

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**“PARTICIPACIÓN DE MOLÉCULAS PRO- INFLAMATORIAS
ASOCIADAS A OBESIDAD EN LA FUNCIÓN DE CÉLULAS
ENDOMETRIALES Y ENDOMETRIO DE MUJERES CON
SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO: RELACIÓN ENTRE
FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA, ADIPONECTINA E
INSULINA”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado de Doctora en Bioquímica por:**

MARÍA LORENA ORÓSTICA ARÉVALO

Directora de Tesis

Dra. Margarita Vega B.

**SANTIAGO - CHILE
2016**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

MARÍA LORENA ORÓSTICA ARÉVALO

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctora en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendida el día **21 de Noviembre de 2016**.

Directora de Tesis:

Dra. Margarita Vega B.

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Guillermo Díaz A. (Presidente)

Dra. Mónica Imarai B.

Dra. M. Cecilia Johnson P.

Dra. Mercedes López N.

DEDICATORIA

A mi familia

Mis papas, María Rosa y Juan Alberto y a mi hermano Juan Patricio

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mi directora de tesis, Dra. Margarita Vega, por la confianza y el cariño que siempre me ha tenido, porque sus consejos trascienden más allá de lo académico y eso no tiene precio. En segundo lugar, agradezco a la comisión de la tesis conformada por: Dr. Guillermo Díaz (presidente), Dra. Mónica Imarai (evaluadora externa y muy querida profesora de la USACH), Dra. María Cecilia Johnson y Dra. Mercedes López. Gracias por siempre haber sido una comisión crítica y constructiva, lo cual fue de esencial ayuda para la realización de esta tesis.

No puedo dejar de agradecer a la Dra. Carmen Romero por sus consejos y el cariño que siempre he sentido de parte de ella. A mis compañeros del Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción (2013-2016) que fueron y son un apoyo diario y constante en cuanto a generar discusión y un clima agradable y afectuoso que resultó ser muy motivante. Gracias a Verónica Tápiá e Ivan Hurtado por las risas y momentos únicos dentro y fuera del laboratorio. Un agradecimiento especial a Carolina Vera por la ayuda constante que me dió con respecto a lo que debía saber y no sabía (...mantengamos el contacto por favor), además por las conversaciones y análisis de diversos temas que nutrieron mi formación personal. Gracias Caro y te deseo lo mejor!.

Gracias a todo el laboratorio de los profesores Hector Contreras y Enrique Castellón, en especial a Graciela, Nancy, Octavio, Dani y Fernanda, por la buena onda y ayuda con la sala de cultivo, lo que me permitió realizar los últimos experimentos de la tesis.

Me siento enormemente agradecida por la gran disposición por parte de las ayudantes técnicas del laboratorio: Sra. Filomena Ogaz, Sra. Erminia Marchant y Sra. Soledad Gómez. Siempre conté con ellas para todo lo relacionado con el manejo de muestras. Gracias por la ayuda y el cariño!. Gracias también a Egardo Caamaño y a Carlos Caroca por la simpatía diaria. Además, quiero agradecer a Don Alberto Urrea y Don Cristian Silva (oxigenistas de la Unidad de Sistemas Industriales del HCUCH) por la disposición incondicional que tuvieron innumerables veces para ayudarme con el tanque de nitrógeno. Eso resultó ser esencial y facilitó mi trabajo en cultivo. A Don Eduardo, Don Daniel y a todos los que me ayudaron con el uso del contador de centelleo de la Facultad de Medicina. Gracias por la buena disposición y las risas.

Un agradecimiento especial a una de las personas que de un comienzo me motivó, por no decir, me convenció de que tenía que creer en mis capacidades y realizar un programa de doctorado, me refiero al Dr. Pedro Orihuela de la USACH, quien sin saberlo, fue para mí un ejemplo de la pasión que se requería

para seguir una carrera científica y me abrió los ojos para entender que era justamente eso lo que yo quería para mí. Gracias profel.

Por último, un agradecimiento dirigido a todos los que me han entregado un apoyo emocional en momentos claves durante el transcurso de la tesis: a mi familia y a mis amigos, en especial a dos personas que fueron las que me llenaron de ánimo en el momento donde más lo necesité: Patricia Pinto y Jenniffer Angulo, mis hermanas. Las amo!. A Alvaro Díaz y Cristian Álvarez por estar ahí siempre. A Paula García por el cariño y palabras de aliento que me salvaron más de una vez. A Emilio Aranda por su preocupación, apoyo y cariño. A todos los que quizás no nombre pero que me brindaron ayuda y de las formas más diversas, muchas gracias.

Gracias **Manuel Maliqueo**, tú sabes por qué.

TABLA DE CONTENIDOS

Dedicatoria	iii
Agradecimientos.....	iv
Tabla de Contenidos	vii
Índice de Figuras y Tablas.....	xii
Índice de Figuras	xii
Índice de Figuras - Anexos	xv
Índice de Tablas.....	xvi
Índice de Tablas – Anexo.....	xvi
Divulgación Científica del Trabajo de Tesis.....	xvii
PUBLICACIONES.....	xvii
ASISTENCIA A CONGRESOS CIENTÍFICOS	xviii
Congresos Nacionales.....	xviii
Congresos Internacionales	xx
Financiamiento	xxi
Resumen.....	xxii
Abstract	xxv

I. Introducción	1
I.1. Fisiopatología del Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP)	1
I.2. Tejido endometrial	3
I.2.1. Tejido endometrial y SOP	4
I.3. Obesidad	8
I.4. Relación entre Síndrome de Ovario Poliquístico y Obesidad	10
I.5. Adipoquinas y Obesidad	12
1.5.1. Adiponectina	13
1.5.2. Señalización de Adiponectina	14
1.5.3. Efectos de Adiponectina sobre la Obesidad y el SOP	16
1.5.4. Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α)	18
1.5.5. Señalización de TNF- α	18
1.5.6. Efectos de TNF- α sobre la Obesidad y el SOP	19
1.5.7 Interleuquina-6 (IL-6)	25
I.6. Posibles mecanismos involucrados en la asociación entre SOP y Obesidad	26
I.7. Relación entre Adipoquinas y Endometrio Patológico	28
I.8. Propuesta	31
II. Hipótesis	33
III. Objetivos Generales	34
III. 1. Objetivos Específicos	34

1. Estudios <i>ex vivo</i> : Suero y Tejido endometrial humano	34
2. Estudios <i>in vitro</i> : cultivos de células T-HESC / St-T1b	35
IV. Materiales y Métodos	37
IV.1 Pacientes y grupos de estudio	37
IV.2 Determinación de concentraciones sanguíneas de Adiponectina, TNF- α e IL-6 mediante ELISA.....	42
IV.3 Preparación del tejido.....	43
IV.4 Cultivo celular y tratamientos	44
IV.5 Ensayos de Viabilidad	47
IV.6 Curva dosis-respuesta para TNF- α	48
IV.7 Detección de niveles de proteínas y visualización por Inmunohistoquímica e Inmunocitoquímica.....	49
IV.8 Detección de proteínas por Inmunofluorescencia	51
IV.9 Detección de niveles de proteínas por Western blot	52
IV.10 Ensayos de RT-PCR y qPCR.....	56
IV.11 Ensayos de captación de glucosa	58
IV.12 Tratamientos con Pirrolidina Ditiocarbamato (PDTC) en la línea celular: St-T1b.....	59
IV.13 Análisis estadístico	60
V. Resultados.....	61
V.1 ENSAYOS <i>EX VIVO</i>	61

V.1.1 Niveles séricos de Adiponectina y TNF- α	61
V.1.2 Detección de moléculas involucradas en la vía de señalización de adiponectina en tejido endometrial	64
V.1.3 Detección de moléculas involucradas en la vía de señalización de TNF- α en tejido endometrial	73
V.1.4 Determinación de moléculas relacionadas con la activación de NF κ B como integrante de la vía canónica de TNF- α	80
V.1.5 Evaluación del ambiente pro-inflamatorio en tejido endometrial: detección de macrófagos a través de la proteína CD68.....	84
V.1.6 Determinación de niveles proteicos de TNF- α , TNFR2 y CD68 en tejido endometrial en fase secretora del ciclo.....	86
V.1.7 Determinación de IL-6 en suero y endometrios de mujeres Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP	87
V.2 ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	90
V.2.1 Determinación de los niveles proteicos de moléculas relacionadas con la vía de adiponectina	91
V.2.2 Efecto de TNF- α sobre la expresión de moléculas relacionadas con la vía de Adiponectina.....	93
V.2.3 Efecto de TNF- α sobre la expresión de moléculas relacionadas con su vía de señalización canónica	103
V.2.4 Efecto de TNF- α sobre la localización subcelular de NF κ B en células estromales endometriales humanas.....	109

V.2.5 Efecto de Pirrolidina Ditiocarbamato (PDTC, inhibidor de NFκB) sobre los niveles proteicos de adiponectina en células T-HESC tratadas con TNF-α, insulina y/o testosterona	112
V.2.6 Efecto de TNF-α sobre la captación de glucosa en células estromales endometriales humanas	116
V.2.7 Efecto de TNF-α sobre la activación de moléculas capaces de modular la acción de insulina en células estromales endometriales humanas	122
VI. Discusión	131
VII. Bibliografía.....	157
VIII. Anexos	179

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microfotografías de endometrio humano control y SOP	7
Figura 2. Esquema de señalización de Adiponectina a través de APPL1	16
Figura 3. Cascada de señalización de TNF- α y su relación con la vía de señalización de insulina	23
Figura 4. Modelo propuesto que muestra las vías de señalización de adiponectina y TNF- α y sus efectos sobre la actividad de la insulina en una célula endometrial.....	32
Figura 5. Diseño experimental para ensayos <i>Ex vivo</i>	44
Figura 6. Diseño experimental para ensayos <i>In vitro</i>	46
Figura 7. Niveles circulantes de adiponectina en mujeres Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP mediante ELISA.....	62
Figura 8. Niveles circulantes de TNF- α en mujeres Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP mediante ELISA	63
Figura 9. Detección de moléculas involucradas con la vía de señalización de adiponectina	66
Figura 10. Niveles proteicos de Adiponectina en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Obesas y Obesas-SOP	67
Figura 11. Niveles proteicos de receptores de adiponectina (AdipoR1 y AdipoR2) en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Obesas y Obesas-SOP	69
Figura 12. Niveles de mRNA de receptores de adiponectina (AdipoR1 y AdipoR2) en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Obesas y Obesas-SOP	

.....	70
Figura 13. Niveles proteicos de APPL1 en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Obesas y Obesas-SOP	71
Figura 14. Niveles de mRNA de APPL1 en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Obesas y Obesas-SOP	72
Figura 15. Localización y niveles proteicos de TNF- α en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP	75
Figura 16. Localización y niveles proteicos del receptor 1 de TNF- α (TNFR1) en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP	77
Figura 17. Localización y niveles proteicos del receptor 1 de TNF- α (TNFR1) en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP	79
Figura 18. Porcentaje de núcleos positivos para la subunidad p65 de NF κ B en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP	82
Figura 19. Niveles de p-IKK S180/181 en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Obesas y Obesas-SOP	83
Figura 20. Número de macrófagos detectados a través de la proteína CD68 en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP	85
Figura 21. Niveles circulantes de IL-6 en mujeres Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP mediante ELISA	88
Figura 22. Localización y niveles proteicos de IL-6 y su receptor (IL-6R) en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP	89
Figura 23. Detección de moléculas asociadas a la vía de señalización de adiponectina en cultivos de células estromales endometriales humanas (T-HESC).....	92

Figura 24. Ensayo de viabilidad.....	95
Figura 25. Niveles proteicos de Adiponectina en cultivos de T-HESC	97
Figura 26. Niveles proteicos de AdipoR1 en cultivos de T-HESC	98
Figura 27. Niveles proteicos de AdipoR2 en cultivos de T-HESC	99
Figura 28. Niveles proteicos de APPL1 en cultivos de T-HESC.....	100
Figura 29. Niveles proteicos de p-AMPK (T172) en cultivos de T-HESC	102
Figura 30. Niveles proteicos de TNFR1 en cultivos de T-HESC	104
Figura 31. Niveles proteicos de TNFR2 en cultivos de T-HESC	105
Figura 32. Niveles proteicos de NFκB (subunidad p65) en cultivos de T-HESC	106
Figura 33. Niveles proteicos de p-IKK S180/181 en cultivos de T-HESC.....	107
Figura 34. Niveles proteicos de IκB en cultivos de T-HESC.....	108
Figura 35. Localización sub-celular de la subunidad p65 de NFκB en células estromales endometriales humanas (T-HESC).....	111
Figura 36. Curva dosis-respuesta. Detección y niveles de adiponectina en células estromales endometriales humanas (St-T1b) pre-tratadas con PDTC	114
Figura 37. Detección y niveles de adiponectina en células estromales endometriales humanas (St-T1b) pre-tratadas con PDTC	115
Figura 38. Detección y niveles de GLUT-4 en células estromales endometriales humanas (St-T1b).....	117
Figura 39. Ensayos de captación de glucosa en células estromales endometriales humanas tratadas con TNF-α (T-HESC).....	119
Figura 40. Ensayos de captación de glucosa en células estromales endometriales humanas (T-HESC).....	121
Figura 41. Niveles proteicos de p-IRS1 (Y612) y p-IRS1 (S270) en cultivos de T-HESC	123
Figura 42. Niveles proteicos de p-S6K (T389) en cultivos de T-HESC	125
Figura 43. Niveles proteicos de p-JNK (T183/Y185) en cultivos de T-HESC	

.....	127
Figura 44. Niveles proteicos de p-AKT (S473) en cultivos de T-HESC	129
Figura 45. Determinación de niveles proteicos de p-AKT S473 en cultivos de T-HESC.....	130
Figura 46. Esquema que muestra la interacción entre TNF- α , Adiponectina e Insulina en endometrios de mujeres Obesas e Hiperinsulínicas con Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP).....	156

INDICE DE FIGURAS - ANEXOS

Figura A1. Determinación de niveles proteicos de p-TAK1 (T184/187) y p-MEK3 (S189) en endometrios de mujeres Delgadas, Obesas y Obesas-SOP	180
Figura A2. Detección de NF κ B (p65) en tejido endometrial y células T-HESC por IF	182
Figura A3. Detección de CD68 en endometrios de mujeres Delgadas y Obesas por IF	183
Figura A4. Determinación de niveles proteicos y localización de TNF- α , TNFR2 y CD68 en tejido endometrial de mujeres Obesas y Obesas-SOP por IHQ	185
Figura A5. Determinación de niveles proteicos y localización de adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2 en cultivos de líneas T-HESC y St-T1b bajo condiciones hiperinsulínicas e hiperandrogénicas por ICQ.....	187
Consentimientos Informados	188

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características clínicas y hormonales de los grupos de estudio.....	40
Tabla 2. Parámetros metabólicos de los grupos de estudio	41
Tabla 3.1 Anticuerpos. Especificaciones y diluciones de trabajo.....	54
Tabla 3.2 Anticuerpos. Especificaciones y diluciones de trabajo.....	55
Tabla 4. Secuencia de partidores para la determinación de niveles de mRNA por qPCR.....	57

INDICE DE TABLAS – ANEXO

Tabla 5. Parámetros clínicos y metabólicos de pacientes Obesas y Obesas- SOP en fase secretora del ciclo menstrual.....	184
---	-----

DIVULGACIÓN CIENTÍFICA DEL TRABAJO DE TESIS

PUBLICACIONES

1. **Lorena Oróstica**, Isis Astorga, Francisca Plaza, Carolina Vera, Víctor García, Rodrigo Carvajal, Fernando Gabler, Carmen Romero, Margarita Vega. Proinflammatory environment and role of TNF- α in endometrial function of obese women having polycystic ovarian syndrome (PCOS). *Int J Obes* 2016: 1-8.

