

EXPRESIÓN DE RECEPTORES ESFEROIDALES Y COACTIVADORES EN ENDOMETRIOS OBTENIDOS DE PACIENTES CON SD. DE OVARIO POLIQUÍSTICO. POTENCIALES CONSECUENCIAS EN EL DESARROLLO DE HIPERPLASIA ENDOMETRIAL

NATALIA ITURAIN M¹, NATALIA SILVA A¹, DRA. MARGARITA VEGA², DR. FERNANDO GABLER², ALEJANDRA VILLAVICENCIO².

RESUMEN

Las mujeres que padecen SOP presentan alto riesgo de desarrollar hiperplasia endometrial. Esto puede evidenciarse a través de factores de transcripción como los receptores esteroidales, RA y REá, cuyas acciones están influenciadas por co-reguladores. Lo anterior conduce a un control diferente de la expresión génica, regulando el crecimiento y la diferenciación endometrial. Objetivo: Evaluar en endometrios de mujeres SOP si la expresión de RA, REá y el co-activador AIB1 se relaciona con el desarrollo de hiperplasia endometrial. Metodología: Se determinó la expresión génica (RT-PCR) de RA y REá, y la expresión proteica (IHQ) de RA, REá y AIB1, en endometrios obtenidos de mujeres normales durante la Fase Proliferativa (FP) (EN, n = 6), endometrios de pacientes SOP (ESOP, n = 6), endometrios de mujeres SOP con hiperplasia endometrial (ESOPH, n = 6), y endometrios no SOP con hiperplasia (EH, n = 6); previo consentimiento escrito y aprobado por el Comité de Ética-HCSBA. Resultados: La expresión génica y proteica del REá no difiere entre los grupos estudiados; sin embargo, su expresión proteica es mayor en la fracción nuclear que en la citoplasmática de todos los grupos ($P < 0.05$). Además se observa una mayor expresión de AIB1 en núcleo de células epiteliales y estromales ESOP (60,4%) y EH (43%), al comparar con EN ($P < 0.05$). Por otro lado, la expresión génica del RA aumenta 2,2 veces en ESOPH vs EN, siendo también mayor su expresión en ESOPH vs ESOP ($P < 0.05$). Sin embargo, la expresión proteica de RA no se modifica. Conclusión: El incremento en la expresión de AIB1 en ESOP puede dar al endometrio mayor sensibilidad a la acción estrogénica, lo que podría conducir al desarrollo de hiperplasia endometrial en pacientes SOP.

FONDECYT 1010821, RE-ENTRY GRANT PLACIRH: PRE-070/2003

Palabras Claves: síndrome de ovario poliquístico, receptores esteroidales, endometriosis.

INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP), es uno de los desórdenes endocrino-reproductivos más comunes en las mujeres en edad fértil (1), afectando entre el 5 al 10 % de este grupo de mujeres. Se caracteriza por cuatro disfunciones globales: 1) hiperandrogenismo, 2) irregularidades menstruales (amenorrea, oligomenorrea), 3) hiperinsulinemia asociada a insulino resistencia (en el 50 - 60% de los casos) (2).

Consecuencia de lo anterior, el útero de las mujeres que padecen SOP presenta un comportamiento diferente al de las normales, que se relaciona con aumento de abortos recurrentes (1 %) comparado con la población normal (0,34 %), con infertilidad, así como, con hiperplasia y cáncer endometrial (3). El riesgo relativo de estas mujeres de desarrollar cáncer endometrial es 3.1.

Como el carcinoma endometrial normalmente está precedido por hiperplasia, ello permite identificar eventos moleculares asociados con conversión a la malignidad. En este contexto, se ha encontrado asociación entre mujeres nulíparas que padecen SOP e hiperplasia endometrial (4). Además, un reporte indicó que el 35,7 % de las mujeres SOP estudiadas tiene hiperplasia endometrial. Por lo tanto, el SOP

es un factor de riesgo para el desarrollo de hiperplasia endometrial, con y sin atipia citológica (5).

La conversión del exceso de andrógenos a estrógenos contribuye a incrementar el riesgo de hiperplasia endometrial. Además, los elevados niveles séricos de testosterona inducen una disminución en la concentración circulante de la SHBG (*steroid hormone binding globulin*), lo cual conduce a un incremento en la concentración de estradiol libre. De esta forma, la exposición endometrial continua a estrógeno, no opuesta por progesterona, estimula la proliferación endometrial, lo cual conduce a que este tejido esté expuesto a un crecimiento no controlado (4).

