



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y
FARMACÉUTICAS

**LA OBESIDAD EN MUJERES CON SÍNDROME DE OVARIO
POLIQUÍSTICO (SOP) PROMUEVE UNA INHIBICIÓN A
NIVEL ENDOMETRIAL EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE
ADIPONECTINA**

Memoria para optar al título de Bioquímico

ISIS PAULINA ASTORGA LEIVA

Prof. Dra. Margarita Vega Blanco

Directora de Tesis. Depto. Obstetricia y Ginecología, Hospital Clínico Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Prof. Dra. Carmen Romero Osses

Profesora Patrocinante. Depto. Obstetricia y Ginecología, Hospital Clínico Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile

Lugar de realización

Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción
Hospital Clínico Universidad de Chile
Santiago-CHILE, Agosto 2015

Este estudio se llevó a cabo a través del proyecto FONDECYT # 1130053, dando origen a las siguientes actividades de difusión:

PRESENTACIONES EN CONGRESOS:

- Oróstica L, **Astorga I**, Poblete C, García V, Romero C, Vega M.

Alteración de la expresión de moléculas relacionadas con la obesidad en endometrios de mujeres con Síndrome de Ovario Poliquístico. Trabajo presentado mediante exposición oral en XXV Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo. Valdivia, 3-6 Septiembre de 2014.

- Oróstica L, **Astorga I**, Poblete C, García V, Romero C, Vega M.

Adiponectin and TNF- α signaling in endometrial from obese women with polycystic ovarian syndrome (PCOS). Trabajo presentado en modalidad panel en XXXVII Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, Puerto Varas 30 sept.- 4 oct. 2014.

ARTÍCULO PUBLICADO

- V. García, C. Poblete, L. Oróstica, **I. Astorga**, C. Rosas C. Romero and M. Vega.

Endometria from obese PCOS women with hyperinsulinemia exhibit altered adiponectin signaling. Hormone and Metabolic Research - Manuscript ID HMR-2014-10-0319. En Prensa.

ÍNDICE GENERAL	Páginas
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	viii
SUMMARY	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP)	2
1.1.1 Endometrio y SOP	3
1.1.1.1 Endometrio Normal	3
1.1.1.2 Endometrio de Mujeres SOP	4
1.1.2 Endometrio e Insulina	5
1.2 Obesidad	5
1.3 Tejido Adiposo	6
1.3.1 Tejido Adiposo Como Órgano Secretor	7
1.4 Adiponectina	7
1.4.1 Receptor de Adiponectina y Vías de Señalización	8
1.5 Moléculas de la Vía de Señalización de Adiponectina	9
1.5.1 APPL1	9
1.5.2 TAK1/TKK1	10
1.5.3 MEK3/MKK3	11
1.5.4 p38 MAPK	11
1.5.5 NF-κB	12
2. HIPÓTESIS	13
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivo General	14
3.2. Objetivos Específicos	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS	15

4.1.	Reactivos Generales	15
4.2.	Obtención de Biopsias Endometriales	15
4.2.1	Obtención de Muestras Endometriales de Mujeres Controles	16
4.2.2	Obtención de Muestras Endometriales de Mujeres con SOP	16
4.2.3	Obtención de Muestras Endometriales de Mujeres Obesas	16
4.2.4	Obtención de Muestras Endometriales de Mujeres Obesas SOP	17
4.2.5	Evaluación de Tejidos Obtenidos y Fichaje Histológico	18
4.3.	Diseño Experimental	18
4.4.	Estudio por Inmunohistoquímica	19
4.5.	Estudio por Western Blot	19
4.6.	PCR Semicuantitativo	20
4.7.	Análisis Estadístico	23
5.	RESULTADOS	24
5.1	Niveles Proteicos de Adiponectina	25
5.1.1	Niveles Proteicos de Adiponectina por IHQ	25
5.1.2	Determinación de Adiponectina 28 kDa por WB	28
5.1.3	Niveles Proteicos de Adiponectina 56 kDa por WB	29
5.2	Evaluación del Receptor de Adiponectina AdipoR1	30
5.2.1	Niveles Proteicos de AdipoR1 por IHQ	30
5.2.5	Niveles Proteicos de AdipoR1 por WB	32
5.2.3	Niveles Génicos de AdipoR1 por qPCR	33
5.3	Evaluación del Receptor de Adiponectina AdipoR2	34
5.3.1	Niveles Proteicos de AdipoR2 por IHQ	34
5.3.2	Niveles Proteicos de AdipoR2 por WB	36
5.3.3	Niveles Génicos de AdipoR2 por qPCR	36
5.4	Determinación del Contenido Génico y Proteico de APPL1	37
5.4.1	Niveles Proteicos de APPL1 por IHQ	37
5.4.2	Niveles Proteicos de APPL1 por WB	40
5.4.3	Niveles Génicos de APPL1 por qPCR	41
5.5	Determinación de los Niveles Proteicos de TAK1	41
5.5.1	Niveles Proteicos de TAK1 por IHQ	41

5.6	Evaluación de los Niveles Proteicos de MEK3	46
5.6.1	Niveles Proteicos de pMEK3 por IHQ	46
5.6.2	Niveles Proteicos de MEK3t por IHQ	48
5.6.3	Niveles Proteicos de pMEK3 por WB	50
5.7	Evaluación de Niveles Proteicos de p38MAPK	51
5.7.1	Niveles Proteicos de p-p38MAPK por IHQ	51
5.7.2	Niveles Proteicos de p38MAPKt por IHQ	53
5.7.3	Niveles Génicos de p38 por qPCR	55
5.8	Determinación de los Niveles Génicos y Proteicos de NF- κ B	55
5.8.1	Niveles Proteicos de NF κ B por IHQ	55
5.8.2	Niveles Proteicos de p65 a nivel nuclear	58
5.8.3	Niveles Génicos de NF κ B por qPCR	59
6.	DISCUSIÓN	60
7.	CONCLUSIONES GENERALES	67
8.	PROYECCIONES	68
9.	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	69
10	BIBLIOGRAFÍA	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Posibles vías de señalización moduladas por APPL1	6
Figura 2: Propuesta de estudio	11
Figura 3: Diseño experimental	18
Figura 4: Calculo para el “n” muestral	23
Figura 5: Detección de Adiponectina por IHQ	26
Figura 6: Cuantificación de niveles proteicos de Adiponectina por IHQ	27
Figura 7: Niveles proteicos de Adiponectina 28 kDa por WB	28
Figura 8: Niveles proteicos de Adiponectina 56 kDa por WB	29
Figura 9: Detección de AdipoR1 por IHQ	30
Figura 10: Cuantificación de niveles proteicos de AdipoR1 por IHQ	31
Figura 11: Niveles proteicos de AdipoR1 por WB	32
Figura 12: Niveles génicos de AdipoR1 por PCR semicuantitativo	33
Figura 13: Detección de AdipoR2 por IHQ	34
Figura 14: Cuantificación de niveles proteicos de AdipoR2 por IHQ	35
Figura 15: Niveles proteicos de AdipoR2 por WB	36
Figura 16: Niveles génicos de AdipoR2 por PCR semicuantitativo	37
Figura 17: Detección de APPL1 por IHQ	38
Figura 18: Cuantificación de APPL1 por IHQ	39
Figura 19: Niveles proteicos de APPL1 por WB	40
Figura 20: Niveles génicos de APPL1 por PCR semicuantitativo	41
Figura 21: Detección de p-TAK1 por IHQ	42
Figura 22: Cuantificación de p-TAK1 por IHQ	43
Figura 23: Detección de TAK1t por IHQ	44
Figura 24: Cuantificación de TAK1 por IHQ	45

Figura 25: Detección de p-MEK3 por IHQ	46
Figura 26: Cuantificación de p-MEK3 por IHQ	47
Figura 27: Detección de MEKt por IHQ	48
Figura 28: Cuantificación de MEK3 por IHQ	49
Figura 29: Niveles proteicos de p-MEK3 por WB	50
Figura 30: Detección de p-p38 MAPK por IHQ	51
Figura 31: Cuantificación de niveles proteicos de p-p38MAPK	52
Figura 32: Detección de p38 MAPKt por IHQ	53
Figura 33: Cuantificación de niveles proteicos de p38 MAPKt	54
Figura 34: Niveles génicos de p38 MAPK	55
Figura 35: Detección de NF- κ B por IHQ	56
Figura 36: Cuantificación de niveles proteicos de NF- κ B	57
Figura 37: Niveles proteicos de p65 a nivel nuclear	58
Figura 38: Niveles génicos de NF- κ B	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de sobrepeso y obesidad según IMC	6
Tabla 2: Clasificación de los distintos grupos de pacientes	7
Tabla 3: Anticuerpos utilizados para la inmunodetección por IHQ	21
Tabla 4: Anticuerpos utilizados para la inmunodetección por WB	22
Tabla 5: Partidores utilizados para el análisis por PCR semicuantitativo	23
Tabla 6: Características Clínicas y endocrinas de los grupos de pacientes en estudio	24
Tabla 7: Parámetros metabólicos de los grupos de pacientes en estudio	25

ABREVIATURAS

Ad	Adiponectina
AdipoR1	Receptor de Adiponectina 1
AdipoR2	Receptor de Adiponectina 2
AES	Sociedad de Exceso de Andr6genos
AKT	Proteína quinasa B
AMIC	Adenosina Monofosfato cídico
AMPK	Adenosina Monofosfato activada por Proteína quinasa
APPL1	Proteína Adaptadora de interacción en fosfotirosina con dominio PH y zipper leucina 1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BSA	Albúmina de suero bovino
CRE	Elemento regulado por AMPc
DEL	Mujeres delgadas
DEL SOP	Mujeres delgadas con Síndrome de Ovario Poliquístico
DTT	Ditiotreitol
EEM	Error estándar medio
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
GCPR	Receptor acoplado a proteína G
IAL	Índice de androgenos libres
IMC	Índice de Masa Corporal
IHQ	Inmunohistoquímica
IOD	Índice de densidad óptica
IR	Resistencia a la insulina
KO	<i>Knock-out</i>

MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEK3	Quinasa de la familia MAPK 3
MEK6	Quinasa de la familia MAPK 6
NF- κ B	Factor de transcripción nuclear Kb
OB	Mujeres con obesidad
OB SOP	Mujeres obesas con Síndrome de Ovario Poliquístico
α -p38 MAPK	Subunidad α de la proteína p38 de la familia MAPK
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Amortiguador fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDK1	Proteína quinasa dependiente de fosfoinositidos
PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinasa
PIP2	Fosfatidilinositol bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol trifosfato
PKA	Proteína quinasa A
PTGO	Prueba de tolerancia a la glucosa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa
S6K1	Proteína quinasa de la proteína ribosomal S6
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SOP	Síndrome de Ovario Poliquístico
TAK1	Kinasa 1 activada por de crecimiento transformante β
TBS	Amortiguador tris salino
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etano-1,2-diamina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alpha
WB	Western blot

RESUMEN

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es una patología endocrino metabólica que afecta entre el 5% - 10% de mujeres que se encuentran en período reproductivo. Un número elevado de estas mujeres son infértiles, acentuando además la posibilidad de desarrollar hiperplasia y cáncer endometrial. Dentro de las mujeres que presentan SOP, existe un alto porcentaje de ellas que son obesas u obesas mórbidas. En este contexto, se sabe que la adiponectina, una adipoquina marcadora de la obesidad, es secretada principalmente por los adipocitos, y juega un rol importante dentro de la señalización celular, activando a los receptores AdipoR1 y AdipoR2 en diversos tejidos del organismo. La hormona adiponectina juega un papel fundamental en el metabolismo de la glucosa y ácidos grasos contribuyendo a la homeostasis energética de los tejidos sensibles a insulina. Además, se ha detectado un efecto anti-neoplásico de la adiponectina, y se han reportado que bajos niveles de adiponectina aumentan el riesgo de cáncer de mama, endometrio y próstata. En cuanto a los componentes de la vía de señalización, APPL1 es una proteína adaptadora que transduce la señal inducida por la activación de los receptores de adiponectina. La mayoría de estos antecedentes experimentales han sido generados de estudios en el tejido adiposo y en líneas celulares de adipocitos. Sin embargo, se ha reportado en células C2H2 de musculo esquelético que la unión de APPL1 a receptores de adiponectina estimula la activación de la isoforma α de p38-MAPK a través de las quinasas TAK1/MKK3. Por otro lado, se ha reportado que en mujeres con obesidad, las concentraciones de adiponectina disminuyen a nivel sérico. Debido a estos antecedentes que la hipótesis propuesta en este estudio es:

“La condición SOP sumada a la obesidad promueve una inhibición de la vía de señalización de adiponectina en endometrios de estas mujeres, disminuyendo la activación de APPL1-TAK1-MEK3-p38 MAPK”.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar si las condiciones endocrino-metabólicas de las pacientes con SOP más la condición de obesidad, modifican la expresión y/o activación de moléculas de la vía de señalización de adiponectina.

Para llevar a cabo este estudio, se consideró la obtención de sangre y endometrios de cuatro grupos experimentales (mujeres delgadas, mujeres delgadas con SOP, mujeres con obesidad, mujeres con obesidad y SOP). Los resultados en tejido endometrial mostraron la

presencia de adiponectina y sus receptores en este tejido, los cuales no presentaron diferencias significativas entre los grupos de estudio. En relación a moléculas de la vía de señalización de adiponectina, como APPL1, pTAK1 y pMEK3, sus niveles proteicos se encuentran disminuidos en condiciones de obesidad y SOP, a partir de estos datos podemos inferir que la vía de señalización activada por Adiponectina estaría disminuida en estas condiciones. Los niveles de α -p38MAPK, no mostraron una disminución en condiciones de obesidad y SOP, como se esperaba. Por el contrario, en estas mujeres la activación de α -p38MAPK estaba aumentada. Lo anterior puede ser posible ya que la literatura nos indica que esta MAPK puede estar aumentada por condiciones de estrés o un ambiente inflamatorio constante, como es el caso de las mujeres SOP con obesidad. Esto podría inducir a otras MAPK a la estimulación de α -p38MAPK, sin embargo esta activación no estaría dada por el estímulo de adiponectina a través de la vía de señalización en estudio. Por último, se evidenció la concentración proteica y génica de NF- κ B, el cual puede ser activado por α -p38MAPK. Los resultados se relacionan con los expresados anteriormente. La activación de NF- κ B estaba aumentada en condiciones de obesidad y SOP, manifestado por el mayor porcentaje de núcleos positivos en condiciones de obesidad y SOP en comparación a los demás grupos experimentales.

En consecuencia, no existe evidencia previa de esta vía de señalización en tejido endometrial y en condiciones de obesidad y SOP. Por lo tanto, la relevancia de este estudio radica en que esta vía podría tener importancia para la mantención de las condiciones óptimas del endometrio, es decir, mantener una homeostasis energética esencial para el correcto funcionamiento de este tejido.

SUMMARY

OBESITY IN WOMEN WITH POLYCYSTIC OVARIAN SYNDROME (PCOS) PROMOTES A ENDOMETRIAL LEVEL INHIBITION IN THE WAY OF SIGNALLING ADIPONECTIN

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is an endocrine metabolic disease that affects between 5% - 10% of women in reproductive period. A large number of these women are infertile, with increased possibility of developing endometrial hyperplasia and cancer. Also, a high percentage of women with PCOS, are obese or obese morbid. In this context, it is known that adiponectin, an adipokine marker of obesity, is mainly secreted by adipocytes and plays an important role in cell signaling, activating the AdipoR1 and AdipoR2 receptors in various tissues. Adiponectin hormone plays a key role in the metabolism of glucose and fatty acids contributing to energy homeostasis in insulin-sensitive tissues. In addition, adiponectin has an anti-neoplas effect and it has been reported that low levels of adiponectin increase breast, endometrial and prostate cancer. As for the signaling pathway component, APPL1 is an adaptor protein that transduces signal upon activation of the adiponectin receptor. Most of these previous studies were generated in adipose tissue and in adipocyte cell lines. However, it has been reported in skeletal muscle cells C2H2 that APPL1 binding to adiponectin receptor after its activation stimulates the α -isoform of p38 MAPK through the TAK1 / kinases MKK3. Furthermore, it has been reported that in women with obesity, serum adiponectin concentration decrease. Therefore, the proposed hypothesis is as follows: *“The SOP condition together with obesity promotes inhibition of adiponectin signaling pathway in endometria of these women decreasing activation of APPL1-TAK1-MEK3-p38MAPK”.*

The aim of this study was to assess whether endocrine-metabolic conditions of PCOS besides their obesity status, modify the expression and / or activation of molecules involved in the adiponectin signaling pathway.

To conduct this study, blood and endometria from four experimental groups (lean women, lean women with PCOS, obese women, women with obesity and PCOS) were considered. The results showed the presence at the endometrial level of adiponectin receptors in all studied groups, and no significant differences were obtained between groups. Regarding

molecules of the signaling pathway, protein levels of Adiponectin, as well as, APPL1, pTAK1 and pMEK3 were reduced in conditions of obesity and SOP. Therefore, it can be infer that Adiponectin signal transduction is abnormal under these conditions. Also, levels of p38MAPK showed a decrease in SOP obesity and conditions, as expected. However, in these women the α -p38MAPK activation was increased. This result could be explained since the literature indicates that MAPK may be increased by stress conditions or constant inflammatory environment, as is the case of obese PCOS women. Therefore, the MAPK stimulation of α -p38MAPK, could be through a pathway different from Adiponectin signaling. Finally, the protein and gene concentration of NF-kB, which can be activated by α -p38MAPK, was evident. The results clearly show that activation of NF-kB is increased in obesity and PCOS conditions, evidenced by the highest percentage of positive nuclei in terms of obesity and PCOS compared to the other experimental groups.

Consequently, there is no previous evidence of this signaling pathway in endometrial tissue or in obesity and PCOS conditions, and the relevance of this study is that this pathway might be important for maintaining optimum conditions of the endometrium, that is, normal homeostasis energy essential for the proper functioning of this tissue.

1. INTRODUCCIÓN

El endometrio es uno de los tejidos imprescindibles para el correcto desarrollo de la embriogénesis animal, y esencial para el proceso de implantación del embrión. Este es un tejido dinámico que experimenta varios cambios morfológicos y fisiológicos a lo largo del ciclo menstrual, como proliferación, diferenciación y muerte celular. El control del ciclo endometrial está dado fundamentalmente por los niveles adecuados de esteroides de origen ovárico y la cantidad de sus respectivos receptores y co-reguladores en el tejido endometrial. Una alteración de las concentraciones sanguíneas de hormonas y/o proteínas o la alteración en la capacidad de síntesis cíclica de los esteroides, tal como sucede en el Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) que favorece la desregulación de ciertas moléculas importantes en el funcionamiento del tejido endometrial, afecta principalmente la homeostasis celular y, en consecuencia, la receptividad uterina (1, 2).

Una de las características que presentan las pacientes con SOP es hiperinsulinemia e hiperandrogenismo, sumado a diversos cambios bioquímicos celulares a nivel del endometrio (1, 2). Junto con esto, un porcentaje importante de mujeres con SOP presentan obesidad (3, 4), y uno de los marcadores de obesidad es la adiponectina, molécula secretada por el tejido adiposo. En tejido adiposo se ha descrito que esta adipoquina ayuda a la translocación del transportador de glucosa hacia la periferia de la célula y aumenta la sensibilidad del receptor de insulina (5, 6, 7). Por otra parte, se ha observado que en la condición de obesidad existe una disminución de adiponectina circulante. Esto ha sido reportado para las pacientes obesas y con SOP, lo que puede conducir a la disminución en la activación de moléculas claves dentro de la vía de señalización de adiponectina, esto puede ser causa del desarrollo o agravamiento de la patología SOP o ser una consecuencia de ella, afectando finalmente lo que es el metabolismo energético celular y la función del tejido endometrial.

1.1 SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO

El SOP es una patología endocrina metabólica que afecta a un alto porcentaje de las mujeres en edad fértil, siendo la endocrinopatía más común dentro de estas mujeres (8,9). Esta patología es considerada un síndrome, es decir, un conjunto de signos y características en donde ningún análisis por sí sólo contribuye a un diagnóstico para la enfermedad.

Las mujeres que sufren de este síndrome, presentan una disfunción ovárica causada por un hiperandrogenismo y/o una hiperandrogenemia (10). Otros signos y síntomas que caracterizan esta patología son hirsutismo, disminución de las globulinas de unión a hormonas esteroidales (SHBG) e incremento de andrógenos libres.

En cuanto a la fisiopatología de la enfermedad, se tienen antecedentes que en algunas pacientes con SOP, existe un aumento de la secreción de la Hormona Luteinizante (LH) (11), tanto en frecuencia como en amplitud, esto sugiere de alguna forma la implicancia de algún defecto a nivel hipotalámico que pudiese inducir mayor liberación de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) (12). Es por eso y otros antecedentes relacionados que mencionaremos más adelante, es que se han desarrollado varios criterios de diagnóstico. El primero de ellos ha sido el del National Institutes of Health (NIH) en Bethesda (1992), donde se estableció que para diagnosticar el síndrome debiese haber hiperandrogenismo clínico o bioquímico y anovulación crónica (13). Más tarde, en el año 2003, en Rotterdam se estableció que para diagnosticar a una paciente con SOP, de las tres características: oligo-anovulación, hiperandrogenismo clínico o bioquímico y ovarios poliquísticos, se debiesen cumplir al menos dos de ellas. Actualmente, la Sociedad de Exceso de Andrógenos AES-PCOS (2008) concluye que el SOP debe ser considerado como un desorden en el exceso de andrógenos, sugiriendo que para el diagnóstico se deben encontrar signos ya sea clínicos o bioquímicos de hiperandrogenismo y una disfunción ovárica como oligo-anovulación y/u ovarios poliquísticos a la ultrasonografía (1).

Además de estos signos, aunque no constituye un parámetro diagnóstico, este síndrome se asocia con insulinoresistencia (3, 4). Alrededor del 70 % de las pacientes presentan esta característica y con ello hiperinsulinemia compensatoria (14). Esta

insulinorresistencia puede ocasionar daños a la salud a largo plazo como el desarrollo de diabetes y enfermedades cardiovasculares (14). Por otra parte, una alta proporción de mujeres con SOP tiene sobrepeso, muchas de ellas son obesas y obesas mórbidas. El exceso de esta adiposidad puede aumentar el desorden reproductivo y metabólico contribuyendo a variados tipos de enfermedades incluidas en el diagnóstico de SOP, aumentando el riesgo a la patología. Por lo mismo, esta patología es un importante factor de riesgo perinatal con una mayor incidencia de diabetes gestacional, pre-eclampsia y restricción del crecimiento intrauterino, condiciones que a su vez se relacionan a estados de insulino resistencia (11).

Además, las mujeres con SOP presentan un alto grado de infertilidad, abortos y abortos recurrentes, hiperplasia y carcinoma endometrial, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia, hipertensión y enfermedades cardiovasculares (2), lo que hace de este síndrome una patología multifactorial.

1.1.1 Endometrio y SOP

1.1.1.1 Endometrio Normal

El endometrio es un tejido dinámico, el cual en situación fisiológica, responde a la exposición cíclica de estrógenos y progesterona, experimentando ciclos de proliferación, diferenciación, muerte celular, junto con cambios morfológicos. El endometrio está conformado por dos compartimientos celulares, estroma y epitelio. Este último compartimiento recubre la superficie endometrial invaginándose y formando las glándulas. A su vez, el compartimiento estromal está formado por un tejido conectivo, con abundantes fibroblastos, granulocitos, linfocitos entre otros tipos celulares, albergando a una gran cantidad de vasos sanguíneos (15,16)

La producción cíclica de los esteroides ováricos regula la funcionalidad del tejido, existiendo dos fases: fase pre-ovulatoria, y fase post-ovulatoria. En la primera fase, existe un predominio de estrógenos, conocido como fase proliferativa, y la segunda fase un predominio de progesterona llamada fase secretora (17). Como se trata de una exposición cíclica a esteroides, la acción hormonal está dada por la abundancia de receptores que están presentes en el endometrio, existiendo un aumento de los receptores de estrógenos y progesterona en estroma y epitelio en fase proliferativa, mientras que en fase secretora los

receptores de estradiol disminuyen y los de progesterona lo hacen en epitelio, permaneciendo constante en estroma (18). En cuanto a los receptores de andrógenos, estos se expresan tanto en fase proliferativa como secretora (19, 20). La morfología endometrial es característica de cada fase. Así en fase proliferativa las glándulas son rectas y el estroma es compacto y en fase secretora las glándulas se presentan tortuosas y estroma laxo y edematoso. Al final de esta fase en el endometrio se produce una isquemia producto de esta tortuosidad glandular, debido a esto se produce fragmentación conducente a la muerte celular y necrosis del tejido, conocida como hemorragia tisular, es decir, la menstruación (17).

1.1.1.2 Endometrio de Mujeres con SOP

Desde el punto de vista de la morfología, los endometrios de mujeres con SOP oligo-anovulatorias son similares a los de fase proliferativa de mujeres sin el síndrome. Por otra parte, se ha detectado que existen características bioquímicas en pacientes con SOP como la expresión de receptores de estrógenos y de andrógenos los que aumentan en fase proliferativa en comparación con mujeres que no presentan SOP (22, 23, 24). Otra característica que se ha logrado reportar es la disminución de la expresión epitelial de la subunidad $\beta 3$ de integrina que es reconocida como un marcador de la receptividad endometrial (25). Esto podría relacionarse con la falla en la implantación que presentan las mujeres con SOP. En los endometrios de estas pacientes también se ha medido la biodisponibilidad de esteroides libres, observando que existe una mayor biodisponibilidad de esteroides libres en endometrios SOP (26). Además, se ha encontrado un aumento de los co-activadores de los receptores de esteroides en fase proliferativa (25), indicando una mayor sensibilidad a la acción esteroidea en endometrios de mujeres con SOP (23).

Por otro lado, se ha detectado que este tejido presenta una mayor probabilidad de desarrollar hiperplasia endometrial, al verse aumentado las fosforilaciones de Akt, y al obtener una elevada expresión de Ras junto con disminución de p27, regulador negativo del ciclo celular, entre otros parámetros (24). Finalmente, en endometrio de pacientes con SOP se ha reportado que el receptor de glucosa GLUT-4 dependiente de insulina, exhibe una notable disminución de los transcritos de éste (27), así como, la reducción de los niveles de

la fosforilación del sustrato del receptor de insulina (p-IRS-1), con la consiguiente menor traslocación de vesículas de GLUT4 a la superficie celular (5, 6).

1.1.2 Endometrio e Insulina

Además de las características ya mencionadas asociadas al SOP, en el endometrio de estas mujeres puede verse afectado no sólo el metabolismo de la glucosa sino que la acción de su regulador principal que es la insulina, esencial para la normal funcionalidad celular. El endometrio requiere para su correcta ciclicidad una adecuada sensibilidad a la insulina, que le permita mantener un ambiente apropiado para la implantación del blastocito, ya que se ha propuesto a la glucosa como la principal fuente de energía (28). La insulina en si ejerce acciones metabólicas activando la vía PI3K/Akt y acciones mitogénicas mediante la activación de la ruta MAPK/ERK (29). Respecto a esto, se ha descrito que la estimulación de células estromales del endometrio con altas concentraciones de insulina activan la vía MAPK (30). Debido a esto el estudio de esta vía de señalización es de gran interés dado que la mayoría de las mujeres con SOP presentan resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina es la disminución a la capacidad de respuesta celular frente a una concentración determinada de insulina (29). En condiciones normales, el aumento en las concentraciones de glucosa sanguínea estimula a las células β pancreáticas para secretar insulina, generando un estado de hiperinsulinemia transitoria que permite establecer los niveles normales de glucosa en la sangre manteniendo así la homeostasis glucosídica (31).

1.2 OBESIDAD

La obesidad es una acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo, que origina un aumento en el peso corporal según a lo que correspondería la talla, sexo y edad. En condiciones normales la cantidad de tejido graso varía entre un 20% o 25% del peso corporal de la mujer en edad reproductiva. El indicador universalmente aceptado para definir el grado de obesidad es el Índice de Masa Corporal (IMC), el cual establece una relación entre el peso y la altura al cuadrado (3, 32):

$$\text{IMC} = \text{peso (Kg)} / \text{altura (m}^2\text{)}$$

Siguiendo los criterios de la OMS, existen diferentes grados de obesidad según el valor del índice de masa corporal tal como se expresa en la Tabla 1.