2. **Lorena Oróstica**, Carlos Rosas, Francisca Plaza-Parrochia, Isis Astorga, Fernando Gabler, Víctor García, Carmen Romero, Margarita Vega. Review: Altered Steroid Metabolism and Insulin Signaling in PCOS Endometria: Impact in Tissue Function. *Curr Pharm Des* 2016; 22: 1-11.

3. V. García, **L. Oróstica**, C. Poblete, C. Rosas, I. Astorga, C. Romero and M. Vega. Endometria from obese PCOS women with hyperinsulinemia exhibit altered adiponectin signaling. *Horm Metab Res* 2015; 47: 901-909.

4. Carlos Rosas, **María L Oróstica**, Cristian Poblete, Rodrigo Carvajal, Fernando Gabler, Carmen Romero, Sergio Lavandero, Margarita Vega.

Hyperandrogenism Decreases GRP78 Protein Level and Glucose Uptake in Human Endometrial Stromal Cells. *Reprod Sci* 2016; 23(6): 761-70.

5. Francisca Plaza-Parrochia, **Lorena Oróstica**, Paula García, Carolina Vera, Carmen Romero, Luis Valladares, Margarita Vega. Molecular mechanisms of androstenediol in the regulation of the proliferative process of human endometrial cells. *Reprod Sci* 2016 (en prensa).

ASISTENCIA A CONGRESOS CIENTÍFICOS

Congresos Nacionales

Oróstica ML, Poblete C, García V, Carvajal R, Gabler F, Romero C, Vega M. Niveles de Moléculas Proinflamatorias en endometrio de mujeres obesas con Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP). Trabajo presentado en XXIV Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo. Valdivia - Chile, 4-7 Septiembre de 2013.

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 en XXV

Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo. Valdivia - Chile, 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 XXXVII Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, Puerto Varas – Chile, 30 sept.- 4 oct. de 2014.

Oróstica L, Carvajal R, García V, Gabler F, Romero C, Vega M. Laboratorio de Efecto de TNF- α sobre la captación de glucosa por células estromales endometriales humanas expuestas a un ambiente hiperandrogénico e hiperinsulínico. Trabajo presentado en XXVI Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo. Antofagasta – Chile, 4-7 Septiembre de 2015.

Astorga I, **Oróstica L**, Torres M, Carvajal R, Gabler F, García V, Romero C, Vega M. Relación entre obesidad y moléculas de la vía de señalización de adiponectina, (appl1/appl2) en endometrios de mujeres hiperinsulinémicas con Síndrome de Ovario Poliquístico (PCOS). Trabajo presentado en XXVII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo. Antofagasta – Chile, 2-5 Septiembre de 2016.

Poblete CE, **Oróstica L**, Astorga I, García V, Carvajal R, Romero C, Vega M. Alteración en la vía de señalización de adiponectina y su relación con la vía de insulina en endometrios de pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico (PCOS). Trabajo presentado en XXVII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo. Antofagasta – Chile, 2-5 Septiembre de 2016.

Congresos Internacionales

Oróstica L, Astorga I, García V, Poblete C, Romero C, Vega M. TNF- α and adiponectin pathways are deregulated in endometria from obese women with polycystic ovarian syndrome (PCOS). 17th European Congress of Endocrinology (ECE) by European Society of Endocrinology (ESE). Dublín – Irlanda, 16 – 20 Mayo 2015.

Oróstica Arévalo L, Astorga Leiva I, García Palomino V, Gabler Neale F, Romero Osses C, Vega Blanco M. La vía de señalización de adiponectina está alterada en endometrios de mujeres obesas con Síndrome de Ovario Poliquístico. XXIV Reunión Bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH). Lima - Perú, 19 – 21 Noviembre 2015.

Oróstica L, Poblete C, García V, Carvajal R, Romero C, Vega M. Effects of the obesity condition on insulin signaling in endometrium from women with hyperinsulinemia and Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS). 16th International Nutrition and Diagnostics Conference (INDC2016). Praga – República Checa, 3 – 6 Octubre 2016.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis estuvo financiada por los siguientes fondos:

1. Proyecto Fondecyt Regular 1130053 (2013 – 2016) “Involvement of Adiponectin in the Regulation of Endometrial Metabolic Function of Obese Women bearing Polycystic Ovarian Syndrome and Hyperinsulinism”. Investigador Responsable: Profesora Dra. Margarita Vega Blanco
2. Beca Doctorado Nacional Conicyt Folio # 21120541; Becaria: Bqca, María Lorena Oróstica

RESUMEN

Antecedentes: El síndrome de ovario poliquístico (SOP), patología endocrino-metabólica, afecta alrededor del 15% de mujeres en edad fértil, afectando principalmente la función del ovario, aunque también altera la función de otros tejidos de importancia reproductiva, como el endometrio. El 70% de las mujeres con SOP son obesas y entre el 60 – 80 % de ellas presentan resistencia a la insulina. La obesidad genera un ambiente pro-inflamatorio leve pero crónico, caracterizado por una alta producción de citoquinas pro-inflamatorias. Además, adiponectina y TNF- α , marcadores de obesidad, tienen un papel importante en la sensibilidad y la acción de insulina en los tejidos. Los niveles de adiponectina (sensibilizador de insulina) disminuyen, mientras que los de TNF- α (regulador negativo de la vía de la insulina) aumentan en mujeres obesas. Estos cambios podrían afectar el estado energético del endometrio, tejido que exhibe una anormal señalización de insulina bajo la condición SOP (ambiente hiperandrogénico / hiperinsulínico). **Objetivo:** Evaluar si el ambiente pro-inflamatorio representado por TNF- α , afecta la señalización de insulina a través de una disminución de la señalización de adiponectina o por la inactivación de IRS1, en endometrios de mujeres obesas con SOP. **Metodología:** En muestras de suero provenientes de cuatro grupos de estudio: Delgadas (peso normal), Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP (este último grupo es el único con hiperinsulinemia / hiperandrogenemia) (n=7 para cada grupo), se determinaron mediante ELISA los niveles de adiponectina, TNF- α e IL-6. En endometrios

provenientes de los cuatro grupos de estudio, se determinó los niveles de proteína / mRNA de moléculas asociadas a las vías de señalización de TNF- α (TNF- α , TNFR1, TNFR2, NF κ B (p65), IKK, I κ B) y adiponectina (adiponectina, AdipoR1, AdipoR2, APPL1, AMPK) por IHQ / WB y qPCR; además, se evaluó el ambiente pro-inflamatorio a través de la proteína CD68 y los niveles de IL-6 e IL-6R, mediante IHQ. Los estudios *in vitro* se realizaron en cultivos de células estromales endometriales humanas (líneas T-HESC / St-T1b) bajo condiciones hiperandrogénicas / hiperinsulínicas, y se determinó el efecto de TNF- α sobre moléculas asociadas a su vía de señalización y a la vía de adiponectina. Se analizó además, la participación de NF κ B, usando un inhibidor de NF κ B (PDCT), en el efecto de TNF- α sobre la expresión de adiponectina en células St-T1b, por ICQ / WB; finalmente, se evaluó el efecto de TNF- α sobre los niveles de IRS1 fosforilado en tirosina (activante) o serina (inactivante) y sobre la activación de quinasas (S6K, JNK, AKT), posiblemente involucradas en la inactivación de IRS1 en una condición de resistencia a la insulina. **Resultados:** Se observó una menor concentración de adiponectina en sueros de Obesas-SOP ($p < 0,05$), no se observaron cambios en las concentraciones de TNF- α sérica, mientras que IL-6 aumenta en sueros de Delgadas-SOP y ambos grupos de Obesas *versus* Delgadas ($p < 0,05$). A nivel tisular, los niveles de adiponectina disminuyen ($p < 0,05$) y los de TNF- α aumentan ($p < 0,001$) en endometrios de Obesas-SOP. El contenido proteico de los receptores de TNF- α son mayores en grupos Delgadas-SOP y ambos grupos de Obesas ($p < 0,05$); sin embargo, el nivel de

TNFR2 y de NFκB nuclear presenta un importante aumento en endometrios de Obesas-SOP ($p < 0,001$). En relación a IL-6 endometrial, ésta es menor en Delgadas *versus* los otros grupos ($p < 0,05$), mientras que su receptor no cambia. Además, un mayor ambiente pro-inflamatorio se observó en endometrios de Obesas-SOP *versus* los otros grupos ($p < 0,01$). Los ensayos *in vitro*, los cuales confirman en gran medida lo observado en el modelo *ex vivo*, muestran que la condición hiperandrogénica / hiperinsulínica disminuye los niveles de adiponectina y moléculas asociadas a su vía (APPL1 / AMPK), al igual que el efecto observado con TNF-α a través de la activación de NFκB ($p < 0,05$). Además, TNF-α induce la expresión de su propia vía de señalización, aumentando los niveles de TNFR1 y -2, moléculas que activan NFκB y el contenido nuclear de NFκB. Por último, TNF-α aumenta la fosforilación en serina de IRS1 y la activación de S6K, JNK y AKT. **Conclusión:** En consecuencia, la obesidad podría afectar la señalización de insulina en el endometrio, a través del aumento del ambiente pro-inflamatorio y la producción de TNF-α local, lo que generaría una disminución de la señalización de adiponectina a través de NFκB y/o una inactivación de IRS1 a través de S6K/JNK bajo condiciones hiperandrogénicas / hiperinsulínicas, lo que comprometería el metabolismo energético necesario para el normal funcionamiento del tejido endometrial, lo que explicaría, en parte, las fallas reproductivas observadas en endometrios de mujeres obesas e hiperinsulínicas con SOP.

ABSTRACT

Background: Polycystic ovary syndrome (PCOS), an endocrine-metabolic disorder, affects about 15% of women of childbearing age, mainly affecting ovarian function, but also alters the function of other tissues of reproductive importance, such as the endometrium. Seventy percent of women with PCOS are obese and between 60 - 80% of them have insulin resistance. Obesity generates a mild but chronic pro-inflammatory environment, characterized by high production of pro-inflammatory cytokines. In addition, TNF- α and adiponectin, obesity markers, have an important role in insulin sensitivity and action in tissues. In fact, adiponectin level (insulin sensitizer) decreases, whereas those of TNF- α (negative regulator of insulin pathway) increases in obese women. These changes could affect the energy state of the endometrium, tissue exhibiting abnormal insulin signaling under the SOP condition (hyperandrogenic / hyperinsulinemic environment). **Objective:** To evaluate whether the proinflammatory environment represented by TNF- α , affects insulin signaling through a decrease in adiponectin signaling or inactivation of IRS1, in endometrium of obese women with PCOS. **Methodology:** In serum samples from the four study groups: Lean (normal-weight), Lean-PCOS, Obese and Obese-PCOS (the latter group is the only one with hyperinsulinemia / hyperandrogenaemia) (n = 7 for each group) were determined: adiponectin, TNF- α and IL-6 levels by ELISA. In endometrium from the four study groups, was determined the levels of protein / mRNA of molecules associated with the

signaling pathways of TNF- α (TNF- α , TNFR1, TNFR2, NF κ B (p65), IKK, I κ B) and adiponectin molecules (adiponectin, AdipoR1, AdipoR2, APPL1, AMPK) by IHC / WB and qPCR; additionally, the proinflammatory environment through CD68 protein and IL-6 / IL-6R levels, was evaluated by IHC. *In vitro* studies were conducted in human endometrial stromal cells (lines T-HESC / St-T1b) under hyperandrogenic / hyperinsulinic conditions, and the effect of TNF- α on molecule levels associated with its signaling pathway and adiponectin pathway, was determined by WB. NF κ B participation was further analyzed using a NF κ B inhibitor (PDCT) of TNF- α action on adiponectin expression in St-T1b cells by ICC; finally, it was evaluated the effect of TNF- α on in tyrosine phosphorylated levels of IRS1 (activating) or serine (inactivating) and kinases activation (S6K, JNK, AKT), possibly involved in the inactivation of IRS1 in an insulin resistance condition. **Results:** A lower concentration of adiponectin in serum from Obese-PCOS (p <0.05) was observed, no changes were found in serum concentrations of TNF- α , whereas IL-6 increases in serum from Lean-PCOS and both Obese groups *versus* the Lean group (p <0.05). At tissue level, adiponectin content decreases (p <0.05) and TNF- α increases (p <0.001) in Obese-PCOS endometrium. The protein content of TNF- α receptors are higher in Lean-PCOS groups and both Obese groups (p <0.05); however, nuclear NF κ B and TNFR2 levels present an important increase in endometrium from Obese-PCOS (p <0.001). Regarding endometrial IL-6, a lower level in Lean *versus* the other groups was observed (p <0.05), while receptor content does not change. In

addition, a higher pro-inflammatory environment was observed in Obese-PCOS endometrium *versus* the other studied groups ($p < 0.01$). *In vitro* assays, which largely confirm what was observed in the *ex vivo* model, show a decrease of adiponectin levels and molecules associated with their pathway (APPL1 / AMPK) under hyperandrogenic / hyperinsulinic conditions, as well as, the effect observed with TNF- α through NF κ B activation ($p < 0.05$). In addition, TNF- α induces the expression of their own signaling pathway, increasing levels of TNFR1 and -2, molecules that activate NF κ B and nuclear NF κ B content. Finally, TNF- α increases phosphorylated IRS1 levels in serine and activation of S6K, JNK and AKT. **Conclusion:** Consequently, obesity may affect insulin signaling in the endometrium, by increasing the proinflammatory environment and local production of TNF- α , generating a decrease in adiponectin signaling through NF κ B and / or inactivation of IRS1 through S6K / JNK under hyperandrogenic / hyperinsulinic conditions, which compromise the energy metabolism necessary for normal functioning of endometrial tissue. These abnormalities may explain in part, reproductive failures observed in endometria from obese and hyperinsulinic women with PCOS.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. FISIOPATOLOGÍA DEL SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO (SOP)

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es un trastorno endocrino-metabólico muy común, que afecta alrededor del 15% de mujeres en edad reproductiva [1], aumentando tres veces la tasa de abortos espontáneos comparado con mujeres sin SOP [2]. Al ser un trastorno multifactorial, se han realizado diversos consensos para establecer los criterios de diagnóstico del SOP, como el del *National Institutes of Health* (NIH) (1990) y el consenso de Rotterdam en el año 2004 [3]. Sin embargo, para el diagnóstico de la patología, actualmente se consideran los criterios acordados por la Sociedad de Exceso de Andrógenos [4], los cuales se basan en la presencia de signos clínicos y/o bioquímicos de hiperandrogenismo acompañado de disfunción ovárica (oligo-anovulación y/u ovarios poliquísticos a la ultrasonografía). Además, se deben excluir otros desordenes relacionados con el exceso de andrógenos, como la hiperplasia adrenal no-clásica o la presencia de tumores secretores de andrógenos, entre otros [4].