Las acciones de los esteroides en el endometrio humano están mediadas en gran parte por receptores específicos y la expresión celular de éstos está altamente regulada por los esteroides circulantes. Así, el aumento exponencial de la concentración de estradiol (E_2) durante la fase proliferativa (FP) del ciclo menstrual, induce la expresión del receptor de E_2 (RE) (regulación positiva) y luego del receptor de progesterona (RP). Mientras que durante la fase secretora (FS), la alta concentración de progesterona (P_4) disminuye la

¹ Estudiante 3º año Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

² Programa de reproducción humana . ICBM. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

expresión del RE e induce la pérdida de su propio receptor (regulación negativa).

De esta forma, los estrógenos ejercen sus efectos a través de dos isoformas de receptores (RE_a y RE_b) (6), los cuáles provienen de distintos genes. Ambos subtipos se encuentran en endometrio humano, siendo predominante la expresión del subtipo a en endometrio humano normal (6, 7).

Además, se ha descrito la expresión de receptores de andrógenos (RA), los cuales experimenta cambios cíclicos durante el ciclo menstrual (8, 9), siendo regulados positivamente por E₂ en FP (10, 11).

Como se indicó anteriormente, en las mujeres con SOP hay un aumento de los niveles séricos de andrógenos y estrógenos, lo que explicaría en parte que los receptores correspondientes tengan una mayor expresión en los endometrios de dichas pacientes.

Por otro lado, la condición hiperandrogénica puede conducir a hiperplasia (12), ya que los andrógenos pueden ser aromatizados a estrógenos. Por lo tanto, se especula que los andrógenos pueden estar involucrados en el desarrollo de hiperplasia endometrial en mujeres que padecen SOP.

Estudios *ex vivo* realizados recientemente en endometrios de pacientes SOP, sugieren que el hiperestrogenismo es prevalente sobre los altos niveles de andrógenos en inducir la expresión de receptores esteroidales (13). Probablemente lo que tenga mayor importancia en el SOP sea la condición hiperestrogénica relativa que presentan estas mujeres (14), debido a la falta de la acción compensadora de P₄.

Además, existen cofactores llamados co-activadores y co-represores, que regulan las acciones de los receptores esteroidales (15, 16, 17) activando o reprimiendo la transcripción mediada por ellos. Recientemente, se ha demostrado que la expresión de un co-activador relacionado con RE, co-activador AIB 1 (amplified in breast cancer-1), está regulada a lo largo del ciclo menstrual normal, aumentando su expresión en las células endometriales provenientes de mujeres SOP tratadas con citrato de clomifeno (3).

Por lo tanto, cambios en los niveles de expresión de receptores esteroidales y co-activadores, podrían jugar roles importantes en el desarrollo de hiperplasia endometrial en pacientes SOP.

MATERIALES Y MÉTODOS

I.- Pacientes

1. Endometrios Normales

Los endometrios fueron obtenidos de pacientes normales en edad fértil, en FP del ciclo menstrual, con fertilidad probada y sin terapia hormonal en los tres meses anteriores a la obtención de la muestra. Ellas fueron sometidas a salpingoligadura, biopsia o histerectomía por causas no neoplásicas, en el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Clínico San Borja-Arriarán, Campus Centro. Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Tabla 1).

2. Endometrios de mujeres con Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP)

Las muestras de endometrio fueron obtenidas de mujeres con SOP sin tratamiento, que asistieron al Consultorio de Infertilidad y Gineco-Endocrinología del Hospital Clínico San Borja-Arriarán.

Los criterios de inclusión fueron: 1) Clínicos: pacientes con signos clínicos de hiperandrogenismo (acné, hirsutismo, seborrea), sin virilización, ciclos con irregularidad menstrual. 2) Bioquímicos: Testosterona total >0.6 ng/ml, índice andrógenos libres >5, progesterona <3 ng/ml (día 22 en oligomenorreicas o al azar en amenorreicas), insulinemias indicativas de insulino-resistencia (insulinemia 2 h post sobrecarga de glucosa >60 UI/ml y glicemia/insulinemia en ayunas <4.5). 3) Ecográficos: volumen ovárico aumentado, estroma aumentado, presencia de 13 o más folículos por ovario no > 10 mm en el estroma ovárico.

Se excluyeron pacientes con PRL >20 ng/ml, testosterona total >2 ng/ml, DHEAS >4000 µg/ml, 17-OH progesterona >2.5 ng/ml, TSH >5 mU/L o con diabetes franca. Las mediciones hormonales fueron determinadas por RIA o IRMA convencionales (Tabla 1).

3. Pacientes SOP con Hiperplasia Endometrial

Las muestras fueron obtenidas de pacientes SOP con hiperplasia endometrial, luego de realización del legrado endometrial y/o histerectomía (Tabla 1).