TABLA 1: Clasificación de sobrepeso y obesidad según IMC propuesto por la Sociedad Española y recomendado por el comité de expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS)

TIPO	IMC (Kg/m²)
Normopeso	18,5-24,9
Sobre peso grado I	25-26,9
Sobre peso grado II	27-29,9
Obesidad tipo I	30-34,9
Obesidad tipo II	35-39,9
Obesidad tipo III	40-49,9
Obesidad tipo IV	Mayor a 50

La obesidad es la enfermedad metabólica prevalente en el mundo occidental. En el último tiempo ha habido un aumento en los individuos obesos en sociedades desarrolladas y en vías de desarrollo (4). En Chile, indicadores registrados por el Ministerio de Salud nos advierten que mujeres en edad pre-reproductiva, reproductiva y post-reproductiva muestran un aumento de la obesidad, en comparación a hombres de su mismo estrato etario.

1.3 TEJIDO ADIPOSEO

En los seres humanos, existen dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo marrón (TAM) (33). Ambos tienen la capacidad de metabolizar y almacenar lípidos, pero presentan diferencias en su función. El tejido adiposo blanco es un órgano que tiene como función almacenar la energía sobrante en forma de grasa. En cambio, el tejido adiposo marrón tiene por función disipar la energía en forma de calor.

1.3.1 El tejido adiposo como órgano secretor

Del tejido adiposo hoy se sabe que es un órgano dinámico con funciones pleiotrópicas capaz de expresar numerosos receptores. Además expresan y secretan una gran variedad de moléculas conocidas como adipocitoquinas como por ejemplo: adiposina (34), el factor de necrosis tumoral (TNF- α) (35), leptina (36), el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (37), la resistina (38) y la adiponectina (39, 40, 41). Estas citoquinas pueden actuar de manera local o sistémica y poseen un papel importante en el metabolismo. En esta tesis como objetivo de estudio nos centraremos en la adiponectina, sus receptores y vía de señalización.

1.4 ADIPONECTINA

La adiponectina es una hormona proteica que tiene 244 aminoácidos. Está compuesta por una secuencia señal en el extremo amino terminal, un dominio variable, un dominio colagenoso y un dominio globular situado en el extremo carboxilo terminal. La adiponectina circula en el plasma en diferentes isoformas producidas por modificaciones post-traduccionales (hidroxilaciones y glicosilaciones), las cuales se ensamblan y son secretadas como trímeros de bajo peso molecular de 67 kDa, hexámeros 120 kDa y estructuras oligoméricas de mayor orden 300 kDa (42, 43). El gen de adiponectina está formado por 3 exones y 2 intrones, y está regulado principalmente por los factores de transcripción PPAR, C/EBP y ADD1 (44, 45). La adiponectina es secretada principalmente por el tejido adiposo (42). Pero evidencias recientes muestran que puede ser producida además por otros tejidos tales como tejido fetal (46), médula ósea (47), miocitos y cardiomiocitos (48), entre otros. La adiponectina juega un papel fundamental en el metabolismo de la glucosa y ácidos grasos contribuyendo a la homeostasis energética de los tejidos sensibles a insulina (42). Dicha acción podría ser por aumento de la oxidación de lípidos y de la sensibilidad a insulina, inhibición de la gluconeogénesis y aumento de la captación de glucosa del músculo esquelético, además de la inhibición de la acción de TNF- α que ha sido descrita en el tejido adiposo. Por lo tanto, adiponectina tiene una actividad insulino sensibilizante. Por otra parte, en procesos donde la resistencia a la

insulina e inflamación se unen, esta proteína se ve disminuida, como es el caso de la obesidad, diabetes mellitus y enfermedades coronarias (49, 50, 51, 52, 53). Por lo anterior, es importante determinar las condiciones que se presenta en mujeres con SOP y obesidad donde se presenta resistencia a la insulina e hiperinsulinemia. Dado que las pacientes con SOP presentan alteraciones a nivel endometrial de su homeostasis celular, metabolismo glucosídico y fertilidad, es importante conocer si la condición de obesidad pudiese afectar la función endometrial en pacientes con SOP.

1.4.1 Receptor de adiponectina y vías de señalización de adiponectina

Para que se lleve a cabo a nivel celular la transducción de la comunicación de Adiponectina, es necesaria la presencia de receptores específicos, AdipoR1 y AdipoR2. Estos son receptores de 7 regiones transmembrana pero no están unidos a una proteína G. La expresión de estos receptores no es homogénea entre los diferentes tejidos, AdipoR1 es expresado principalmente en musculo esquelético, AdipoR2 en cambio se expresa principalmente en el hígado. AdipoR1/R2 se han encontrado en otros tejidos, como hipotálamo, tejido adiposo (54, 55), placenta, células de la granulosa (56) células beta pancreáticas (57). En tejido endometrial humano en condiciones normales se ha reportado la presencia de los receptores a lo largo del ciclo menstrual (58).

La vía de señalización de adiponectina (Figura 1) consiste en el reclutamiento de APPL1, proteína adaptadora que promueve diferentes señales, por ejemplo la vía de AMPK con la consiguiente inhibición de acetil coenzima A carboxilasa (ACC) y a un aumento de la beta-oxidación de ácidos grasos (59, 60). Además, la activación de AMPK puede llevar al aumento de la sensibilidad de insulina, inhibiendo la actividad de S6K, quinasa que puede fosforilar en serina al sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1), inhibiendo la acción de la insulina. Por otra parte, se ha determinado vías de activación que a través de APPL1 aumentan la translocación hacia la superficie celular de GLUT-4, que es el transportador de glucosa sensible a insulina. Esto es a través de las vías de fosforilación de p38MAPK o Rab5, favoreciendo la captación de glucosa (42, 47, 61, 62). Además, se ha determinado que APPL1 se puede unir a PI3K y Akt estimulando la captación de glucosa.

Actualmente no se dispone de antecedentes sobre la señalización de adiponectina en endometrio humano de mujeres controles o bien en endometrios de aquellas mujeres que presentan SOP y son obesas. En este estudio nos centraremos en la vía de señalización a través de la activación de p38MAPK.

1.5 MOLECULAS DE LA VÍA DE SEÑALIZACION DE ADIPONECTINA

1.5.1 APPL1

La adiponectina ejerce su efecto a través de una directa interacción con el dominio extracelular COOH de los receptores de adiponectina, lo que conduce a un cambio conformacional del receptor que induce la unión intracelular de APPL1 a estos receptores, interactuando directamente con la región intracelular NH₂-terminal de Adipo-R1 o Adipo-R2. En adipocitos, esta molécula se ha descrito como una proteína adaptadora o *scaffold*, así APPL1 transmite la señal desde receptores de adiponectina (23). Es una proteína muy hidrofóbica de 709 aminoácidos, contiene un dominio NH₂-terminal, un dominio BAR, dominio PH, un dominio PTB, COOH terminal. El dominio BAR se ha descrito que está involucrado en la unión de pequeñas GTPasa Rab5 (63) que tienen que ver por ejemplo, con la salida de vesículas de secreción como GLUT-4. El dominio PH, el cual reconoce fosfoinosítidos que están en la membrana, y un dominio PTB que reconoce tirosina fosforilada de moléculas blanco. La función general del dominio PTB es actuar como un adaptador o andamiaje para la unión de proteínas, en particular los de las vías de señalización, por ejemplo interactúa con proteínas, tales como Akt (64, 65, 66), las subunidades de PI3K (67, 68) entre otras, lo que indica la capacidad de actuar de APPL1 como un adaptador o proteína andamio para distintas vías de señalización. El dominio PTB de APPL1 puede interactuar con un diverso conjunto de receptores, como por ejemplo receptor de NGF, TRKA (69, 70), receptor FSH (71), AdipoR1 y AdipoR2 (72, 73), entre otros.

Por lo dicho anteriormente, APPL1 tiene vital importancia en lo que es la comunicación intracelular (6), y lo más relevante que se ha descrito de APPL1 para este estudio, es que está involucrada en la regulación del metabolismo celular y la sensibilidad

de la insulina, activando moléculas que están involucradas en la captación de glucosa por la translocación de GLUT4 (complejo APPL1-Rab5-GTP) (74). Por otro lado, puede modular la actividad de AMPK, la cual puede inhibir a S6K, y por consiguiente, estimular la actividad de IRS-1, como ya se mencionó anteriormente. Esta es una de las razones por las cuales la disminución de la concentración de adiponectina circulante descrita en mujeres obesas puede jugar un papel crucial en la respuesta a insulina, ya que estaría alterada negativamente la captación de glucosa lo que pudiese ser agravado con la condición SOP.

Un estudio importante en el cual centraremos esta tesis es el realizado por Xin et. al, (2010) en células musculares C2C12. En este estudio se describió que APPL1 se une a diferentes quinasas, como una MAPKKK (TAK1), esta unión permite la fosforilación de TAK1 en T184/T187, y el reclutamiento de MEK3, permitiendo su fosforilación en S189 y a la vez, reclutando a p38MAPK, y promoviendo la activación de p38-MAPK en T180/Y182. Estas moléculas se unen a APPL1, demostrando la importancia que tiene esta proteína como moduladora de las señales celulares (Figura 1). Mutaciones en el dominio PH o PTB de APPL1 no induce la activación de esta vía de señalización (75). Es importante destacar que este proceso no ha sido estudiado en endometrio de mujeres, y no se sabe en qué condiciones se encuentran el contenido proteico de esta vía en este microambiente celular de mujeres con obesidad y SOP.

1.5.2 TAK1/TKK1

Proteína caracterizada como una MAPK kinasa kinasa (MAP3K), la activación de TAK1 ya fue mencionada. Diversos estudios recientes han demostrado que TAK1 es activada por numerosos estímulos, incluidos los ligandos IL-1 β , TNF- α , TLR (76). Por otro lado, se ha observado que la acción de adiponectina a través de APPL1, estimula la activación de TAK, fosforilando así a MKK3, provocando la activación de la vía p38-MAPK (75).

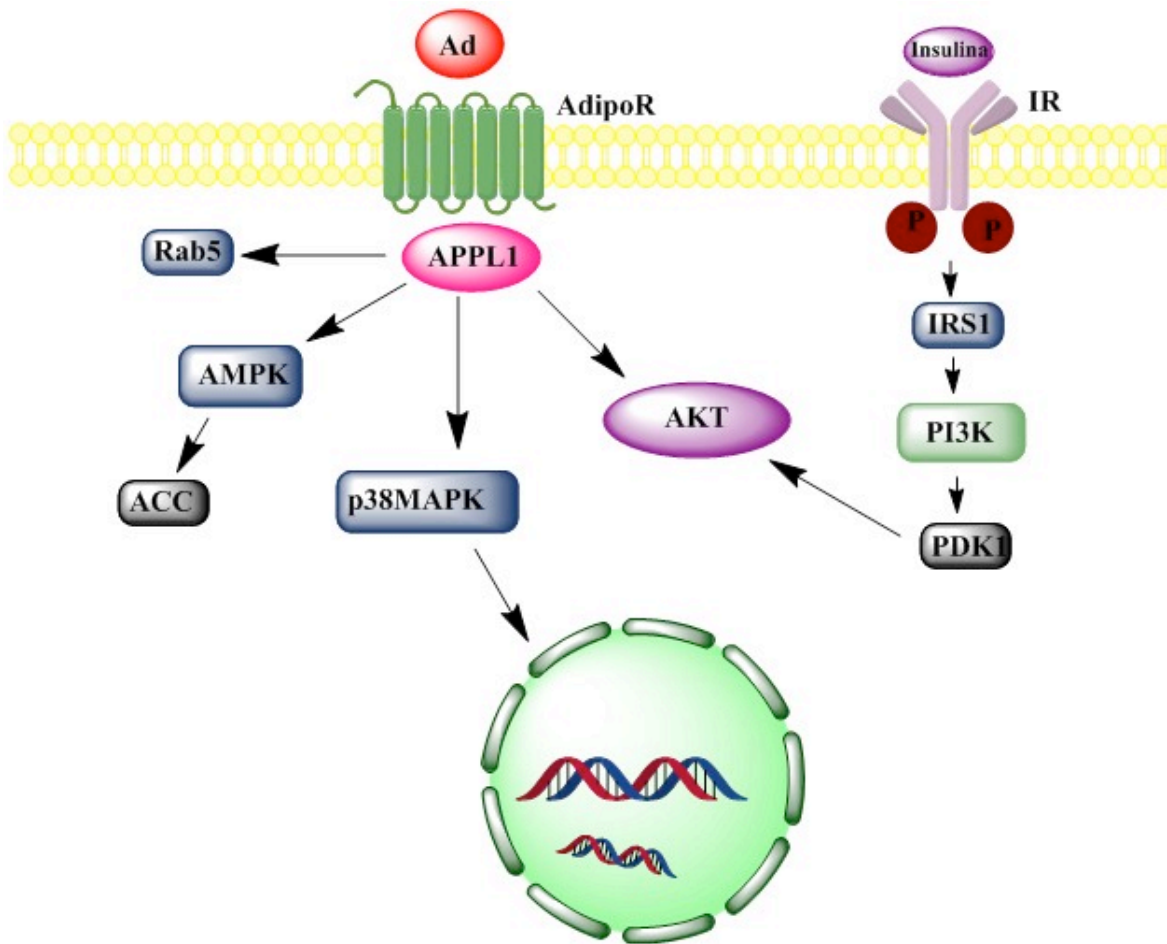


FIGURA 1. Posibles vías de señalización de adiponectina, mediado por APPL1, relacionada con la vía de señalización del receptor de insulina.

1.5.3 MEK3/MKK3

Caracterizada como una MAPK, esta proteína es estimulada por estrés ambiental, citoquinas inflamatorias, y por estímulos mitogénicos. La acción de adiponectina induce la fosforilación de MEK3 a través de la vía APPL1/TAK1/MEK3, y uno de sus blancos es p38-MAPK, el cual induce la fosforilación en los residuos Thr-180 y Tyr-182 de p38-MAPK (21, 75).

1.5.4 p38MAPK

La quinasa p38MAPK es una MAPK, la modulación de ella consiste en la activación de varias MAPKKK, que inducen la activación de p38. En su estructura, p38 tiene sitios de consenso para las MAPK y sitios blancos que actúan como un factor

transcripcional. Se conocen 4 isoformas de p38 (α , β , γ , δ); estas isoformas de p38 son activadas fuertemente por estrés ambiental y citoquinas inflamatorias, pero aparentemente no por estímulos mitogénicos. El mecanismo de activación de p38 consiste en la activación de MAPKKK, tales como MKK3 y MKK6 las que muestran un alto grado de especificidad por p38. Mientras que MKK6 activa a todas las isoformas de p38, MKK3 es más selectiva, pues preferentemente fosforila a las isoformas α y β de p38. Se ha observado que p38 es activada con estímulos de adiponectina donde la activación es a través de MEK3 (75). Es interesante constatar que p38 fosforila varios blancos celulares como factor transcripcional para NF- κ B (77, 78, 79).

1.5.5 NF- κ B:

Se ha descrito que en condiciones basales y en distintos tipos celulares, NF- κ B se encuentra en el citoplasma unido a su inhibidor I κ B (IKK). Por señales como citoquinas, se activan quinasas que fosforilan a I κ B (IKK) en la subunidad I κ B α en Ser32 y Ser36, promoviendo la degradación del inhibidor. Como consecuencia de esto, NF- κ B ingresa al núcleo donde induce la transcripción de diversos genes como citoquinas pro-inflamatorias, por ejemplo TNF- α , IL-6, e IL-1 β (90, 91). El factor transcripcional NF- κ B puede ser clave en mecanismos involucrados en obesidad y SOP.

En base a los antecedentes descritos, se propone que la disminución de adiponectina en mujeres con obesidad y con SOP, tiene una incidencia directa en la disminución de la vía de señalización de la adiponectina (APPL1-TAK1-MKK3-p38MAPK). Basado en lo anterior, se puede inferir que la condición de obesidad puede influir en el decaimiento de esta vía, lo cual lleva a una disminución en la captación de glucosa con la consiguiente disminución en los niveles de glucosa a nivel celular. Esto puede ser clave ya que en el caso del endometrio se puede alterar la implantación del embrión, lo que puede agravarse en la condición SOP.

2. HIPOTESIS

Por lo analizado anteriormente, la hipótesis propuesta es:

“La condición SOP sumada a la obesidad promueve una inhibición de la vía de señalización de adiponectina en endometrios de estas mujeres, disminuyendo la activación de APPL1, TAK1, MEK3, p38MAPK”.

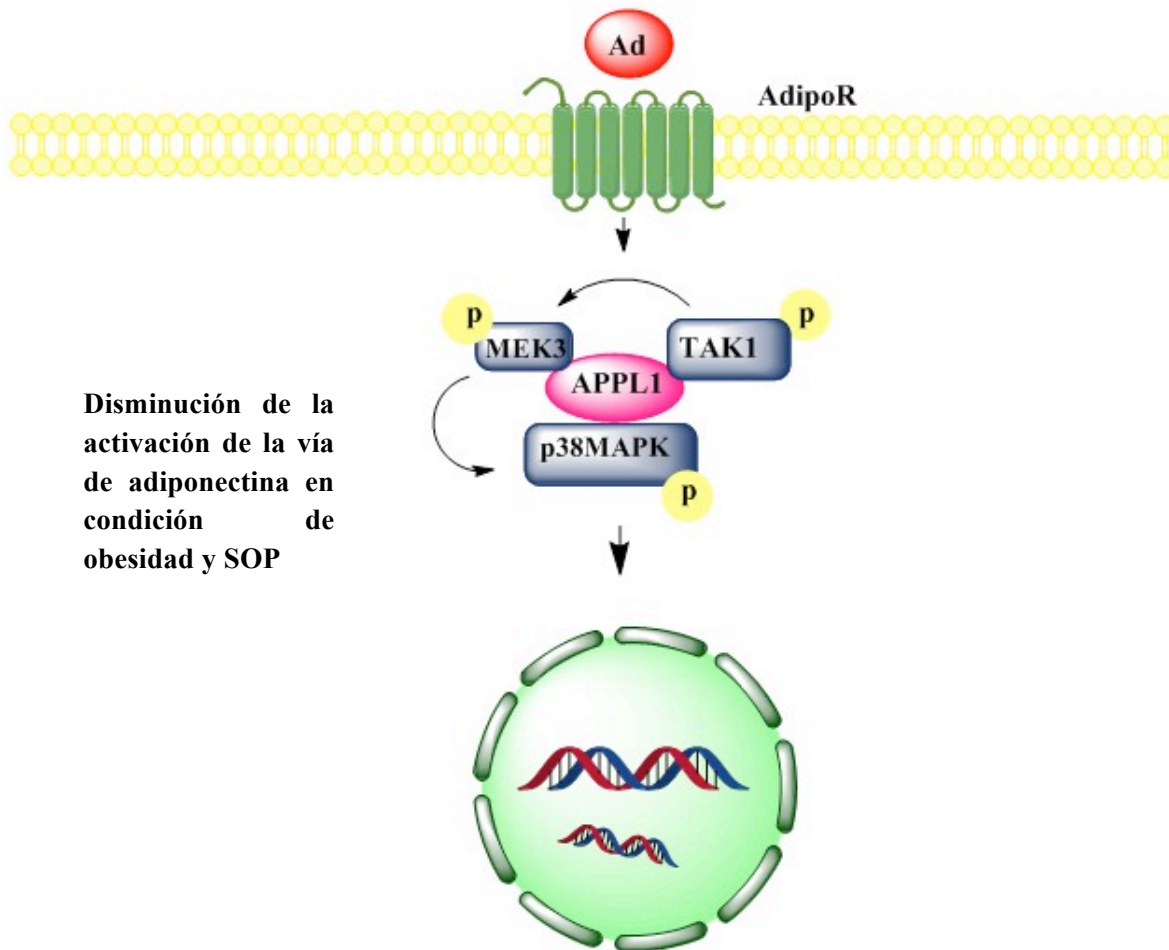


FIGURA 2. Propuesta del estudio. Vía de señalización TAK1/MEK3/p38MAPK modulada por adiponectina, donde la condición de obesidad y SOP influiría negativamente en la activación de esta vía de señalización.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar si la activación de la vía de señalización de adiponectina APPL1-TAK1-MKK3-P38MAPK en endometrios de mujeres con SOP, se modifica por la condición de obesidad.

3.2 Objetivos Específicos

1.- Evaluar el contenido génico y proteico de receptores de adiponectina en endometrios obtenidos de mujeres obesas con SOP y mujeres peso normal (qPCR/IHQ/WB).

2.- Determinar si los niveles génicos/proteicos de moléculas de la vía de señalización de adiponectina (APPL1, TAK1/MKK3, p38 MAPK) en endometrios de mujeres obesas y con SOP difieren de aquellos observados en mujeres con peso normal y SOP (qPCR/ IHQ/WB).

3.- Examinar si los niveles endometriales del transcrito y/o de proteína de NF-kB se modifican en condiciones de obesidad y SOP respecto a las mujeres controles (qPCR/IHQ).

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Reactivos Generales

BioRAD: azul de bromo fenol, persulfato de amonio.

Merck: KCl, etanol absoluto (p.a.), acetona (p.a.), cloroformo (p.a.), KH_2PO_4 , ditioneitol, glicerol, Tween 20, Triton X-100, Tris HCl.

Sigma-Aldrich: Rojo Ponceau, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, HEPES, EGTA, albumina de suero de bovino, EDTA.

Winkler: Tris-base, Bis, *N*, *N'*-metilen-bis-acrilamida, acrilamida, NaCl, SDS, glicina, sacarosa, Na_2HPO_4 .

Invitrogen: TEMED.

Roche: Cóctel inhibidor de proteasas 25X, Cóctel inhibidor de Fosfatasa 25X.

Thermo Scientific: Estándar de masa molecular para geles de poliacrilamida, kit de ensayo de proteínas BCA.

Biological Industries: Kit de detección de quimioluminiscencia para HRP EZ-ECL.

4.2. Obtención de biopsias endometriales

Los tejidos endometriales se obtuvieron de mujeres que acudieron al Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (HCUCH), Campus Norte. Previamente, todas las mujeres voluntarias participantes en el estudio debieron firmar un Consentimiento Escrito, aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y del HCUCH en el marco del Proyecto FONDECYT #1130053.

4.2.1. Obtención de muestras de mujeres controles (Grupo A)

Estas muestras correspondieron a tejidos provenientes de endometrios de mujeres voluntarias, con IMC normal (Delgadas), sin hiperandrogenismo ni hiperinsulinismo y sin tratamiento hormonal previo a la obtención de la muestra (n=9). Las muestras se obtuvieron por cánula de Pipelle.

4.2.2. Obtención de muestras de mujeres con SOP (Grupo B)

Las muestras endometriales provenientes de mujeres con SOP (n=4) se obtuvieron mediante una cánula de Pipelle de mujeres diagnosticadas con SOP, sin tratamiento hormonal ni farmacológico a la fecha del estudio, cumpliendo con la condición de hiperandrogenismo evidenciada por signos clínicos y/o bioquímicos (hirsutismo, testosterona sérica > 0,6 ng/mL y/o índice de andrógenos libres (IAL) > 4,5) y disfunción ovárica, la cual es medida por oligo o anovulación u ovarios poliquísticos a la ultrasonografía. Estos criterios han sido establecidos por la Sociedad de Exceso de Androgenos-PCOS (AES-PCOS) para el diagnóstico de la patología (6). Este grupo de mujeres presentó un IMC y niveles de insulinemia dentro de los rangos normales, por lo que se les denominó Pacientes Delgadas con SOP y sin Hiperinsulinemia. Es importante considerar que este grupo de pacientes es muy difícil de reclutar, ya que la mayoría de las pacientes SOP presentan sobrepeso-obesidad.

4.2.3. Obtención de muestras de mujeres con obesidad (Grupo C)

Las muestras endometriales de mujeres obesas sin SOP (n=9), se obtuvieron mediante una canula de Pipelle. Estas pacientes presentaron niveles normales de andrógenos e insulina en la sangre y no presentaron hirsutismo ni disfunción ovulatoria. El IMC fue mayor o igual a 30 lo que significa que son pacientes obesas.

4.2.4 Obtención de muestras de mujeres con obesidad y SOP (Grupo D)

Las muestras (n=10) se obtuvieron mediante una canula de Pipelle de mujeres diagnosticadas con SOP de acuerdo a los criterios ya mencionados. El motivo de la visita al Servicio de Obstetricia y Ginecología del HCUCH fue en la mayoría de los casos la presencia de infertilidad. Estas mujeres presentaban hiperandrogenismo (clínico o bioquímico, IAL mayor o igual a 4,5), obesidad con un IMC mayor o igual a 30 y con resistencia a la insulina (HOMA mayor o igual a 2,77). A todos los grupos de estudio se les realizó un prueba de tolerancia a la glucosa oral, previo a la extracción de una muestra de sangre, a la cual se le midió glicemia e insulinemia basal y post carga oral de 75 gramos de glucosa a los 120 min (insulinemia 2 h post sobrecarga de glucosa > 60 μ UI/mL y

glicemia/insulinemia en ayunas < 4,5), posteriormente a todas las pacientes se le midió el índice HOMA.

Todos los tejidos endometriales se obtuvieron durante la fase proliferativa del ciclo menstrual, y los obtenidos de las pacientes con SOP correspondieron a aquellos compatibles morfológicamente con la fase proliferativa del ciclo.

TABLA 2: Clasificación de los distintos Grupos de Pacientes

Grupos:	Pacientes:	Presentan:
Grupo A	Mujeres no obesas sin SOP	IMC <25; HOMA <2,77; IAL <4,5
Grupo B	Mujeres no obesas con SOP	IMC <25; HOMA <2,77; IAL 4,5
Grupo C	Mujeres obesas sin SOP	IMC >30; HOMA <2,77; IAL <4,5
Grupo D	Mujeres obesas con SOP	IMC >30; HOMA > 2,77; IAL 4,5

IMC= Índice de Masa Corporal

HOMA: Modelo Homeostático o Índice HOMA, evalúa resistencia a la insulina. Valor de Referencia: <2,77, si es mayor indicará resistencia a la insulina.

IAL: Índice de Andrógenos Libres, refleja la concentración de andrógenos libres en la sangre. Valor de Referencia: <4,5, si es mayor indica hiperandrogenismo. El cálculo de este índice considera la concentración plasmática de SHBG y de testosterona total.

4.2.5. Evaluación de los tejidos obtenidos y fechaje histológico

Se realizaron cortes de 5 µm de espesor en las muestras de tejidos endometriales incluidas en parafina, y luego teñidos con hematoxilina-eosina para la evaluación de la arquitectura endometrial y fechaje histológico realizado por un médico anatómo patólogo experimentado, de acuerdo con los criterios de Noyes (82), considerando además la fecha de la última menstruación referida por la paciente.

4.3. Diseño experimental

Una vez obtenida la muestra, cada tejido se dividió de la siguiente forma: un trozo de tejido se incluyó en parafina, posteriormente se realizaron cortes de 5 µm de espesor, a un corte se realizó tinción de hematoxilina – eosina, el cual se destinó para análisis de morfología y fechaje histológico. El resto de los cortes se utilizaron para análisis de expresión proteica por inmunohistoquímica (IHQ). El otro trozo se congeló en nitrógeno líquido y se mantuvo a -80°C , para posteriormente realizar estudios de expresión proteica y génica mediante Western Blot (WB) y qPCR, respectivamente (Figura 3).



FIGURA 3: Diseño Experimental. Endometrios en fase proliferativa (EC), Western blot (WB), Inmunohistoquímica (IHQ), reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Grupos de estudios A: mujeres delgadas, B: mujeres delgadas con SOP, C: mujeres con obesidad, D: mujeres con obesidad y SOP.

4.4. Estudio Inmunohistoquímico (IHQ)

Este estudio se realizó con el objetivo de identificar la localización y semicuantificar las proteínas de la vía de señalización de adiponectina, en los diferentes grupos de estudio. La técnica se realizó en cortes de tejidos previamente incluidos en parafina. Los tejidos se desparafinaron en xilol y rehidratados en concentraciones seriadas de alcohol. Para la recuperación antigénica, las muestras se incubaron en buffer citrato 10 mM a pH 6,0 a $96-97^{\circ}$ por 20 min. Se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al

3% y los sitios inespecíficos usando el bloqueador específico del kit de Ultravision LP detectionsystem, (ThermoScientific) por 10 min. Posteriormente, se incubó por 20 h a 4°C, con los anticuerpos primarios (ver las condiciones utilizadas para la inmunodetección en Tabla 3).