Además, al ser una patología metabólica y endocrina, el SOP presenta características particulares que no son necesariamente criterios de diagnóstico. Entre ellas, el hiperinsulinismo asociado a la resistencia a la insulina, el cual se

ha relacionado con el exceso de andrógenos circulantes en estas pacientes, lo que daría paso a intolerancia a la glucosa y posteriormente a diabetes tipo 2 [5]. Otra consideración importante es que alrededor de un 70% de las pacientes con SOP lo componen mujeres que presentan algún grado de obesidad [6]. Con respecto a esto, mujeres obesas con SOP presentan fallas funcionales del tejido adiposo asociadas a la presencia de un ambiente inflamatorio moderado pero crónico [7], lo que sumado a una desregulación de la secreción de adipocinas, podrían contribuir significativamente a la patogénesis del síndrome [7,8].

Por otro lado, las mujeres con SOP generalmente presentan problemas de infertilidad, siendo la causa principal la condición anovulatoria que caracteriza al síndrome. Es importante considerar que el SOP representa el 75% de todos los desordenes anovulatorios que causan infertilidad en las mujeres [9]. Más aún, como ya se mencionó, mujeres con SOP muestran una tasa de aborto espontáneo y recurrente, mayor a la población normal (40% vs 20% pacientes controles), además de una mayor predisposición a desarrollar hiperplasia y cáncer endometrial (riesgo relativo 3:1) [10-12]. Estos datos sugieren que además del ovario, otros tejidos reproductivos, como el endometrio, experimentarían alteraciones en su función a causa del SOP.

I.2. TEJIDO ENDOMETRIAL

Las fallas reproductivas en mujeres hiperinsulínicas con SOP, asociadas principalmente a la alta tasa de abortos espontáneos y recurrentes observados, condujo el interés de estudiar la relación entre las condiciones inherentes al síndrome y las fallas metabólicas y funcionales del endometrio, tejido de gran importancia reproductiva debido a su esencial rol en la implantación, proceso que requiere de un alto gasto de energía.

El endometrio humano consiste en un epitelio que reviste la cavidad uterina y se invagina en el compartimento estromal y forma las glándulas endometriales (Figura 1). El estroma está formado no solo por células estromales, sino que se pueden encontrar fibroblastos, macrófagos, endoteliales, entre otras. Además, el estroma mantiene una comunicación paracrina con el epitelio a lo largo del ciclo menstrual, permitiendo los cambios morfológicos y bioquímicos que se generan tanto en la etapa proliferativa del endometrio (previo a la ovulación) como en la etapa secretora (desde la ovulación hasta el final del ciclo) [13]. Todos estos cambios requieren de una disponibilidad energética, asociada tanto a la comunicación del estroma con el epitelio, como a la diferenciación del estroma, proceso denominado “decidualización”, en donde en un ciclo concepcional las células estromales se diferencian para la recepción embrionaria y su invasión en el proceso de implantación uterina [13].

Por lo tanto, la expresión de distintos transportadores de glucosa en el endometrio humano entre ellos, el transportador dependiente de insulina GLUT-4, avalan el requerimiento energético en este tejido relacionado con la demanda metabólica dinámica y cíclica que presenta en función del ciclo menstrual [14].

I.2.1. Tejido endometrial y SOP

Existe un alto porcentaje de pacientes con SOP que presentan alteraciones reproductivas, las que eventualmente podrían ser potenciadas por una condición de obesidad [15]. Desde el punto de vista reproductivo, indudablemente es el ovario la glándula mayormente afectada en el SOP, donde la formación del gameto está interrumpida. Sin embargo, en aquellas mujeres con SOP que logran ovular y fecundar sus ovocitos, la mayoría de ellas sufren abortos [11]. Lo anterior señala que otro de los tejidos altamente afectados por el SOP es el endometrio, el que tiene una función reproductiva clave, por lo que el estudio molecular de este tejido ayudaría a entender mejor las fallas inducidas por el SOP y posiblemente mejorar los tratamientos a estas pacientes.

Como ya se mencionó, para que el endometrio mantenga sus funciones de manera apropiada, es esencial que cuente con un apoyo energético adecuado y constante. Por lo tanto, un desequilibrio en su homeostasis energética podría llevar a fallas en procesos biológicos como la implantación del embrión o incluso generar graves patologías como son la endometriosis o el cáncer [10-

12]. Con respecto a esto, morfológicamente el endometrio de mujeres con SOP que son anovulatorias u oligo-ovulatorias, es similar al de la etapa proliferativa de mujeres controles (Figura 1). Sin embargo, estudios de nuestro laboratorio han descrito que existen diversas alteraciones bioquímicas en moléculas involucradas en la homeostasis y metabolismo tisular, en el metabolismo de hormonas esteroidales, y en la vía de transducción de señal de insulina, lo que colectivamente sugiere una alteración de las funciones reproductivas del endometrio [12, 16-31].

Se ha demostrado que endometrios de pacientes hiperinsulínicas con SOP presentan menores niveles proteicos del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1) y de proteínas involucradas en la activación y translocación de GLUT-4 a la membrana celular, como la proteína AS160, comparado con mujeres SOP normoinsulínicas y controles [22-24]. Además, se ha determinado que altas concentraciones de insulina o testosterona en cultivos de una línea celular inmortal de estroma endometrial (T-HESC) afectan la expresión y fosforilación de proteínas presentes en la vía de señalización de la insulina como PKC y Munc18c. Esto último también es posible detectarlo en tejido endometrial proveniente de pacientes con SOP e insulino resistencia [25]. Estas observaciones resultan de gran importancia si consideramos que entre el 60 y el 75 % de pacientes con SOP presentan hiperinsulinemia [5]. Estos cambios en la señalización de la insulina en endometrios podrían explicar en parte las fallas metabólicas que presenta el tejido, tales como deficiencias en el proceso de

captación de glucosa y los posibles problemas de fertilidad que se observan bajo estas condiciones.

Otros experimentos han demostrado que existen niveles más bajos, tanto de proteína como de RNA mensajero, de GLUT-4 en endometrios de mujeres hiperinsulinémicas con SOP, comparados con los controles respectivos [22], además de un aumento en la expresión del factor de transcripción PPAR γ (receptor activado por proliferadores peroxisomales-gamma). Dicho factor de transcripción es capaz de inhibir la expresión de GLUT-4 en adipocitos, situación que también se observó en el endometrio patológico [24]. Por otro lado, se ha descrito que la metformina, fármaco insulino-sensibilizante usado en tratamientos contra la diabetes y la insulino resistencia, es capaz de aumentar los niveles y la actividad de las proteínas AMPK α que fosforila a MEF2A (factor transcripcional que posee un sitio en el promotor de GLUT-4) en endometrios de pacientes hiperinsulínicas con SOP. La estimulación de AMPK y MEF2A regulan positivamente la expresión del transportador de glucosa GLUT-4 [28], lo que le confiere gran importancia a la metformina como un fármaco para propósitos terapéuticos sobre el endometrio patológico.

Dado estos antecedentes, el presente trabajo se focaliza en evaluar si la obesidad o factores involucrados, favorecen la generación de alteraciones endometriales relacionadas con el SOP y con los problemas reproductivos característicos del síndrome, como las fallas en la implantación. Para esto, se estudiarán moléculas asociadas con la obesidad y con la acción de la insulina, especialmente las adipoquinas: adiponectina y TNF- α , en endometrios de mujeres obesas con SOP.

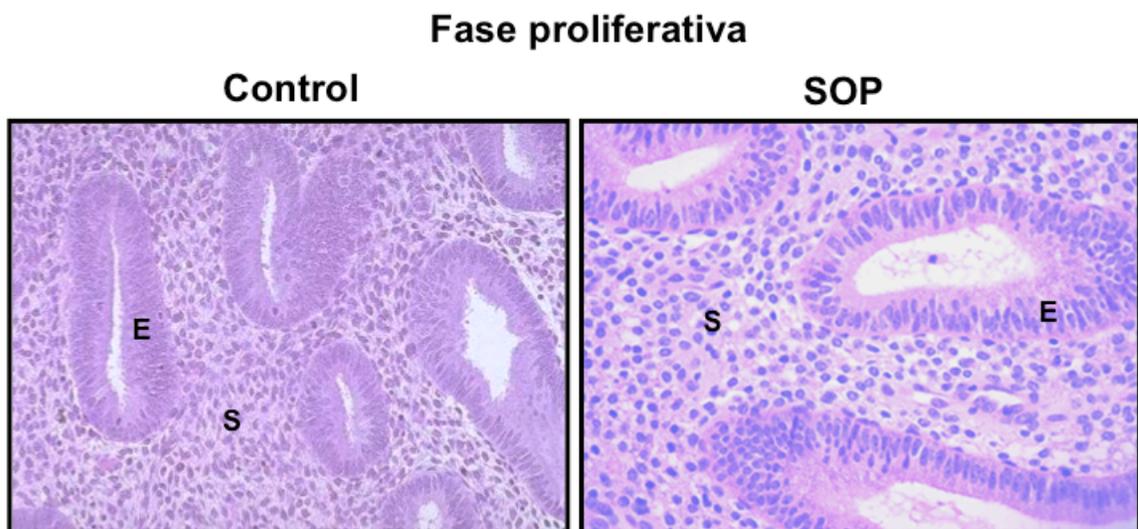


Figura 1. Microfotografías de endometrio humano control y SOP. Control: Endometrio en fase proliferativa del ciclo menstrual proveniente de una mujer sin SOP. **SOP:** Endometrio compatible con fase proliferativa del ciclo menstrual proveniente de una mujer con SOP. E: epitelio glandular endometrial; S: estroma endometrial. En ambas imágenes se observa un estroma compacto y glándulas tubulares típicas de un endometrio en fase proliferativa del ciclo.

I.3. OBESIDAD

La obesidad es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una acumulación anormal y excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud [32]. En terminos prácticos, se considera el índice de masa corporal (IMC) como el método ideal para el diagnóstico de la obesidad por su buena correlación con la masa corporal total; se define obesidad tipo I cuando el IMC es entre 30 y 34,9; obesidad tipo II: 35 a 39,9; obesidad tipo III extrema o mórbida con un IMC mayor a 40 [33].

Esta condición es considerada un problema no sólo a nivel nacional sino también mundial, ya que no solo afecta la calidad de vida, sino que puede reducir la esperanza de vida de las personas hasta en 10 años [34]. Se ha considerado la “epidemia del siglo”, debido a la alta prevalencia. De acuerdo a datos de la OMS, en el año 2005 habían 400 millones de personas obesas, mientras que en el 2015 esta cifra subió a 700 millones [32]. En nuestro país las cifras son alarmantes, alcanzando una prevalencia alta y creciente de 4 millones de personas obesas [35]. La preocupación radica por su fuerte asociación con las principales enfermedades no transmisibles de tipo cardiovascular, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial, osteoarticulares y algunos tipos de cánceres. En el desarrollo de la enfermedad confluyen factores genéticos, estilo de vida y ambientales, como la dieta [34].

Las alteraciones propias de la obesidad se relacionan fuertemente con una condición de insulino-resistencia asociado a un aumento del estado pro-inflamatorio del tejido. Esto debido principalmente a las alteraciones en la expresión de moléculas secretadas por el tejido adiposo o adipocinas, relacionadas con la señalización de la insulina y con acciones pro o anti-inflamatorias, o por una alteración en la tasa lipolítica del tejido que genera una mayor secreción de ácidos grasos libres (AGL) y radicales libres, los cuales pueden inducir efectos negativos sobre la acción de la insulina a través de un aumento en el estado pro-inflamatorio, ya sea en el tejido adiposo o en tejidos distantes [6, 36-39].

Con respecto a esto, se ha demostrado que el tejido adiposo de pacientes obesos está infiltrado de células inflamatorias [38] y si bien no se conoce lo que gatilla este fenómeno inflamatorio muy característico de la condición de obesidad, se sabe que esto tiene consecuencias nefastas en el metabolismo local y sistémico y le confiere al paciente obeso un fenotipo de insulino-resistencia, aterogénesis e inflamación [32-34]. Se ha descrito este estado inflamatorio como un “ambiente pro-inflamatorio moderado pero crónico” que no se observa en pacientes delgados. Este estado está caracterizado principalmente por mayores niveles de citoquinas pro-inflamatorias en suero y tejido adiposo, además de otros órganos estudiados, como músculo esquelético e hígado [6,38,39]. Se sabe que el tejido adiposo de personas obesas también presenta una mayor acumulación de macrófagos los que podrían ser la causa

del aumento en la secreción de citoquinas como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) e Interleuquina-6 (IL-6), entre otras [38]. Estos factores secretados por los macrófagos pueden modificar el perfil de expresión y secreción de otras adipoquinas por parte de las células adiposas [40-43]. Entre las adipoquinas que se ven disminuídas en condiciones de obesidad se incluye a la adiponectina, la que presenta una alta capacidad de sensibilizar a la célula ante la acción de la insulina (efecto insulino-sensibilizante) [44,45]. De esta forma, el ambiente patológico propio de la obesidad favorece una condición de insulino-resistencia, entre otros desórdenes.

I.4. RELACIÓN ENTRE SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO Y OBESIDAD

El SOP se caracteriza por alteraciones endocrinas y metabólicas, fallas que probablemente están exacerbadas en presencia de obesidad. Esto adquiere mayor relevancia cuando se considera que aproximadamente el 70% de mujeres con SOP presentan sobrepeso (IMC sobre los 25 kg/m²) u obesidad (IMC sobre 30 kg/m²) [5,6] aunque como se mencionó, la obesidad no está incluida como criterio diagnóstico para este síndrome [3].

A pesar de ésto, se ha observado que la condición de obesidad puede intensificar la gravedad de las características fenotípicas del SOP, incluyendo

alteraciones en el ciclo menstrual [6]. En efecto, la severidad del hiperandrogenismo se ve aumentada en mujeres SOP obesas respecto a mujeres delgadas con el síndrome, debido a que en el primer grupo se observan mayores niveles circulantes de testosterona libre [45], sugiriendo una estrecha relación entre la alteración metabólica propia de la obesidad y fallas endocrinas observadas en el SOP. De hecho, se ha observado que un aumento de la circunferencia de cintura asociado a una mayor presencia de masa corporal, especialmente grasa abdominal, se relaciona con alteraciones en los niveles circulantes de esteroides sexuales. Esto debido principalmente a una disminución de los niveles circulantes de SHBG (*Sex Hormone Binding Globulin*, en inglés), glicoproteína cuya función es el transporte de hormonas sexuales esteroidales en el torrente sanguíneo, resultando en un incremento en la fracción de andrógenos libres en la sangre [45]. Otro factor que puede relacionar la obesidad con el SOP es la hiperinsulinemia, característica común tanto en mujeres obesas como en mujeres con SOP, normo-peso y obesas [5]. Se ha observado que mujeres obesas con SOP presentan un mayor grado de resistencia a la insulina, hiperinsulinemia compensatoria y menores niveles de SHBG comparado con mujeres delgadas con SOP [5,6,45], lo que favorecería la condición hiperandrogénica en estas mujeres.