4. Pacientes con Hiperplasia Endometrial

Las muestras de tejido endometrial fueron obtenidas posterior al procedimiento quirúrgico (legrado endometrial y/o pieza de histerectomía), según el criterio médico (Tabla 1).

Los tejidos fueron clasificados según la fecha de la última regla (FUR), concentraciones plasmáticas de E₂ y P₄ y mediante estudio histológico de acuerdo a los criterios de Noyes (18).

Al obtener los tejidos, una fracción (t = 0) fue congelada en N₂ líquido y guardada a -70° C (estudios de expresión de mRNA) o fijada en formalina e incluida en parafina (estudios de expresión proteica). Cada situación experimental se realizó en duplicado o triplicado.

Todas las muestras fueron obtenidas previo consentimiento escrito e informado de las pacientes. Cabe destacar que este proyecto ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, y por el Comité de Ética del Hospital Clínico San Borja Arriarán, de donde provienen las pacientes.

Tabla 1: Características generales de los sujetos participantes del estudio.

| | EN | ESOP | ESOPH | EH |
|------|----------|----------|----------|----------|
| n | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Edad | 35.2±6.8 | 32.5±4.0 | 27.2±3.5 | 45.2±4.6 |
| IMC | 28.8±6.8 | 31.5±7.4 | 37.0±4.5 | 25.0±1.6 |

Valores expresados en promedio ± EEM

II.- Estudios de Expresión

Reacción de polimerización en cadena de DNA complementario (RT-PCR)

El RNA total se preparó utilizando TRIzol (Gibco BRL, Life Technology) y el DNA complementario (cDNA) se sintetizó a partir de RNA tratado con DNasa I, utilizando la enzima Super Script II Transcriptasa Reversa (Gibco BRL, Life Technology). De 100 a 300 ng de cDNA fueron amplificados utilizando los primers específicos de cada gen a estudiar:

·RE_a :AGG CTG CGC GTT CGG C
AGC CAT ACT TCC CTT GTC AT
·RA :ATG GCT GTC ATT CAG TAC TCC TGG A
AGA TGG GCT TGA CTT TCC CAG AAA G
·GAPDH: CCA TGG AGA AGG CTG GGG
CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC

El cDNA fue amplificado en una mezcla que contenía:

·RE_a: Buffer PCR, MgCl₂ 2 mM, desoxinucleótidos (dNTP) 0.15 mM, 60 mU/µl de Taq polimerasa (Gibco BRL, Life Technology), 0.8 µM de mezcla primer de RE_a.

RESULTADOS

I) Receptor de Estrógenos alfa (REá)

a. Expresión génica del REá mediante RT-PCR:

La Figura 1 muestra los niveles de mRNA del REá en endometrios de los cuatro grupos estudiados: EN, ESOP, ESOPH y EH.

Se observa que si bien existe una tendencia a una mayor expresión del gen de este receptor en ESOP (42% vs EN), la misma no es significativa al compararse con la expresión en los otros grupos de endometrios.

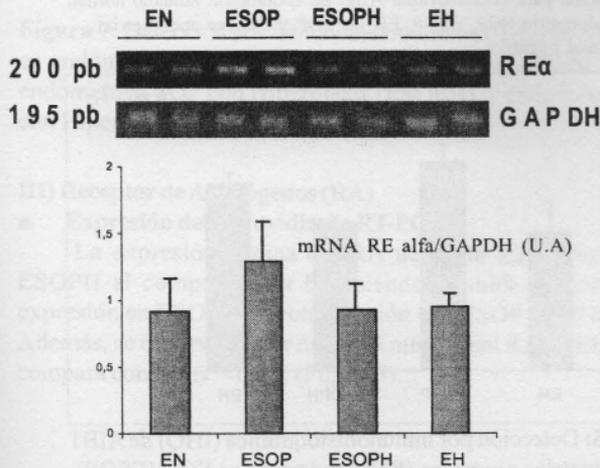


Figura 1: Niveles del mRNA del REá en endometrios normales (EN), endometrios SOP (ESOP), endometrios SOP con Hiperplasia endometrial (ESOPH), y endometrios con Hiperplasia no SOP (EH).

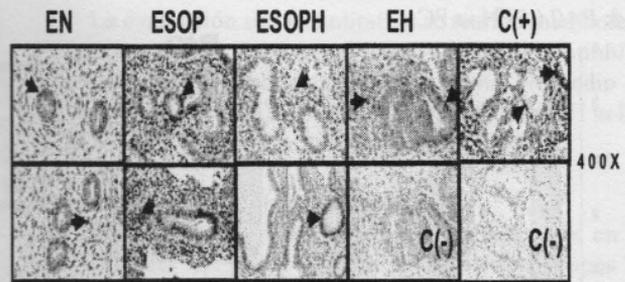
La evaluación semicuantitativa se realizó mediante la razón entre el mRNA del REá y el mRNA del gen constitutivo GAPDH. Los resultados se expresan como promedio de unidades arbitrarias (U.A.) ± EEM.

b. Expresión proteica del REá por Inmunotinción:

Como se observa en la Figura 2, la expresión proteica del REá (Fracción nuclear, FN + Fracción citoplasmática, FC) en los diferentes grupos de pacientes, no se modifica de manera notoria, aunque si existe un aumento significativo de la expresión del REá en ESOP en comparación con ESOPH ($P < 0,05$).