Se utilizó como sustrato final de la reacción el cromógeno diaminobencidina, DAB (DakoCytomation, Inc., CA, USA), dando una tinción positiva de color café. Los tejidos se contratiñeron con hematoxilina. Cada placa contó con un control negativo incubado sólo con PBS-BSA 2%, sin anticuerpo primario. Las fotografías se capturaron y evaluaron con el programa computacional Image-ProPlus 6.2. Para la cuantificación se obtiene el Índice de densidad Óptica (IOD) en unidades arbitrarias, el cual permite semicuantificar la tinción generada por el anticuerpo específico dado por la muestra en estudio.

4.5. Estudio por Western Blot (WB)

Para la extracción de proteínas, trozos de tejido de aproximadamente 30 mg se homogenizaron en un buffer de lisis (HEPES 20 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, PSMF 15 μ M, Triton X-100 1X, Na₃VO₄ 0,4 mM) y un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche, IN). Este homogenizado se centrifugó a 1000 g por 20 min a 4°C y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 10.000 g por 20 min a 4°C. Para la determinación de la concentración proteica se utilizó el kit BCA ProteinAssay Kit (Pierce, IL). Para este ensayo se utilizó un volumen de muestra equivalente a 50 μ g de proteína, denaturándose a 95°C y cargándose en un gel SDS-PAGE (SodiumDodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis) al 8% por 2 h aproximadamente a 100 volts. Posteriormente, las transferencias se realizaron en membranas de nitrocelulosa durante 1 h a 400 mA, donde la transferencia se confirmó por Rojo Ponceau. Para bloquear los sitios inespecíficos se utilizó leche descremada al 5% durante 1 h en TTBS 20 mM Tris, pH 7,5; 137 mM NaCl; 0,1% Tween 20. Las membranas se lavaron en 3 tiempos por 5 min con TTBS, seguido de la incubación con anticuerpos primarios donde la dilución de cada anticuerpo utilizado por WB se muestra en la Tabla 4. Después de la incubación, las membranas se lavaron en 3 tiempos por 5 minutos con TTBS. Como control interno se utilizó la proteína β -actina, la cual se detectó con un anticuerpo anti- β -actina monoclonal (Sigma MO, USA) en dilución

1:20000. Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa anti-rabbit IgG (AmershamBiosciences), y anti-mouse IgG 1:20000 (AmershamBiosciences). La detección de las señales de las proteínas se hizo por quimioluminiscencia y las bandas obtenidas se semicuantificaron por densitometría con el programa UN-SCAN-IT gel 5.1 (SilkScientificCorporation).

4.6. PCR semicuantitativo

Para el PCR cuantitativo se utilizó 10 ng de DNAc como molde. Además, se agregó partidores a una concentración final de 0,12 μM y se mezcló con Brilliant II Ultra-fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies) y se completó a un volumen final de 20 μL . Se utilizó un perfil térmico estándar para todas las amplificaciones, que consistió de las siguientes fases: denaturación inicial a 95°C por 10 min., 40 ciclos de denaturación a 95°C por 15 seg., alineamiento a 60°C por 15 seg. y extensión a 72°C por 20 seg. Cada reacción se realizó en duplicado con su blanco, y se llevó a cabo su curva de fusión para corroborar la presencia de un solo amplicón. La cuantificación se calculó en base al método del $2^{-\Delta(\Delta\text{Ct})}$ corregido por las eficiencias de los partidores (Schmittgen and Livak 2008). Los partidores utilizados con sus respectivas eficiencias se muestran en la (Tabla 5).

4.7. Análisis Estadístico

El cálculo del n muestral se realizó mediante la fórmula de comparación de medias, para esto se utilizó la fórmula expresada en la Figura 3. Los resultados se expresarán en todos los ensayos como promedio \pm error estándar de la media (EEM) y se compararon endometrios de mujeres delgadas v/s endometrios de mujeres delgadas SOP; endometrios mujeres delgadas v/s endometrios mujeres Obesas; endometrios mujeres delgadas SOP v/s endometrios mujeres obesas SOP; endometrios mujeres obesas v/s endometrios mujeres obesas SOP. Para el análisis se utilizó el programa computacional estadístico GraphPadPrisma versión 4.0 (GraphPad Software Incorporated). Las muestras se analizaron por: test no paramétrico de Kruskal-Wallis con post test de comparación múltiple de Dunn's, Test no paramétrico de Mann Whitney y t-Test pareado, todos con un intervalo de confianza del 95%.

$$n = \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 S^2}{d^2}$$

FIGURA 4. Calculo para "n" muestral

TABLA 3: Anticuerpos utilizados para el análisis por inmunodetección (IHQ)

Proteína	PM	N° Catalogo	Fabricante	Hospedero	Dilución
Adiponectin	56 kDa	NBP1-	NovusBiologica	Rabbit	1:100
a	28 kDa	40607	ls	Monoclonal	
AdipoR1	42 kDa	ADIPOR12	AlphaDiagnosti	Rabbit	1:500
		A	c	Policlonal	
AdipoR2	42 kDa	ADIPOR22	AlphaDiagnosti	Rabbit	1:100
		A	c	Policlonal	
APPL1	82 kDa	#3858	Cell	Rabbit	1:200
			Signaling	Monoclonal	
pTAK1	72 kDa	4531S	CellSignaling	Rabbit	1:100
(T184/187)					
TAK1	72 kDa	Ab109526	Abcam	Rabbit	1:200
				Monoclonal	
pMEK3	39 kDa	Ab131283	Abcam	Rabbit	1:200
(S189)				Policlonal	
MEK3	39 kDa	ab109557	Abcam	Rabbit	1:500
				Policlonal	
α-p38	40 kDa	#9218	CellSignaling	Rabbit	1:50
MAPK				Policlonal	
α-	34 kDa	#4511	CellSignaling	Rabbit	1:100
pp38MAPK				Monclonal	
(T180/Y18)					
NF-κB	65 kDa	#8242	CellSignaling	Rabbit	1:500
(p65)				Monclonal	

TABLA 4: Anticuerpos utilizados para el análisis por WB

Proteína	PM	N° Catalogo	Fabricante	Hospedero	Dilución
Adiponectina	56 kDa 28 kDa	NBP1-40607	NovusBiologicals	Rabbit Monoclonal	1:200
AdipoR1	30 kDa	ADIPOR12A	AlphaDiagnostic	Rabbit Policlonal	1:200
AdipoR2	30 kDa	ADIPOR22A	AlphaDiagnostic	Rabbit Policlonal	1:100
APPL1	82 kDa	#3858	Cell Signaling	Rabbit Monoclonal	1:200
pTAK1 (T184/187)	72 kDa	4531S	CellSignaling	Rabbit	1:200
TAK1	72 kDa	Ab109526	Abcam	Rabbit Monoclonal	1:250
pMEK3 (S189)	39 kDa	Ab131283	Abcam	Rabbit Policlonal	1:300
MEK3	39 kDa	ab109557	Abcam	Rabbit Policlonal	1:400
α-p38 MAPK	40 kDa	#9218	CellSignaling	Rabbit Policlonal	1:200
α- pp38MAPK (T180/Y182)	34 kDa	#4511	CellSignaling	Rabbit Monoclonal	1:200
β-actina	42 kDa	A5441	Sigma	Mouse Monoclonal	1:20000

TABLA 5: Partidores utilizados para análisis por PCR semicuantitativo

Gen Objetivo	Partidor sentido (5' ->3')	Partidor anti sentido (5' ->3')	PB
<i>AdipoR1</i>	AAACTGGCAAC ATCTGGACC	GCTGTGGGGAG CAGTAGAAG	300 pb
<i>AdipoR2</i>	ACAGGCAACAT TTGGACACA	CCAAGGAACAA AACTTCCCA	267 pb
<i>APPL1</i>	TTAGCTGCCCCG GCCATCCATA	ATCTTTTCCCC CTCATTGTTTG	260 pb
<i>α-p38</i>	AGCCCTTGCAC ATGCCTACTTT	CACACTAACAC GCACGCACACG	203 pb
<i>p65 (NF-KB)</i>	CCGGCCATGGA CGAACTGTT	TGGGGTGGGTC TTGGTGGTAT	184 pb
<i>GAPDH</i>	GAGTCAACGGA TTTGGTCGT	ATCCACAGTCT TCTGGGTG	548 pb

5. RESULTADOS

Las características tanto clínicas como metabólicas de las pacientes incluidas en este estudio se muestran en las Tablas 6 y 7. En ellas se observa que las pacientes con SOP poseen sobrepeso u obesidad, mayor nivel de testosterona e índice de andrógenos libres (IAL). De acuerdo a estos parámetros y al diseño experimental propuesto, se clasificaron a las pacientes en los cuatro grupos de estudio mencionados. Además, en esta tesis se evaluaron los niveles proteicos de Adiponectina, y proteínas involucradas en su vía de señalización. Para esto, se analizó en los cuatro grupos experimentales la tinción por IHQ, pero en las técnicas WB y PCR semicuantitativo, las muestras de mujeres delgadas con SOP no estaban disponibles, por lo tanto, en estas técnicas solo se trabajó con tres grupos experimentales: Grupos A, C y D.

TABLA 6. Antecedentes clínicos y endocrinos de los grupos estudiados

Parametros	Delgadas	Delgadas SOP	Obesas	Obesas SOP
Edad (años)	26,6 ± 5,6	25,75± 5,56	27,9 ± 5,2	25,9±2,4
IMC	22,4± 2,1	25,70±0,42	34,7± 4,8 [§]	32,6±3,4*
E₂ (pg/mL)	168,7 ± 77	183,00 ± 111,09	151,3 ± 73	143,6 ± 40
A₄ (ng/mL)	4,9 ± 13	3,88 ± 0,97	3,5 ± 1,6	5,3±1,4
T (ng/mL)	36,6 ± 10,7	40,00±10,68	22,6 ± 8,4	49,4 ± 9,2
SHBG (mmol/L)	68,9± 0,8	20,73±7,5	43,0 ± 24	25,7±11
IAL	1,9 ± 0,6	7,33±3,09	2,3 ±0,7	6,7 ± 7,8
Adiponectina (ng/ml)	85,0±24,7	64,03±31,20	73,5 ±31,7	47,7 ±7,8

Los valores se expresan como promedio ± EEM.

Abreviaciones: índice de masa corporal (IMC), estradiol (E₂), androstenediona (A₄), testosterona (T), globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG por sus siglas en inglés), índice de andrógenos libres (IAL).

*p< 0.05 entre mujeres delgadas SOP y mujeres obesas con SOP, § p< 0,05 entre mujeres delgadas y mujeres obesas

TABLA 7. Antecedentes metabólicos de los grupos estudiados

Parámetros	Delgadas	Delgadas SOP	Obesas	Obesas SOP
Glucosa en ayuno (mg/dL)	96,1 ± 12,4	90,25± 8,77	89,1 ± 7,2	92,9 ± 11,7
Glucosa 120 min	96,1± 15,7	106,5± 26,41	124,3± 26,5	122 ± 21,6
Insulina en ayuno (μUI/mL)	7,8 ± 3,5	4,97± 2,41	10,5 ± 3,3	17,1 ± 6,0*
Insulina 120 (μUI/mL)	45,6 ± 15,4	47,88±22,31	59,4 ± 20,6	150,5 ± 86,6
HOMA IR	1,49 ± 1,1	1,10±0,51	2,3 ± 0,8	4,5 ± 1,1*

Los valores se expresan como promedio ± EEM.

HOMA-IR, Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance = Insulinemia μUI/mL x glicemia (mg/dL)/ 405. * p< 0,01 entre mujeres delgadas SOP y mujeres obesas con SOP

5.1 NIVELES PROTEICOS DE ADIPONECTINA

5.1.1 Niveles proteicos de adiponectina por inmunohistoquímica

Para evaluar los niveles proteicos de Adiponectina en tejido endometrial se determinó por IHQ la tinción positiva y localización de esta adipoquina (Figura 5) en los diferentes grupos experimentales. Además, se semicuantificó los niveles proteicos de Adiponectina por el programa Image-ProPlus 6.2, expresado en Unidades Arbitrarias (UA) de IOD (*Integrated Optical Density*). En todas las muestras analizadas se observó tinción positiva para esta adipoquina, siendo de tipo granular y citoplasmática detectada en epitelio y estroma (Figuras 5 A, B, C, D). La semicuantificación (IOD UA) se muestra en las Figuras 5 A, B y C; se determinó que existen cambios significativos en el compartimiento estromal donde se observa una disminución de esta adipoquina en mujeres delgadas con SOP versus mujeres delgadas (p<0,01), y que existe un aumento en mujeres con obesidad SOP versus mujeres que solo presentan obesidad (p<0,01). En el caso del epitelio se obtuvo una diferencia significativa entre delgadas versus mujeres obesas (p<0,01).

Adicionalmente, en la Figura 6 C se muestran los resultados como niveles proteicos totales de adiponectina, considerando lo obtenido en el epitelio y estroma, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

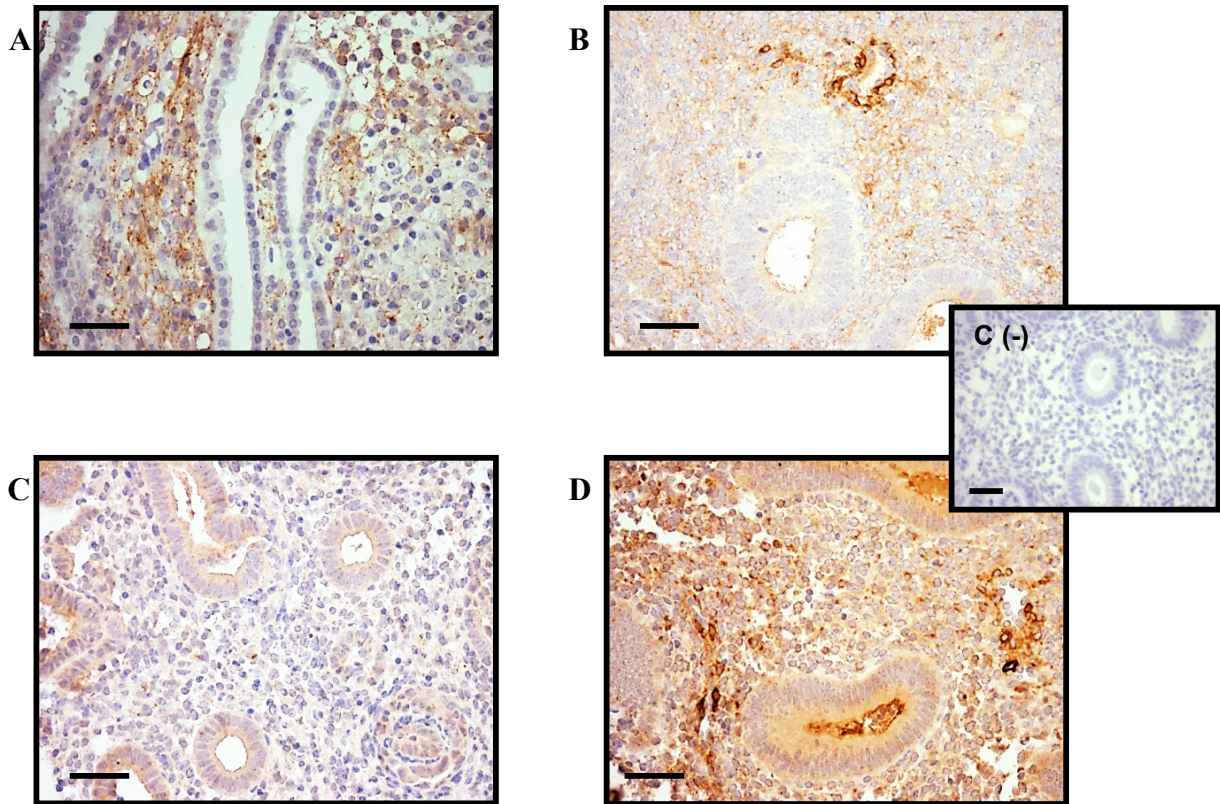


FIGURA 5: Detección de Adiponectina por IHQ en endometrios de los distintos grupos estudiados. (A) Mujeres delgadas; (B) Mujeres delgadas con SOP; (C) Mujeres obesas; (D) Mujeres obesas con SOP. C (-) Control negativo. Barra: 50 μ m.

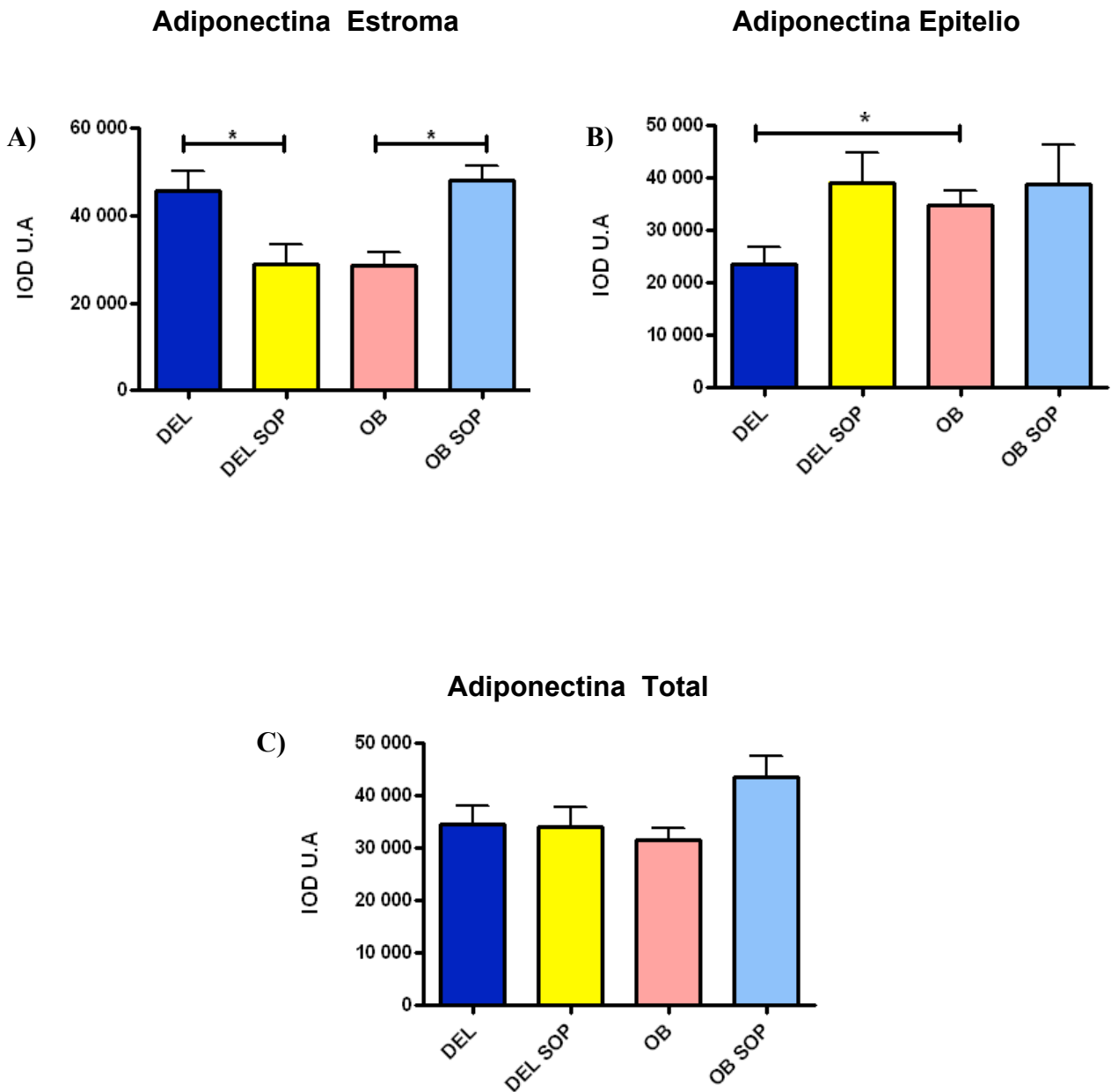


FIGURA 6: Semicuantificación de los niveles proteicos de adiponectina en endometrios obtenidos de los distintos grupos de estudio.

A) Estroma endometrial; B) Epitelio endometrial; C) cuantificación en conjunto del estroma más epitelio estromal. Las Figuras A, B y C representan el promedio IOD UA \pm EEM de DEL (n=3); DEL SOP (n=3); OB (n=3); OB SOP (n=3). *p<0,01. Los datos se analizaron por test no paramétrico de Kruskal Wallis.

5.1.2. Determinación de los niveles proteicos de Adiponectina 28 kDa en endometrios humanos

Adiponectina presenta dos tamaños moleculares, 28 kDa y 56 kDa, que pueden ser identificados por WB. Desde el punto de vista funcional, no está claro si alguna de las dos proteínas tiene un efecto mayor en los tejidos. Al parecer, ambas tendrían una actividad biológica equivalente. Tal como se mencionó, este ensayo se realizó en endometrios de tres grupos de pacientes. Al realizar el análisis de los niveles proteicos de adiponectina 28 kDa, no se observó diferencia significativa entre los niveles proteicos del grupo de mujeres delgadas versus mujeres que presentan obesidad (Figura 7 B). Así mismo, los niveles de adiponectina de mujeres obesas versus mujeres que presentan obesidad y SOP no fueron diferentes significativamente. No obstante se determinó una disminución de 60% en el grupo obesas SOP. Los niveles de adiponectina fueron normalizados con los niveles de la proteína β -actina.

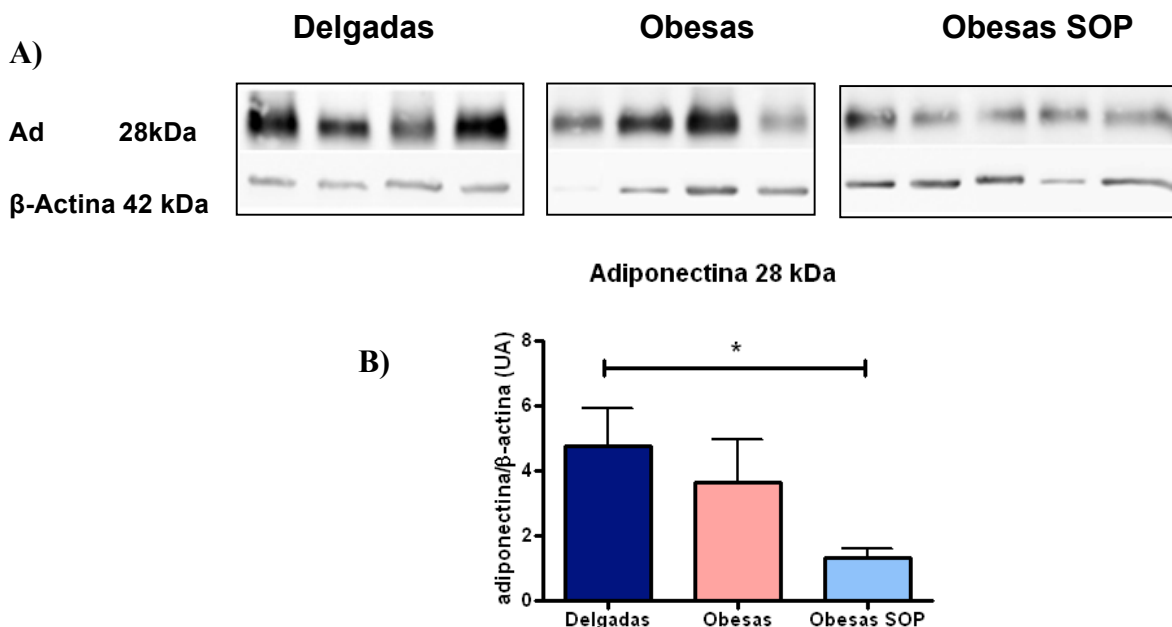


FIGURA 7: Niveles proteicos de adiponectina de 28 kDa en endometrios de mujeres de los distintos grupos de estudio. (A) Geles representativos de Adiponectina 28 kDa y posterior representación gráfica del análisis por WB en (B). La Figura representa el promedio IOD UA \pm EEM de las muestras Delgadas (n=4), Obesas (n=3), Obesas SOP (n=4). * $p < 0,01$. Los datos se analizaron por test no paramétrico de Kruskal Wallis.

5.1.3 Niveles proteicos de adiponectina 56 kDa

Los niveles proteicos de adiponectina 56 kDa se evaluaron mediante WB (Figura 8). El análisis muestra una disminución de adiponectina en endometrios de mujeres que presentan obesidad y SOP (alrededor de 50% respecto al grupo de obesas), pero estos datos no son estadísticamente significativos. Lo mismo ocurre cuando se evaluó mujeres delgadas versus mujeres con obesidad (Figura 8 B). Por otro lado, al evaluar los niveles proteicos de adiponectina se encontró que existe una disminución de estos cuando se comparó mujeres delgadas versus mujeres obesas con SOP ($p < 0,01$).

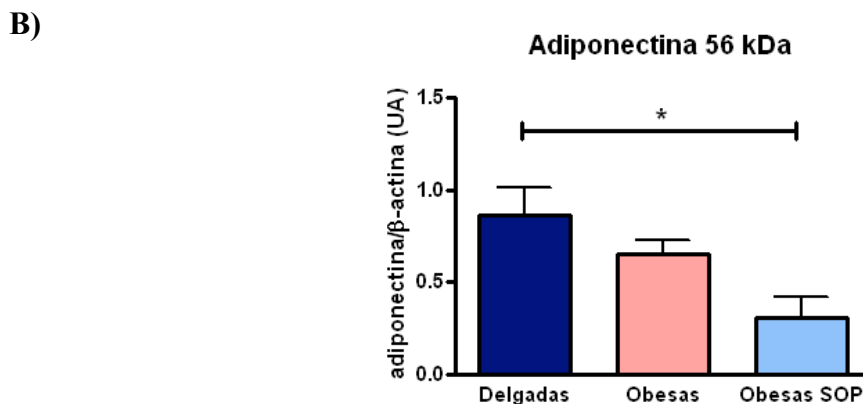
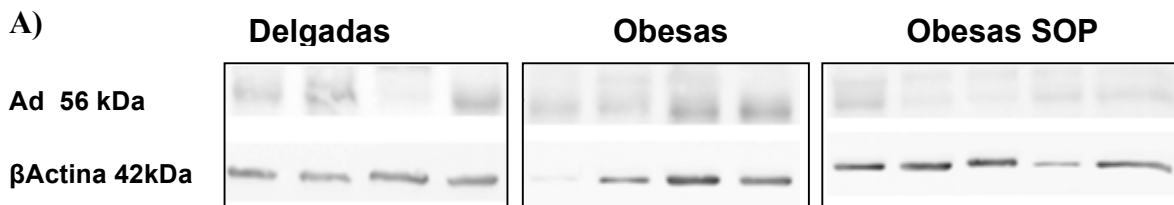


FIGURA 8: Niveles proteicos de adiponectina de 56 kDa en endometrios de mujeres. (A) Geles representativos de adiponectina 56 kDa y posterior representación gráfica del análisis por Western blot (WB) en (B). El gráfico representa el promedio \pm EEM de las muestras experimentales, delgadas ($n=4$), obesas ($n=4$), obesas SOP ($n=5$). $*p < 0,01$ entre mujeres delgadas versus mujeres obesas SOP. Los datos fueron analizados por test de Mann Whitney.

5.2 EVALUACIÓN DEL RECEPTOR DE ADIPONECTINA ADIPOR1

5.2.1. Niveles proteicos de AdipoR1

La acción de adiponectina es a través de su unión a receptores específicos expresados en membranas plasmáticas de distintas células del organismo. Existen dos tipos de receptores, AdipoR1 y AdipoR2. Se detectó tinción positiva para ambos receptores en todas las muestras de los grupos estudiados (Figura 9). Para AdipoR1, la inmunodetección fue principalmente citoplasmática y hacia la periferia de las células epiteliales en todos los grupos de estudio, similar a lo observado en el compartimiento estromal (Figura 9 A). Específicamente, en los endometrios de mujeres delgadas con SOP, la proteína AdipoR1 presentó una tinción intensa en el citoplasma epitelial y estromal, con valores de IOD UA significativamente mayores que las del grupo obesas SOP y delgadas (Figura 9 C) (* $p < 0,01$, ** $p < 0,001$). Por otra parte, no se observó diferencias entre los grupos de obesas (Figura 10 C).