Con respecto al rol de la hiperinsulinemia en la fertilidad de mujeres obesas con SOP, prácticamente no existe información científica al respecto. Sin embargo, es importante mencionar el hecho de que tales mujeres al perder peso vuelven

a ovular con regularidad, además de mejorar su sensibilidad a la insulina [46]. Por otro lado, es conocido que la obesidad y la resistencia a la insulina juegan un rol central en la fisiopatología de SOP y existe evidencia que la obesidad podría afectar la sensibilidad a la insulina a través del patrón de secreción de adipoquinas, tales como leptina, adiponectina, vistatina, resistina, IL-6 y TNF- α [6].

I.5. ADIPOQUINAS Y OBESIDAD

Como ya se ha mencionado, la obesidad abdominal, la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia compensatoria juegan un rol central en la patogénesis del SOP. Además, la obesidad significa un factor de riesgo para la resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa y diabetes mellitus tipo 2 en pacientes con o sin SOP [5], características que podrían verse intensificadas en pacientes con ambas condiciones.

Por otro lado, se ha observado que numerosos genes son desregulados en adipocitos de individuos obesos comparado con no obesos [39]. Entre estos, se encuentran los que codifican para las denominadas adipoquinas, moléculas de señalización secretadas por las células adiposas que regulan la función, así como la integridad estructural del tejido adiposo y de otros tejidos [5]. Entre las principales adipoquinas secretadas por el tejido adiposo que modulan la homeostasis de la glucosa se incluyen las ya mencionadas, TNF- α , IL-6 y

adiponectina, las que podrían estar involucradas en los efectos adversos que conlleva la obesidad en mujeres con SOP [5-8].

1.5.1. Adiponectina

Una de las adipoquinas séricas más abundantes es la adiponectina, proteína de 30 kDa sintetizada fundamentalmente por el tejido adiposo y que participa en el metabolismo de la glucosa y ácidos grasos, además de tener un rol importante en la homeostasis energética en tejidos sensibles a la insulina [47]. Sin embargo, evidencia reciente indica que la adiponectina puede ser producida por otros tejidos tales como médula ósea [48], tejido fetal [49], miocitos, cardiomiocitos [50] y recientemente descrito en endometrio humano [51], entre otros.

Adiponectina está formada por 244 aminoácidos, la cual contiene una secuencia señal en el extremo amino, seguida por un dominio tipo colágeno y un dominio globular en el carboxilo terminal (mm1), que puede ser secretada por el tejido adiposo como un trímero de bajo peso molecular (67 kDa), como dos trímeros (120 kDa) y en hexámeros que corresponden a una forma de adiponectina de mayor peso molecular (> 300 kDa) [52,53]. Sin embargo, la adiponectina circulante se encuentra predominantemente como hexámero o formando oligómeros de alto peso molecular (HMW), y se cree que poseen diferentes actividades biológicas [53].

1.5.2. Señalización de Adiponectina

Se han identificado dos receptores principales por los cuales adiponectina realiza su acción, denominados AdipoR1 y AdipoR2; además de receptores putativos como T-caderina, que solo puede unir la forma hexamérica y el oligómero de alto peso molecular de adiponectina [52]. Con respecto a AdipoR1 y AdipoR2, corresponden a receptores de siete dominios transmembrana, aunque estructural y funcionalmente distintos a los receptores acoplados a proteína G [52]. AdipoR1 se expresa principalmente en músculo esquelético, mientras que AdipoR2 en hígado; sin embargo, se ha demostrado la presencia de estos receptores en otros tejidos como hipotálamo, tejido adiposo, placenta, en células de la granulosa y en endometrio [43,48-51,54].

Respecto a la señalización, recientemente se ha descrito que la activación de estos receptores por parte de la adiponectina induce la activación de diversas moléculas intracelulares a través de la proteína adaptadora APPL1, la que interactúa directamente con la región intracelular de AdipoR1 y AdipoR2, transmitiendo la señal a moléculas río abajo de estos receptores [47,52,55] (Figura 2). Uno de los blancos moleculares que se han descrito es la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) la que se activa por la unión de la adiponectina a la región carboxilo terminal de AdipoR1, reclutando a APPL1 a la región amino terminal del receptor, transmitiendo así la señal e iniciando diversas cascadas de señalización. Esto resulta en la regulación de procesos celulares como la captación de glucosa, la oxidación de ácidos grasos y la

vasodilatación [52,55]. Se ha descrito principalmente en músculo esquelético, que la activación de AMPK induce la inhibición de la enzima acetil coenzima A carboxilasa y un incremento de la beta-oxidación de ácidos grasos [52]. Más aún, AMPK podría inducir un incremento en la sensibilidad a la insulina debido a que su activación, vía adiponectina/APPL1, reduce la fosforilación inhibitoria en serina de IRS1 catalizada por la enzima serina quinasa S6K, favoreciendo la activación de IRS1 y de la vía PI3K/AKT e induciendo un aumento en la captación de glucosa en tejidos sensibles a insulina [47,56] (Figura 2). Además, se ha determinado que la adiponectina a través de APPL1, puede aumentar la translocación de GLUT-4, por la activación de otras vías de señalización que involucran la fosforilación de p38-MAPK o Rab5, aumentando la exposición de GLUT-4 en la superficie celular y favoreciendo la captación de glucosa (Figura 2) [47,58].

Por otro lado, se ha demostrado que la adiponectina de mayor peso molecular se une principalmente a AdipoR2, el que se encuentra mayormente expresado en el hígado y actúa principalmente a través de PPAR α y la activación de MAPKs, regulando el transporte, síntesis y metabolismo de ácidos grasos, entre otros efectos [52,55].

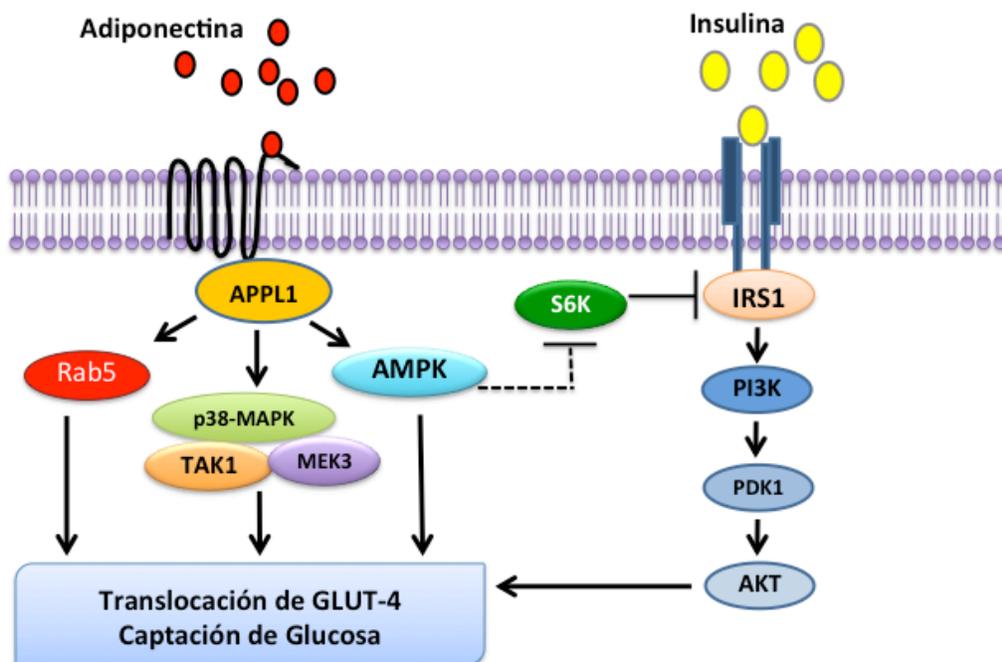


Figura 2. Esquema de señalización de Adiponectina a través de APPL1. Las vías que se activan por adiponectina conllevan a un aumento en la sensibilidad de la insulina a través de varios mecanismos.

1.5.3. Efectos de Adiponectina sobre la Obesidad y el SOP

Con respecto a las funciones biológicas de la adiponectina, se sabe que tiene efectos anti-inflamatorios e insulinosensibilizantes ya que interviene en la inhibición de la secreción hepática de glucosa, así como en el aumento de la captación y utilización de glucosa por el músculo y tejido adiposo [55,56]. Los efectos beneficiosos de adiponectina son mediados principalmente por la estimulación de AMPK y PPAR α a través de sus receptores, AdipoR1 y

AdipoR2. Diversos estudios usando ratones *knockouts* para ambos receptores han demostrado que tanto AdipoR1 como AdipoR2 son los principales receptores que median los efectos de adiponectina sobre la regulación del metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina [52,54,55]. Debido a que la adiponectina tiene efectos directos sobre la sensibilidad a la insulina por parte de la célula, una disminución de los niveles de adiponectina podría contribuir a la resistencia sistémica de la acción de insulina y a una hiperinsulinemia compensatoria, induciendo fallas funcionales en tejidos que usan la glucosa como fuente principal de energía.

Se ha observado que la expresión de adiponectina se encuentra reducida en adipocitos y suero de pacientes obesos con respecto a pacientes delgados [56]. Sin embargo, el rol de esta adipoquina en plasma sobre la fisiopatología de SOP es controversial; diversos análisis han sugerido que existen niveles más bajos de adiponectina en circulación en mujeres con SOP que además presentan un alto IMC [8,57]. Con respecto a esto, se ha observado un menor nivel de expresión de RNA mensajero de adiponectina en tejido adiposo de mujeres con SOP respecto a mujeres sin el síndrome [56,59], transformándose en un blanco importante de estudio para ambas patologías (SOP y obesidad). Por último, se ha demostrado que existen menores niveles de adiponectina en el suero de mujeres con SOP y que estos niveles son aumentados al tratar a estas pacientes con metformina, un conocido sensibilizador de la insulina [60].

1.5.4. Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α)

TNF- α es catalogado como una citoquina pro-inflamatoria pluripotencial involucrada en diversos procesos celulares y sistémicos debido a que regula distintas vías de señalización intracelular que llevan a la activación o represión de la expresión de numerosos genes. Entre estos procesos se encuentran la proliferación, diferenciación, inflamación y apoptosis, lo que lo hace un importante marcador terapéutico para múltiples patologías [61].

Es secretado por diversos tipos celulares, como monocitos, macrófagos activos, células tumorales, endoteliales y adipocitos [63]. Se sintetiza como un precursor de membrana de 26 KDa y 233 aminoácidos, el que es cortado por la proteasa TACE, liberando la forma madura de 17 KDa y 157 aminoácidos [64]. De manera interesante, estudios han demostrado que ambas formas participan en una respuesta inmunológica, ya sea de forma local (la unida a membrana) o de forma paracrina a células distantes (forma madura) [65].

1.5.5. Señalización de TNF- α

Las acciones de TNF- α se inician por la unión de la citoquina en forma de homotrímero a dos principales receptores localizados en la superficie celular denominados receptor de TNF- α tipo 1 (TNFR1) y receptor de TNF- α tipo 2 (TNFR2) de 55 y 75 kDa, respectivamente [61,65]. Numerosas respuestas de TNF- α implican un aumento en la transcripción de genes particulares, incluyendo el propio gen de TNF- α , mediante la activación de los factores de

transcripción NF κ B y AP-1 principalmente, los que son traslocados al núcleo y se unen a secuencias específicas del DNA para regular positivamente la expresión génica [61]. En general, la activación de TNFR1 se relaciona con procesos pro-inflamatorios y de muerte celular programada, ambas asociadas a lesión tisular [66]; mientras que TNFR2, a diferencia de TNFR1 no posee un dominio de muerte, se asocia no solo a procesos inflamatorios, sino que a vías de supervivencia promoviendo la reparación tisular y la angiogénesis [61,62]. Las acciones biológicas de TNF- α se comprenden mejor en función de sus concentraciones, puesto que a concentraciones bajas actúa localmente como un regulador paracrino y autocrino activando componentes del sistema inmune, mientras que a concentraciones altas esta citoquina puede ingresar desde los tejidos al torrente sanguíneo y actuar de forma endocrina induciendo acciones sistémicas que si no son controladas podrían inducir colapso y muerte del organismo [61,65].

1.5.6. Efectos de TNF- α sobre la Obesidad y el SOP

TNF- α tiene un amplio espectro de actividades biológicas incluyendo estimulación del crecimiento celular y diferenciación, regulación de respuestas inmunes, inflamatorias e incluso efectos sobre la señalización del receptor de insulina, pudiendo aumentar la resistencia a la insulina en tejidos sensibles a esta hormona [61,65]. Los efectos pleiotrópicos están mediados por la presencia de sus dos receptores en las distintas células del cuerpo y dependen

del tipo celular y del contexto biológico en que se encuentren [65]. Además, éstos receptores están expresados en la mayoría de las células del organismo a excepción de eritrocitos y linfocitos T [62,67], lo que hace de esta citoquina una molécula clave en numerosos procesos biológicos.

Por ejemplo, existe evidencia que indica un rol activo de TNF- α sobre el metabolismo lipídico en condiciones de obesidad: un aumento de esta citoquina contribuye a la elevada lipólisis basal que se observa comúnmente en adipocitos de individuos obesos [68]. Más aún, ratones deficientes de TNF- α muestran menores niveles de ácidos grasos libres (AGL) y triglicéridos circulantes que lo observado en ratones silvestres [69]. Estudios *in vitro*, usando cultivos primarios de adipocitos humanos o cultivos celulares de pre-adipocitos 3T3L1, han demostrado que TNF- α exógeno es capaz de aumentar la tasa de lipólisis y los niveles de AGL secretados [40,68]. Debido a que los AGL pueden mediar la resistencia a la insulina, la acción de TNF- α sobre la sensibilidad a la insulina podría ser potenciada por el efecto de la citoquina sobre la lipólisis y el incremento de los AGL circulantes.