Además, el REá está localizado principalmente en el núcleo de las células del epitelio y del estroma endometrial ($P < 0,05$) (Figura 3), observándose una mayor expresión de éste en epitelio de EN (43,9%) y de EH (42,7%) en comparación con el estroma ($P < 0,05$) (Figura 4).

Además, si se analiza la expresión del receptor a nivel epitelial, se observa que éste se encuentra mayormente expresado en ESOP que en ESOPH ($P < 0,05$). Por otro lado, a nivel estromal, existe una expresión mayor del REá en ESOP al compararse con EN y con EH ($P < 0,05$) (Figura 4).



Inmunotinción para el REá en endometrio humano normal en FP, endometrio SOP, ESOPH, EH no SOP y cáncer endometrial. 400X. C(-): control negativo. C(+): Cáncer de endometrio.

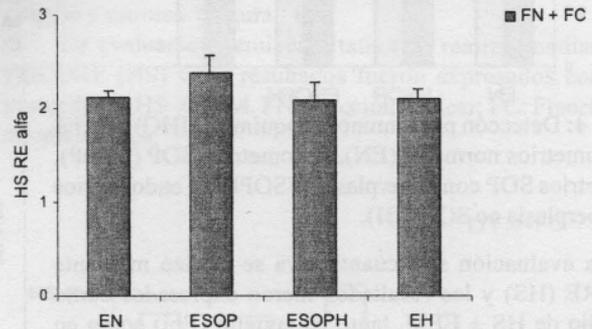


Figura 2: Detección por inmunohistoquímica (IHQ) del REá en endometrios normales (EN), endometrios SOP (ESOP), endometrios SOP con Hiperplasia (ESOPH), y endometrios con Hiperplasia ni SOP (EH).

La evaluación semicuantitativa se realizó mediante HSCORE (HS) y los resultados fueron expresados como promedio de HS ± EEM. FN: Fracción nuclear, FC: Fracción citoplasmática.

La evaluación semicuantitativa se realizó mediante HSORE (HS) y los resultados fueron expresados como promedio de HS ± EEM. FN: Fracción nuclear y FC: Fracción citoplasmática.

(a) $P < 0,05$ ESOP vs ESOPH

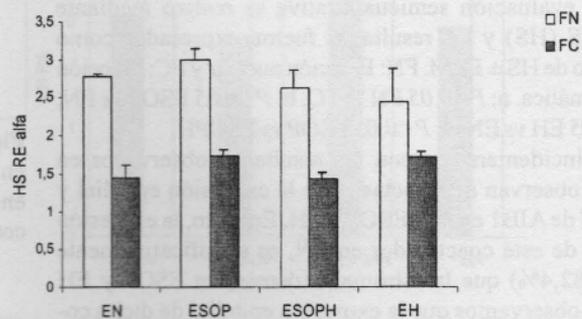


Figura 3: detección por inmunohistoquímica (IHQ) de REá en endometrios normales (EN), endometrios SOP (ESOP), endometrios SOP con Hiperplasia (ESOPH), y endometrios con Hiperplasia no SOP (EH).

a, b, c, d: $P < 0.05$ FN vs FC.

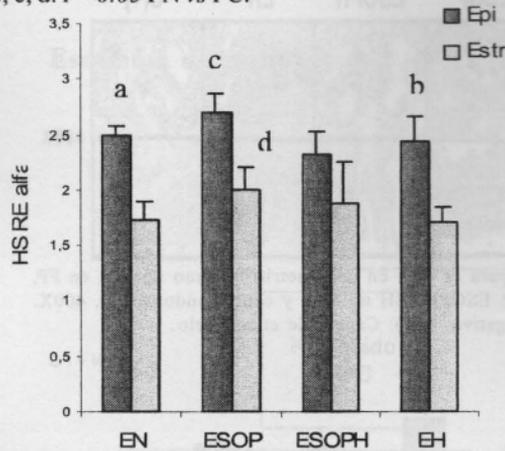


Figura 4: Detección por inmunohistoquímica (IHQ) de REA en endometrios normales (EN), endometrios SOP (ESOP), endometrios SOP con Hiperplasia (ESOPH), y endometrios con Hiperplasia no SOP (EH).