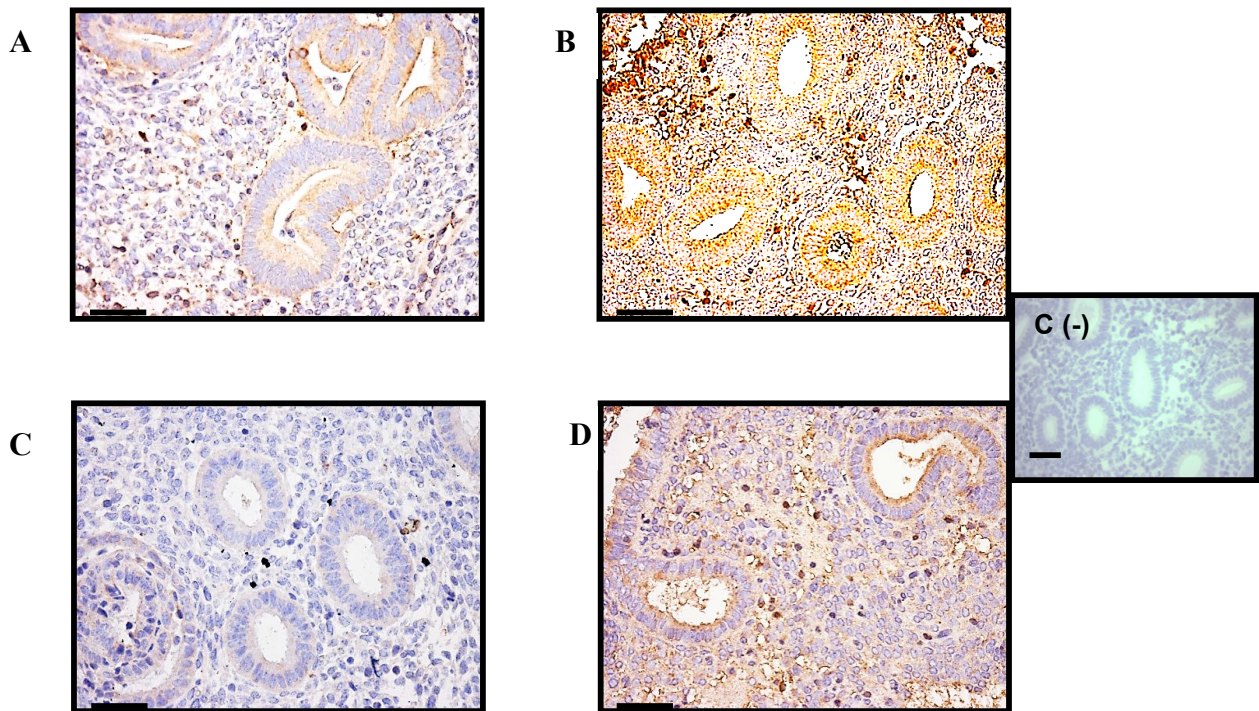


FIGURA 9: Detección de AdipoR1 por IHQ en endometrios de grupos estudiados. (A) Mujeres delgadas; (B) Mujeres delgadas con SOP; (C) Mujeres obesas; (D) Mujeres obesas con SOP. C (-) Control negativo. Barra: 50 μm .

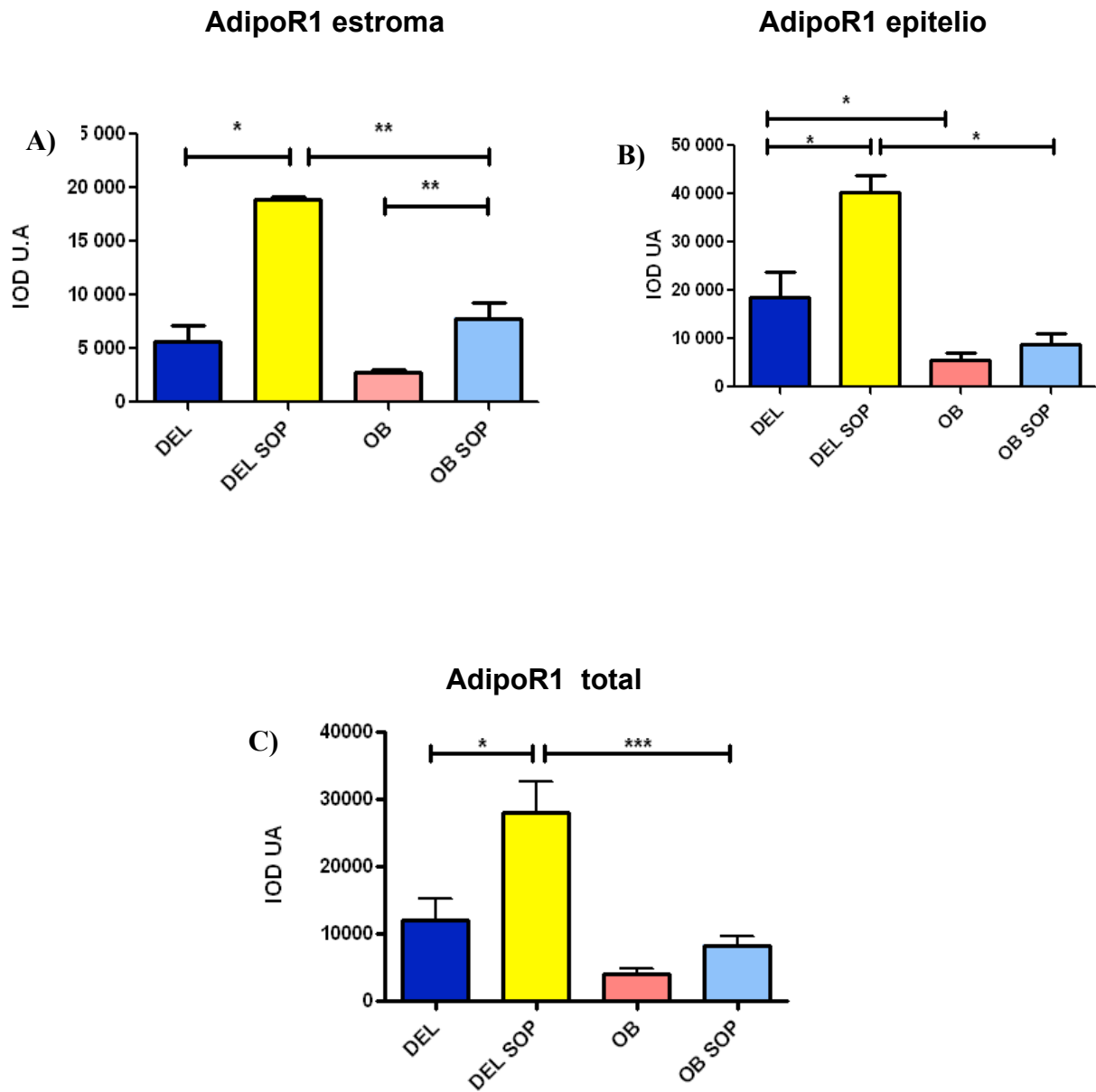


FIGURA 10: Semicuantificación de los niveles proteicos de AdipoR1 en endometrios de mujeres evaluados por IHQ. A) Análisis por inmunohistoquímica del estroma endometrial; B) Análisis del epitelio endometrial; C) Semicuantificación del estroma mas epitelio endometrial. Los graficos A, B y C representan el promedio IOD UA \pm EEM de mujeres delgadas (n=3), mujeres delgadas SOP (n=3), mujeres obesas (n=3), mujeres obesas SOP (n=3). *p<0.01, **p<0.001, ***p<0.0001. Los datos fueron analizados por test no paramétrico de Kruskal Wallis y test de Mann Whitney.

5.2.2 Niveles proteicos de AdipoR1

Al evaluar por Western blot los niveles proteicos de AdipoR1 se encontró que los endometrios de mujeres obesas tienen altos niveles de este receptor en comparación a los endometrios del grupo de delgadas ($p < 0,05$), no encontrándose diferencia significativa entre obesas y obesas SOP (Figura 11).

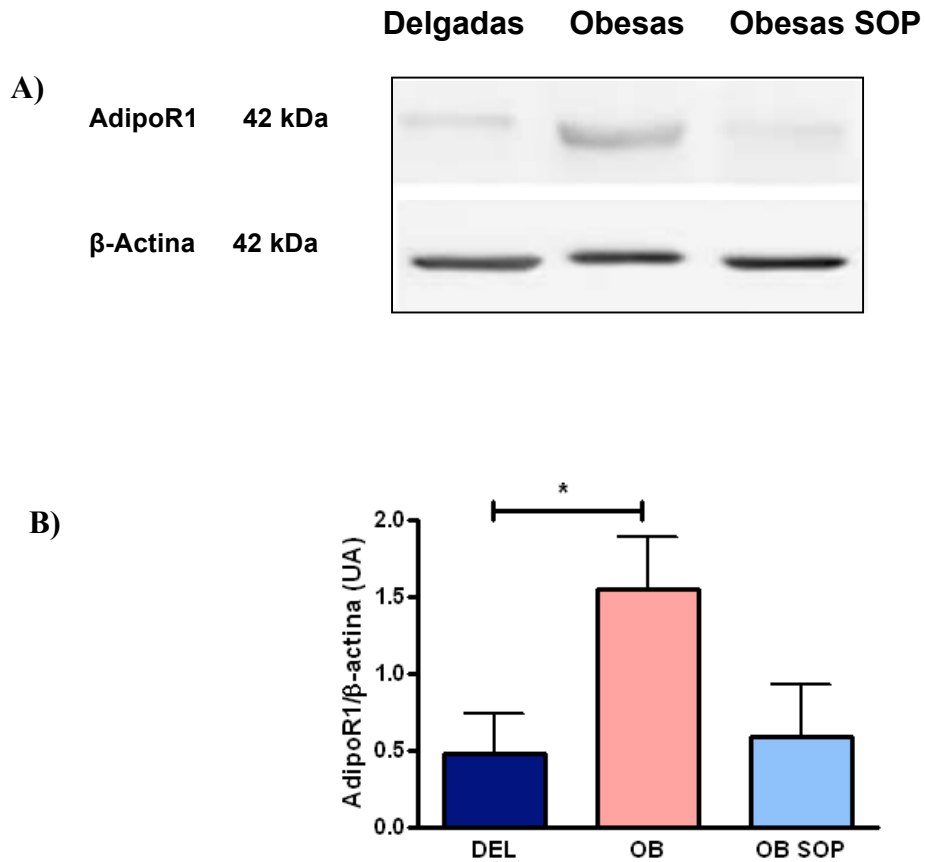


FIGURA 11: Niveles proteicos de AdipoR1 en endometrios de mujeres de los distintos grupos de estudio. (A) Geles representativos de AdipoR1 (42 kDa); **(B)** representación gráfica del análisis por WB. La Figura representa el promedio UA \pm EEM de las muestras de endometrio, delgadas (n=4), obesas (n=4), obesas SOP (n=5). * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. Los datos fueron analizados por test de Mann Whitney.

5.2.3 Niveles génicos de AdipoR1

Con el interés de conocer si las condiciones de obesidad, hiperandrogenismo y/o hiperinsulinismo pudiesen alterar el proceso de transcripción en el endometrio del receptor AdipoR1, se realizó un PCR semicuantitativo. Los resultados se muestran en la Figura 12 y se encontró niveles génicos de AdipoR1 similares entre los distintos grupos de endometrios estudiados, sin diferencia significativa. Sin embargo, es importante destacar que aunque no significativo, se observó un aumento en la expresión génica de AdipoR1 en endometrios del grupo de obesas de manera similar a lo observado para el contenido proteico de este receptor (Figura 12).

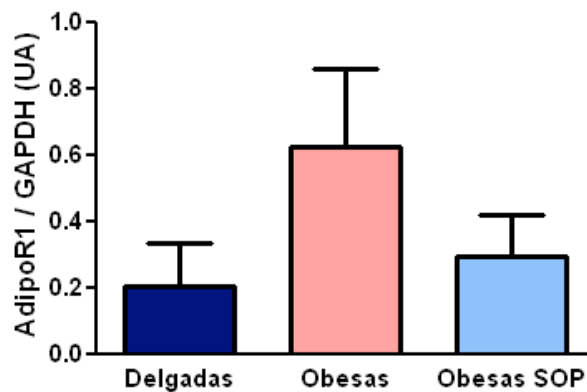


FIGURA 12: Niveles génicos de AdipoR1 en endometrios de mujeres. (A) PCR semicuantitativo representación gráfica del análisis. El gráfico representa el promedio UA \pm EEM de las muestras analizadas, delgadas (n=3), obesas (n=3), obesas SOP (n=3). Los datos se analizaron por test Mann Whitney.

5.3 EVALUACIÓN DEL RECEPTOR DE ADIPONECTINA ADIPOR2

5.3.1 Niveles proteicos de AdipoR2

Los receptores AdipoR2 se detectaron en mujeres de todos los grupos estudiados (Figura 13), con una tinción citoplasmática de preferencia hacia la periferia de las células a nivel del compartimiento epitelial. El análisis semicuantitativo mostró una diferencia significativa entre mujeres delgadas SOP versus mujeres obesas con SOP ($p < 0,01$) (Figura 14A). En epitelio también se observó una disminución de los receptores de AdipoR2 entre mujeres obesas versus mujeres con obesidad y SOP ($p < 0,001$) (Figura 14 B). No obstante, la concentración proteica total (Figura 14 C) fue similar entre los grupos.

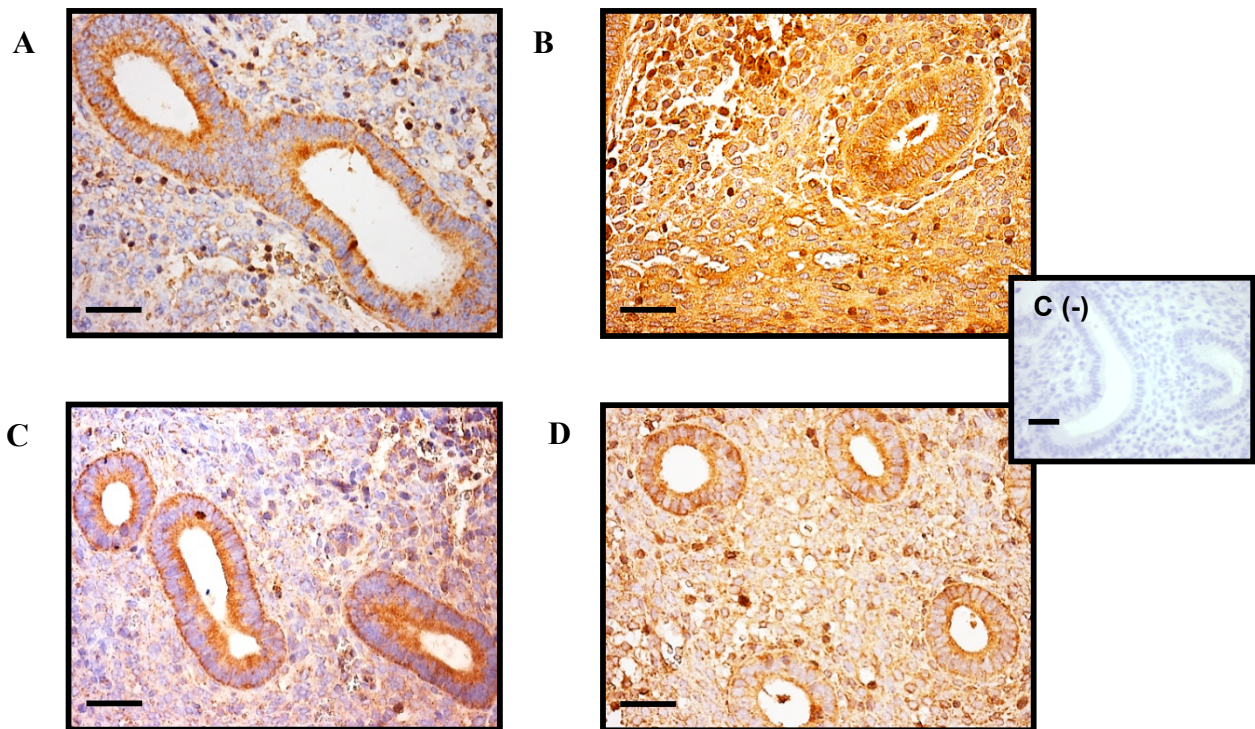


FIGURA 13: Detección de AdipoR2 por IHQ en endometrios de grupos estudiados. (A) Mujeres delgadas, (B) Mujeres delgadas con SOP, (C) Mujeres obesas, (D) Mujeres obesas con SOP. C (-) Control negativo. Barra: 50 μm .

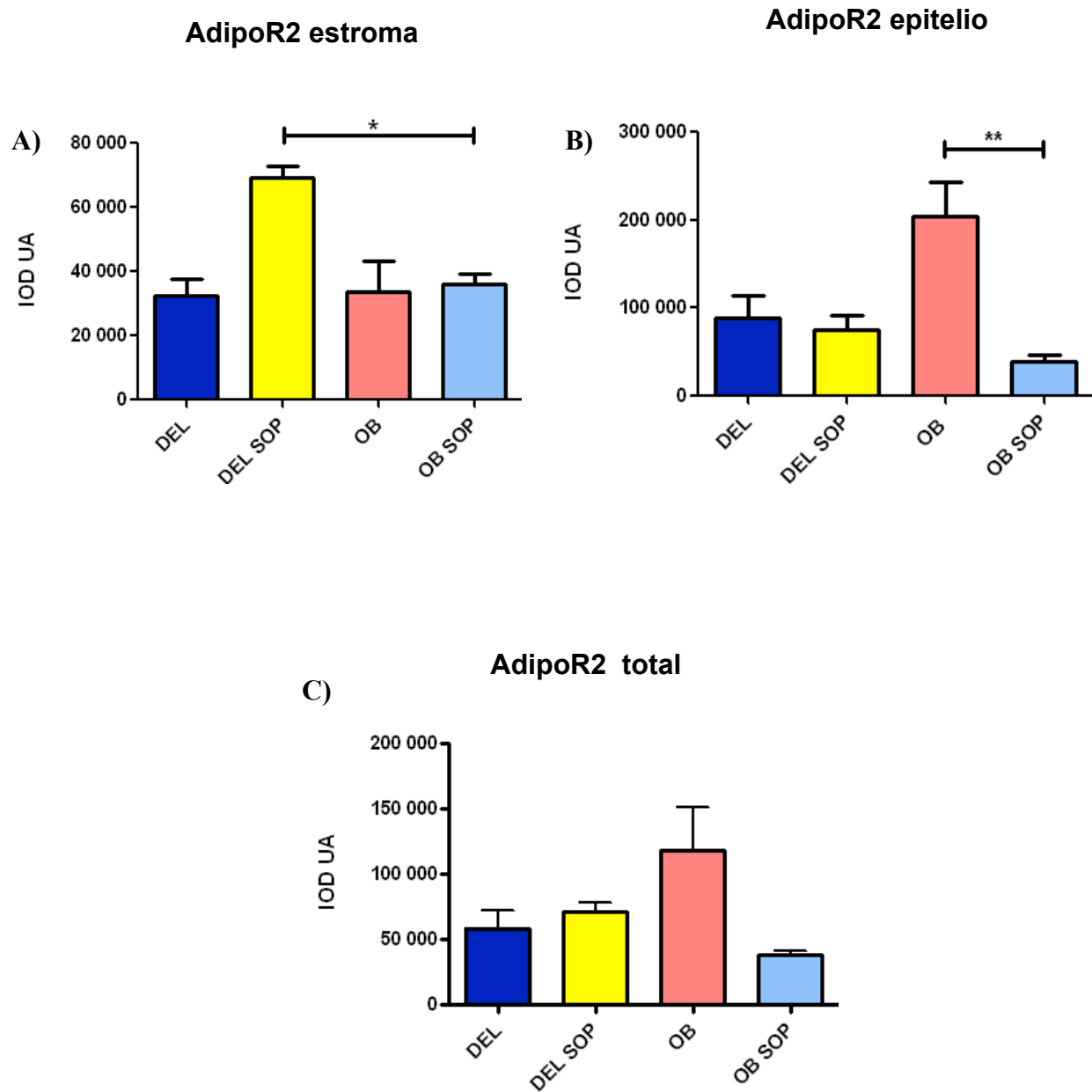
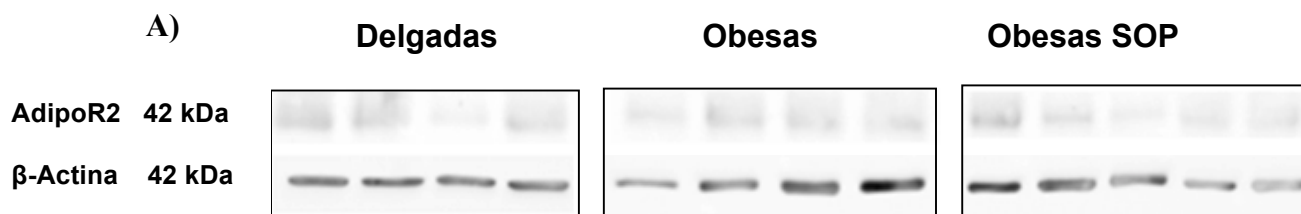


FIGURA 14: Semicuantificación de niveles proteicos de AdipoR2 en endometrios de mujeres. **A)** Representación gráfica del análisis por IHQ del estroma endometrial, **B)** análisis del epitelio endometrial, **C)** semicuantificación del estroma más epitelio estromal. Los gráficos A, B y C representan el promedio IOD UA \pm EEM de DEL (n=3); DEL SOP (n=3); OB (n=3); OB SOP (n=3). * $p < 0,01$ entre grupo DEL SOP vs OB SOP (Figura A) y OB vs OB SOP ** $p < 0.001$ (Figura B) datos analizados por test Mann Whitney. Figura C) no se evidencia diferencia significativa, los datos fueron analizados por test no paramétrico de Kruskal Wallis y test de Mann Whitney.

5.3.2 Niveles proteicos de AdipoR2

Al evaluar los niveles proteicos por Western blot se encontraron niveles similares en los endometrios de los tres grupos estudiados (Figura 15); por lo tanto, no se evidenció diferencia significativa entre los grupos estudiados.



B)

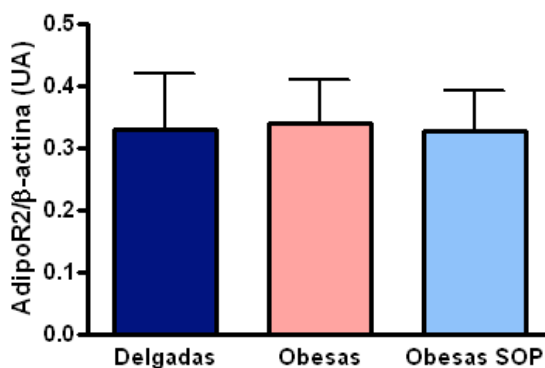


FIGURA 15: Niveles proteicos de AdipoR2 de 42 kDa en endometrios. (A) Geles representativos de AdipoR2 42 kDa y posterior representación gráfica del análisis por WB en **(B)**. La figura representa el promedio UA \pm EEM de las muestras analizadas. Delgadas (n=4), Obesas (n=4), Obesas SOP (n=5). Los datos se analizaron por test no paramétrico de Kruskal Wallis y test Mann Whitney.

5.3.3 Niveles génicos de AdipoR2

Para evaluar si los niveles génicos de AdipoR2 cambian en los distintos grupos de endometrios, se utilizó qPCR (Figura 16). No se evidenció diferencias significativas entre los grupos de estudio.

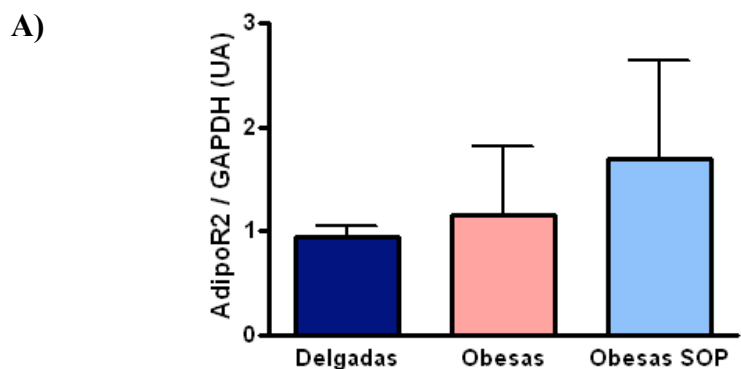


FIGURA 16: Niveles génicos de AdipoR2 en endometrios de los distintos grupos de estudio. (A) PCR semicuantitativo representación gráfica del análisis. La Figura representa el promedio UA \pm EEM de las muestras experimentales, delgadas (n=3), obesas (n=3), obesas SOP (n=3). Los datos se analizaron por test no paramétrico de Kruskal Wallis y test Mann Whitney.

5.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO GÉNICO Y PROTEICO DE APPL1

El segundo objetivo específico de esta tesis consistió en determinar los niveles proteicos y génicos de APPL1 y algunas moléculas involucradas en la vía de señalización de adiponectina como TAK1/MEK3/p38 MAPK. Primero, se determinó por IHQ, WB y qPCR los niveles de APPL1 que es una proteína adaptadora que se une a los receptores de adiponectina. Para la evaluación por IHQ se utilizaron los cuatro grupos de estudio: delgadas, delgadas con SOP, obesas y obesas con SOP.

5.4.1 Niveles proteicos de APPL1

La inmunodetección para APPL1 mostró su presencia en todos los grupos analizados (Figura 17). La semicuantificación señaló una clara disminución de APPL1 en las mujeres que presentan hiperandrogenismo y obesidad (Figura 18 C). En ambos compartimientos, epitelio y estroma, la tendencia fue similar (Figura 18).

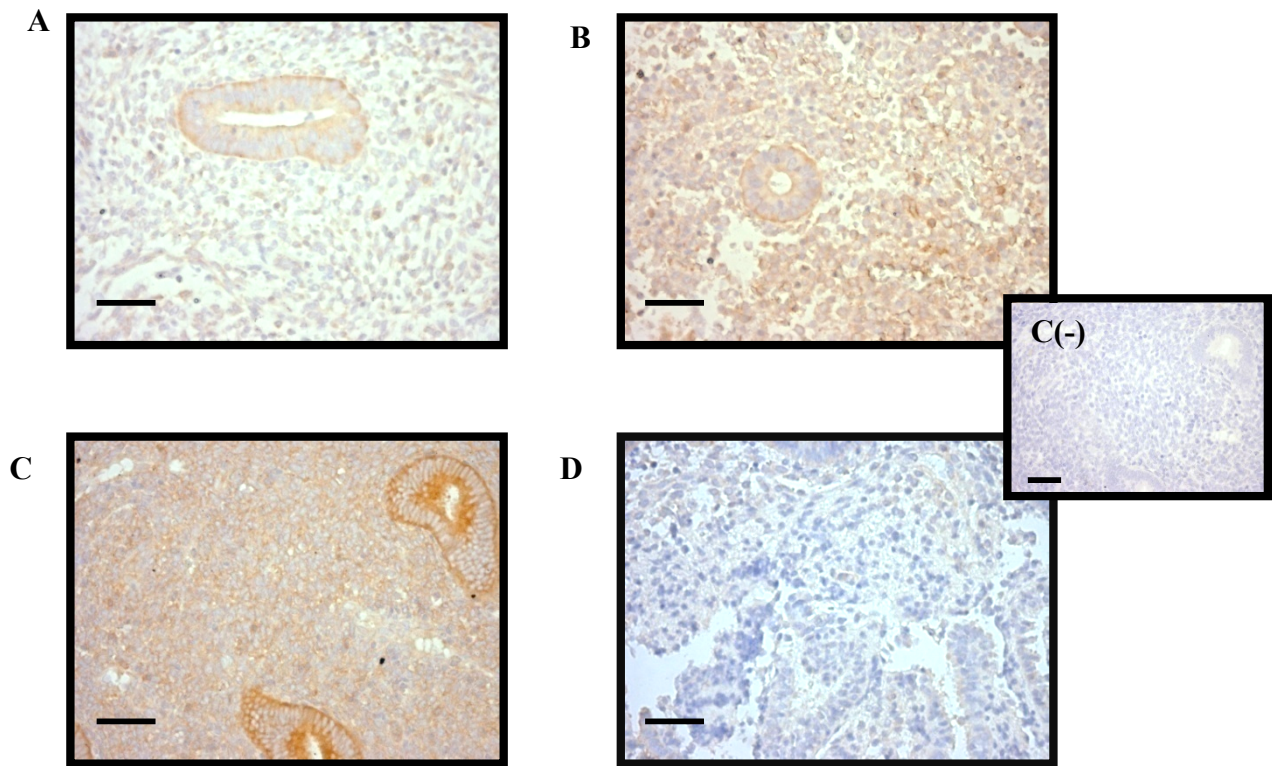


FIGURA 17: Detección de APPL1 por IHQ en endometrios de grupos estudiados. (A) mujeres delgadas, **(B)** mujeres delgadas con SOP, **(C)** mujeres obesas, **(D)** mujeres obesas con SOP. **C (-)** Control negativo. Barra: 50 µm.