Como ya se ha mencionado, el aumento de TNF- α se ha relacionado con fallas en la acción de la insulina, pudiendo ser en parte, el responsable de inducir un estado de insulino-resistencia o diabetes en el organismo, factores que están estrechamente relacionados con la obesidad [68-70]. Con respecto a esto, estudios han asociado la obesidad con la acumulación de macrófagos en tejido adiposo los que participan en procesos inflamatorios bajo condiciones de

obesidad y serían los responsables de los altos niveles de expresión de TNF- α , IL-6 e iNOS en adipocitos de individuos obesos [38]. Otras evidencias muestran que la adición de TNF- α a cultivos de adipocitos induce una disminución de los niveles de RNA mensajero y proteína de GLUT-4 [37] y que la neutralización de la citoquina aumenta la captación de glucosa en estas células [36]. Además, se ha observado que TNF- α interfiere con la señalización de la insulina inhibiendo la producción de adiponectina inducida por insulina en cultivos de adipocitos [36] y que la disminución en la cantidad de GLUT-4 expuesto en la superficie de los adipocitos estimulados previamente con insulina y TNF- α , se debe a que la citoquina interfiere en la activación de IRS1 y/o en la activación de PI3K, como parte del mecanismo de translocación del transportador en estas células (Figura 3) [37]. Con respecto a esto, estudios en la línea celular 3T3L1 han señalado que TNF- α induce la activación de la quinasa S6K, la que fosforila directamente a IRS1 en cuatro residuos de serina, siendo la principal en Ser270 en humanos, debido a que es requerida para la fosforilación de los otros tres residuos en la molécula [71]. Estas fosforilaciones corresponden a señales inhibitorias de IRS1, por lo que se le atribuye un efecto negativo de TNF- α sobre la señalización de la insulina a través de la actividad de S6K en estas células (Figura 3) [71]. Con respecto a estas señales inhibitorias, se han identificado numerosos residuos presentes en IRS1, los cuales pueden ser fosforilados por la acción de quinasas como S6K, JNK, IKK- β , mTOR, entre otras, las que se activan por distintas señales o condiciones, tales como TNF- α o factores asociados a la obesidad.

Se postula además, que la fosforilación, específicamente en Ser307 de IRS1, puede inducir un cambio conformacional de la molécula, escondiendo residuos de tirosina y de esta forma, disminuyendo la capacidad de unión de IRS1 con el receptor de insulina, y por ende afectando la señalización río abajo del receptor y favoreciendo una condición de insulino resistencia (Figura 3) [72].

Por otro lado, se han determinado distintos efectos de TNF- α dependientes de su concentración. En algunos estudios realizados en un modelo *in vitro* de resistencia a la insulina inducido por TNF- α , han mostrado que altas concentraciones de la citoquina (200 ng/mL) activan la vía de PI3K/AKT/mTOR, lo que se relaciona con la consecuente fosforilación en distintos residuos inactivantes de serina en IRS1 [71].

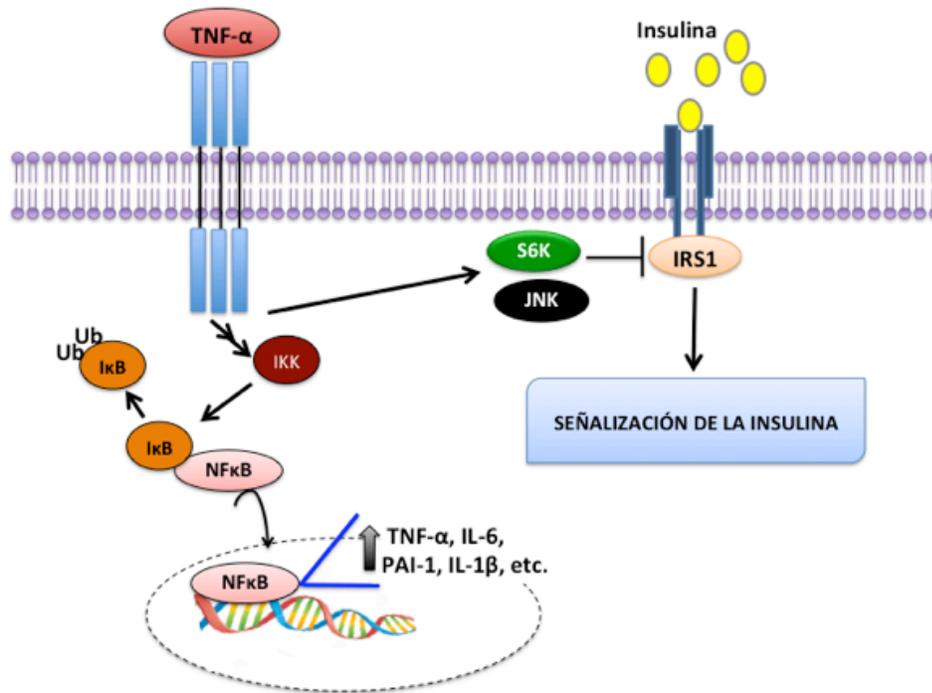


Figura 3. Cascada de señalización de TNF- α y su relación con la vía de señalización de insulina. TNF- α puede inducir efectos negativos sobre la señalización de insulina a través de la activación de NF κ B y/o la inhibición de IRS1, entre otros mecanismos.

En relación a los efectos de TNF- α sobre la obesidad y el SOP, el aumento en los niveles de la citoquina en suero de pacientes obesas con SOP se ha relacionado fuertemente con un estado hiperandrogénico propio del SOP en ese grupo de mujeres [7,8]. Esto se condice con las evidencias que demuestran que existe un ambiente pro-inflamatorio moderado pero crónico, en condiciones de obesidad y SOP y por supuesto, una elevada expresión de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-6 y la proteína C-reactiva en tejidos con alta actividad metabólica [6,7,40,41,73].

Con respecto a la adiponectina, estudios han demostrado que TNF- α es capaz de disminuir los niveles de proteína y RNA mensajero de adiponectina en

cultivos de pre-adipocitos 3T3L1 [40,41]. Además, se sabe que el promotor de adiponectina presenta sitios de reconocimiento para TNF- α [74], pudiendo ser un fuerte modulador de su expresión. Por lo tanto, los efectos negativos de TNF- α sobre la señalización y acción de insulina en su célula blanco podrían ser el resultado de acciones directas, afectando el estado fosforilado de IRS1 o de acciones indirectas de la citoquina, disminuyendo la expresión de GLUT-4 y/o de adiponectina.

Las acciones de TNF- α sobre la señalización de insulina podrían estar fuertemente relacionadas con las fallas encontradas en pacientes obesas con SOP, las que podrían presentar cuadros complejos caracterizados por resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hiperandrogenemia, un mayor ambiente inflamatorio, involucrando no solo tejidos de importancia metabólica sino que tejidos reproductivos, como el ovario y el endometrio. Sin embargo, no existen estudios que asocien de forma directa las alteraciones de estas citoquinas con las fallas funcionales de tejidos de importancia reproductiva.

Con respecto a la relación entre TNF- α y el SOP, estudios han demostrado que cultivos de adipocitos provenientes de pacientes con SOP, sometidos a un ambiente pro-inflamatorio, ya sea a través de la adición de TNF- α o realizando co-cultivos con macrófagos de tejido adiposo, muestran un menor grado de secreción de adiponectina con respecto a cultivos de adipocitos de pacientes sin SOP [75]. Esto indica que la secreción de adiponectina en respuesta a citoquinas o a la presencia de macrófagos, los que generalmente aumentan en

obesidad, difiere en mujeres que presentan SOP con respecto a mujeres sin la patología [76].

Por otro lado, se han encontrado variantes de los genes que codifican para TNF- α [76,77], TNFR2 [78], IL-6 [79] y sus moléculas transductoras de señales, las que han sido asociadas con el SOP y con desórdenes metabólicos en poblaciones europeas, sugiriendo posibles eventos evolutivos comunes para ambas condiciones. De forma interesante, estudios en la línea celular de mioblasto de ratón C₂C₁₂ han determinado que los efectos metabólicos de la citoquina sobre la resistencia a la insulina son mediados principalmente por la región soluble de TNF- α y TNFR2 [80].

Estos antecedentes sugieren una estrecha relación entre la obesidad y el SOP en relación a las fallas funcionales de tejidos reproductivos, las que podrían estar exacerbadas en pacientes obesas con SOP y explicar, en parte, las fallas reproductivas en estas mujeres.

1.5.7 Interleuquina-6 (IL-6)

Otra de las citoquinas que aumenta su expresión en condiciones de obesidad es IL-6, lo que está muy relacionado con los menores niveles séricos de adiponectina y con resistencia a la insulina asociado a obesidad [41,42,81].

Además, estudios en ratas han demostrado que IL-6 inhibe la secreción de LH y evita la ovulación gatillada por esta hormona [6]. Esta evidencia, sumado a que mujeres con SOP y resistencia a la insulina muestran una mayor concentración

de IL-6 en suero [42,81], sugiere una fuerte contribución de esta citoquina sobre la fisiopatología del SOP.

Por otro lado, existen estudios que demuestran que IL-6 disminuye tanto los niveles de RNA mensajero como los niveles de secreción de adiponectina en cultivos de adipocitos 3T3L1 [82], sugiriendo que el aumento de IL-6, condición observada en mujeres obesas y con SOP, podrían estar afectando la señalización y/o expresión de adiponectina, contribuyendo a defectos en la sensibilidad a la insulina, entre otras fallas.

Se debe mencionar que la expresión génica de esta citoquina puede ser estimulada tanto por la activación del factor de transcripción NFκB, como también por TNF-α [83], por lo que al considerar IL-6 en el proceso no se descarta la participación indirecta de TNF-α.

I.6. POSIBLES MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA ASOCIACIÓN ENTRE SOP Y OBESIDAD

Como se ha mencionado previamente, una molécula que podría ser clave en los posibles mecanismos presentes tanto en obesidad como en el SOP, es el factor de transcripción NFκB. Dicho factor está compuesto por dímeros de la familia de los NFκB, los cuales comparten dominio de homología Rel en su extremo N-terminal y un dominio de transactivación en su extremo C-terminal

[83]. NF κ B es uno de los efectores típicos involucrado en la vía canónica de TNF- α capaz de regular procesos como proliferación, reparación tisular o inflamación a través de la regulación transcripcional de diversos genes [65,83]. Además, se ha relacionado con otros procesos como la resistencia a la insulina inducida por obesidad o resistencia a la insulina hepática relacionada con dietas ricas en fructosa [84,85].

Bajo condiciones basales, NF κ B se encuentra en el citoplasma celular unido al inhibidor I κ B; por diversas señales, en su mayoría provenientes de citoquinas o moléculas relacionadas con estados de estrés celular, se activa un complejo de quinasas (IKKs) llamado NEMO. NEMO se activa principalmente por acción de TNF- α y como consecuencia, ocurren activaciones mediadas por fosforilaciones. Una de ellas, la fosforilación de IKK en el residuo de S180/181, permite la fosforilación de I κ B en S32/36, señal de degradación vía proteosoma de I κ B, con la consecuente activación de NF κ B, el que se traslada al núcleo en forma de homo o heterodímero, siendo los más comunes los dímeros p65-p65 y p65-p50, para la regulación transcripcional de diversos genes [61,65,68,70,83]. Las proteínas codificadas por estos genes incluyen citoquinas pro-inflamatorias tales como PAI-1, TNF- α , IL-6, e IL-1 β [83].

El mecanismo responsable de la activación de IKKs y NF κ B en la obesidad no está claro. Una posibilidad es que la acumulación de lípidos en el hígado y en otros tejidos en la condición de obesidad, contribuya al aumento de la β -oxidación mitocondrial de ácidos grasos y a la generación de productos de

peroxidación que pudiesen estimular a IKK y, por lo tanto, la activación de NFκB [83-85]. Se postula que en individuos con resistencia hepática a la insulina, la activación de NFκB puede activar a TNF-α, el que a través de la activación de quinasas como JNK-1 o S6K, promueve la fosforilación inhibitoria de IRS1 en residuos de serina y de esta forma, inducir resistencia a la insulina en dichos individuos [84]. De esta forma, NFκB y TNF-α pueden inducir fallas en la señalización de la insulina, lo que puede acentuar una condición insulino resistente de una forma similar a lo observado en adipocitos.

I.7. RELACIÓN ENTRE ADIPOQUINAS Y ENDOMETRIO PATOLÓGICO

Existe escasa información disponible con respecto a la adiponectina y su función en el tejido endometrial. Las evidencias indican que las adipoquinas, específicamente la adiponectina, tienen un rol importante en la fertilidad femenina, gracias a su capacidad de regular el metabolismo energético y la sensibilidad a la insulina, además de sus efectos anti-diabéticos, anti-inflamatorios, anti-angiogénicos y anti-aterioscleróticos [6,47].

Como se mencionó, se han observado menores niveles de adiponectina tanto en plasma como en adipocitos de mujeres obesas con SOP, por lo que una desregulación en la señalización de esta proteína en el endometrio podría ser

causa importante de una alteración del metabolismo energético endometrial y responsable de gran parte de las fallas reproductivas observadas en el endometrio patológico bajo estas condiciones.

Con respecto a la señalización de adiponectina en el endometrio fisiológico, se ha señalado la presencia de sus dos receptores en tejido endometrial humano, principalmente en células estromales y epiteliales [51]. Además, se ha observado un aumento de AdipoR1 y AdipoR2 en endometrios de fase secretora media correspondiente al momento de la implantación en un ciclo concepcional [51], lo que indica un posible rol de la adiponectina en la regulación del proceso de receptividad uterina y homeostasis endometrial. Sin embargo, no existe información disponible que relacione la vía de señalización de adiponectina en endometrios patológicos, sometidos a una condición hiperandrogénica e hiperinsulínica como es el SOP.

En consecuencia, las evidencias sugieren que la condición pro-inflamatoria que presentan las mujeres obesas favorecería la aparición de características típicas del SOP, como es la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia compensatoria y quizás el ambiente hiperandrogénico. Con respecto a esto, se ha demostrado un aumento de niveles de MCP-1 (proteína quimioattractante de monocito-1), conocido marcador de macrófagos, en muestras de sangre de mujeres con SOP comparado con mujeres sin el síndrome y que este aumento se correlaciona con el IMC, los niveles de adipocitos abdominales en estas pacientes y con una alteración en la expresión de adipoquinas [86,87].

Con respecto a la señalización endometrial de TNF- α , estudios en endometrio de mujeres con endometriosis han mostrado un rol activo de la citoquina sobre la progresión de la patología; mientras que el uso de antagonistas de TNF- α induce una regresión significativa de la enfermedad en un modelo de endometriosis en ratas [88,89]. Por otro lado, el endometrio humano, decidua y placenta expresan TNF- α y sus receptores a nivel de proteína y RNA mensajero, sugiriendo que múltiples efectos autocrinos y paracrinos por parte de la citoquina ocurren en tejido gestacional [62]. Sin embargo, no se cuenta con información que relacione de forma concreta la señalización de TNF- α y de adiponectina en tejido endometrial bajo condiciones patológicas del SOP y obesidad, así como tampoco si la obesidad constituye un factor que favorezca la fisiopatología o exacerbe los efectos del SOP sobre el endometrio humano.

I.8. PROPUESTA

En su conjunto, los antecedentes descritos nos llevan a investigar el efecto del ambiente pro-inflamatorio en el endometrio, fundamentalmente de TNF- α sobre la acción de la insulina, ya sea disminuyendo la expresión y/o señalización de adiponectina a través de la activación de NF κ B o afectando la activación de moléculas río abajo del receptor de insulina, como IRS1. Lo anterior llevaría a alteración de procesos como la captación de glucosa y finalmente el metabolismo endometrial, lo que contribuiría a la fisiopatología de la enfermedad y a las fallas de fertilidad presente en mujeres obesas con SOP (Figura 4).