La evaluación semicuantitativa se realizó mediante HSCORE (HS) y los resultados fueron expresados como promedio de $HS \pm EEM$, tanto en epitelio (Epi) como en estroma (Estr). a: $P < 0.05$ EN (epi vs estr), b: $P < 0.05$ EH (epi vs estr), c: $P < 0.05$ ESOP (epi) ESOPH (epi), d: $P < 0.05$ ESOP (estr) vs EH (estr).

II) Coactivador AIB1:

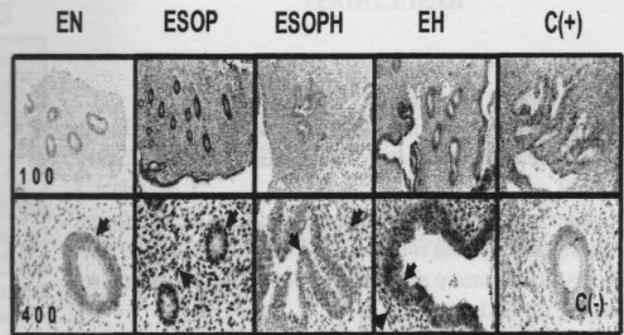
Los resultados indican una mayor expresión del coactivador (FN + FC) en ESOP (52%) al comparar con EN ($P < 0.05$). La Figura 5 muestra la inmunotinción de AIB1.

La evaluación semicuantitativa se realizó mediante HSCORE (HS) y los resultados fueron expresados como promedio de $HS \pm EEM$. FN: Fracción nuclear; FC: Fracción citoplasmática. a: $P < 0.05$ ESOP vs EN.

También, se observan diferencias significativas en la expresión proteica del coactivador, entre la FN y la FC de ESOP y EH. En el caso de ESOP, la expresión nuclear supera a la citoplasmática en un 32,2%; mientras que en el caso de EH la diferencia es de un 31,3% a favor de la FN ($P < 0.05$) (Figura 6).

La evaluación semicuantitativa se realizó mediante HSCORE (HS) y los resultados fueron expresados como promedio de $HS \pm EEM$. FN: Fracción nuclear y FC: Fracción citoplasmática. a: $P < 0.05$ FN vs FC, b: $P < 0.05$ ESOP vs EN, c: $P < 0.05$ EH vs EN, d: $P < 0.05$ ESOP vs ESOPH.

Coincidentemente con los resultados observados en REA, se observan diferencias entre la expresión epitelial y estromal de AIB1 en EN, ESOP y EH. En efecto, la expresión epitelial de este coactivador en EN, es significativamente mayor (82,4%) que la estromal. Además, en ESOP y EH también observamos que la expresión epitelial de dicho co-regulador se encuentra aumentada de forma significativa al comparar con la expresión a nivel estromal. Dentro de este análisis, es importante destacar que existe una mayor expresión estromal del coactivador en ESOP (86,1%) al comparar con EN ($P < 0.05$) (Figura 7).



Inmunotinción para el coactivador AIB1 en endometrio humano normal en FP, endometrio SOP, ESOP, EH no SOP y Cáncer endometrial. C(-): control negativo.

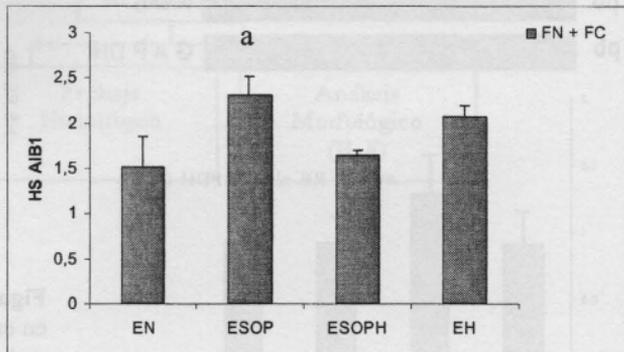


Figura 5: Detección por inmunohistoquímica (IHQ) de AIB1 en endometrios normales (EN), endometrios SOP (ESOP), endometrios SOP con Hiperplasia (ESOPH), y endometrios con Hiperplasia no SOP (EH).

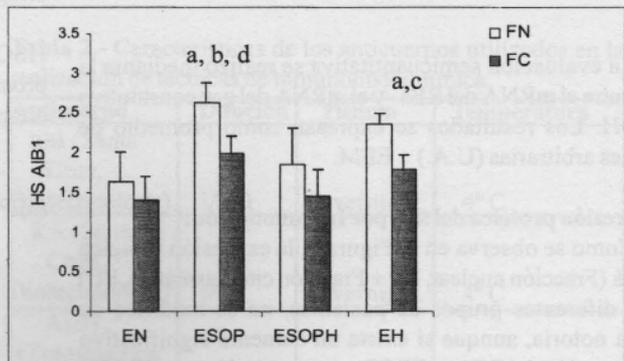


Figura 6: Detección por inmunohistoquímica (IHQ) de AIB1 en endometrios normales (EN), endometrios SOP (ESOP), endometrios SOP con Hiperplasia (ESOPH), y endometrios con Hiperplasia no SOP (EH).