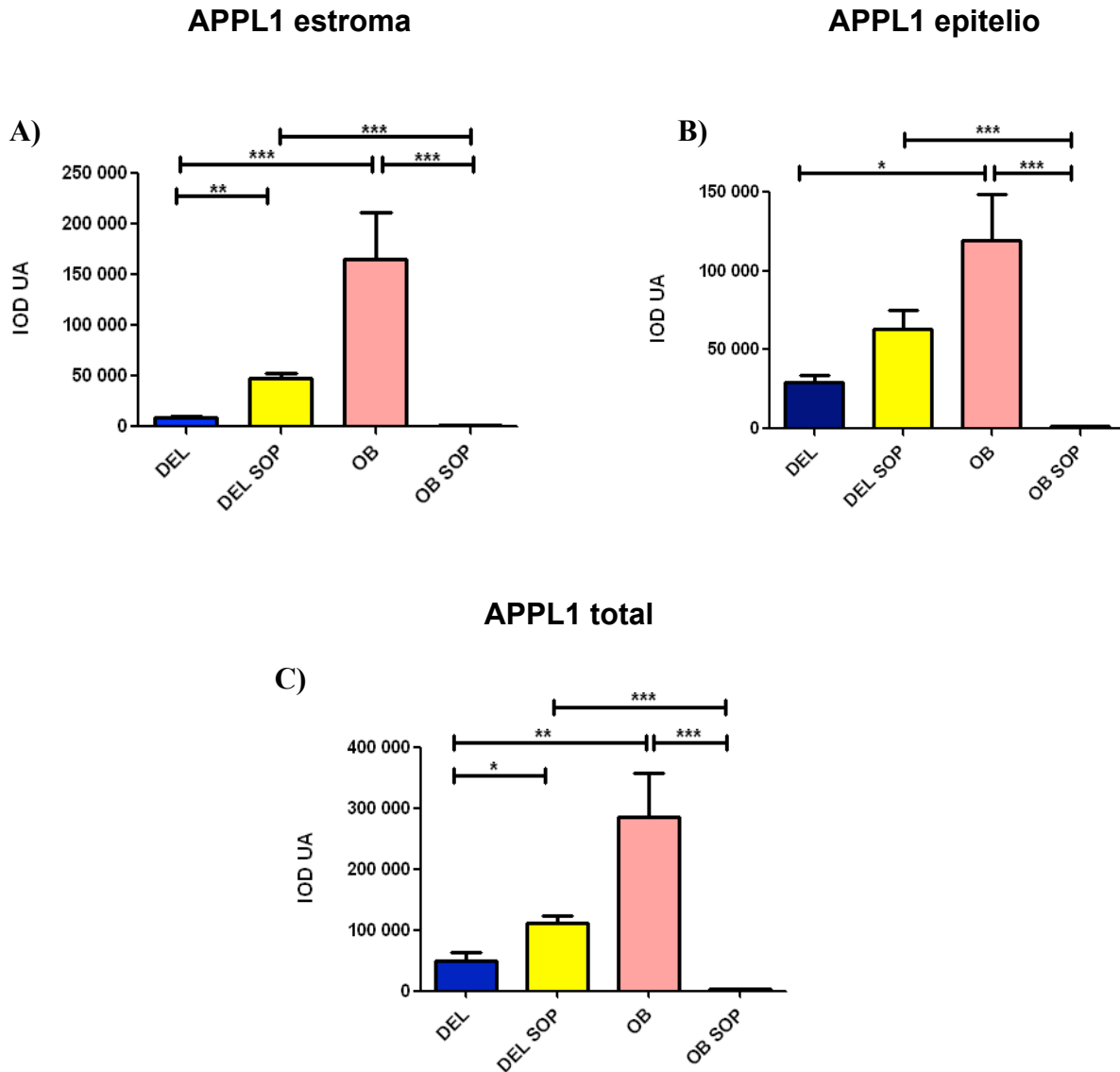
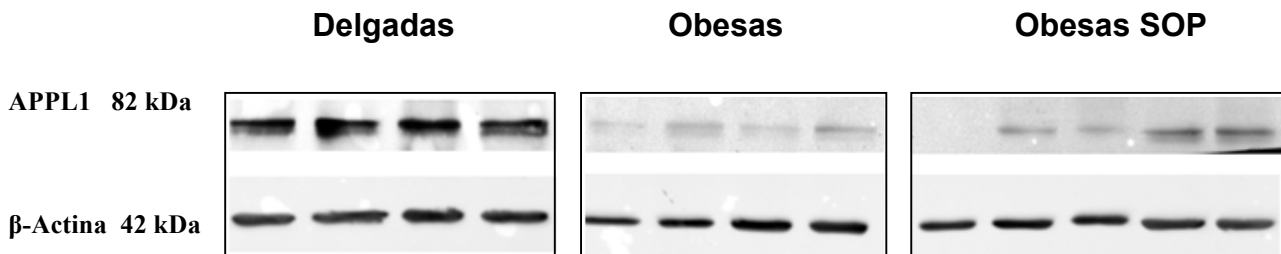


FIGURA 18: Niveles proteicos de APPL1 en endometrios de los distintos grupos estudiados **A)** Representación gráfica del análisis por inmohistoquímica del estroma endometrial. **B)** Análisis del epitelio endometrial. **C)** Semicuantificación en conjunto del estroma más epitelio endometrial. Las Figuras A, B y C representan el promedio IOD UA \pm EEM de las muestras DEL (n=4), DEL SOP (n=3), OB (n=5), OB SOP (n=5). *p<0,01, **p<0,001, ***p<0,0001. Figuras **A**, **B**, **C** se analizaron por test no paramétrico de Kruskal Wallis.

5.4.2 Niveles proteicos de APPL1

La cuantificación de APPL1 por WB, dio un resultado muy similar a lo observado por IHQ (Figura 17 y 18), donde las condiciones de obesidad e hiperandrogenismo están involucradas en la disminución de APPL1. En efecto, se determinó una disminución significativa ($*p<0,01$) de APPL1 en los dos grupos de obesas vs el grupo de Delgadas.

A)



B)

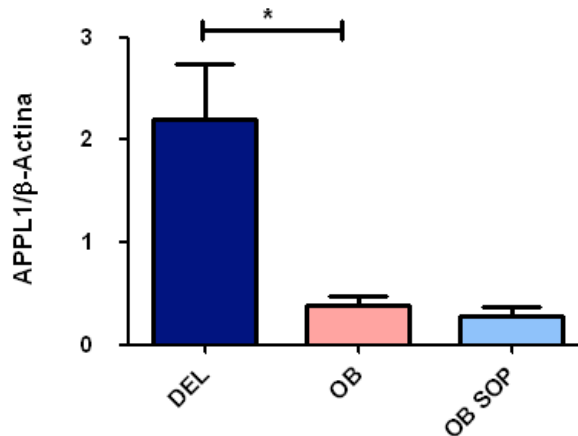


Figura 19: Niveles proteicos de APPL1 de 82 kDa en endometrios. (A) Geles representativos de APPL1 82 kDa y posterior representación gráfica del análisis por WB en **(B)**. La figura representa el promedio UA \pm EEM de las muestras experimentales, delgadas, DEL (n=4); obesas, OB (n=4); obesas SOP, OB SOP (n=5). Los datos fueron analizados por test Mann Whitney. $*p<0,01$ Delgadas vs Obesas.

5.4.3 Niveles génicos de APPL1

Para determinar los cambios ocurridos a nivel génico entre los grupos de estudio, se evaluó APPL1 por qPCR, donde no se evidenció una diferencia significativa entre los grupos experimentales (Figura 20).

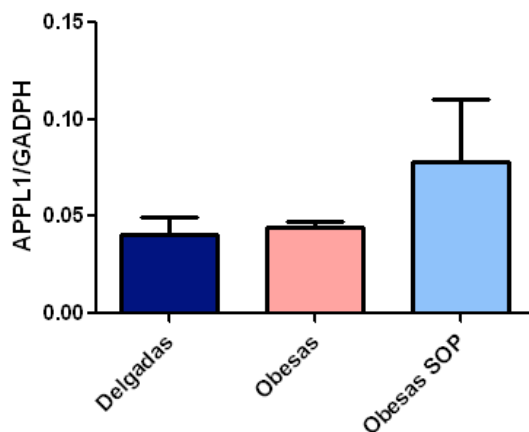


FIGURA 20: Niveles génicos de APPL1 en los distintos grupos de endometrio. Representación gráfica del análisis PCR semicuantitativo. La figura representa el promedio $UA \pm EEM$ de las muestras experimentales, delgadas (n=3), obesas (n=3), obesas SOP (n=3). Los datos se analizaron por test no paramétrico de Kruskal Wallis y test Mann Whitney.

5.5 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PROTEICOS DE TAK1

5.5.1 Niveles proteicos de p-TAK1

Se observó inmunodetección de p-TAK1-T184/187 en todos los grupos estudiados (Figura 21). p-TAK1 estaba localizada en el compartimiento epitelial, mayoritariamente en el citoplasma celular (Figura 21). La semicuantificación reveló que en los endometrios de mujeres delgadas con hiperandrogenismo, la proteína p-TAK1 presentó tinción intensa en el citoplasma estromal y epitelial, en comparación a mujeres delgadas y obesas con SOP

(Figura 21). Por otra parte, los resultados de nivel proteico para p-TAK1 en ambos grupos de obesas y en el grupo de delgadas, fue similar (Figura 22).

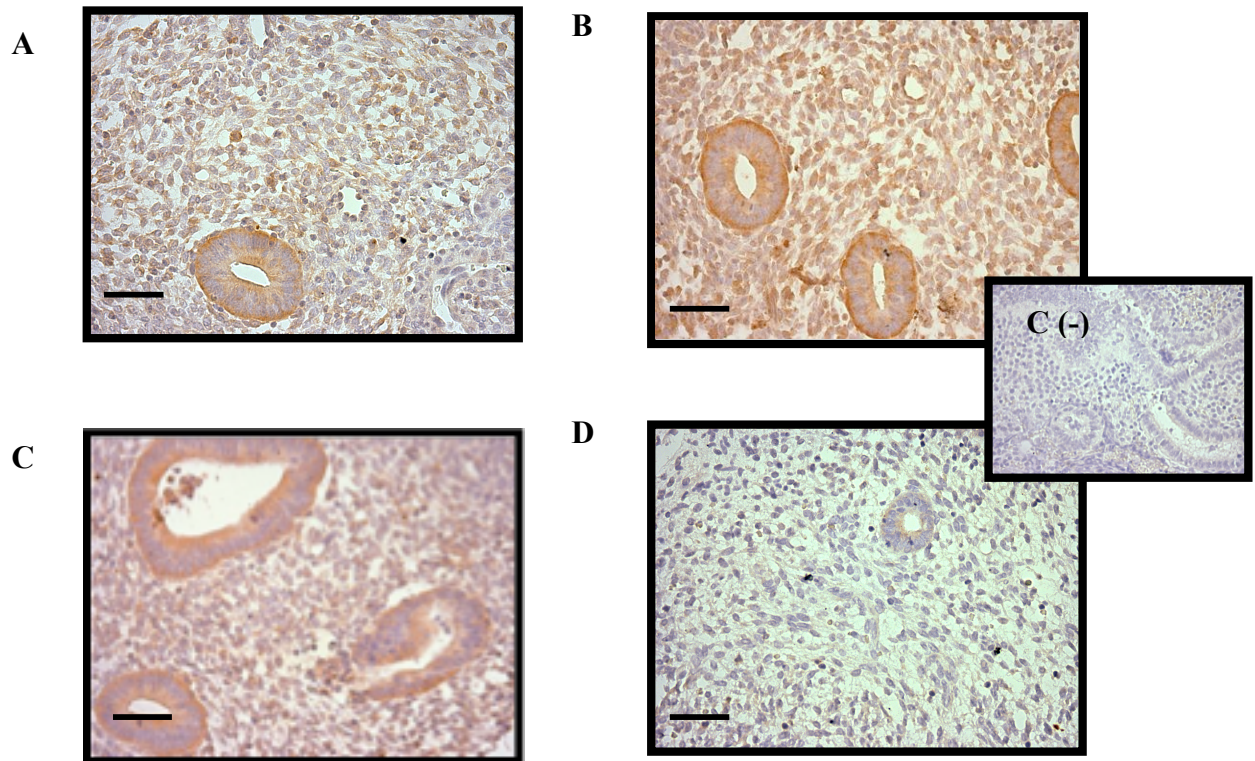


FIGURA 21: Detección de p-TAK1 por IHQ en endometrios de grupos estudiados. (A) mujeres delgadas, **(B)** mujeres delgadas con SOP, **(C)** mujeres obesas, **(D)** mujeres obesas con SOP. **C (-)** Control negativo. Barra: 50 μ m.

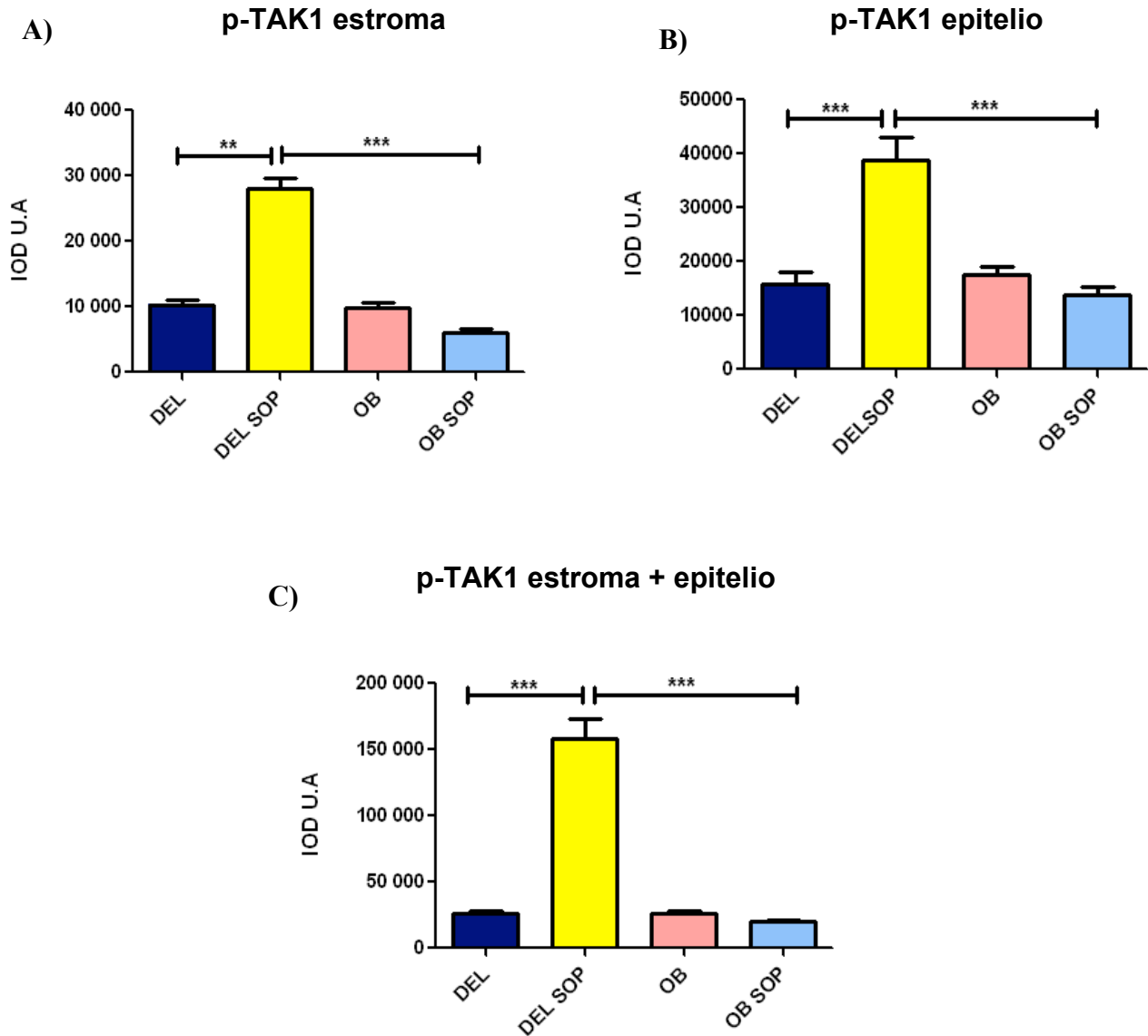


FIGURA 22: Niveles proteicos de p-TAK1-T184/187 en endometrios de mujeres de los diferentes grupos de estudio. (A, B) Representación gráfica del análisis por IHQ de tejido estromal y epitelial. **(C)** Representación gráfica de tejido endometrial epitelio + estroma. Las figuras representan el promedio IOD UA \pm EEM de DEL (n=3), DEL SOP (n=3), OB (n=3), OB SOP (n=3). *p<0.01, **p<0.001, ***p<0.0001. Los datos fueron analizados por test no paramétrico Kruskal Wallis. DEL: mujeres delgadas; DEL SOP: mujeres delgadas con SOP; OB: mujeres obesas; OB SOP: mujeres obesas SOP.

5.5.2 Niveles proteicos de TAK1 total por inmunohistoquímica

Al analizar los niveles totales de TAK1 (TAK1t) se observa que estos también se vieron afectados en condición de obesidad e hiperandrogenismo, ya que la tinción fue menor en comparación a la tinción que mostrarón las mujeres delgadas con SOP (Figura 23). Al semicuantificar estas tinciones (Figura 24) observamos que en ambos compartimientos se vio un comportamiento similar, un aumento de los niveles proteicos de TAK1t en mujeres delgadas con SOP y una disminución de los niveles de TAK1t en mujeres con obesidad y SOP. Esto sugiere que la condición de obesidad está influyendo en los contenidos proteicos de TAK1t.

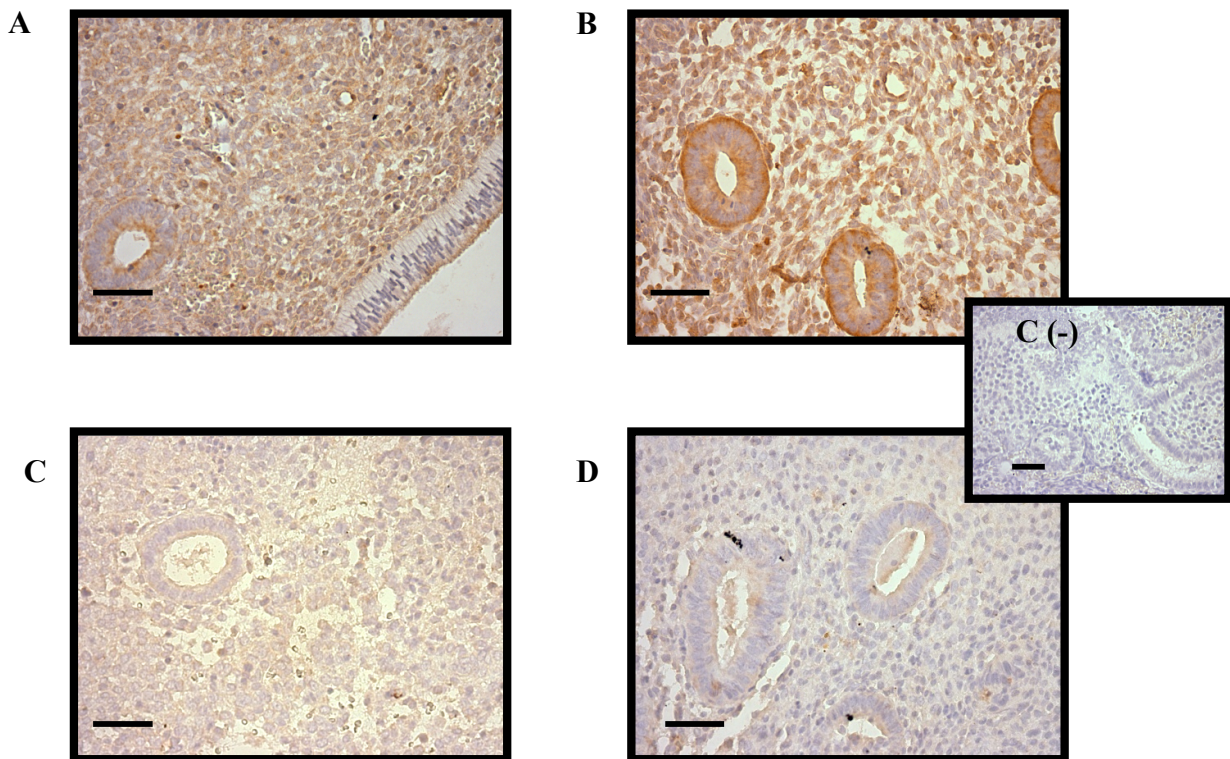


FIGURA 23: Detección de TAK1t por IHQ en endometrios de grupos estudiados. (A) mujeres delgadas, **(B)** mujeres delgadas con SOP, **(C)** mujeres obesas, **(D)** mujeres obesas con SOP. **C (-)** Control negativo. Barra: 50 μ m.

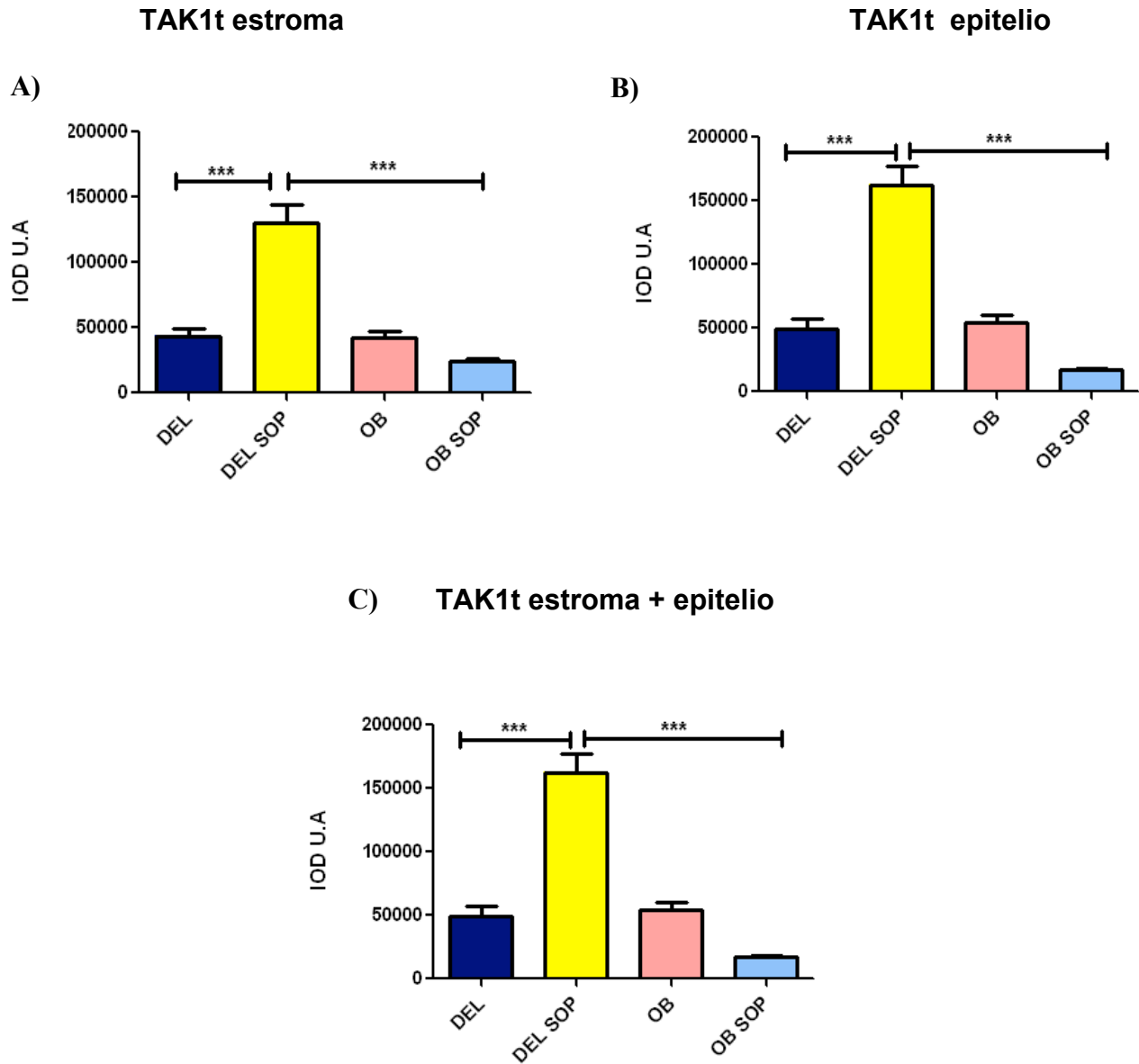


FIGURA 24: Niveles proteicos de TAK1t en endometrios de mujeres en estudio. (A, B) Representación gráfica del análisis por inmunohistoquímica de tejido estromal y epitelial. **(C)** Representación gráfica del contenido endometrial epitelio + estroma. Las figuras representan el promedio IOD UA \pm EEM de DEL (n=3), DEL SOP (n=3), OB (n=3), OB SOP (n=3) con *p<0,01, **p<0,001, ***p<0,0001. Los datos se analizaron por test no paramétrico Kruskal Wallis. DEL: mujeres delgadas; DEL SOP: mujeres delgadas con SOP; OB: mujeres obesas; OB SOP: mujeres obesas SOP.

5.6 EVALUACIÓN DE NIVELES PROTEICOS DE MEK3

5.6.1 Niveles proteicos de p-MEK3 por inmunohistoquímica

Todas las muestras de endometrio obtenidos de los cuatro grupos de mujeres estudiadas presentaron inmunodetección para p-MEK3(S189). La tinción positiva se detectó principalmente a nivel citoplasmático, tanto en el compartimiento estromal como epitelial (Figura 25). La semicuantificación (Figura 26) reveló en general una disminución de los niveles de p-MEK3 tanto en el compartimiento estromal como epitelial en los endometrios de los tres grupos de mujeres comparados con el grupo de mujeres delgadas. Al evaluar por separado los compartimientos epitelial y estromal, se encontró que en el estroma se observa una disminución significativa de p-MEK3 en condiciones de obesidad e hiperandrogenismo comparado con mujeres con obesidad y con mujeres delgadas e hiperandrogénicas. Lo mismo se observó en los endometrios de mujeres delgadas versus mujeres delgadas con SOP (Figura 26).

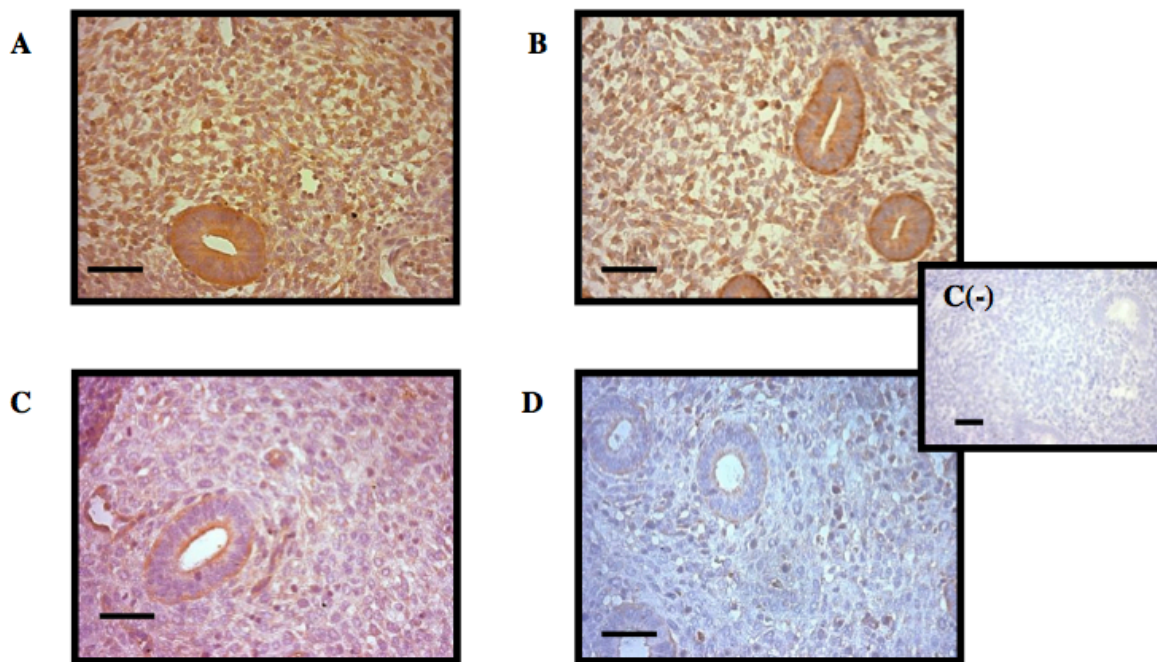


FIGURA 25: Detección de p-MEK3 (S189) por IHQ en endometrios de grupos estudiados. (A) mujeres delgadas, (B) mujeres delgadas con SOP, (C) mujeres obesas, (D) mujeres obesas con SOP. C (-) Control negativo. Barra: 50 µm.