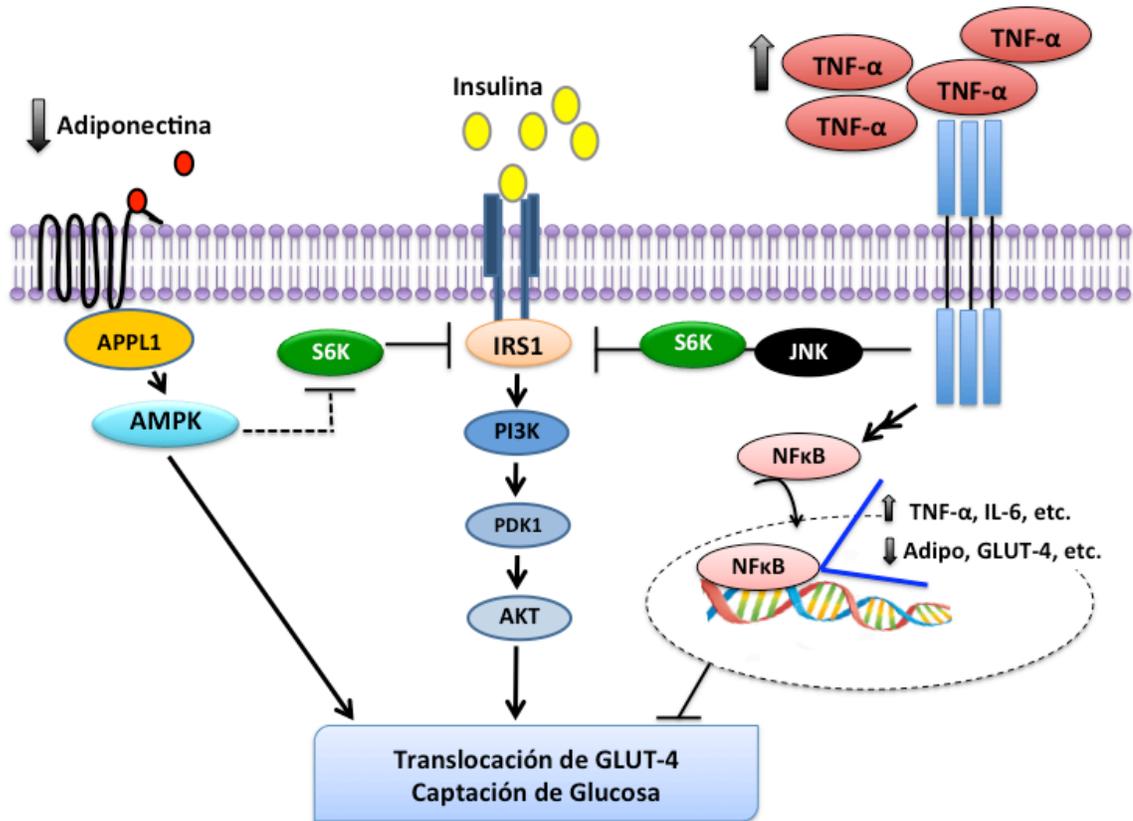


Figura 4. Modelo propuesto que muestra las vías de señalización de adiponectina y TNF- α y sus efectos sobre la actividad de la insulina en una célula endometrial. Las fallas en la señalización de la insulina en endometrios provenientes de mujeres obesas con SOP pueden ser el resultado de una sumatoria de factores negativos: el aumento del ambiente pro-inflamatorio y por ende, de citoquinas como TNF- α , inducido por obesidad, así como, la disminución de adiponectina (Adipo), molécula insulino-sensibilizante y anti-inflamatoria. Como consecuencia, este ambiente patológico altera la señalización de la insulina y con ello el metabolismo y normal funcionamiento del tejido endometrial.

II. HIPÓTESIS

El aumento de los niveles de TNF- α en la obesidad disminuye la vía de señalización de insulina en el endometrio de pacientes obesas con Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP), a través de la disminución de los niveles de adiponectina y de su vía de señalización y/o afectando la activación de IRS1. Lo anterior conduce a la disminución de la captación de glucosa por células endometriales expuestas a condiciones hiperandrogénicas e hiperinsulínicas.

III. OBJETIVOS GENERALES

1. Determinar si la condición SOP en conjunto con la obesidad modifican los niveles de TNF- α , adiponectina y moléculas involucradas en sus vías de señalización, así como, de macrófagos presentes en endometrios de mujeres obesas con SOP con respecto de aquellos encontrados en mujeres delgadas y obesas (estudios *ex vivo*).

2. Evaluar si TNF- α afecta la señalización de adiponectina, la captación de glucosa y la resistencia a la insulina en cultivos de células estromales endometriales humanas (T-HESC/St-T1b) expuestas a condiciones hiperandrogénicas e hiperinsulínicas (estudios *in vitro*).

III. 1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudios *ex vivo*: Suero y Tejido endometrial humano

1.1 Evaluar si los niveles circulantes de adiponectina y TNF- α varían en muestras de suero provenientes de los 4 grupos de estudio: Control (Normo-peso), Normo-peso con SOP, Obesas y Obesas con SOP (hiperinsulinémicas).

1.2 Evaluar si los niveles de expresión de RNA mensajero, proteína y/o localización celular de adiponectina y TNF- α , además de moléculas

involucradas en sus vías de señalización (AdipoR1, AdipoR2, APPL1, TNFR1 y 2) son diferentes entre muestras de tejido endometrial provenientes de los grupos de estudio.

1.3 Determinar si existen cambios en los niveles de expresión de NFkB y moléculas relacionadas con su activación (IKKs, Ikb α), además de la localización celular / subcelular del factor de transcripción en tejido endometrial provenientes de los grupos de estudio.

1.4 Identificar y comparar el número de macrófagos a través de la determinación de la proteína CD68 en muestras de tejido endometrial provenientes de los distintos grupos de estudio.

2. Estudios *in vitro*: cultivos de células T-HESC / St-T1b

En células T-HESC / St-T1b cultivadas en condiciones hiperandrogénicas e hiperinsulínicas:

2.1 Determinar los niveles de proteína de adiponectina, APPL1, AdipoR1 y AdipoR2 en las líneas celulares.

2.2 Evaluar si la adición de TNF- α a los cultivos celulares modifica los niveles de proteína de moléculas asociadas a la vía de señalización de adiponectina: AdipoR1, AdipoR2, APPL1 y AMPK.

2.3 Examinar si la adición de TNF- α modifica los niveles de proteína de moléculas asociadas a la vía de señalización canónica de TNF- α : TNFR1, TNFR2 y NF κ B.

2.4 Detectar si la localización subcelular y actividad de NF κ B cambian por acción de TNF- α .

2.5 Evaluar el efecto de TNF- α y NF κ B sobre los niveles de proteína de adiponectina a través de la adición de Pirrolidina Ditiocarbamato (PDTC), un inhibidor de la activación de NF κ B.

2.6 Determinar los efectos de TNF- α sobre los niveles de GLUT-4 y la captación de glucosa en las líneas celulares.

2.7 Analizar si la adición de TNF- α altera la activación de IRS1, PI3K/AKT y quinasas que regulan IRS1 como S6K y/o JNK-1.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 Pacientes y grupos de estudio

Veintiocho mujeres fueron reclutadas y se clasificaron en cuatro grupos: 1) Normo-peso (Delgadas; n=7); 2) Delgadas o Normo-peso con SOP (Delgadas-SOP; n=7); 3) Obesas (n=7); 4) Obesas con SOP e hiperinsulinemia (Obesas-SOP; n=7). Las características para la clasificación de las pacientes en los diferentes grupos, se resumen en la Tabla 1 y 2, considerando parámetros clínicos, hormonales y metabólicos que presentan las mujeres participantes del estudio.

Se observa que sus edades son similares independiente del grupo de estudio al que pertenecen; por otro lado, ambos grupos de Obesas presentaron un IMC > 30 kg/m², mientras que ambos grupos de Delgadas presentaron un IMC < 25 kg/m². El SOP fue diagnosticado de acuerdo a los criterios de la Sociedad de Exceso de Andrógenos y PCOS (año 2006 y re-evaluado el año 2009), considerando como criterio estricto el hiperandrogenismo, determinado por el índice de andrógenos libres (IAL) (hiperandrogenismo bioquímico) y/o hirsutismo (hiperandrogenismo clínico evaluado por el Score de Ferriman). En la presente tesis se utilizó el IAL como medida de hiperandrogenismo. Los valores de IAL mayores a 4,5 están dados por los menores niveles de SHBG y

mayores niveles de Testosterona total (Tabla 1) encontrados en las pacientes con SOP. Por otro lado, solo el grupo de mujeres Obesas-SOP presenta alterados los niveles de insulina a los 120 min post-carga y de glucosa sobre los valores normales (Tabla 2). Estas mujeres son consideradas hiperinsulinémicas, lo que fue corroborado con el índice HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment-Insulin Resistance*) [90] e ISI Composite (*Insulin Sensitivity Index*) [91], obtenidos a partir de los datos de la prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) con 75 gramos de carga de glucosa (valores normales: glucosa en ayunas <110 mg/dL; glucosa 120 min <140 mg/dL) (Tabla 2). Por lo tanto, las pacientes del grupo Obesas-SOP son las únicas que presentan ambas condiciones: hiperinsulinemia e hiperandrogenemia. Además, otras patologías que inducen una hiperinsulinemia o hiperandrogenemia se descartaron, como el síndrome de Cushing o la hiperplasia adrenal congénita. Ninguna de las mujeres participantes en esta investigación había recibido tratamiento hormonal en los últimos 3 meses previo al reclutamiento. Se obtuvieron muestras de sangre y tejido endometrial de las pacientes durante la fase proliferativa del ciclo menstrual, lo que se determinó usando los criterios de Noyes [13]. Además, se obtuvo un número reducido de muestras de endometrio durante la fase secretora del ciclo menstrual de las mujeres obesas con o sin SOP para evaluar su estado pro-inflamatorio. Las características clínicas y metabólicas de estas pacientes se muestran en Anexos, Tabla 5.

Los Comités de Ética de la Facultad de Medicina y del Hospital Clínico de la Universidad de Chile aprobaron esta investigación, para lo cual todas las pacientes firmaron un consentimiento informado por escrito, los que se adjuntan en Anexos. Esta investigación se enmarca en el Proyecto FONDECYT # 1130053 (MV) y apoyado además por Beca Doctorado Nacional Folio # 21120541 (LO).

Tabla 1. Características clínicas y hormonales de los grupos de estudio

Parámetros	Delgadas	Delgadas-SOP	Obesas	Obesas-SOP
Edad (años)	26,6 ± 5,6	25,8 ± 2,7	27,9 ± 5,2	25,9 ± 2,4
Índice de masa corporal (kg/m ²) (obesidad > 30)	22,4 ± 2,1	25,6 ± 0,2	34,7 ± 4,8 &	32,6 ± 3,4 \$
Estradiol (pmol/L)	168,7 ± 77	183,3 ± 55	151,3 ± 73	143,6 ± 40
Testosterona (ng/dL)	36,6 ± 10,7	40,0 ± 5,4 #	22,6 ± 8,4	49,4 ± 9,2 *
Androstenediona (ng/mL)	4,9 ± 1,3	3,9 ± 0,5	3,5 ± 1,6	5,3 ± 1,4
SHBG (nmol/L)	68,9 ± 0,8	20,8 ± 2,4 #	43,0 ± 2,4	25,7 ± 11 *
Índice de andrógenos libres (IAL) (normal < 4,5)	1,9 ± 0,6	7,3 ± 1,5	2,3 ± 0,7	6,7 ± 1,9 *

Grupo Obesas-SOP: Síndrome de Ovario Poliquístico, obesas e hiperinsulinémicas; SHBG, proteína de unión a hormonas sexuales; Valores de referencia: Obesidad: IMC > 30 kg/m²; Testosterona 5,7 – 77 ng/dL; SHBG 18 – 114 nmoles/L; IAL < 4,5 normal.

*P *value* < 0,05 entre Obesas-SOP y Delgadas

& P *value* < 0,05 entre Obesas y Delgadas

P *value* < 0,05 entre Delgadas-SOP y Delgadas

Tabla 2. Parámetros metabólicos de los grupos de estudio

Parámetros	Delgadas	Delgadas-SOP	Obesas	Obesas-SOP
Glucosa basal (mg/dL)	96,1 ± 12,4	90,2 ± 4,3	89,1 ± 7,2	92,9 ± 11,7
Glucosa post-carga 120 min (mg/dL)	96,1 ± 15,7	106,5 ± 13,2	124,3 ± 26,5	122 ± 21,6
Insulina basal (μUI/dL)	7,8 ± 3,5	5,0 ± 1,2	10,5 ± 3,3	17,1 ± 6,0
Insulina post-carga 120 min (μUI/dL)	45,6 ± 15,4	47,8 ± 11,1	59,4 ± 20,6	150,5 ± 86,6 *
HOMA-IR (normal < 2,6)	1,49 ± 1,1	1,1 ± 0,2	2,3 ± 0,8	4,5 ± 0,9 *
ISI Composite (normal > 3)	8,1 ± 4,7	8,0 ± 1,8	4,6 ± 2,3	2,09 ± 1,1 *

Grupo Obesas-SOP: Síndrome de Ovario Poliquístico, obesas e hiperinsulinémicas; Valores de referencia: Glucosa basal ≤ 100 mg/dL; Glucosa post-carga 120 min ≤ 140 mg/dL; Insulina basal ≤ 20 μUI/mL; Insulina post-carga 120 min ≤ 60 μUI/mL; Homa-IR normal < 2,6; ISI Composite normal > 3.

*P *value* < 0,05 entre Obesas-SOP y Delgadas

IV.2 Determinación de concentraciones sanguíneas de Adiponectina, TNF- α e IL-6 mediante ELISA

Muestras de suero de los cuatro grupos de estudio fueron obtenidos para la detección de los niveles de adiponectina, TNF- α e IL-6 por ELISA (Figura 5). Para ésto, se utilizaron los siguientes kits de ELISA: adiponectina: Human Total Adiponectin/Acrp30 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, cat. No. DRP300); TNF- α : TNF- α IMMULITE (Siemens, cat. No. PILKNF-11); IL-6: Human IL-6 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, cat. No. RD6050). La detección se realizó a través de reacción colorimétrica y la medición de la absorbancia a 450 nm usando el lector de ELISA Biotek EL800 y el programa computacional Gen5 1,06. Los datos se presentan en ng/mL para TNF- α y para adiponectina, y en pg/mL para IL-6. Los resultados para las tres proteínas se expresan como: media \pm EEM (error estándar de la media) para cada grupo.

IV.3 Preparación del tejido

Muestras de tejido endometrial de los cuatro grupos de estudio fueron obtenidos a través de una cánula de Pipelle y fueron divididos en tres fragmentos (Figura 5). Un fragmento se fijó en una solución tamponada de formaldehído al 4% durante 24 h, se incluyó en parafina y luego cortado con micrótopo en secciones de 4 μm de espesor previo a los estudios histológicos e inmunohistoquímicos. Los otros dos fragmentos de la muestra se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para medir los niveles de las proteínas y RNA mensajero (mRNA) de interés. Para la extracción de proteínas totales, una sección de cada fragmento de muestra congelada fue homogenizada en tampón RIPA (Tris-Base 50 mM, NaCl 150 mM, desoxicolato de sodio 0,5%, 1% de Triton X-100 y SDS 0,1%) con una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas 1X (ThermoScientific). Las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 20 min a 4°C . Se utilizó el sobrenadante resultante para determinar la concentración de proteínas usando una curva estándar de BSA (*Bovine Serum Albumin*, Fracción V; Roackland BSA-50) y el kit: PierceTM BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific Prod# 23227). Los otros fragmentos de muestras congeladas fueron utilizadas para la extracción de RNA total a través del uso del kit comercial Trizol (Ambion, #15596018), lo que se detallará más adelante.