La evaluación semicuantitativa se realizó mediante HSCORE y los resultados fueron expresados como promedio de $HSCORE \pm EEM$, en epitelio (Epi) y estroma (Estr). a: $P < 0.05$ (epi vs estr), b: $P < 0.05$ ESOP vs EN.

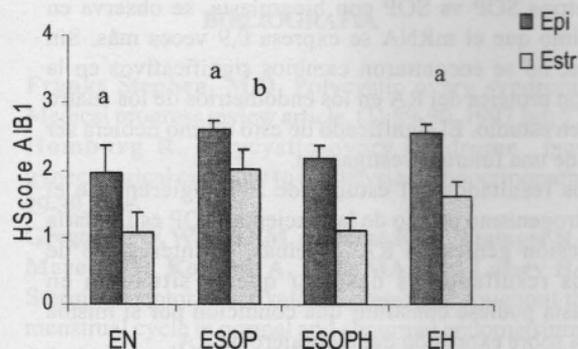


Figura 7: Detección por inmunohistoquímica (IHQ) de AIB1 en endometrios normales (EN), endometrios SOP (ESOP), endometrios SOP con Hiperplasia (ESOPH), y endometrios con Hiperplasia no SOP (EH).

III) Receptor de Andr6genos (RA)

a. Expresi3n del RA mediante RT-PCR:

La expresi3n g6nica del RA aumenta 2,2 veces en ESOPH al comparar con EN, siendo tambi6n mayor su expresi3n en ESOPH en comparaci3n con ESOP ($P < 0.05$). Adem6s, se observa mayor nivel del mRNA del RA en EH al compara con EN ($P < 0.05$) (Figura 8).

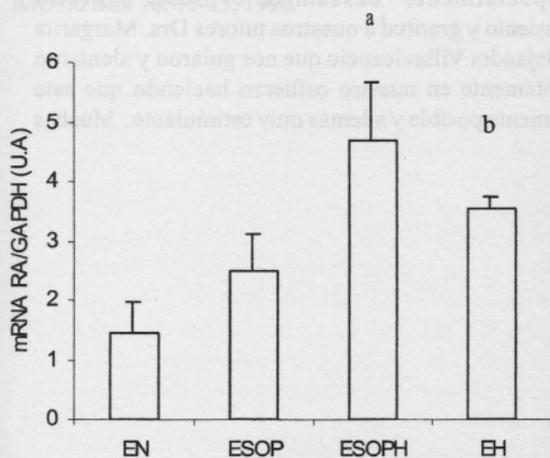


Figura 8: Niveles del mRNA del RA en endometrios normales (EN), endometrios SOP (ESOP), endometrios SOP con Hiperplasia endometrial (ESOPH) y endometrios con Hiperplasia no SOP (EH).

La evaluaci3n semicuantitativa se realiz3 mediante la raz3n entre mRNA del RA y el mRNA del gen constitutivo GAPDH. Los resultados se expresan como promedio de unidades arbitrarias (U.A.) \pm EEM. a: $P < 0.05$ ESOPH vs EN y ESOPH vs ESOP; b: $P < 0.05$ EH vs EN.

a. Expresi3n del RA por inmunotinci3n:

No se observan diferencias significativas en la expresi3n del RA (FN + FC) en los diferentes grupos de pacientes, aunque los resultados muestran una ligera tendencia a aumentar su expresi3n en ESOPH (Figura 9 y 10). Lo mismo ocurre al comparar la expresi3n del RA entre epitelio y estroma (Figura 11).

La evaluaci3n semicuantitativa se realiz3 mediante HSCORE (HS) y los resultados fueron expresados como promedio de HS \pm EEM. FN: Fracci3n nuclear; FC: Fracci3n citoplasm6tica.