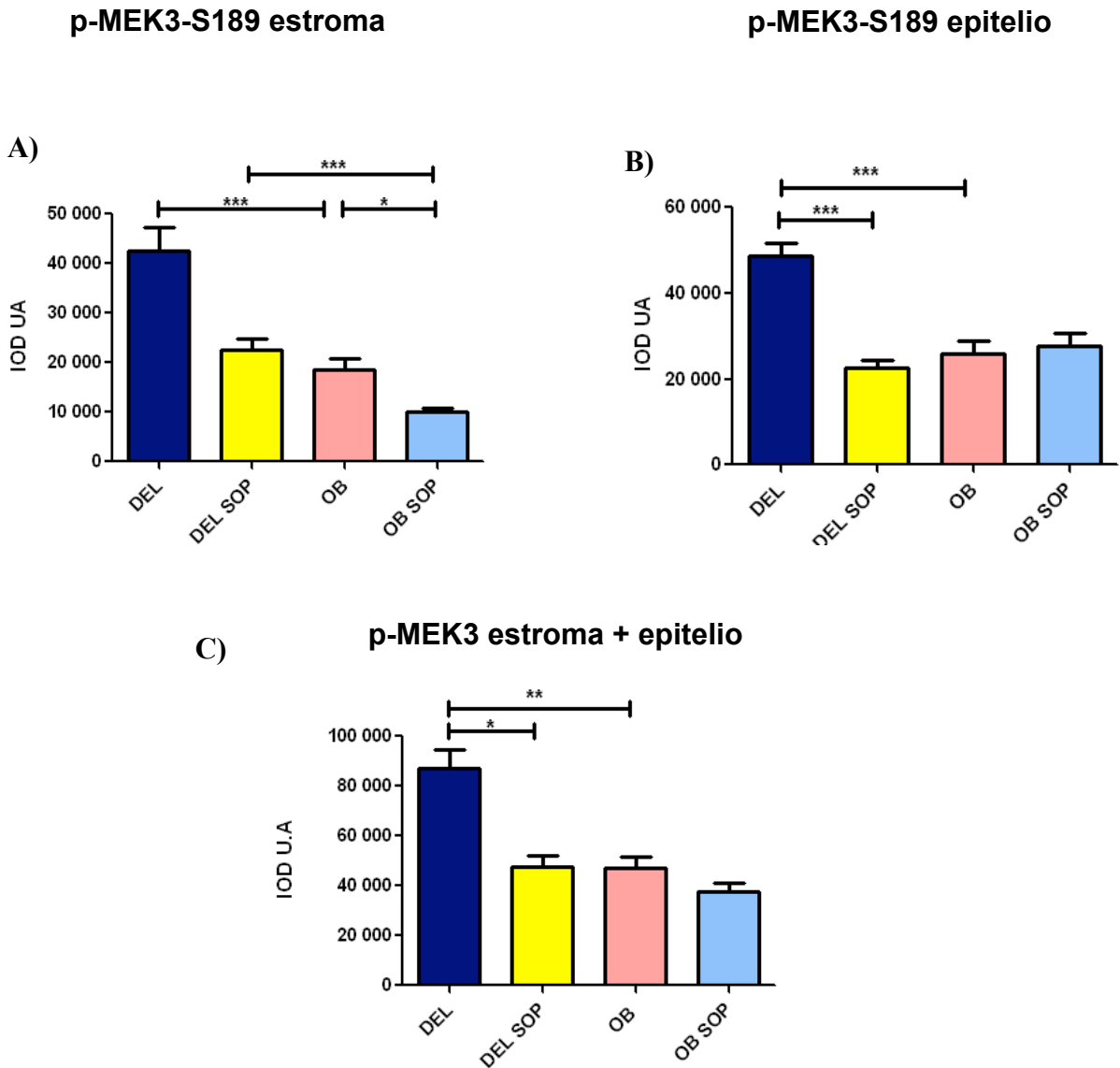


FIGURA 26: Niveles proteicos de p-MEK3 (S189) en los endometrios de los distintos grupos de mujeres. (A) Representación gráfica del análisis por IHQ de tejido estromal, (B) análisis de tejido epitelial. (C) Representación de tejido endometrial estroma + epitelio. Las Figuras A, B y C representan el promedio IOD UA \pm EEM de DEL (n=3), DEL SOP (n=3), OB (n=3), OB SOP (n=3), *p<0,01, **p<0,001, ***p<0,0001. Los datos se analizaron por test no paramétrico Kruskal Wallis.

5.6.2 Niveles proteicos de MEK3 total

La tinción positiva para MEK3 total (MEKt) se detectó en todas las muestras analizadas (Figura 27). Dicha tinción es a nivel citoplasmático tanto en epitelio como en estroma. Al evaluar el contenido proteico por IOD UA (Figura 27), se obtuvo un mayor contenido proteico en los endometrios de mujeres que presentaban obesidad y SOP en comparación a los otros grupos de tejidos, situación que es similar en epitelio y en estroma. Sin embargo, al determinar la fracción fosforilada de MEK3 en cada una de las muestras analizadas (Figura 27 C), se encontró que existe disminución significativa de los tres grupos versus el grupo de mujeres delgadas, señalando que la condición SOP sumado a la obesidad regularía negativamente la activación de esta proteína.

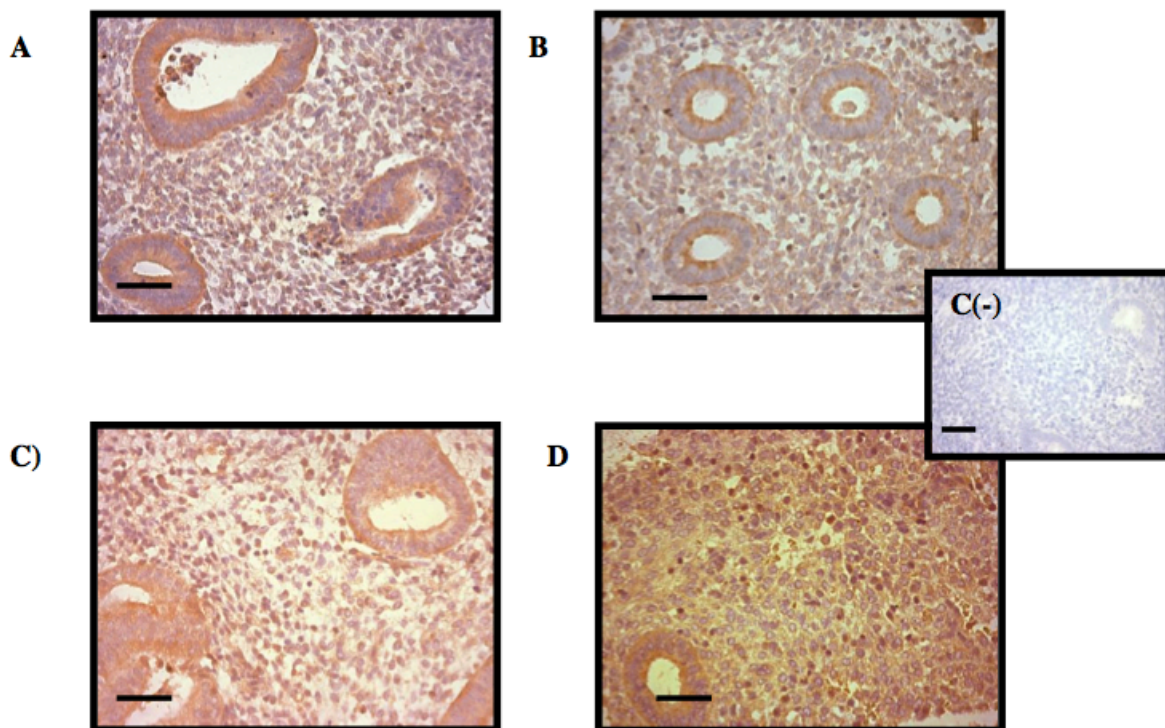


FIGURA 27: Detección de MEK3t por IHQ en endometrios de grupos estudiados. (A) mujeres delgadas, (B) mujeres delgadas con SOP, (C) mujeres obesas, (D) mujeres obesas con SOP. C (-) Control negativo. Barra: 50 μ m.

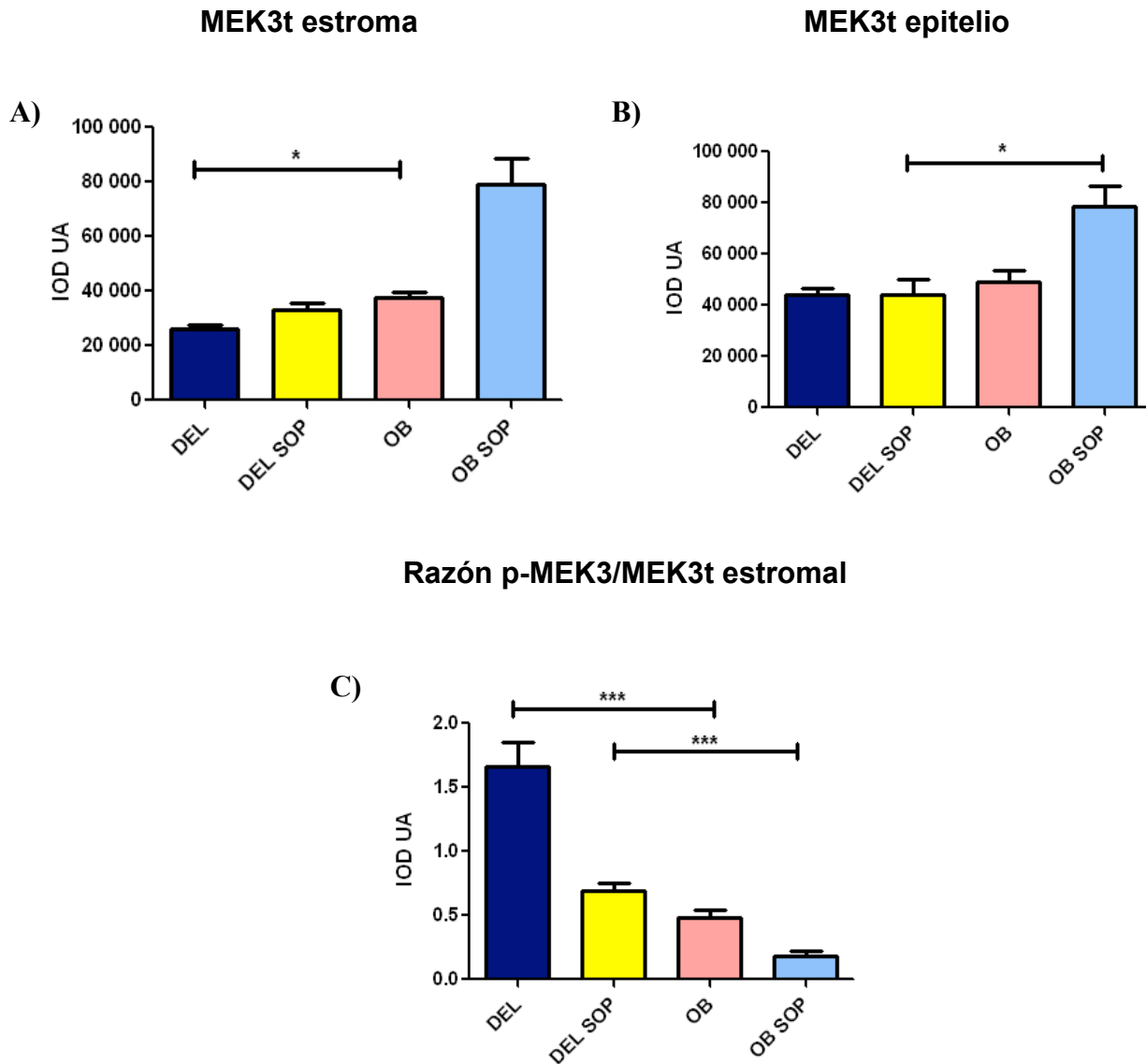


FIGURA 28: Niveles proteicos de MEK3 en endometrios de mujeres de los grupos en estudio. A) IHQ de MEK3 total en tejido estromal, B) IHQ de MEK3 total en tejido epitelial, C) Razón entre p-MEK3 / MEK total. Las figuras A, B, C representan el promedio IOD UA \pm EEM de DEL (n=3), DEL SOP (n=3), OB (n=3), OB SOP (n=3), *p<0,01, **p<0,001, ***p<0,0001. Los datos se analizaron por test no paramétrico Kruskal Wallis.

5.6.3 Determinación de los niveles proteicos de p-MEK3 / MEK3 total

Además de estudiar el contenido proteico de p-MEK3 y de MEK3 total por IHQ, se determinaron los niveles proteicos por WB. Los resultados de este análisis indicaron una congruencia con los resultados obtenidos por IHQ, donde se observó una disminución de los niveles proteicos de p-MEK3 comparado con MEK3 totales en los endometrios del grupo de obesas y obesas SOP en relación al grupo de delgadas (Figura 29). Aún más, la fracción fosforilada de MEK3 disminuyó en ambos grupos de obesas, indicando que fundamentalmente la condición de obesidad induce una disminución de la activación de esta proteína (Figura 29)

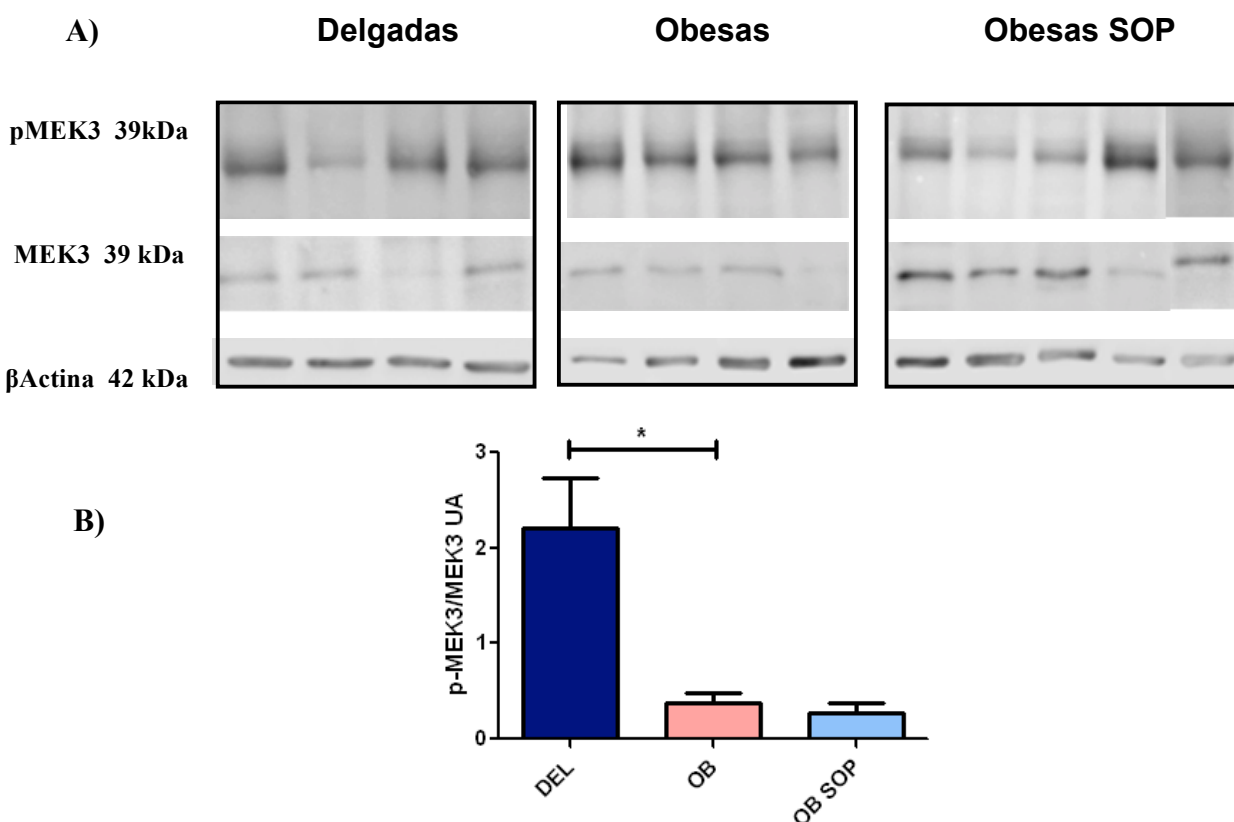


FIGURA 29: Niveles proteicos de p-MEK3-S189/MEK3t de 39 kDa en los distintos grupos de endometrios. (A) Geles representativos de MEK3 y p-MEK3 (39 kDa) y posterior representación del análisis por WB en (B). La Figura (B) representa el promedio UA \pm EEM de las muestras analizadas, delgadas (n=4), obesas (n=4), obesas SOP (n=5). Los datos se analizaron por test de Mann Whitney y Kruskal Wallis, *p<0,01.

5.7 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES PROTEICOS DE p38MAPK

5.7.1 Niveles proteicos de p-p38 α MAPK

La tinción positiva de p-p38MAPK se detecto en los cuatro grupos de endometrios (Figura 30), observándose principalmente en el compartimiento nuclear. Los análisis estadísticos (Figura 31) muestran que en condiciones de hiperandrogenismo en ausencia de obesidad existe una disminución de los niveles proteicos de p-p38 MAPK, al contrario de lo que se observó para el grupo de obesas con SOP. Estos resultados son similares en ambos compartimientos celulares del endometrio.

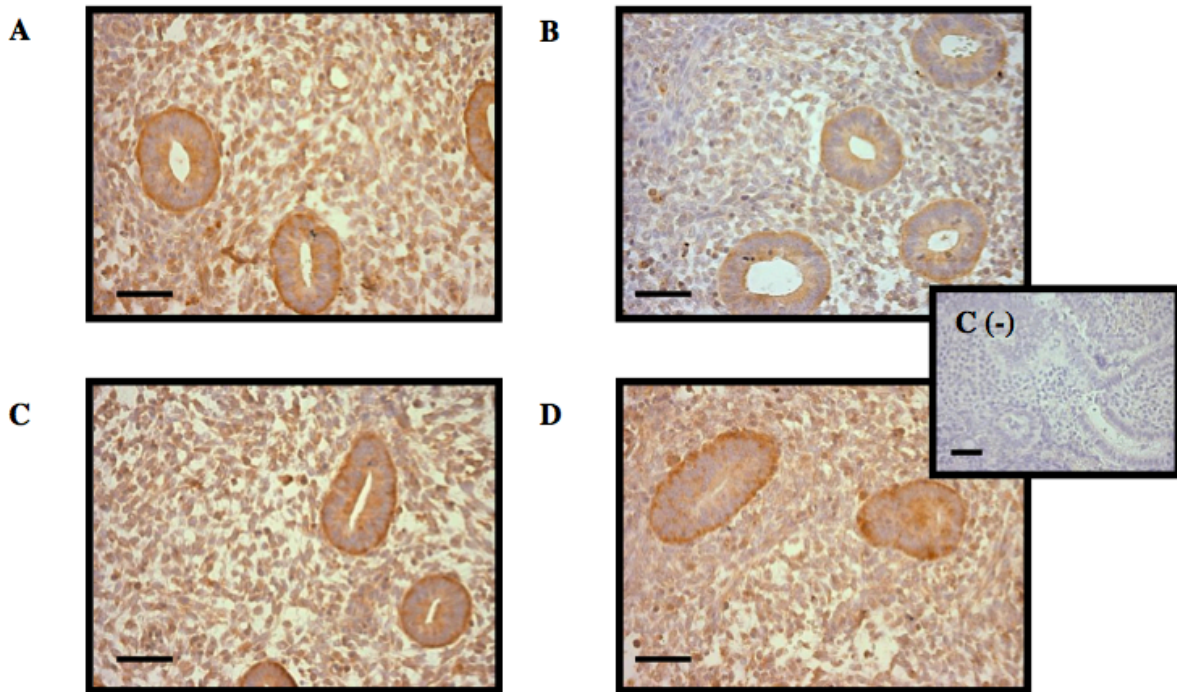


FIGURA 30: Detección de p-p38MAPK por IHQ en endometrios de grupos estudiados. (A) mujeres delgadas, (B) mujeres delgadas con SOP, (C) mujeres obesas, (D) mujeres obesas con SOP. C (-) Control negativo. Barra: 50 μ m.

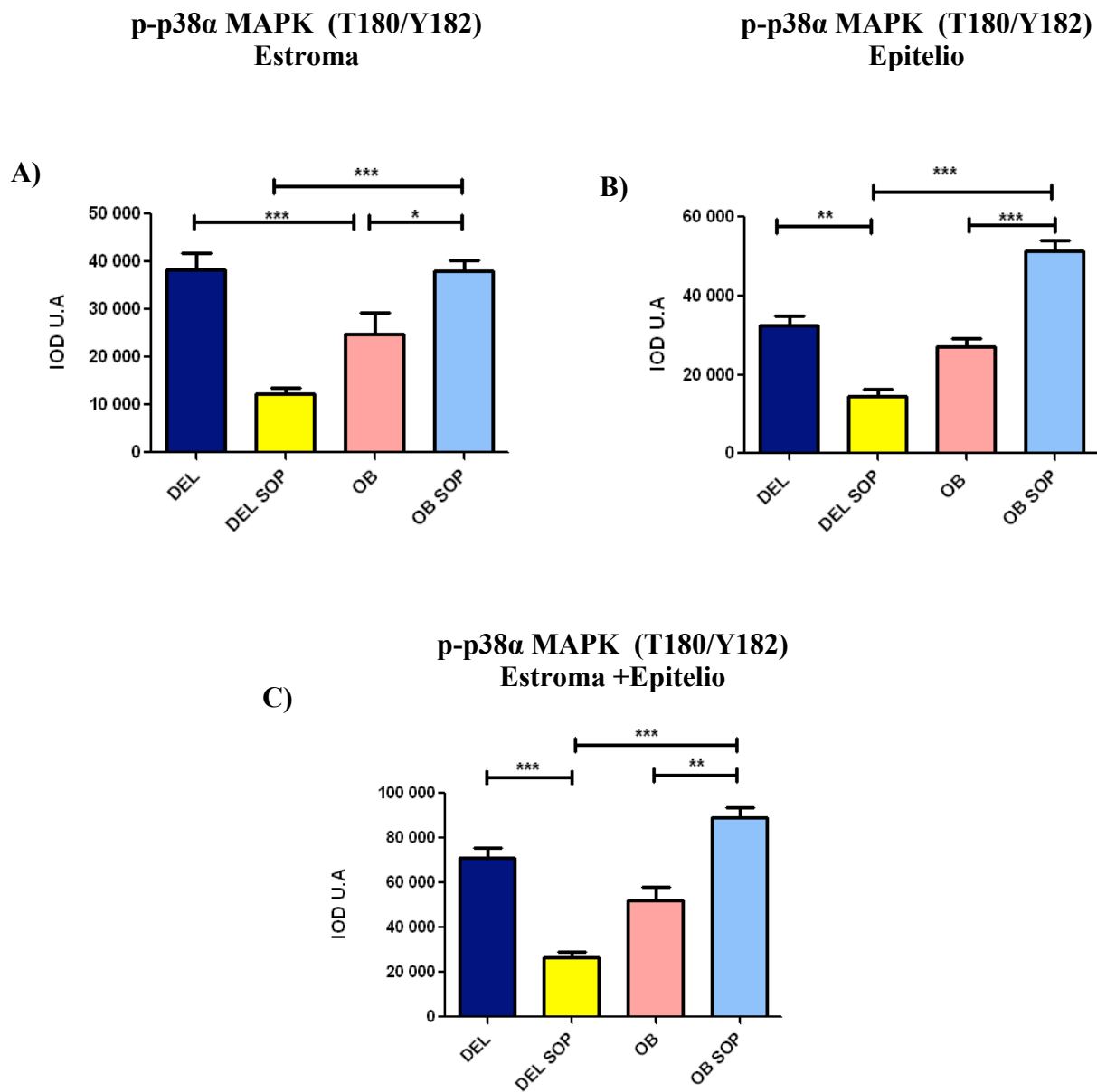


FIGURA 31: Niveles proteicos de p-p38MAPK (T180/Y182) en endometrios de mujeres en estudio. A) IHQ de tejido estromal, B) IHQ de tejido epitelial. C) Cuantificación estroma + epitelio. Las figuras A, B y C representan el promedio IOD UA \pm EEM de DEL (n=3), DEL SOP (n=3), OB (n=3), OB SOP (n=3), *p<0,01, **p<0,001, *p<0,0001. Los datos se analizaron por test no paramétrico Kruskal Wallis.**

5.7.2 Niveles proteicos de α -p38 MAPK

Los niveles proteicos de p38MAPK totales se detectaron en todas las muestras analizadas (Figura 32), se observó una tinción positiva principalmente en el compartimiento nuclear. El análisis estadístico (Figura 33) mostró que existe diferencia significativa entre los endometrios obtenidos de mujeres en condición de obesidad con hiperandrogenismo versus mujeres delgadas con hiperandrogenismo. Estos datos indican que la condición de obesidad tiene influencia sobre la activación de esta molécula. Adicionalmente, se determinó la razón entre los niveles proteicos fosforilados de p38 MAPK y p38 MAPK total, confirmando el aumento en la fosforilación de p38 en condiciones de obesidad e hiperandrogenismo (Figura 33 C). Este resultado sugeriría que la obesidad podría estimular la activación de p38 MAPK, a través de un aumento de la condición inflamatoria (97,89).

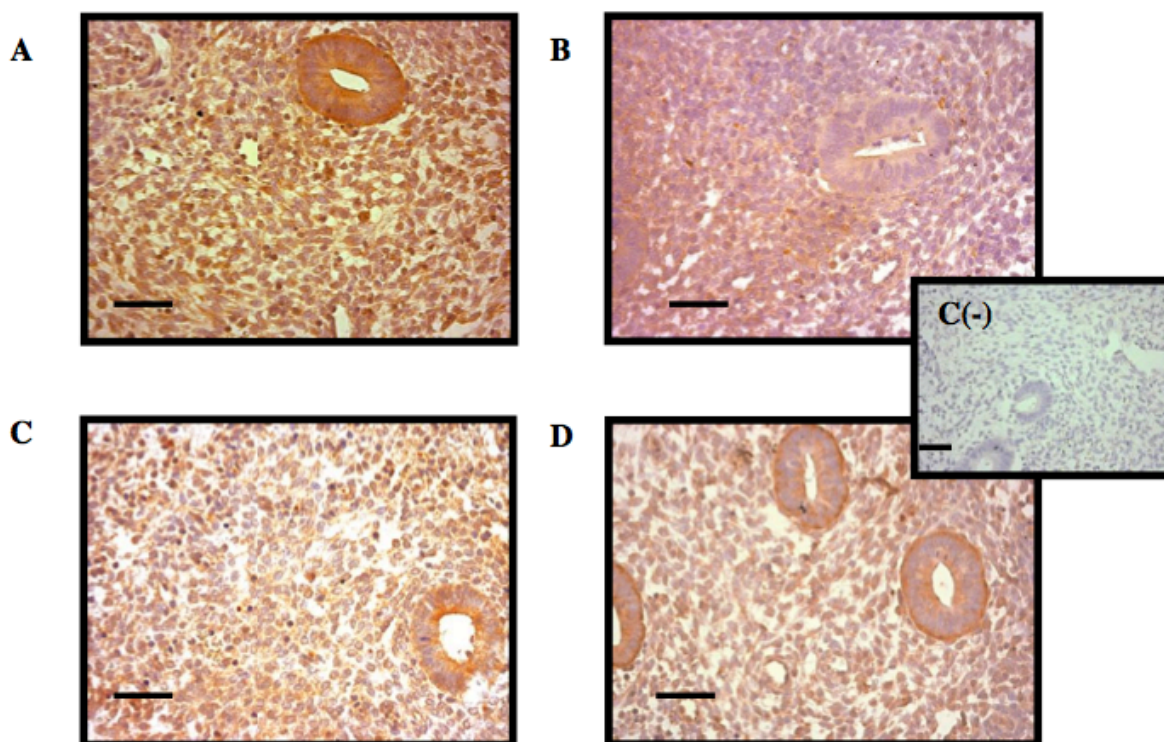


FIGURA 32: Detección de p38MAPKt por IHQ en endometrios de grupos estudiados. (A) mujeres delgadas, (B) mujeres delgadas con SOP, (C) mujeres obesas, (D) mujeres obesas con SOP. C (-) Control negativo. Barra: 50 μ m.

