocer mejor su patogénesis. Esto daría paso a futuros estudios de prevención, evitando exponerse a los factores que se encuentren asociados a la enfermedad. Adicionalmente, se pueden evaluar medidas terapéuticas para mujeres afectadas por endometriosis, tomando en cuenta modificaciones nutricionales, de actividad física, de estado de ánimo, etc. Se podrá evaluar, además, si estas acciones correctivas modifican los perfiles de expresión de los genes evaluados.

La comprensión de las causas y medidas preventivas y terapéuticas de la endometriosis contribuiría con el abordaje integral de la infertilidad. El descubrimiento de las causas subyacentes de la infertilidad y tratarlas respetando la naturaleza física y ontológica de la

persona es una contribución invaluable de la biomedicina restaurativa para las mujeres y parejas que sufren esta dolorosa condición.

### **Bibliografía**

- Akoum, A., M. Al-Koum, A. Lemay, R. Maheux & M. Leboeuf. 2007. Imbalance in the peritoneal levels of interleukin 1 and its decoy inhibitory receptor type II in endometriosis women with infertility and pelvic pain. *Fertility and Sterility* 89: 1618-1624.
- Barrés, R., J. Yan, B. Egan, J. T. Treebak, M. Rasmussen, T. Fritz, K. Caidahl, A. Krook, D. O'Goorman & J. Zierath. 2011. Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. *Cell Metabolism* 11: 405-411.
- Bjornsson, H. T., M. Daniele-Fallin & A. Feinberg. 2004. An integrated epigenetic and genetic approach to common human disease. *TRENDS in Genetics* 8: 350-358.
- Breitling, L., R. Yang, B. Korn, B. Burwinkel & H. Brenner. 2011. Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27k discovery and replication. *The American Journal of Human Genetics* 88: 450-457.
- Campbell, I. G. & E. J. Thomas. 2001. Endometriosis: candidate genes. *Human Reproduction Update* 7: 15-20.
- Capobianco A. & P. Rovere-Querini. 2013. Endometriosis, a disease of the macrophage. *Frontiers in Immunology* 4: 1-9.
- Chang, K., L. Liu, L. Jin, Y. Meng, J. Shao, Y. Wang, J. Mei, M. Li & D. Li. 2013. NME1 suppression of endometrial stromal cells promotes angiogenesis in the endometriotic milieu via stimulating the secretion of IL-8 and VEGF. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 6: 2030-2038.
- Colón-Díaz, M., P. Báez-Vega, M. García, A. Ruiz, J. B. Monteiro, J. Fourquet, M. Bayona, C. Alvarez-Garriga, A. Achille, E. Seto & I. Flores. 2012. HDAC1 and HDAC2 are differentially expressed in endometriosis. *Reproductive Sciences* 19: 483-492.
- Dunselman, G. A. J., N. Vermeulen, C. Becker, C. Calhaz-Jorge, T. D'Hooghe, B. De Bie, O. Heikinheimo, A. W. Horne, L. Kiesel, A. Nap, A. Prentice, E. Saridogan, D. Soriano & W. Nelen. 2014. ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Human Reproduction*, 1-14.
- Falconer, H., T. D'Hooghe & G. Fried. 2007. Endometriosis and genetic polymorphisms. *Obstretical & Gynecological Survey* 62: 616-628.
- Fambrini, M., F. Sorbi, C. Bussani, R. Cioni, G. Sisti & K. L. Andersson. 2013. Hypermethylation of *HOXA10* gene in mid-luteal endometrium from women with ovarian endometriomas. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 92: 1331-1334.

- Feinberg, A. P. 2007. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 447: 433-440.
- Gauderman, W. J. 2002. Sample size requirements for matched case-control studies of gene-environment interaction. *Statistics in Medicine* 21: 35-50.
- González-Lutz, M. I. 2006. Cómo diagnosticar y corregir el problema de la endogeneidad: el número de hijos obtenidos en la predicción de las preferencias de fecundidad en Costa Rica. *Población y Salud en Mesoamérica* 4: 1-13.
- Greenland, S. 2004. Model-based estimation of relative risks and other epidemiologic measures in studies of common outcomes and in case-control studies. *American Journal of Epidemiology* 160: 301-305.
- Grazia-Propora, M., R. Brunelli, G. Costa, L. Imperiale, E. K. Krasnowska, T. Lundeberg, I. Nofroni, M. Grazia-Piccioni, E. Pittaluga, A. Ticino & T. Parasassi. 2013. A promise in the treatment of endometriosis: an observational cohort study on ovarian endometrioma reduction by N-acetilcisteína. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 1: 1-7.
- Guay, S., N. Michaud, N. Bourcier, M. Lebouf, M. Lemyre, J. Mailloux & A. Akoum. 2011. Distinct expression of the soluble and the membrane-bound forms interleukin-1 receptor accessory protein in the endometrium of women with endometriosis. *Fertility and Sterility* 95: 1284-1290.
- Guo, S. W. 2010. Epigenetics of endometriosis. *Molecular Human Reproduction* 15: 587-607.
- Hapangama, D. K., M. A. Turner, J. A. Drury, S. Quenby, G. Saretzki, C. Martin-Ruiz & T. Von Zglinicki. 2008. Endometriosis is associated with aberrant endometrial expression of telomerase and increased telomere length. *Human Reproduction* 23: 1511-1519.
- Hilgers, T. W. 2004. *The medical and surgical practice of NaProTECHNOLOGY*. Pope Paul VI Institute. 1243 p.
- Hill, J. A., H. M. Faris, I. Schiff & D. J. Anderson. 1988. Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 50: 216-222.
- Izawa, M., F. Taniguchi, T. Uegaki, E. Takai, T. Iwabe, N. Terakawa & T. Harada. 2011. Demethylation of a nonpromoter cytosine-phosphate-guanine island in the aromatase gene may cause the aberrant up-regulation in endometriotic tissues. *Fertility and Sterility* 95: 33-39.
- Jaenisch, R. & A. Bird. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics* 33: 245-254.
- Jeong, J. 2014. In search of molecular mechanisms in endometriosis. *Endocrinology* 155: 1178-1180.