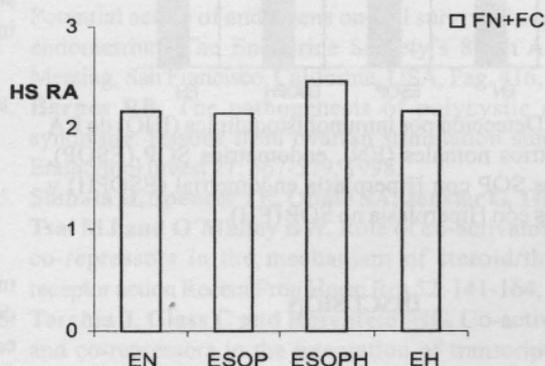


Figura 9: Detecci3n por inmunohistoquímica (IHQ) de RA en endometrios normales (EN), endometrios SOP (ESOP), endometrios SOP con Hiperplasia endometrial (ESOPH) y endometrios con Hiperplasia no SOP (EH).

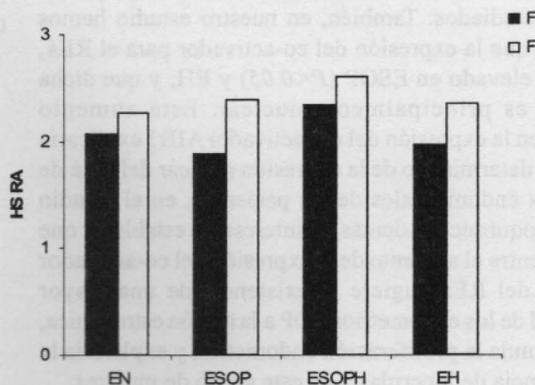


Figura 10: Detecci3n por inmunohistoquímica (IHQ) de RA en endometrios normales (EN), endometrios SOP (ESOP), endometrios SOP con Hiperplasia endometrial (ESOPH) y endometrios con Hiperplasia no SOP (EH).

La evaluación semicuantitativa se realizó mediante HSCORE (HS) y los resultados fueron expresados como promedio de HS \pm EEM. FN: Fracción nuclear y FC: Fracción citoplasmática.

La evaluación semicuantitativa se realizó mediante HSCORE (HS) y los resultados fueron expresados como promedio de HS \pm EEM, en epitelio (Epi) y (Estr).

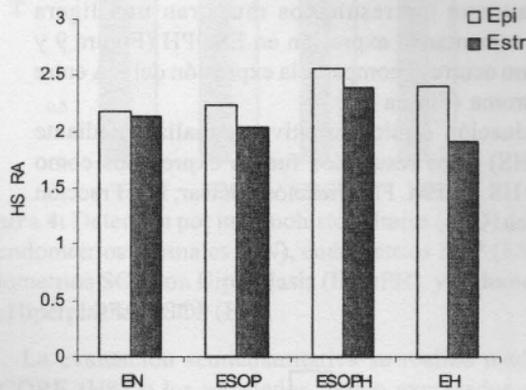


Figura 11: Detección por inmunohistoquímica (IHQ) de RA en endometrios normales (EN), endometrios SOP (ESOP), endometrios SOP con Hiperplasia endometrial (ESOPH) y endometrios con Hiperplasia no SOP (EH).

DISCUSIÓN

En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en la expresión génica y proteica del RE α entre los distintos grupos de pacientes, aunque sí una tendencia en ESOP a expresar más dicho receptor. Además, el RE α se encuentra significativamente más expresado en la fracción nuclear de las células endometriales de los cuatro grupos de pacientes estudiados. También, en nuestro estudio hemos encontrado que la expresión del co-activador para el RE α , AIB1, está elevado en ESOP ($P < 0.05$) y EH, y que dicha expresión es principalmente nuclear. Este aumento observado en la expresión del co-activador AIB1 explicaría el aumento determinado de la expresión nuclear del RE α de las biopsias endometriales de las pacientes, en el estudio inmunohistoquímico. Además, es interesante establecer que la relación entre el aumento de la expresión del co-activador AIB1 y el del RE α sugiere la existencia de una mayor sensibilidad de los endometrios SOP a la acción estrogénica, lo cual estimula la proliferación endometrial y explicaría la gran incidencia de hiperplasia en este grupo de mujeres.

Por otro lado, los niveles del mRNA del RA están significativamente elevados en ESOPH y EH en comparación con los de EN. En efecto, en ESOPH, el mRNA del RA se encuentra expresado 2,2 veces más que en endometrios normales, y en endometrios con Hiperplasia no SOP se encuentra 1,4 veces más expresado que en los normales. Así mismo, al comparar los niveles del mRNA de RA en

endometrios SOP vs SOP con hiperplasia, se observa en este último que el mRNA se expresa 0,9 veces más. Sin embargo, no se encontraron cambios significativos en la expresión proteica del RA en los endometrios de los cuatro grupos en estudio. El significado de esto último debiera ser motivo de una futura investigación.

Los resultados del estudio de RA sugieren que el hiperestrogenismo propio de las pacientes SOP estimularía la expresión génica de RA. Además, lo interesante de nuestros resultados es destacar que la situación en hiperplasia pudiese constituir una condición por sí misma para una sobre expresión del mensajero de RA.