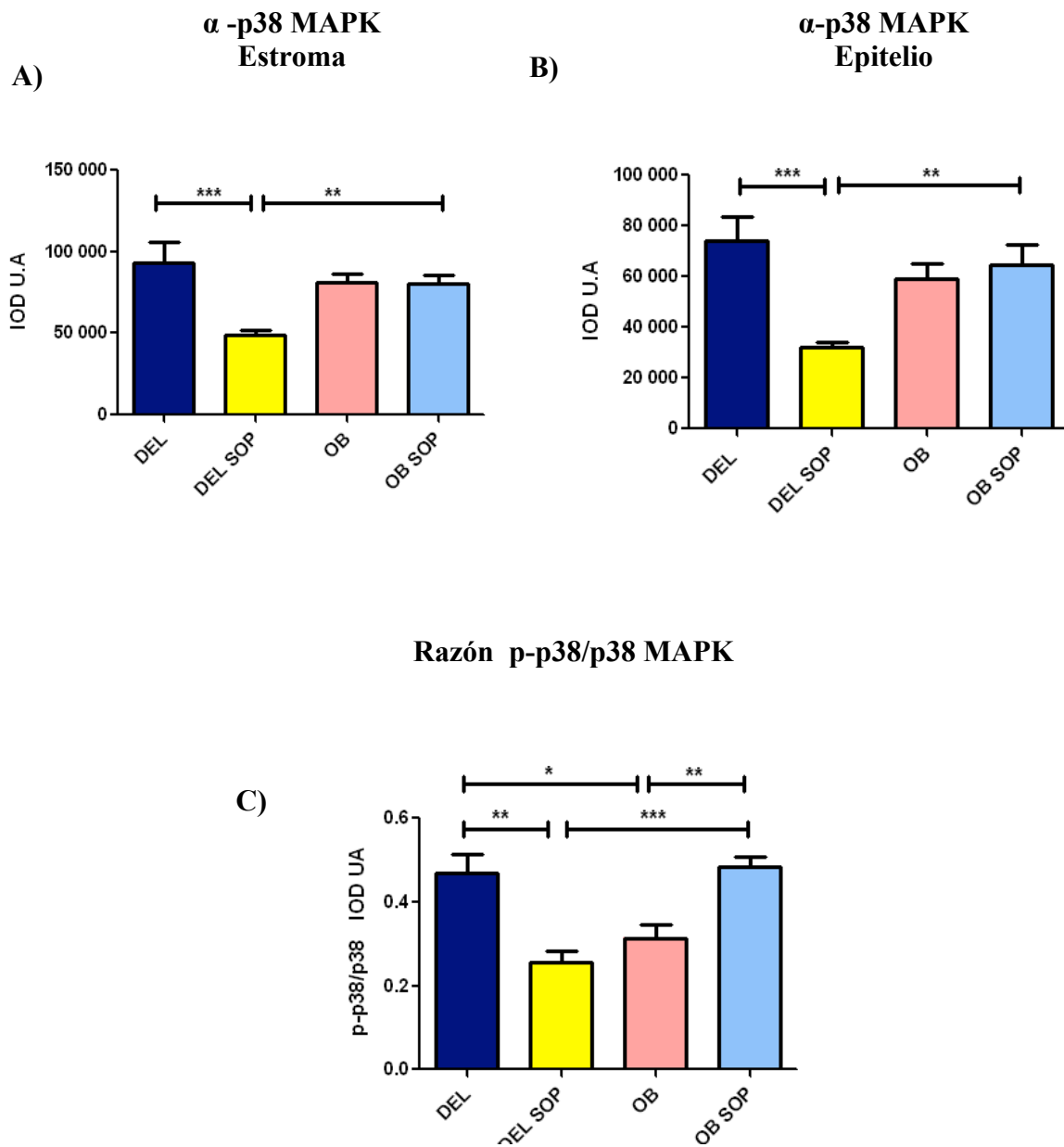


Figura 33: Niveles proteicos de p38 MAPK en los distintos grupos de endometrios estudiados. A) IHQ de tejido estromal, B) IHQ de tejido epitelial. C) Razón entre p-p38 / p38 MAPK. Los gráficos A, B, C representan el promedio IOD UA \pm EEM de DEL (n=3), DEL SOP (n=3), OB (n=3), OB SOP (n=3) con *p<0,01, **p<0,001, *p<0,0001. Grafico A, B, C se encuentra diferencia significativa por test no paramétrico Kruskal Wallis.**

5.7.3 Niveles génicos de α -p38 MAPK

Se determinaron los niveles génicos de p38MAPK en tres grupos experimentales. El análisis estadístico en este caso no mostró diferencias significativas. No obstante, se observó el comportamiento de los niveles génicos en mujeres que presentan ambas condiciones estudiadas. Es decir, obesidad e hiperandrogenismo hacia una disminución, lo que tendría relación con los niveles proteicos expuestos en la Figura 33.

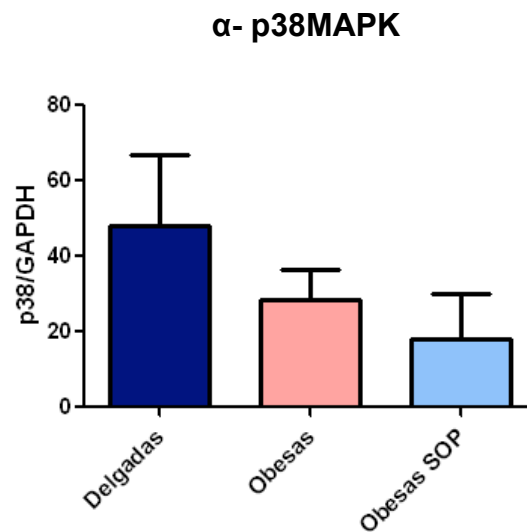


FIGURA 34: Niveles génicos de α -p38MAPK en los distintos grupos de endometrios estudiados. Se realizó PCR semicuantitativo y la figura representa el promedio UA \pm EEM de las muestras analizadas, delgadas (n=3), obesas (n=3), obesas SOP (n=3). Los datos se analizaron por test no paramétrico de Kruskal Wallis y test Mann Whitney.

5.8 DETERMINACIÓN DE NF- κ B

5.8.1 Niveles proteicos de NF- κ B

Se determinaron los niveles proteicos de la subunidad p65 de NF- κ B por IHQ, la tinción positiva de esta proteína se detectó en todas las muestras analizadas tanto en el citoplasma como en el núcleo (Figura 35). El análisis estadístico de este estudio (Figura 36) consideró la tinción positiva para p65 de NF- κ B, tanto en núcleo como citoplasma. Los

resultados indican una reducción significativa del contenido proteico de p65 en las muestras endometriales provenientes de mujeres con hiperandrogenismo y obesidad en relación a las obesas y delgadas SOP, tanto en el compartimiento estromal como epitelial (Figura 36).

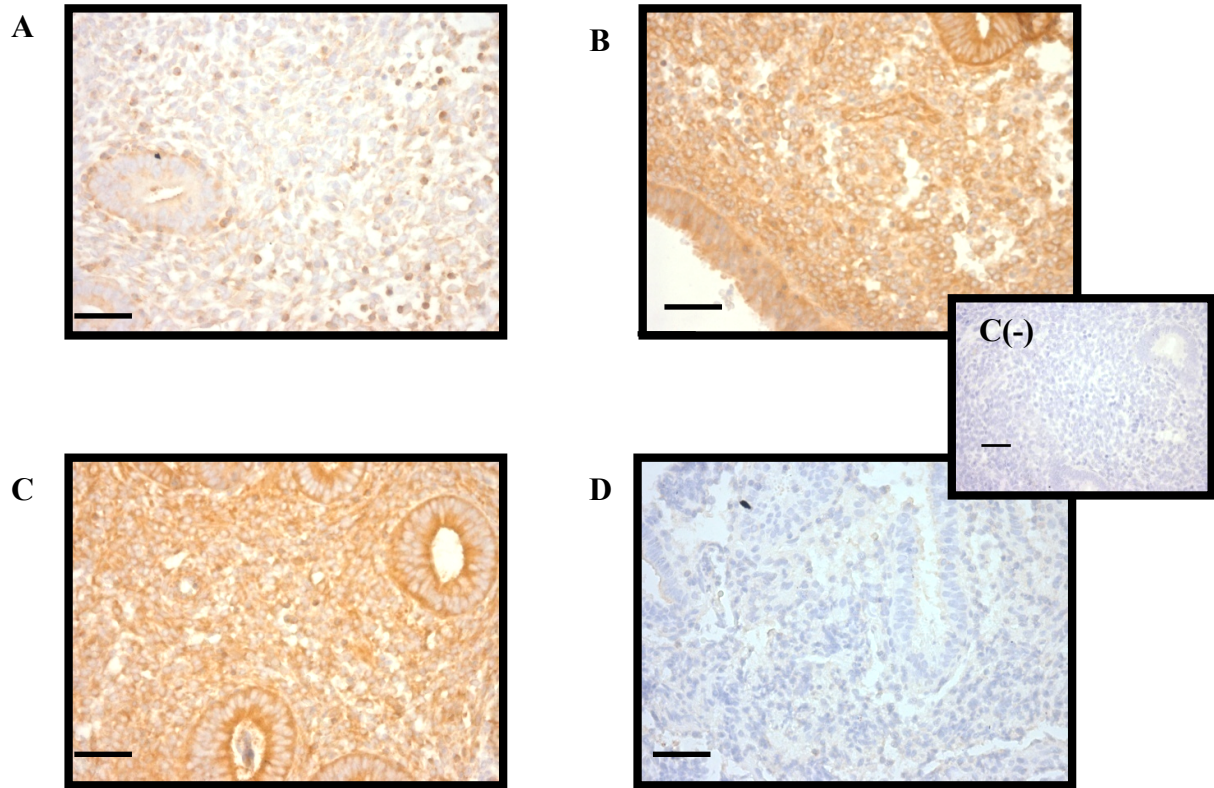


FIGURA 35: Detección de la subunidad p65 de NF- κ B por IHQ en endometrios de grupos estudiados. (A) mujeres delgadas, (B) mujeres delgadas con SOP, (C) mujeres obesas, (D) mujeres obesas con SOP. C (-) Control negativo. Barra: 50 μ m.

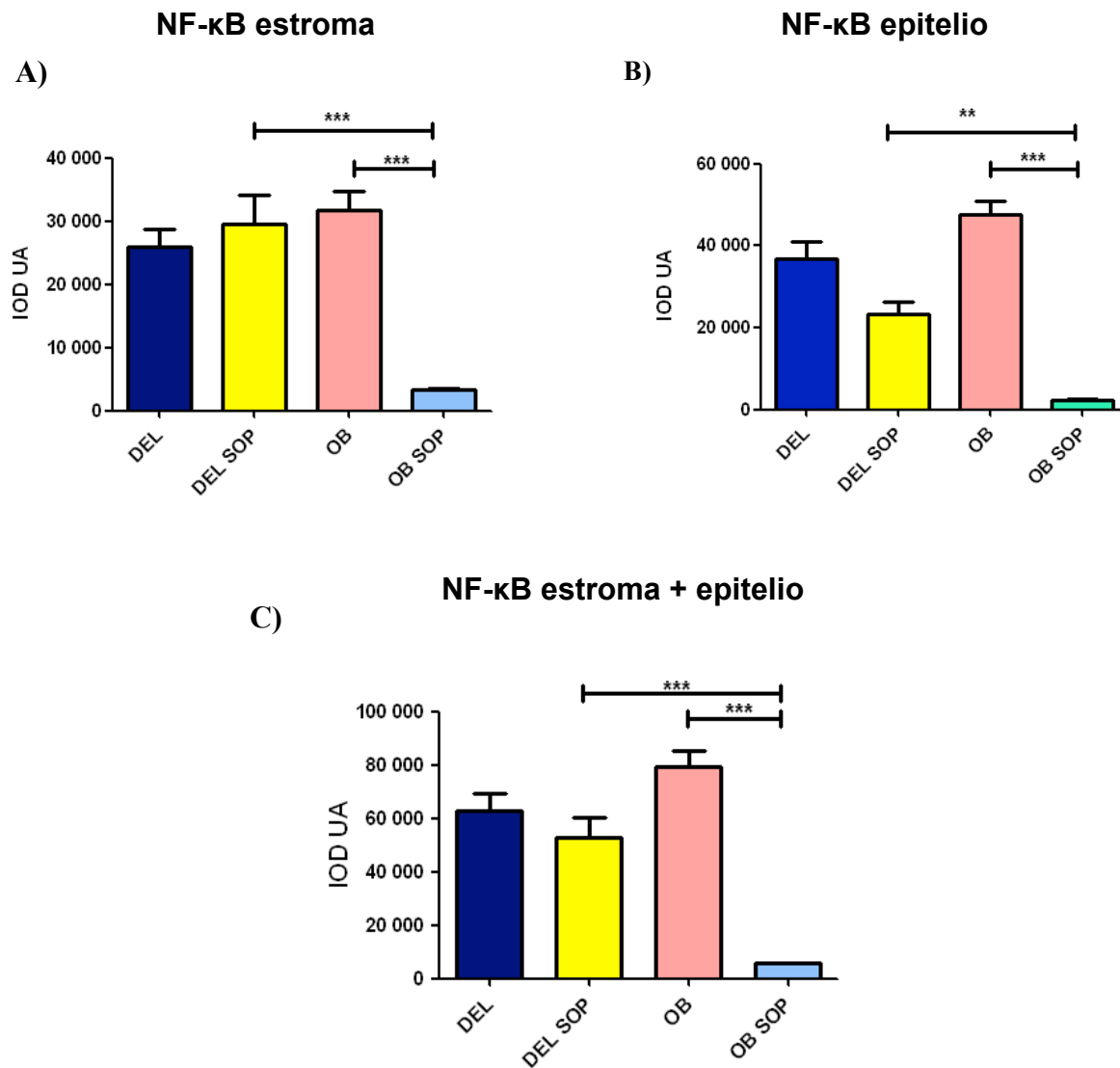


FIGURA 36: Niveles proteicos de p50 de NF-κB en los distintos grupos de endometrios estudiados. A) IHQ de tejido estromal, B) IHQ de tejido epitelial, C) Cuantificación estroma + epitelio. Los gráficos A, B y C representan el promedio IOD UA ±EEM de DEL (n=4), DEL SOP (n=3), OB (n=3), OB SOP (n=4) *p<0,01, **p<0,001, *p<0,0001. Los datos se analizaron por test no parametrico Kruskal Wallis.**

5.8.2 Niveles proteicos de p65 de NF-κB nuclear

Los resultados se muestran en la figura 36. Es importante considerar el contenido proteico de NF-κB a nivel nuclear, dado que una de las funciones de esta proteína, especialmente la subunidad p65 de NF-κB, es ejercida a nivel nuclear, regulando positiva o negativamente la transcripción de genes. Los datos muestran claramente que en los endometrios del grupo de mujeres con obesidad y SOP existe un aumento significativo de los niveles de NF-κB nuclear respecto de los otros grupos de estudio. Estos resultados sugieren que la condición de obesidad sumada a la condición SOP favorecería el ingreso de NF-κB al núcleo celular (Figura 37).

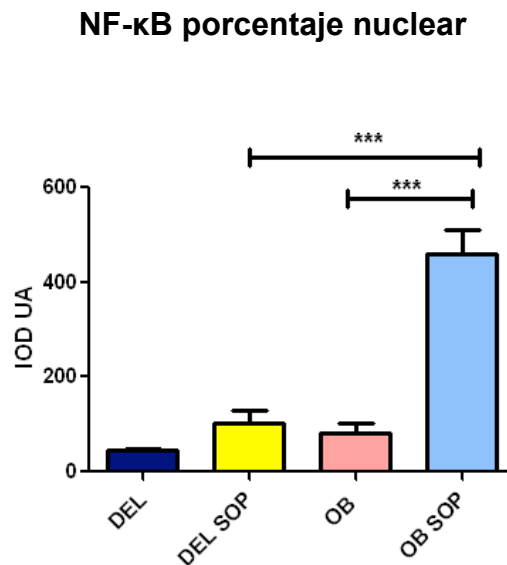


FIGURA 37: Niveles proteicos de la subunidad p65 de NF-κB a nivel nuclear en endometrios. IHQ del porcentaje nuclear de p65, la figura representa el promedio IOD UA \pm EEM de DEL (n=4), DEL SOP (n=3), OB (n=3), OB SOP (n=4), *p<0,01, **p<0,001, ***p<0,0001. Los datos se analizaron por test no paramétrico Kruskal Wallis.

5.8.3 Niveles génicos de p65

Se determinaron los niveles génicos de p65 a través de qPCR en los endometrios de los grupos delgadas, obesas y obesas SOP, cuyos resultados se muestran en la figura 38. Se encontró niveles significativamente disminuidos en el grupo de obesas SOP respecto de obesas, lo que indicaría que la condición de hiperandrogenismo podría influir en este resultado.

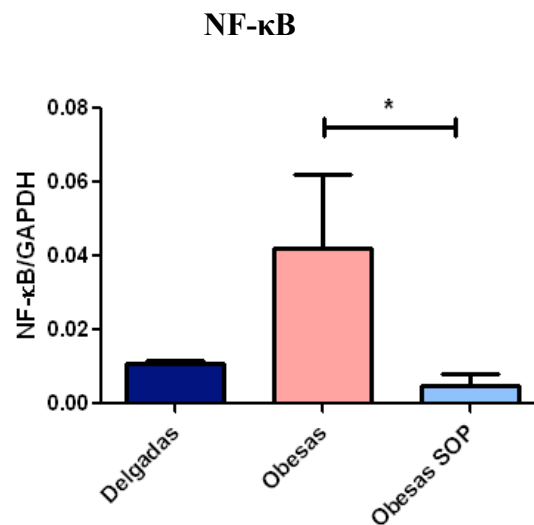


Figura 38: Niveles génicos de NF-κB en endometrios. PCR semicuantitativo representa el promedio UA ± EEM de las muestras analizadas, delgadas (n=3), obesas (n=3), obesas SOP (n=3), *p<0,01. Los resultados se analizaron por test no paramétrico de Kruskal Wallis.

6. DISCUSIÓN

La hiperandrogenemia, el hirsutismo, los ciclos menstruales irregulares, la obesidad central, la resistencia a la insulina y el SOP, pueden estar presentes simultáneamente en un mismo individuo. Estos desordenes parecen estar fuertemente relacionados, aunque la naturaleza exacta y los mecanismos de cómo ocurre dicha relación aún no se encuentran bien establecidos (83). Posteriormente a los criterios de diagnóstico del SOP establecidos en el consenso de Róterdam (2004), la Sociedad de Exceso de Andrógenos (AES) publicó un nuevo artículo donde explicaba la importancia del hiperandrogenismo y de los ciclos anovulatorios como criterio de diagnóstico por sobre la observación de ovarios poliquístico a la ultrasonografía (84). Es por esta razón que es importante mencionar que las pacientes con SOP incluidas en este trabajo cumplían tanto con los criterios de diagnóstico del consenso de Róterdam como también con los criterios establecidos por la AES, de esta forma la característica común entre ellas era la hiperandrogenemia. Además, como ya ha sido mencionado, pese a que la resistencia a la insulina no está dentro de los criterios de diagnóstico del SOP, un subgrupo de pacientes participantes de este estudio son mujeres que presentan obesidad y SOP (hiperandrogenemia) e hiperinsulinemia. El grupo de mujeres obesas sólo tenían alterado el IMC, las mujeres delgadas con SOP presentaban solo hiperandrogenismo, y las mujeres delgadas no presentaron ninguna de estas alteraciones. Por otro lado, es importante recordar que la obesidad no es un criterio diagnóstico de SOP. Sin embargo, actualmente se considera que entre el 60 a 80 % de las mujeres que padecen SOP son obesas (3).

Se sabe que la insulina participa en la regulación de la ovulación normal y puede estimular excesivamente la producción de andrógenos (85). Es por esto que se ha presentado evidencia que existe una relación recíproca entre hiperinsulinemia e hiperandrogenemia, ya que la administración de andrógenos puede inducir resistencia a la insulina tanto en hombres como en mujeres. Sin embargo, la mayoría de los estudios han mostrado que en pacientes con SOP que han recibido tratamientos anti-androgénicos o con otras drogas que suprimen la secreción de andrógenos del ovario, como por ejemplo los anticonceptivos o agonistas de GnRH, la resistencia a la insulina se ve pobremente

disminuida (86). Para determinar la condición de resistencia a la insulina en una paciente, una de las pruebas más sensibles y fáciles de realizar es la Prueba de Tolerancia a la Glucosa Oral (PTGO) (4). De acuerdo a lo anterior, a todas las mujeres participantes de este estudio (con o sin SOP) se les realizó un PTGO y se incluyeron en este trabajo todas las muestras endometriales que provenían de aquellas pacientes que presentaban o no hiperinsulinemia, dependiendo del grupo de estudio.

Este ambiente hiperinsulínico, en conjunto con la constante exposición que tiene el endometrio de mujeres con SOP a la acción de los esteroides sexuales, podrían explicar, en parte, los cambios observados en la homeostasis del tejido endometrial de estas pacientes. Resultados de nuestro laboratorio han demostrado que existen diferencias moleculares entre el endometrio de mujeres con SOP y sin SOP, aunque morfológicamente sean indistinguibles ambos tipos de endometrio. En los últimos años, nuestro grupo ha reportado que lo anterior es de particular importancia dado que para el correcto funcionamiento del endometrio, éste requiere del aporte energético proveniente de glucosa. Con el objeto de aumentar el conocimiento sobre el estado metabólico del endometrio en la condición SOP, además de hiperinsulinismo y obesidad, el presente trabajo se enfocó en la acción de adiponectina y su vía de señalización a nivel endometrial, debido a que se ha descrito una acción insulino-sensibilizante de adiponectina (74).

Se han descrito tres tipos principales de resistencia insulínica que afectan a los receptores de insulina o a las señales involucradas antes o después del receptor. La importante para esta tesis ya que es la más frecuente en el SOP (87) es el tipo de resistencia a la insulina que es poligénica, multifactorial y sería una alteración en los mecanismos post-receptor, es decir, en la vía de señalización de insulina. En efecto, estudios previos en nuestro laboratorio muestran que los niveles proteicos del receptor de insulina no varían entre endometrios de pacientes con SOP resistentes a la insulina y los endometrios controles (88). Por lo tanto, esto lleva a pensar que la alteración en la vía de señalización metabólica de la insulina en los endometrios de las mujeres que presentan este síndrome debe ser posterior a la unión de la insulina con su receptor.

La adiponectina es una adipoquina producida por varios tejidos del organismo, fundamentalmente por el tejido adiposo. Su concentración plasmática se relaciona de manera inversa con el grado de obesidad (38, 50, 59, 89, 90), lo que se confirma en este

trabajo, donde se observó pacientes obesas con SOP e hiperinsulínicas, presentaron valores inferiores de adiponectina sanguínea. Sin embargo, esta situación no se evidenció en las pacientes obesas, lo que podría explicarse por la ausencia de hiperandrogenismo y/o de hiperinsulinismo en ese grupo de mujeres. Este resultado fue comprobado a nivel endometrial, donde se obtuvo una disminución del contenido proteico de adiponectina en tejidos provenientes de pacientes obesas SOP respecto de los otros grupos de estudio. En efecto, por WB se observa una disminución de los niveles de adiponectina cuando las condiciones de hiperandrogenismo e hiperinsulinemia están presentes, lo que se relaciona con la literatura que nos indica una relación inversa entre adiponectina y obesidad, como ya se mencionó (38, 50, 59, 89, 90, 91). Lo anterior se refuerza por los resultados que señalan una disminución en los niveles de adiponectina al comparar endometrios de mujeres delgadas con mujeres obesas, indicando que la condición de obesidad estaría influenciando la disminución de adiponectina en el tejido de este tipo de mujeres. Más aún, las moléculas de la vía de señalización de adiponectina también se vieron afectadas por la condición SOP, hiperinsulinemia y obesidad. Por ejemplo, los receptores de adiponectina y APPL1, molécula adaptadora, ambas involucradas en la activación de proteínas que permiten la captación de glucosa, también estarían disminuidas en los endometrios de mujeres obesas SOP, tal como se discutirá más adelante.

En relación a los receptores AdipoR1 y AdipoR2, éstos se encuentran alterados en los endometrios de las pacientes obesas y SOP, de acuerdo a los resultados de esta tesis. Es así como los niveles de AdipoR1 están disminuidos en los endometrios de mujeres obesas con SOP e hiperinsulínicas respecto a los endometrios del grupo de obesas, siendo similar al grupo de delgadas. De este resultado se puede inferir que la condición hiperandrogénica e hiperinsulínica y no la obesidad, tendría un efecto importante sobre la regulación del receptor. Lo anterior tiene relación con estudios donde se evidenció mecanismos compensatorios a partir de su micro-ambiente, donde exceso de insulina promueve una inhibición de ambos receptores (11, 94), lo cual tiene congruencia con los resultados obtenidos en este tipo de pacientes. Al contrario, el nivel del receptor tipo 2 de adiponectina fue similar en los tres grupos estudiados. En cuanto a los niveles génicos de ambos receptores, estos no se modificaron con las condiciones metabólicas ni endocrinas de las muestras.

En conjunto, estos resultados sugieren que en el tejido endometrial el receptor de adiponectina tipo 1 es el que mayoritariamente es regulado por las condiciones metabólicas y endocrinas de las muestras, cuyos mecanismos moleculares deben ser dilucidados en investigaciones futuras.

Continuando con la vía de señalización de adiponectina, los receptores se asocian con la molécula adaptadora APPL1, como se mencionó. Esta molécula por si misma puede provocar la activación de varias rutas de señalización (Figura 1). No se conoce el mecanismo por el cual APPL1 distingue la vía de señalización a seguir o activar ni cuáles son las condiciones moleculares que hacen preferir una vía de señalización sobre otra. En el presente trabajo nos enfocamos en la vía de señalización adiponectina/TAK1/MEK3/p38MAPK. Ha sido descrito en la literatura que APPL1 se une al receptor de adiponectina, y esta interacción induciría la fosforilación (activación) de TAK1, lo cual provocaría la unión de MEK3 y su activación por fosforilación. Finalmente, existiría una interacción entre APPL1 y α -p38MAPK. Esto último se demostró por estudios de co-inmunoprecipitación, donde se evidenció que estas moléculas se unen a APPL1 estimulando esta vía de señalización (75). Para la presente investigación es de particular interés considerar que APPL1 activa la vía de las MAPK, como es la familia de p38MAPK. Esta proteína es fosforilada en respuesta a un estímulo exterior, como por ejemplo, stress oxidativo, citoquinas inflamatorias (interleuquina IL-1, factor de necrosis tumoral, TNF α), stress celular (78, 93). Por otro lado, la activación de p38MAPK puede estimular la transcripción y fosforilación de varias moléculas, algunas de las cuales discutiremos más adelante.

Los resultados descritos en esta tesis muestran que los niveles proteicos de APPL1, evaluados por IHQ y WB, en mujeres que presentan obesidad y además SOP, están disminuidos. Específicamente, al evaluar por IHQ se encontró que el contenido proteico de APPL1 en los endometrios de mujeres obesas y con SOP es significativamente menor al encontrado en los endometrios de los otros grupos en estudio, lo cual se confirmó por WB respecto al grupo de delgadas. Estos datos sugieren que en presencia de hiperandrogenismo, hiperinsulinismo y obesidad, la comunicación a través de APPL1 en el endometrio de mujeres con estas condiciones, estaría regulada negativamente, lo cual produciría una disminución de la señalización de adiponectina. Además, se podría inferir que la situación

hiperinsulínica tendría una acción preponderante por sobre las otras condiciones en el contenido proteico de APPL1, según los resultados de IHQ.