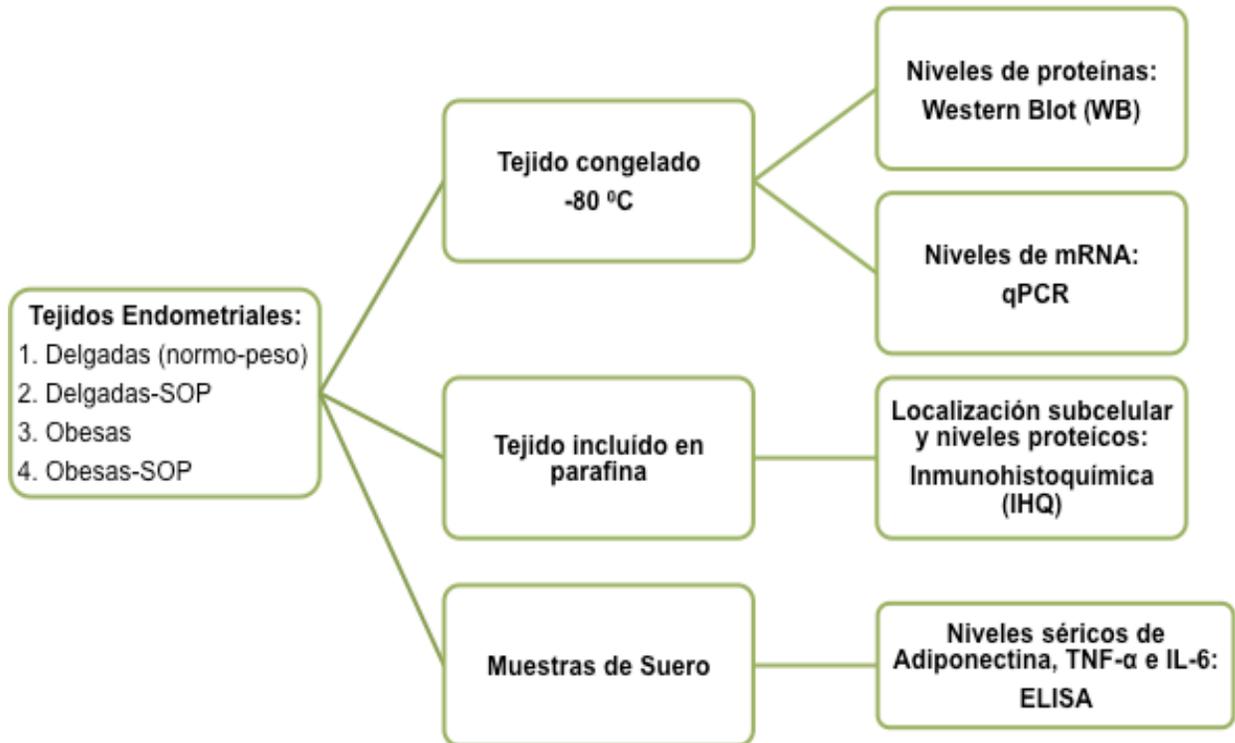


Figura 5. Diseño experimental para ensayos *Ex vivo*. A partir de tejido endometrial proveniente de los grupos de estudio se obtuvieron muestras de proteínas totales, RNAs mensajeros y cortes de tejido los que fueron usados para determinar los niveles de expresión y localización de moléculas de la vía de adiponectina, insulina y/o TNF- α , mediante WB, qPCR e IHQ, respectivamente. Además, muestras de suero fueron usadas para determinar adiponectina, TNF- α e IL-6 mediante ELISA.

IV.4 Cultivo celular y tratamientos

Para la mayoría de los ensayos *in vitro* (Figura 6), se utilizó una línea comercial de células estromales endometriales humanas T-HESC (ATCC, CRL-4003) [92], obtenidas de una mujer adulta con miomas. Para experimentos específicos, se usó la línea celular St-T1b [93] que, al igual que T-HESC, provienen de células estromales endometriales humanas obtenidas en fase proliferativa del ciclo. En

ambas líneas celulares la inmortalización se logró por transfección con un vector que expresa la telomerasa humana acoplado al gen de resistencia a puromicina. Las células provenientes de ambas líneas celulares se cultivaron en medio de crecimiento DMEM / F12 Ham (Sigma Aldrich) con 10% de suero fetal bovino tratado con carbón dextrano (Hyclone™ Thermoscientific) y una mezcla de antimicóticos / antibióticos 1X, a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Luego, las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X estéril de Dulbecco (DPBS, GIBCO® Invitrogen). Los cultivos se sometieron a tratamientos con 100 nM de Testosterona (Sigma T-0508) o con 100 nM de Insulina (HUMULIN) durante 48 h en medio libre de suero para simular un ambiente hiperandrogénico e hiperinsulínico propio del SOP. Las concentraciones de testosterona e insulina se determinaron en estudios previos de nuestro laboratorio [27,30]. Además, algunos cultivos celulares se co-estimularon con insulina, testosterona (100 nM cada uno) y TNF- α (dosis definida por una curva dosis-respuesta) por 24 y 48 h para determinar el efecto de la citoquina (las curvas dosis-respuesta se explican en la Sección IV.6).

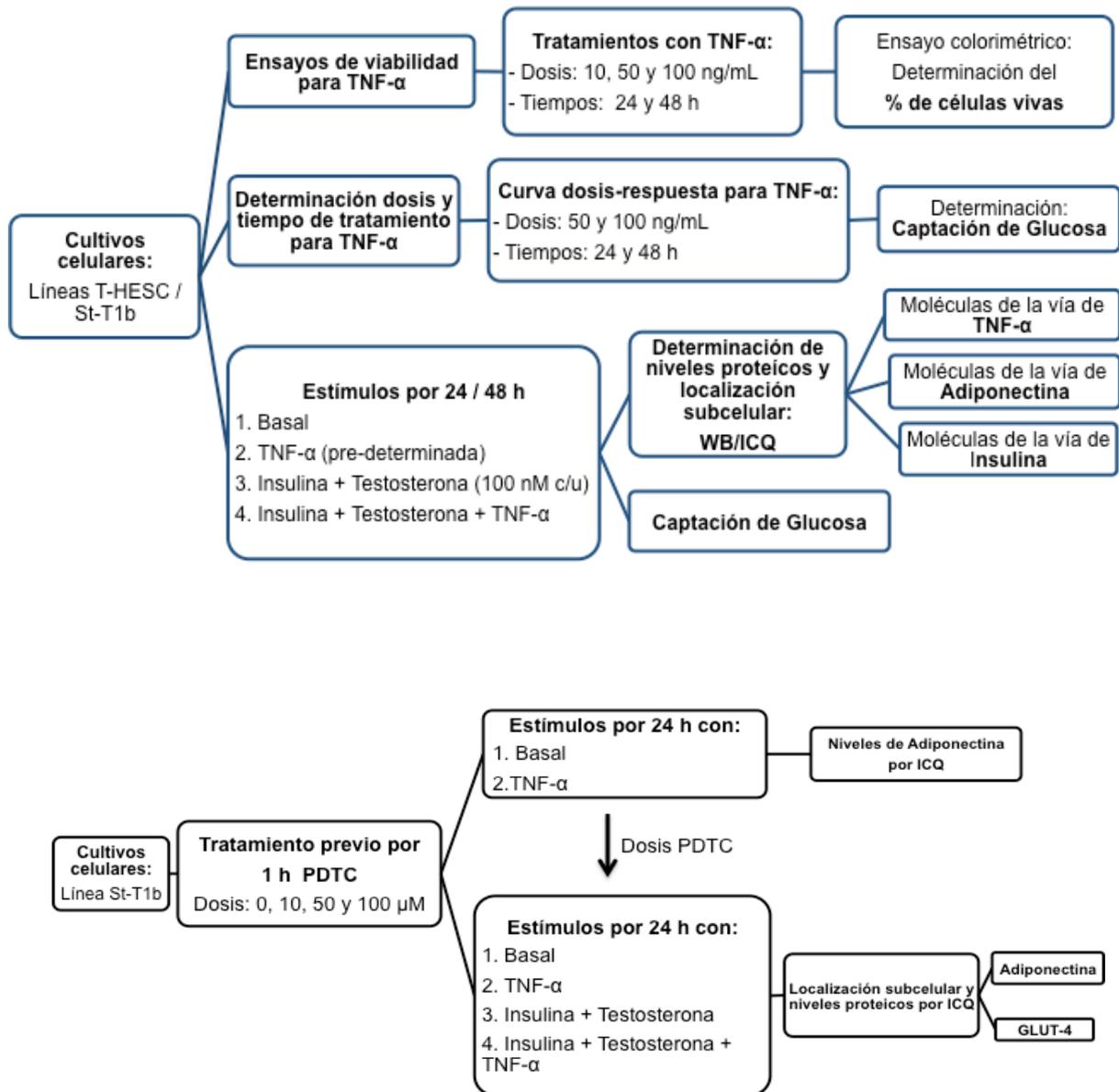


Figura 6. Diseño experimental para ensayos *In vitro*. Cultivos celulares, principalmente de la línea celular T-HESC (diagrama superior) y algunos ensayos específicos con la línea celular St-T1b (diagrama inferior), fueron usados para determinar el efecto de TNF- α sobre moléculas asociadas a la vía de señalización de adiponectina e insulina.

IV.5 Ensayos de Viabilidad

Para evaluar los posibles efectos de los distintos tratamientos sobre la viabilidad de las células, se realizó un ensayo de viabilidad en cultivos de T-HESC (Figura 6), usando el kit comercial: Cell Cytotoxicity Assay (Abcam Ab112118). Para ello, se cultivó 50.000 células por pocillo en placas Labtek (ThermoScientific Lab-Tek II Chamber Slide™ System). Al alcanzar 80% de confluencia, las células fueron tratadas con 50 o 100 ng/mL de TNF- α (Recombinant Human Tumor Necrosis Factor- α , Gibco by LifeTechnologies PHC3015) por 24 y 48 h. El sobrenadante fue descartado y se agregó 100 μ L de medio de crecimiento sin suero a cada pocillo. Luego, se adicionó 20 μ L en una dilución de 1:5 en medio sin suero y previamente calentado a 37 °C. Se incubó la placa a 37 °C por 4 h. Finalmente, se midió la absorbancia usando el equipo NanoDrop a 570 nm y 605 nm para obtener una razón de células vivas y muertas. Como control de la técnica, se incluyó ensayo de viabilidad con el fármaco antineoplásico, mitoxantrona en una concentración tóxica para la célula (10 nM) [94]. El valor del blanco (medio sin suero en ausencia de células), fue restado en todas las mediciones. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad en relación al basal (células tratadas con medio sin suero).

IV.6 Curva dosis-respuesta para TNF- α

En base a los resultados obtenidos del ensayo de viabilidad y considerando que 100 ng/mL de TNF- α no son tóxicos para las células, se realizó una curva en la que se determinó funcionalidad de células T-HESC con distintas dosis de TNF- α (0, 50 y 100 ng/mL) por 24 y 48 h de tratamiento (Figura 6). El ensayo evaluó el efecto de TNF- α sobre la capacidad de captar glucosa en cultivos de T-HESC, los cuales mostraron una disminución significativa a las 48 h de tratamiento con 100 ng/mL de TNF- α . Los resultados de estos ensayos se muestran más adelante en la Figura 39. El protocolo usado para evaluar la captación de glucosa se explica con más detalle en las siguientes secciones. Además, se realizó un ensayo independiente para determinar el efecto de TNF- α sobre los niveles de AKT fosforilado en el residuo de serina 473 (S473) en tiempos más cortos de tratamiento. Para ello, en placas de 6 pocillos se sembraron 700.000 células por pocillo las que fueron tratadas con distintas concentraciones de la citoquina: 10 y 50 ng/mL. Las células se trataron por 6 y 24 h para luego extraer proteínas totales y determinar los niveles proteicos de p-AKT S473 mediante Western blot. El ensayo indicó que con ambas concentraciones se observan cambios significativos a las 24 h de tratamiento (los resultados se muestran en la Figura 45). Por ello, la mayoría de las determinaciones realizadas en el presente trabajo fueron a 24 y 48 h de estímulo.

IV.7 Detección de niveles de proteínas y visualización por Inmunohistoquímica e Inmunocitoquímica

Para los ensayos de inmunohistoquímica, los cortes de tejido fueron incubados en xileno para descartar la parafina e hidratados usando soluciones de alcohol graduadas (100%, 95% y 70% de etanol). Luego, para la exposición antigénica, las placas fueron incubadas en 10 mM de tampón de citrato (pH 6,0) a 95°C durante 30 min. Para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena, las muestras se incubaron en peróxido de hidrógeno al 3% por 15 min. La unión no específica de anticuerpos fue inhibida por la incubación de las muestras con solución de bloqueo (Histostain-SP, Invitrogen) durante 10 min. Para los ensayos de inmunocitoquímica, las células T-HESC o St-T1b se cultivaron directamente sobre placas especializadas para la técnica (ThermoScientific Lab-Tek II Chamber Slide™ System). Por cada pocillo se sembró 50.000 células en medio de crecimiento bajo las condiciones previamente descritas. Luego, las células fueron fijadas usando, primero una solución de paraformaldehído (PFA) al 2% en PBS 1X (Winkler BM-1340) por 2 min y luego con 4% de PFA por 15 min a temperatura ambiente. Los tratamientos siguientes fueron similares a los usados para las muestras de tejidos; sin embargo, el bloqueo se realizó con PBS-BSA al 2% por 40 min a temperatura ambiente.

A continuación, las placas con los tejidos y con las células fueron incubadas con anticuerpos primarios específicos diluidos en PBS 1X durante toda la noche a

4°C (Tabla 3). Un control interno se llevó a cabo incubando solo con PBS 1X en ausencia de los anticuerpos primarios. Para la detección de las proteínas se usó un anticuerpo secundario biotinilado unido a la enzima HRP y el sistema estreptavidina-peroxidasa. El compuesto 3,3-diaminobencidina (DAB) fue utilizado como sustrato para la reacción cromogénica lo que permitió la formación de un compuesto color café (señal inmunopositiva); la contratinción se realizó con hematoxilina filtrada (Dako) para la tinción nuclear. Luego, las muestras se deshidrataron usando las soluciones graduadas de etanol y se les agregó medio de montaje (Entellan®new, Millipore HX54866861) para su posterior visualización. Las muestras se evaluaron semi-cuantitativamente en un microscopio óptico (Olympus BX51TF); el análisis semi-cuantitativo consiste en medir la intensidad de los píxeles en un área seleccionada y que representa la tinción que se desea evaluar a través de la herramienta IOD (*Integrated Optical Density*, en inglés) del programa Image Pro Plus 6.0. Los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias (UA).