- Johnson, N. P. & L. Hummerlshoj. 2013. Consensus on current management of endometriosis. *Human Reproduction* 6: 1552-1568.
- Källberg, H., L. Padyukov, R. M. Plenge, J. Rönnelid, P. K. Gregersen, A. H. M. van der Helm-van Mil, R. E. M. Toes, T. W. Huizing, L. Klareskog & L. Alfredsson. 2007. Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, *PTPN22* and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. *The American Journal of Human Genetics* 80: 867-875.
- Kirkman, M. A., P. Yu-Wai-Man, A. Korsten, M. Leonhardt, K. Dimitriadis, I. F. De Coo, T. Klopstock & P. F. Chinnery. 2009. Gene-environment interactions in Leber hereditary optic neuropathy. *Brain* 1: 1-10.
- Kim, J., H. S. Taylor, Z. Lu, O. Ladhani, J. Hastings, K. Jackson, Y. Wu, S. Guo & A. Fazleabas. 2007. Altered expression of HOXA10 in endometriosis: potential role of decidualization. *Molecular Human Reproduction* 13: 323-332.
- Khoufache, K., P. Kibangou, N. Harr, M. Daris, M. Leboeuf, J. Mailloux, M. Lemyre, W. Foster & A. Akoum. 2012. Soluble IL-1 receptor type 2 inhibits ectopic endometrial tissue implantation and growth. *The American Journal of Pathology* 181: 1197-1205.
- Li, M., J. Shao, Y. Meng, J. Mei, Y. Wang, H. Li, L. Zhang, K. Chang, X. Wang, X. Zhou & D. Li. 2013. NME1 suppression promotes growth, adhesion and implantation of endometrial stromal cells via Atk and MAPK/Erk/1/2 signal pathways in the endometrium milieu. *Human Reproduction* 28: 2822-2831.
- Meaney, M. J. & M. Szyf. 2005. Environmental programming Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. *Dialogue in Clinical Neuroscience* 7: 103–123.
- Mier-Cabrera, J., T. Aburto-Soto, S. Burrola-Méndez, L. Jiménez-Zamudio, M. C. Tolentino, E. Casanueva & C. Hernández-Guerrero. 2009. Women with endometriosis improved their peripheral antioxidant markers after the application of a high antioxidant diet. *Reproductive Biology and Endocrinology* 28: 1-11.
- Missmer, S. A., J. E. Chavarro, S. Malspeis, E. R. Bertone-Johnson, M. D. Hornstein, D. Spiegelman, R. L. Barbieri, W. C. Willett & S. E. Hankinson. 2010. A prospective study of dietary fat consumption and endometriosis risk. *Human Reproduction* 25: 1528-1535.
- Montgomery, G. W., D. R. Nyholt, Z. Z. Zhao, S. A. Treolar, J. N. Painter, S. A. Missmer, S. H. Kennedy & K. T. Zondervan. 2008. The search for genes contributing to endometriosis risk. *Human Reproduction Update* 14: 447-457.
- Ngo, C., C. Chéreau, C. Nicco, B. Weill, C. Chapron & F. Batteaux. 2009. Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *The American Journal of Pathology* 175: 225-234.