En conjunto, estos resultados sugieren que la acción inapropiada de estrógenos a nivel endometrial puede alterar el patrón de expresión de genes y proteínas importantes en el control de la homeostasis tisular, conduciendo a un crecimiento incontrolado lo que puede llevar al desarrollo de hiperplasia endometrial en pacientes SOP. Futuros estudios serán necesarios para poder entender completamente las implicaciones de nuestras observaciones.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a las pacientes por dejar utilizar sus muestras para esta investigación, a la Dra. Rosa Smith por dejarnos utilizar su laboratorio y al Dr. Fernando Gabler por enseñarnos dating histológico en muestras de endometrio. Sin el material y los métodos que todos ellos pusieron a nuestra disposición habría sido muy difícil nuestro trabajo. Muy especialmente deseamos expresar nuestro reconocimiento y gratitud a nuestros tutores Dra. Margarita Vega y Alejandra Villavicencio que nos guiaron y alentaron permanentemente en nuestro esfuerzo haciendo que este fuera realmente posible y además muy estimulante. Muchas Gracias.

BIBLIOGRAFIA

1. **Franks Stephen, M.D.** Polycystic ovary syndrome. Medical progress review article. (1):89-90. 1997 Jul; 77.
2. **Homburg R.** Polycystic ovary syndrome from gynecological curiosity to multisystem endocrinopathy, 29-39, 1996.
3. **Gregory CW, Wilson EM, Apparao KBC, Lininger RA, Meyer WR, Kowalik A, Fritz MA, and Lessey BA.** Steroid receptor coactivator expression throughout the menstrual cycle in normal and abnormal endometrium J Clin Endocrinol Metab 87 (6): 2960-66, 2002.
4. **Segreti EM.** Endometrial hyperplasia and carcinoma in women with androgen excess disorders Androgen Excess Disorders in Women Capítulo 64: 667-672, 1997
5. **Balen A** Polycystic ovary syndrome and cancer Hum Reprod Update 7 (6): 522-525, 2001.
6. **Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjold M, and Gustafsson JA.** Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern J Clin Endocrinol Metab 82: 4258-65, 1997.
7. **Fujimoto J, Sakaguchi H, Aoki I, Toyoki H, and Tamaya T.** Clinical implications of the expression of estrogen receptor- α and - β in primary and metastatic lesions of uterine endometrial cancers Oncology 62: 269-77, 2002
8. **Kato J and seto T.** Correlation of androgen receptors with histological differentiation in human endometrial carcinomas Acta Obstet Gynecol Scand 64: 209-212, 1985.
9. **Mertens HJMM, Heineman MJ, Koudstaal J, Theunissen P, and Evers JLH.** Androgen receptor content in human endometrium Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 70: 11-13, 1996.
10. **Fujimoto J, Nishigaki M, Hori M, Ichigo S, Itoh T, and Tamaya T.** The effect of estrogen and androgen on androgen receptors and mRNA levels in uterine leiomyoma, myometrium and endometrium of human subjects J Steroid Biochem Mol Biol 50: 137-143, 1994.
11. **Lovely LP, Appa Rao KBC, Gui Y, and Lessey BA.** Characterization of the androgen receptor in a well-differentiated endometrial adenocarcinoma cell line (Ishikawa) J Steroid Biochem Mol Biol 74: 235-241, 2000.
12. **Sherman AI and Brown S.** Androgen-uterine interactions: an assessment of androgen interactions with the testosterone and estrogen receptor systems and stimulation of uterine growth and progesterone receptor synthesis Mol Cell Endocrinol 15: 91-108, 1979.
13. **Vega M, Maliqueo M, Anido M, Clementi M, Palomino A, Sir-Petermann T, Gabler F, and Johnson MC.** Potential action of androgens on cell survival in human endometrium The Endocrine Society's 84 th Annual Meeting, San Francisco, California, USA, Pag. 416, 2002.
14. **Barnes RB.** The pathogenesis of polycystic ovary syndrome: lessons from ovarian stimulation studies J Endocrinol Invest 21: 567-579, 1998.
15. **Shibata H, Spencer TE, Onate SA, Jenster G, Tsai SY, Tsai MJ and O'Malley BW.** Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action Recent Prog Horm Res 52: 141-164, 1997.
16. **Torchia J, Glass C and Rosenfeld MG.** Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses Curr Opin Cell Biol 10: 373-383, 1998
17. **Parker MG** Transcriptional activation by oestrogen receptors Biochem Soc Symp 63: 45-50, 1998.
18. **Noyes RW, Hertig DT and Rock J.** Dating the endometrial biopsy Fertil Steril 1: 3-25, 1950.