Para confirmar si efectivamente la vía de adiponectina/TAK1/MEK3/p38MAPK esta disminuida, se evaluó los niveles proteicos de las moléculas involucradas. Los resultados muestran que la activación de TAK1 está disminuida en los endometrios de mujeres obesas, hiperinsulínicas y SOP, evidenciada por los menores niveles de p-TAK1 encontrados por IHQ. Más importante aún es el resultado que muestra que la activación de TAK1 es menor en el grupo de obesas SOP comparado con lo obtenido para endometrios de mujeres delgadas SOP. Por lo tanto, la condición de obesidad e hiperinsulinismo estaría influenciando la disminución en la activación de esta molécula de manera significativa. Al contrario, la condición hiperandrogénica pareciera ejercer un efecto opuesto. Esto tiene concordancia con los resultados obtenidos para APPL1, donde en la condición de obesidad observamos menor nivel de esta molécula, lo que indicaría que existe una disminución de la activación de las moléculas de esta vía de señalización en la condición de obesidad.

Otro de los componentes de la vía de señalización de adiponectina es MEK3. Esta es una quinasa activada por TAK1, en cooperación con la proteína de andamiaje APPL1. Los resultados del presente trabajo muestran que los niveles proteicos de p-MEK3 están disminuidos en los endometrios de mujeres en la condición de obesidad y SOP, en comparación a mujeres delgadas SOP. Es importante destacar que el hiperandrogenismo presente en ambos grupos de mujeres SOP induce una disminución de los niveles proteicos endometriales de p-MEK3, pero esta disminución es más evidente en condición de obesidad. Por lo tanto, la obesidad tiene efectos fisiológicos importantes en la activación de moléculas de comunicación celular. Estos resultados también son congruentes con los niveles proteicos disminuidos de APPL1 obtenidos en este estudio, donde el contenido de APPL1 está disminuido influenciado por la obesidad.

Tal como se mencionó, en la vía de adiponectina, APPL1 puede interactuar con p38MAPK. En este estudio se evaluó el contenido proteico de esta quinasa y su estado fosforilado en los endometrios obtenidos de los distintos grupos de mujeres incluidas en este estudio. A diferencia de lo encontrado para las otras moléculas de la vía, los niveles de esta proteína se encuentran aumentados en los endometrios de mujeres obesas, hiperinsulínicas con SOP al compararlos con las delgadas con SOP y con el grupo de

obesas. Estos datos no son congruentes con los resultados discutidos previamente, donde los niveles de APPL1, p-TAK1 y p-MEK3 están disminuidos en condición de obesidad y SOP. En este sentido, podríamos inferir y de acuerdo a información de la literatura, que α -p38MAPK puede activarse por otras moléculas como MEK6 no mediante la vía de adiponectina, sino que a través de TNF- α (78, 94). Es interesante destacar que resultados no publicados de nuestro laboratorio señalan que los niveles de TNF- α en los endometrios de mujeres con obesidad y SOP están aumentados, pudiendo estimular el ambiente pro-inflamatorio y promover la activación de otras moléculas como NF- κ B.

De acuerdo a lo anterior así como al interés de esta tesis, este estudio se centró en conocer la activación de NF- κ B, la cual pudiese estar mediada por p38MAPK, entre otros factores. Como se mencionó, esta molécula (NF- κ B) regula la expresión de genes de varias citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión celular (79), las cuales podrían estar relacionadas con el estado pro-inflamatorio que experimentan las mujeres que presentan obesidad.

En la presente tesis se evaluó los niveles proteicos totales celulares, el porcentaje de núcleos positivos para NF- κ B y los niveles génicos de esta proteína blanco de α -p38MAPK. Los resultados obtenidos muestran una disminución clara de los niveles de NF- κ B total en ambos compartimentos celulares (epitelio y estroma) del endometrio de mujeres con hiperinsulinemia, obesidad y SOP en comparación a los otros grupos de pacientes. Sin embargo, el análisis del porcentaje de células con núcleo positivo para NF- κ B, reveló que en los endometrios de mujeres obesas y con SOP estos están aumentados. Lo anterior indicaría que los tejidos de las mujeres con estas características tendrían mayor contenido de NF- κ B a nivel nuclear, sugiriendo que esta proteína activa estaría transcribiendo moléculas en el núcleo. Es decir, lo interesante es que en los endometrios de mujeres obesas con SOP, a pesar de determinar niveles menores de NF- κ B total, el nivel proteico de la proteína activa encontrado en el núcleo, es mayor. Estos datos tienen concordancia con los obtenidos anteriormente y con antecedentes de la literatura (77, 78, 79), donde se establece que α -p38MAPK podría activar a NF- κ B. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis, α -p38MAPK está aumentado en condiciones de obesidad y SOP, por lo que se debería esperar un mayor nivel de NF- κ B activa, que es lo que efectivamente ocurre. Además, se debiera considerar el ambiente pro-inflamatorio presente

en la condición de obesidad en mujeres con SOP, una de las moléculas liberadas por el tejido adiposo en este estado es TNF- α , esta molécula puede activar no solo a NF- κ B, sino que también a MEK6 (77, 78, 80, 94).

En consecuencia, en las condiciones de hiperinsulinemia, obesidad y SOP se evidencia en el endometrio una disminución de los niveles de moléculas de la vía de señalización de adiponectina estudiadas, a excepción de p38MAPK. La activación de este último puede estar mediada por otro tipo de moléculas como TNF- α , o el ambiente inflamatorio que conlleva a un stress celular (77). Por otro lado, resultados de nuestro laboratorio señalan que en células estromales *in vitro* en presencia de TNF- α , la captación de glucosa se encuentra disminuida, en condiciones de obesidad y SOP e hiperinsulinemia, resultados que aun no han sido publicados. Al respecto, el aumento de p38MAPK encontrado en las muestras de endometrios de mujeres obesas, hiperinsulínicas y con SOP, de acuerdo a reportes de literatura, podría indicar un aumento de la captación de glucosa, situación que claramente no ocurre, por las características presentadas por las pacientes obesas con SOP evidenciada en la Tabla 7. Por lo tanto, podríamos pensar que existen otras moléculas involucradas en la regulación de la captación de glucosa a través de p38MAPK que pudiesen estar alteradas en estas condiciones estudiadas.

En resumen, la obesidad, en primer lugar y luego la condición SOP e hiperinsulinemia presente en un subgrupo de mujeres de este estudio, claramente alteran negativamente la vía de señalización de adiponectina. Esto sugiere que la acción insulino sensibilizante de esta adipoquina se encuentra disminuida, todo lo cual puede aportar a una anomalía en el funcionamiento endometrial y, por ende, a las fallas reproductivas observadas en estas mujeres.

7. CONCLUSIONES GENERALES

El SOP es una de las patologías con mayor prevalencia dentro de mujeres en edad reproductiva y se caracteriza por poseer disfunción ovárica debido a un exceso de andrógenos. Un alto porcentaje de mujeres con esta patología presenta obesidad, dentro de las cuales adiponectina y su vía de señalización parecen ser claves en el correcto funcionamiento del endometrio humano.

- ✓ Los resultados obtenidos en el primer objetivo específico denotan la presencia de adiponectina y su receptor en el tejido endometrial. El contenido proteico de adiponectina evidenció una disminución en mujeres con obesidad y SOP. En cuanto al contenido proteico y génico del receptor AdipoR1 se observó una disminución de su contenido en mujeres con obesidad y SOP, en cambio el receptor AdipoR2 no presentó diferencias significativas entre los grupos estudiados. Por lo tanto, el tejido endometrial humano es blanco potencial de la acción de adiponectina, sugiriendo su participación en la homeostasis glucídica de este tejido.
- ✓ Los resultados del objetivo específico dos muestran disminución en los contenidos génicos y proteicos de moléculas que pertenecen a la vía de señalización de adiponectina. En efecto, en la condición de obesidad y SOP el contenido proteico y génico de las moléculas APPL1, MEK3-p, TAK1-p fueron menores que en los endometrios de los otros grupos estudiados. Estos datos explicarían en parte la disminución en la captación de glucosa detectada en estos tejidos, la cual hemos reportado previamente.

No obstante lo anterior, se encontró aumento en el contenido proteico de p38-MAPK; este resultado se podría explicar fundamentalmente por la condición pro-inflamatoria dada por la obesidad y que hemos demostrado en el tejido endometrial de mujeres obesas y SOP, no descartando que la condición hiperandrogénica tenga una participación en estos resultados.

- ✓ En el objetivo específico tres se determinó una proteína blanco para p38-MAPK, el factor de transcripción NF-kB, específicamente la subunidad p65. Se observó un aumento de esta molécula en su contenido proteico a nivel nuclear en los

endometrios de la condición de obesidad y SOP, indicando que es probable que en estas condiciones esta proteína pueda regular negativamente algunas moléculas importantes para la captación de glucosa, como GLUT4.

En base a los resultados expuestos, la Hipótesis propuesta para este estudio se concluye como verdadera. La condición de obesidad sumada al SOP promueve una disminución de los niveles de moléculas en la vía de señalización de adiponectina, como APPL1/TAK1/MEK3, lo que sumado al aumento de la subunidad p65NF-kB, pudiese conducir a la disminución en la captación de glucosa que hemos demostrado anteriormente. Por lo tanto, estas condiciones tienen un impacto a nivel del estroma endometrial, lo cual sería relevante para entender el funcionamiento anómalo de este tejido y explicaría, al menos en parte, las fallas reproductivas de estas pacientes.

8. PROYECCIONES

Los resultados de este estudio pueden dar inicio a investigaciones futuras que pueden desarrollarse en tejido endometrial, y que pretendan buscar los mecanismos específicos de la comunicación celular en patologías como el SOP y obesidad. El endometrio es un tejido esencial en los procesos reproductivos y específicamente, el correcto funcionamiento del estroma endometrial es relevante para mantener la homeostasis energética del tejido. Como se sabe, la fertilidad de las pacientes con SOP se encuentra alterada y sistemas de señalización como Adiponectina/APPL1 parecen ser claves en los procesos que conducen a patologías que involucran el mantenimiento de la homeostasis celular. Sería interesante poder entender la vía metabólica y bajo qué condiciones APPL1 selecciona la vía a través de la cual actuará. Además, y de manera importante, aumentar el conocimiento a nivel molecular de la acción insulino sensibilizante de adiponectina, y por ende, de la regulación del efecto de insulina en los tejidos y de qué manera estos efectos pueden modificarse en personas obesas.

9. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Una de las limitaciones más importante es el acceso a reclutar pacientes que acepten la invitación a participar de este estudio. A pesar que el SOP es una patología de alta prevalencia, la obtención de muestras endometriales es dificultosa, especialmente en los grupos de mujeres que tienen SOP y son delgadas. Ese fenotipo es poco frecuente en nuestra población chilena, por lo que disponer de un número adecuado de esas muestras endometriales sería un logro. Es por ello que del análisis estadístico realizado a los resultados obtenidos en esta tesis, se observan que algunos de ellos presentan “tendencias” que no alcanzan a ser significativas al ser analizadas por los test estadísticos. Por ello, lo ideal sería disponer de un mayor número de muestras. Además, es importante consignar que el SOP no posee un fenotipo clásico, ya que al ser un síndrome presenta diversas alteraciones a nivel molecular que se entremezclan en cada una de las pacientes. Por esto, en la presente tesis se estableció criterios clínicos y de laboratorio precisos para definir los grupos a estudiar de acuerdo a la pregunta formulada en esta investigación.

10. BIBLIOGRAFIA

- (1) Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar- Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF. Androgen Excess Society. (2006) Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 91:4237-45
- (2) Azziz R, Marin C, Hoq L, Badamgarav E, Song P. (2005) Health care-related economic burden of the polycystic ovary syndrome during the reproductive life span. *J Clin Endocrinol Metab.* 90:4650-8.
- (3) Gallagher D, Heymsfield SB, Heo M, Jebb SA, Murgatroyd PR, and Sakamoto Y. (2000). Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *Am J Clin Nutr.* 72, 694-701.
- (4) Kuczmarski RJ, Flegal KM, Campbell SM, and Johnson CL (1994). Prevalence of overweight among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991. *JAMA.* 272, 205-211.

- (5) Rosas C, Gabler F, Vantman D, Romero C, Vega M. (2010) Levels of Rabs and WAVE family protein associated with translocation of GLUT4 to the cell surface in endometria from hyperinsulinemic PCOS women. *Hum Reprod Biol Endocrinol* 10:17-27
- (6) Fornes R, Ormazabal P, Rosas C, Gabler F, Vantman D, Romero C, Vega M. (2010) Changes in the expression of insulin signaling pathway molecules in endometria from polycystic ovary syndrome women with or without hyperinsulinemia. *Mo Med* 16:129-136.
- (7) Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K. (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med*. 7:941-6.
- (8) Baillargeon JP, Nestler JE. (2006) COMMENTARY: Polycystic Ovary Syndrome: A Syndrome of Ovarian Hypersensitivity to Insulin. *J Clin Endocrinol Metab*. 91(1):22–24.
- (9) Marx TL, Mehta AE. (2003) Polycystic ovary syndrome: pathogenesis and treatment over the short and long term. *Cleve Clin J Med*. 70:31-3.
- (10) Guzmán E, Rodríguez N, Ruiz M. (2005). Selección de Temas de Ginecoobstetricia, 1er ed, Santiago: Ediciones Publimpacto.
- (11) Homburg R. (2006). Pregnancy complications in PCOS. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20, 281-292.
- (12) Rulli S, Huhtaniemi I. (2005) What have gonadotrophin overexpressing transgenic mice taught us about gonadal function?. *Reproduction* 130, 283-291.
- (13) Zawadzki JK, Dunaif A. (1992) Diagnostic criteria for Polycystic Ovary Syndrome: towards a rational approach. Dunaif A, Givens JR, Haseltine F, eds. *Polycystic Ovary Syndrome*. Boston: Blackwell Scientific: 377-84.
- (14) Schuring AN, Schulte N, Sonntag B, Kiesel L. (2008) Androgens and insulin—two key players in polycystic ovary syndrome. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch*. 48(1): 9-15.
- (15) Ferency C, Bergeron C. (1991) Histology of the human endometrium: From birth to senescence. *Ann N Y Acad Sci* 622-627.
- (16) Critchley HO, Kelly RW, Brenner RM, Baird DT. (2001) The endocrinology of menstruation—a role for the immune system. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 55:701–710
- (17) Jabbour HN, Kelly RW, Fraser HM, Critchley HO. (2006) Endocrine regulation of menstruation. *Endocr Rev*. 27:17-46
- (18) Giudice L. (2006) Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 20 : 235-244.
- (19) Avellaira C. Regulation de la función del receptor de andrógenos en endometrios de

mujeres con Síndrome de Ovario Poliquístico. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, mención Biología de la Reproducción 2005, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

(20) Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, Von Wolff M. (2006) The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update*. 12:617-630.

(21) Enslen H, Raingeaud J, Davis R.J. (1998) Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoformas by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem*. 16; 273:1741-1749.

(22) Maliqueo M, Clementi M, Gabler F, Johnson MC, Palomino A, Sir-Petermann T, Vega M. (2003) Expression of steroid receptors and proteins related to apoptosis in endometria of women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 80: 812-9.

(23) Villavicencio A, Bacallao , Avellaira C, Gabler F, Fuentes A, Vega M. (2006) Androgen and estrogen receptors and co-regulators levels in endometria from patients with polycystic ovarian syndrome with and without endometrial hyperplasia. *Gyn Oncol*. 103:307-314.

(24) Villavicencio A, Goyeneche A, Telleria C, Bacallao K, Gabler F, Fuentes A, Vega M. (2009) Involvement of Akt, Ras and cell cycle regulators in the potential development of endometrial hyperplasia in women with polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Oncol*. 115:102-7

(25) Quezada S, Avellaira C, Johnson MC, Gabler F, Fuente A, Vega M. (2006) Evaluation of steroid receptors, coregulators, and molecules associated with uterine receptivity in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 85:1017- 26.

(26) Leon L, Bacallao K, Gabler F, Romero C, Valladares L, Vega M. (2008) Activities of steroid metabolic enzymes in secretory endometria from untreated women with Polycystic Ovary Syndrome. *Steroids*. 73:88-95.

(27) Mioni R, Chiarelli S, Xamin N, Zuliani L, Granzotto M, Mozzanega B, Maffei P, Martini C, Blandamura S, Sicolo N, Vettor R. (2004) Evidence for the presence of Glucose Transporter 4 in the Endometrium and its Regulation in Polycystic Ovary Syndrome Patient. *J Clin Endocrinol Metab*. 89:4089-4096.

(28) Von Wolff M, Ursel S, Hahn U, Steldinger R, Strowitzki T. (2003) Glucose transport protein (GLUT) in human endometrium: expression, regulation, and function throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *J. Clin. Endocrinol.Metab*. 88: 3885–92.

(29) Ovalle F, Azziz R. (2002) Insulin resistance, polycystic ovary syndrome, and type 2 diabetes mellitus. *Fertil Steril*. 77:1095–1105.

(30) Lathi R, Hess A, Tulac S, Nayac N, Conti M, Giudice L. (2005) Dose-dependent

insulin regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 in human endometrial stromal cells is mediated by distinct signaling pathways. *J Clin Endocrinol Metab.* 90:1599-1606

(31) Chakraborty C. (2006) Biochemical and molecular basis of insulin resistance. *Curr Protein Pept Sci.* 7: 113-121.

(32) Keys A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Taylor HL. (1972) Indices of relative weight and obesity. *J Chronic Dis.* 25, 329-343.

(33) Cinti S. (2001) The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proc Nutr Soc.* 60, 319-328.

(34) Cook K, Groves D, Min H, Spiegelman B. (1975) A developmentally regulated mRNA from 3T3 adipocytes encodes a novel serine protease homologue. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82, 6480-6484.

(35) Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 95, 2409-2415.

(36) Friedman JM. (2000) Obesity in the new millennium. *Nature.* 404, 632-634.

(37) Shimomura I, Funahashi T, Takahashi M, Maeda K, Kotani K, Nakamura T, Yamashita S, Miura M, Fukuda Y, Takemura K, Tokunaga K, Matsuzawa Y. (1996) Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat Med.* 2, 800-803.

(38) Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee R, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 409, 307-312

(39) Hu E, Liang P, Spiegelman BM. (1996) AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem.* 271, 10697-10703

(40) Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. (1996) cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun.* 221, 286-289.

(41) Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. (1996) Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J. Biochem. (Tokyo).* 120, 803-812.

(42) Deepa S, Dong L. (2009) APPL1: role in adiponectin signaling and beyond. *American journal of physiology. Endocrinol and metabol.* 296: E22-36.

- (43) Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. (2003) Adiponectin: more than just another fat cell hormone? . *Diabetes Care*. 26, 2442-2450.
- (44) Gustafson B, Jack MM, Cushman SW, Smith U. (2003) Adiponectin gene activation by thiazolidinediones requires PPAR gamma 2, but not C/EBP alpha-evidence for differential regulation of the aP2 and adiponectin genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 308, 933-939.
- (45) Park SK, Oh SY, Lee MY, Yoon S, Kim KS, Kim JW. (2004) CCAAT/enhancer binding protein and nuclear factor-Y regulate adiponectin gene expression in adipose tissue. *Diabetes*. 53, 2757-2766.
- (46) McDonald EA, Wolfe MW. (2009) Adiponectin attenuation of endocrine function within human term trophoblast cells. *Endocrinol*. 150: 4358-4365.
- (47) Yokota T, Meka CS, Medina KL, Igarashi H, Comp PC, Takahashi M, Nishida M, Oritani K, Miyagawa J, Funahashi T, Tomiyama Y, Matsuzawa Y, Kincade PW. (2002). Paracrine regulation of fat cell formation in bone marrow cultures via adiponectin and prostaglandins. *J Clin Invest* 109: 1303-1310.
- (48) Fang X, Palanivel R, Cresser J, Schram K, Ganguly R, Thong FS, Tunei J, Xu A, Abel ED, Sweeney G. (2010) APPL-1-AMPK signaling axis mediates beneficial metabolic effects of adiponectin in the heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299:721-729.
- (49) Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y. (2000) Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20, 1595-1599.
- (50) Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley R.E, and Tataranni P.A.(2001). Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J. Clin. Endocrinol.Metab*.86, 1930-1935.
- (51) Adamczak M, Wiecek A, Funahashi T, Chudek J, Kokot F, and Matsuzawa Y. (2003). Decreased plasma adiponectin concentration in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens*. 16, 72-75.
- (52) Kishida K, Nagaretani H, Kondo H, Kobayashi H, Tanaka S, Maeda N, Nagasawa A, Hibuse T, Ohashi K, Kumada M, Nishizawa H, Okamoto Y, Ouchi N, Maeda K, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y. (2003) Disturbed secretion of mutant adiponectin associated with the metabolic syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*. 306, 286-292.

- (53) Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, and Tataranni PA. (2001) Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 86, 1930-1935.
- (54) Fasshauer M, Klein J, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, and Paschke R. (2004) Growth hormone is a positive regulator of adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett.* 558, 27-32.
- (55) Bluher M, Fasshauer M, Kralisch S, Schon MR, Krohn K, and Paschke R. (2005) Regulation of adiponectin receptor R1 and R2 gene expression in adipocytes of C57BL/6 mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 329, 1127-1132.
- (56) Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno N.H, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. (2003) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature.* 423, 762-769.
- (57) Kharroubi I, Rasschaert J, Eizirik DL, Cnop M. (2003). Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 312, 1118-1122.
- (58) Takemura Y, Osuga T, Yamauchi T, Kobayashi M, Harada M, Hirata T, Morimoto C, Hirota Y, Yoshino O, Koga K, Yano T, Kadowaki T, Teketani Y. (2006) Expression of adiponectin Receptors and its Possible Implication in the Human Endometrium. *Endocrinol* 147:3203-3210.
- (59) Gil-Campos M, Canete RR, Gil A. (2004) Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clin Nutr.* 23 : 963-74.
- (60) Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman M.L, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. (2002) Adiponectin stimulates utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein Kinase. *Nature.* 11; 1288-1295.
- (61) Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8: 1288–1295.
- (62) Miaczynska M, Christoforidis S, Giner A, Shevchenko A, Uttenweiler-Joseph S, Habermann B, Wilm M, Parton RG, Zerial M. (2004). APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell* 116: 445–456.

- (63) Miaczynska M, Christoforidis S, Giner A, Shevchenko A, Uttenweiler-Joseph S, Habermann B, Wilm M, Parton RG, Zerial M. (2004) APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell*. 116: 445–456.
- (64) Mitsuuchi Y, Johnson SW, Sonoda G, Tanno S, Golemis EA, Testa JR. (1999) Identification of a chromosome 3p14.3–21.1 gene, APPL, encoding an adaptor molecule that interacts with the oncoprotein-serine/threonine kinase AKT2. *Oncogene*. 18: 4891–4897.
- (65) Nechamen CA, Thomas RM, Dias JA. (2007) APPL1, APPL2, Akt2 and FOXO1a interact with FSHR in a potential signaling complex. *Mol Cell Endocrinol*. 260–262.
- (66) Saito T, Jones CC, Huang S, Czech MP, Pilch PF. (2007) The interaction of Akt with APPL1 is required for insulin-stimulated Glut4 translocation. *J Biol Chem*. 282: 32280–32287.
- (67) Mitsuuchi Y, Johnson SW, Sonoda G, Tanno S, Golemis EA, Testa JR. Identification of a chromosome 3p14.3–21.1 gene. (1999) APPL, encoding an adaptor molecule that interacts with the oncoprotein-serine/threonine kinase AKT2. *Oncogene*. 18: 4891–4897
- (68) Yang L, Lin HK, Altuwaijri S, Xie S, Wang L, Chang C. (2003) APPL suppresses androgen receptor transactivation via potentiating Akt activity. *J Biol Chem*. 278: 16820–16827
- (69) Lin DC, Quevedo C, Brewer NE, Bell A, Testa JR, Grimes ML, Miller FD, Kaplan DR. (2006) APPL1 associates with TrkA and GIPC1 and is required for nerve growth factor-mediated signal transduction. *Mol Cell Biol*. 26: 8928–8941
- (70) Varsano T, Dong MQ, Niesman I, Gacula H, Lou X, Ma T, Testa JR, Yates JR 3rd, Farquhar MG. (2006) GIPC is recruited by APPL to peripheral TrkA endosomes and regulates TrkA trafficking and signaling. *Mol Cell Biol*. 26: 8942–8952
- (71) Nechamen CA, Thomas RM, Cohen BD, Acevedo G, Poulikakos PI, Testa JR, Dias JA. (2004) Human follicle-stimulating hormone (FSH) receptor interacts with the adaptor protein APPL1 in HEK 293 cells: potential involvement of the PI3K pathway in FSH signaling. *Biol Reprod*. 71:629–636
- (72) Chakraborty C. (2006) Biochemical and molecular basis of insulin resistance. *Curr Protein Pept Sci*. 7: 113-121.
- (73) Mao X, Kikani CK, Riojas RA, Langlais P, Wang L, Ramos FJ, Fang Q, Christ-Roberts CY, Hong JY, Kim RY, Liu F, Dong LQ. (2006) APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nat Cell Biol* 8: 516–523
- (74) Xunning M (2006). APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin

signaling an function. *Nat Cell Biol.* 43:47-59.

(75) Xin X, Zhou L, Reyes C, Liu F, Dong L. (2010) APPL1 mediates adiponectin-stimulated p38 MAPK activation by scaffolding the TAK1-MKK3-P38 MAPK pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 300: E103-E110

(76) Adebusola A, Ajibade Helen Y Wang, Rong-Fu. Cell type-specific function of TAK1 in innate immune signaling. *Cell.* 8-9-11.

(77) Sakai N, Walda T, Furuichi K, Iwata Y, Yoshimoto K, Kitagawa K, Kokubo S, Kobayashi M, Takeda S, Kida H, Kobayashi K, Mukaida N, Matsushima K, Yokoyama H. (2005) p38 MAPK phosphorylation and NF- κ B activation in human crescentic glomerulonephritis. *Neph Dial Transplant.* 17:998-1004.

(78) Zarubin T, Han J. (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell research.* 15:11-18.

(79) Wong C, Wang C, Ip W, Tian YP, Lam C. (2005) Rol of MAPK and NF κ B for chemokine release in coculture of human eosinophils and bronchial epithelial cells. *Clin Exp Immunol.* 139:90-100.

(80) Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand P, Bergamini G, Croughton K, Cruciat C. (2004) A physical and functional map of the human TNF- α /NF- κ B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol.* 6: 97-105.

(81) Cai D, Yuan M, Frantz D, Melendez P, Hansen L, Lee J, Shoelson S. (2006). Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *NIH Public Access.* 11: 183-190

(82) Noyes RW, Hertig AT, Rock J. (1950) Dating the endometrial biopsy. *Fert Steril.* 1:3-25.

(83) Iatrakis G, Tsionis C, Adonakis G, Stoikidou M, Anthonli-Anagnostopoulou F, Parava M, Vouxinou A, Georgopoulos N, Kourounis G. (2006). Polycystic ovarian syndrome, insulin resistance and thickness of the endometrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 127, 218-221.

(84) Salley K, Wickham E, Cheang K, Essah P, Karjane N, Nestler J. (2007). Position statement: glucose intolerance in polycystic ovary syndrome—A position statement of the androgen excess society. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 4546–4556.

(85) Seto-Young D, Avtanski D, Strizhevsky M, Parikh G, Patel P, Kaplun J, Holcomb K, Rosenwaks Z, Poretsky L. (2007) Interactions among peroxisome proliferator activated receptor- γ , insulin signaling pathways, and steroidogenic acute regulatory protein in human ovarian cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 92, 2232-2239.

- (86) Pugeat M, Ducluzeau P, Mallion-Donadieu M. Association of insulin resistance with hyperandrogenia in women (2000). *Horm Res* 54: 322-326.
- (87) Guzmán E, Rodríguez N, Ruiz M. (2005) Selección de Temas de Ginecoobstetricia, 1er ed, Santiago: Ediciones Publimpacto.
- (88) Fornes R. (2007) Evaluación de moléculas relacionadas con la vía de señalización metabólica inducida por insulina en endometrios de mujeres con síndrome de ovario poliquístico. Tesis de Postgrado Magíster en Ciencias Biológicas, mención Biología de la Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- (89) Barber TM, McCarthy MI, Wass JA, Franks S. (2006) Obesity and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 65:137-45
- (90) Hoeger KM. (2007) Obesity and lifestyle management in polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 50:277-94.
- (91) Burghen G, Givens J, Kitabchi A. (1970) Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 50:113-116.
- (92) Tsuchida A, Yamauchi T, Takekawa S, Hada Y, Ito Y, Maki T, Kadowaki T. (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPARalpha, PPARgamma, and their combination. *Diabetes.* 54:3358-3370.
- (93) Wong CK, Zhang JP, Ip WK, Lam CWK. (2002) Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase and NF- κ B in tumor necrosis factor- α induced eotaxin release of human eosinophils. *Clin Exp Immunol.* 128:483-492.