- Nie, J., X. Liu & S.W. Guo. 2010. Promoter Hypermethylation of Progesterone Receptor Isoform B (PR-B) in Adenomyosis and Its Rectification by a Histone Deacetylase Inhibitor and a Demethylation Agent. *Reproductive Sciences* 11: 995-1005.
- Nnoaham, K., L. Hummelshoj, P. Webster, T. D'Hooghe, F. Nardone, C. Nardone, C. Jenkinson, S. H. Kennedy & K. T. Zondervan. 2011. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multi-centre study across 10 countries. *Fertil Steril* 96: 366-373.
- Ouchi, N., S. Akira, K. Mine, M. Ichikawa & T. Takeshita. 2013. Recurrence of ovarian endometrioma after laparoscopic excision: risk factors and prevention. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 40: 230-236.
- Pelch, K. E., A. L. Schroeder, P. A. Kimball, K. L. Sharpe-Timms, J. W. Davis & S. C. Nagel. 2010. Aberrant gene expression profile in a mouse model of endometriosis mirrors that observed in women. *Fertil Steril* 93: 1615-1627.
- Peters, V. A., J. J. Joesting, G. G. Freund. 2012. IL-1 receptor 2 (IL-1R2) and its role in immune regulation. *Brain, Behavior and Immunity* 32: 1-8.
- Prowse, A. H., S. Manek, R. Varma, J. Liu, A. K. Godwin, E. R. Maher, I. P. M. Tomlinson & S. H. Kennedy. 2006. Molecular genetic evidence that endometriosis is a precursor of ovarian cancer. *International Journal of Cancer* 119: 556-562.
- Silva, R. C. P. C., I. R. Costa, B. M. Bordin, C. T. X. Silva, S. R. Souza, C. L. R. Júnior, A. B. Frare & K. K. V. O. Moura. 2011. *RsaI* polymorphism of the *ER-β* gene in women with endometriosis. *Genetics and Molecular Research* 10: 465-470.
- Smid-Koopman, E., L. Kuhne, E. Hanekamp, S. Gielen, P. Ruiter, J. Grootegoed, T. Helmerhorst, C. Burger, A. Brinkmann, F. Huikeshoven & L. Blok. 2005. Progesterone-induced inhibition of growth and differential regulation of gene expression in *PRA*-and/or-*PRB*-expressing endometrial cancer cell lines. *Journal of the Society of Gynecologic Investigation* 12: 285-292.
- Stefansson, H., R. T. Geirsson, V. Steinthorsdotti, H. Jonsson, A. Manolescu, A. Kong, G. Ingadottir, J. Gulcher & K. Stefansson. 2002. Genetic factors contribute to the risk of developing endometriosis. *Human Reproduction* 17: 555-559.
- Stettner, R., S. Kaulfuss, P. Burfeind, S. Schweyer, A. Strauss, R. Ringert & P. Thelen. 2007. The relevance of estrogen receptor-beta expression to the antiproliferative effects observed with histone deacetylase inhibitors and phytoestrogens in prostate cancer treatment. *Molecular Cancer Therapy* 6: 2626-2633.
- Stilley, J. A., J. A. Birt & K. Sharpe-Timms. 2012. Cellular and molecular basis for endometriosis-associated infertility. *Cell and Tissue Research* 349: 849-862.
- Szczepańska, M., P. Wirstlein, M. Luczak, P. P. Jagodziński & J. Sskrzypczak. 2010. Reduced expression of *HOXA10* in the midluteal endometrium from infertile women with minimal endometriosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 64: 697-705.

- Taylor, H. S. 2000. The role of *HOX* genes in human implantation. *Human Reproductive Update* 6: 75-79.
- Treloar, S., R. Hadfield, D. Phil, G. Montgomery, A. Lambert, J. Wicks, D. H. Barlow, D. T. O'Connor, S. Kennedy & the International Endogene Study Group. 2002. The interational endogene study: a collection of families for genetic reserach in endometriosis. *Fertility and Sterility* 78: 679-685.
- Wu, Y., G. Halverson, Z. Basir, E. Strawn, P. Yan & S. W. Guo. 2005. Aberrant methylation at *HOXA10* may be responsable for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 193: 371-380.
- Wu, Y., E. Strawn, Z. Basir, G. Halverson & S. W. Guo. 2006. Promoter hypermethylation of progesterone receptor isoform B (*PR-B*) in endometriosis. *Epigenetics* 1: 106-111.
- Xue, Q., Z. Lin, Y. Cheng, C. Huang. E. Marsh, P. Yin, M. P. Milad, E. Confino, S. Reierstad, J. Innes & S. E. Bulun. 2007. Promoter methylation regulates estrogen receptor 2 in human endometrium and endometriosis. *Biology of Reproduction* 77: 681-687.

**Reseña biográfica:**

Alejandro Leal Esquivel está casado con Gloriana Alán Tellez, tienen tres hijos: María, Ignacio y Francisco y se encuentran esperando el cuarto.

Trabaja como Profesor e Investigador en la Escuela de Biología y en el Programa institucional de Investigación en Neurociencias. Es coordinador de la Sección de Genética y Biotecnología de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica.

Desarrolla una amplia labor como investigador, principalmente en el Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica y en el Centro de Investigaciones en Salud (INISA) DE LA universidad de Costa Rica.

Ha recibido muchos reconocimientos académicos y es un gran seguidor de los CIRF, habiendo participado como ponente en el tercero y en el cuarto.