Para determinar la translocación al núcleo de la subunidad p65 de NFκB en tejido y en células estimuladas con Insulina, testosterona y TNF-α, se calculó la razón entre el número de núcleos positivos y el número de núcleos totales en el tejido o células cultivadas. Los resultados se expresaron como el porcentaje de núcleos positivos.

La posibilidad concreta de la existencia de un ambiente pro-inflamatorio fue evaluada por la inmunotinción positiva de la proteína CD68, proteína de

membrana que se expresa en macrófagos, por lo que es utilizada como marcador de macrófagos [95]. Los resultados se expresaron como el número de macrófagos en relación al área total de tejido. La media de estos valores se obtuvo por cada grupo de estudio o condición *in vitro* y se expresaron como media \pm EEM.

IV.8 Detección de proteínas por Inmunofluorescencia

Para ensayos de inmunofluorescencia en T-HESC, las células fueron cultivadas en placas Lab-Tek como se indicó para la técnica de inmunocitoquímica. Después de los estímulos con insulina, testosterona y/o TNF- α se removió el medio. Las células fueron fijadas y lavadas con PBS 1X y se permeabilizaron con Triton X-100 (Winkler BM-2020) al 0,3% en PBS 1X. Las placas se bloquearon con 2% de BSA en PBS 1X por 30 min. Finalmente, se incubaron toda la noche con anticuerpos primarios específicos (Tabla 3). Para la detección de las proteínas, se incubó con anticuerpos secundarios (dilución 1:500) unidos a fluoróforos (A11070: AlexaFluor® 488 F(ab')₂ Fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L) y A11005: AlexaFluor® 594 goat anti-mouse IgG (H+L), LifeTechnologies) por 1 h a 37°C en oscuridad. Luego de los lavados, las placas se montaron usando medio de montaje que contenía DAPI (Prolong® Gold Probes, Antifade with DAPI; Cell Signaling #8961S) que identifica núcleos. La fluorescencia fue detectada usando un microscopio de epifluorescencia Olympus BX51TF acoplado a una lámpara fluorescente modelo BH2-RFL-T3.

Para ensayos de inmunofluorescencia en tejido, se siguió el mismo protocolo usado para células T-HESC; sin embargo, para descartar la parafina, inicialmente se procedió a incubar los cortes en xilol y luego se hidrataron usando soluciones graduadas de etanol para la posterior exposición antigénica con tampón citrato y bloqueo con BSA 2% en PBS 1X por 30 min.

IV.9 Detección de niveles de proteínas por Western blot

Las proteínas totales fueron obtenidas a partir de aproximadamente 50 mg de tejido endometrial proveniente de los cuatro grupos de mujeres incluidas en los estudios *ex vivo*. Para los ensayos *in vitro*, las proteínas totales se obtuvieron a partir de placas con 700.000 células por pocillo cultivadas en medio de crecimiento por 24 h bajo las condiciones ya descritas. Las muestras de proteínas se resolvieron por electroforesis en geles de SDS-PAGE al 6 – 12% de acrilamida/bisacrilamida, dependiendo de la proteína a analizar (Tabla 3). Las proteínas se electro-transfirieron a membranas de nitrocelulosa por 90 min a 400 mA para su posterior detección con el anticuerpo específico. La transferencia de proteínas fue confirmada por tinción de rojo Ponceau. Las membranas se bloquearon durante 1 h en leche descremada al 5% en tampón de lavado TTBS 1X (Tris 20 mM, pH 7,5; NaCl 137 mM; 0,1% de Tween-20). Luego, las membranas bloqueadas se incubaron durante toda la noche a 4°C con anticuerpos específicos (Tabla 3). Las membranas se revelaron a través de

una reacción quimioluminiscente incubando por 1 h con anticuerpo secundario acoplado a la enzima HRP diluido en leche al 5% (1:5000), y luego una incubación por 5 min con luminol, usado como sustrato (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; ThermoScientific Prod #34080). Los valores fueron obtenidos por análisis densitométrico de las intensidades de cada banda a través de un sistema de digitalización automatizada utilizando el programa UN-SCAN-IT gel, versión 5.1. Las intensidades se presentan como unidades arbitrarias (UA) y los resultados se normalizaron en relación a los valores obtenidos para la proteína constitutiva (β -actina). Para las proteínas fosforiladas se reemplazó la leche por BSA (*Bovine Serum Albumin*, Fraction V; Roackland BSA-50) al 5% y las UA se normalizaron en relación a las UA de cada proteína no fosforilada, según corresponda (Tabla 3). Los resultados se presentan como la media \pm EEM.

Tabla 3.1 Anticuerpos. Especificaciones y diluciones de trabajo

Anticuerpo	Fuente	Dilución WB/IHQ	MW (KDa)	Marca y código
Adiponectina	Mono-Rabbit	1:300 / 1:50	28 y 56	Novus Biologicals (NBP1-40607)
AdipoR1	Poly-Rabbit	1:600 / 1:100	42	Alpha Diagnostic (ADIPOR12-A)
AdipoR2	Poly-Rabbit	1:600 / 1:100	42	Alpha Diagnostic (ADIPOR22-A)
APPL1	Mono-Rabbit	1:500 / 1:100	82	Cell Signaling (#3858)
AMPK α / p-AMPK α T172	Poly-Rabbit / Mono-Mouse	1:500 / 1:100	62	Cell Signaling (#2532 / #2535)
TNF- α	Poly-Rabbit	1:100 (IHQ)	17 y 25	Cell Signaling (#3707)
TNFR1	Mono-Rabbit	1:500 / 1:100	55	Cell Signaling (#3736)
TNFR2	Poly-Rabbit	1:500 / 1:100	75	Cell Signaling (#3727)
NF κ B (p65)	Mono-Rabbit	1:500 / 1:200	65	Cell Signaling (#8242)
I κ B α / p-I κ B α S32-36	Poly-Rabbit / Mono-Mouse	1:500 / 1:200	39 / 40	Cell Signaling (#9242 / #9246)

Mono: monoclonal; Poly: policlonal

Tabla 3.2 Anticuerpos. Especificaciones y diluciones de trabajo

Anticuerpo	Fuente	Dilución WB/IHQ	MW (KDa)	Marca y código
IKK α β / pIKK α β	Poly-Rabbit	1:200 / 1:50	85	Sta. Cruz (sc-7607 / sc-23470-R)
IRS1 / pIRS1 S270	Poly-Rabbit / Poly-Goat	1:200 / 1:50	170-185	Sta. Cruz (sc-559 / sc-17192)
pIRS1 Y612	Poly-Rabbit	1:500 / 1:50	165	Abcam (ab66153)
AKT / pAKT S473	Poly-Rabbit	1:500 / 1:100	60	Cell Signaling (#9272 / #9271)
S6K1	Mono-Rabbit	1:250 / 1:100	70	Abcam (ab32359)
pS6K T389	Mono-Mouse	1:250 / 1:100	70-85	Cell Signaling (#9206)
JNK / pJNK T183- Y185	Mono-Rabbit / Poly- Rabbit	1:500 / 1:100	46-54	Cell Signaling (#9258 / #9251)
IL6	Poly-Mouse	1:100 (IHQ)	23	Sigma (SAB1400139)
IL6R	Poly-Rabbit	1:100 (IHQ)	52	GeneTex (GTX54364)
CD68	Mono-Mouse	1:100 (IHQ)	--	Dako (M0876)
GLUT-4	Poly-Rabbit	1:50 (ICQ)	50-63	Sta. Cruz (sc-7938)
β -actina	Mono-mouse	1:10000 (WB)	42	Sigma (A5441)

Mono: monoclonal; Poly: policlonal

IV.10 Ensayos de RT-PCR y qPCR

Muestras de RNA total de tejido endometrial o cultivos celulares fueron utilizadas para determinar el nivel mRNA a través de PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR). Para ello, el RNA total fue extraído con Trizol (Ambion, #15596018) y cloroformo para eliminar las trazas de fenol. Posteriormente, se extrajo la fase acuosa para precipitar el RNA usando isopropanol. Las muestras se centrifugaron a 10.000 g por 10 min a 4°C y el precipitado fue lavado con etanol 75%. El precipitado fue re-suspendido con 20 µL de H₂O_{DEPC} (MO BIO Laboratories, Inc. #17011-200). El RNA resultante fue cuantificado por espectrofotometría usando el equipo NanoDrop 2000 (ThermoScientific). Sólo se utilizaron las muestras de RNA que presentaron parámetros óptimos de calidad e integridad. El RNA obtenido fue tratado con DNasa (Fermentas #EN0521) para eliminar restos de DNA genómico y con 50 mM de EDTA para inactivar la reacción. Un volumen equivalente a 1 µg de RNA fue usado para la transcripción reversa, la que se realizó usando Random Primers (Promega #C118A) y la enzima *Reverse Transcriptase* M-MLV (Invitrogen 28025-013). Previamente, las muestras fueron tratadas con inhibidor de ribonucleasas (rRNasin; Promega #N251A). El cDNA obtenido se guardó a -30°C para su posterior uso. Para el qPCR se usó una mezcla que contenía 10 µL de Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies #600828), 8 µL de H₂O bi-destilada (Apiroflex, marca Fresenius Kabi), 0,5 µL de cada partidor (sentido

y antisentido) y 1 μ L de cDNA diluido 10 veces en agua bi-destilada estéril. Además, la mezcla para el qPCR contenía ROX (1:10.000) como referencia pasiva. Los qPCRs se realizaron en el termociclador Step One™ Real-Time PCR System Thermal Cycling Block de Applied Biosystems. Los partidores específicos para cada transcrito se muestran en la Tabla 4. El análisis de los datos se realizó mediante una cuantificación relativa con el método de la curva estándar usando distintas diluciones de cDNA. Con este método se comprobó la eficiencia de cada par de partidores (eficiencia permitida: entre 90 y 110%, Tabla 4). Los datos se presentaron como copias relativas de mRNA normalizados en relación a los niveles de mRNA de GAPDH (expresión constitutiva). Los resultados se expresan como las medias de cada grupo \pm EEM.

Tabla 4. Secuencia de partidores para la determinación de niveles de mRNA por qPCR

Transcrito	Partidor <i>Sense</i>	Partidor <i>Antisense</i>	% Eficiencia
AdipoR1	AAACTGGCAACATCTGGACC	GCTGTGGGGAGCAGTAGAAG	107
AdipoR2	ACAGGCAACATTTGGACACA	CCAAGGAACAAAACCTTCCA	90
APPL1	TTAGCTGCCCGGGCCATCCATA	ATCTTTTCCCCCTCATTGTTTG	104
GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	ATCCACAGTCTTCTGGGTG	101

IV.11 Ensayos de captación de glucosa

Los ensayos de captación de glucosa fueron realizados como se ha reportado previamente [30]. Brevemente, las células T-HESC fueron sembradas en placas de 12 pocillos con 150.000 células por pocillo. Después de los estímulos con las hormonas y/o TNF- α , los cultivos celulares se incubaron en medio de transporte (15 mM HEPES, pH 7,6; NaCl 135 mM; KCl 5 mM; CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 0,8 mM y 10 mM de desoxi-D-glucosa). Los ensayos de captación se realizaron en 500 μ L de medio de transporte que contenían 1 Ci/mL de 2-desoxi-D-[1,2(N)³H] glucosa (PerkinElmer, EE.UU.). Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente, la captación se detuvo agregando 500 μ L de solución de detención fría (NaCl 135 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgSO₄ 0,8 mM, HgCl₂ 0,2 mM). Las células se lisaron en 500 μ L de tampón de lisis (NaOH 0,5 mM). A cada pocillo se añadió 3,5 mL de líquido de centelleo para determinar la radiactividad usando un contador de centelleo (Packard 2100 TR Tricard; 18% de eficiencia). Para descartar la captación de glucosa inespecífica se utilizó el flavonoide Quercetina (150 μ M), bloqueador de transportadores GLUT-1. Para cada ensayo, se realizaron tres experimentos independientes en duplicado. Los resultados obtenidos en cada pocillo se expresaron como picomoles de glucosa / μ g proteína total.

IV.12 Tratamientos con Pirrolidina Ditiocarbamato (PDTC) en la línea celular: St-T1b

Para determinar la participación de NFκB en la acción de TNF-α sobre la expresión de adiponectina, se utilizó un antioxidante e inhibidor de la activación de NFκB [96,97], denominado: Pirrolidina Ditiocarbamato (PDTC) en cultivos de St-T1b. En primer lugar, se determinó la dosis de PDTC, ensayando tratamientos con tres dosis del compuesto (10, 50 y 100 μM) por 1 h y luego las células fueron estimuladas con TNF-α (100 ng/mL) por 24 h, para determinar los niveles de adiponectina. Los resultados se muestran en la Figura 36. Luego, cultivos de St-T1b fueron pre-tratadas con 50 μM PDTC por 1 h y estimulados con los diferentes tratamientos por 24 h: TNF-α (100 ng/mL), Insulina y testosterona (100 nM cada una), o tratamientos combinados con las tres moléculas (Figura 6). Luego, se determinaron por ICQ, la localización y niveles de adiponectina / GLUT-4, siguiendo los protocolos ya descritos (Tabla 3).

IV.13 Análisis estadístico

Todos los datos mostraron una distribución no paramétrica y se analizaron mediante la prueba de Kruskal Wallis. Para comparaciones múltiples, se utilizó el Post Test de Dunn (*P *value* < 0.05; **P *value* < 0,01; ***P *value* < 0,001). En algunos casos de comparaciones múltiples, letras distintas (a ≠ b ≠ c ≠ d) indican diferencias estadísticamente significativas con un *P *value* < 0,05. Los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa GraphPad Prism 5.0. Para el cálculo del n muestral para los ensayos *ex vivo*, se utilizó la fórmula: $n = [2 (Z\alpha + Z\beta)^2 S^2 / d^2]$, usada en estudios similares del laboratorio [23,24] y en ensayos adelantados de ésta tesis, lo cual consideró una diferencia entre las medias de un 25% (d) y una desviación estándar igual a 0,2 (S). El resultado fue un n igual a 7.

V. RESULTADOS

V.1 ENSAYOS *EX VIVO*

V.1.1 Niveles séricos de Adiponectina y TNF- α

Se ha reportado que en mujeres obesas existe una disminución de los niveles circulantes de adiponectina [6] y que estos niveles pueden también ser alterados bajo una condición SOP y una mayor condición pro-inflamatoria [73]. Por ello, como primer objetivo se evaluaron los niveles de adiponectina y TNF- α en suero de pacientes Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP mediante la técnica de ELISA. La Figura 7 muestra la concentración de adiponectina en los cuatro grupos de estudio y se observa que sólo en el grupo Obesas-SOP, que son mujeres que presentan hiperandrogenismo e hiperinsulinemia, ocurre una disminución de la quimoquina con respecto a los otros grupos ($p < 0,05$). Este resultado fue incluido en el artículo *Endometria from obese PCOS women with hyperinsulinemia exhibit altered adiponectin signaling* en la revista *Hormone and Metabolic Research* [29].

Adiponectina sérica

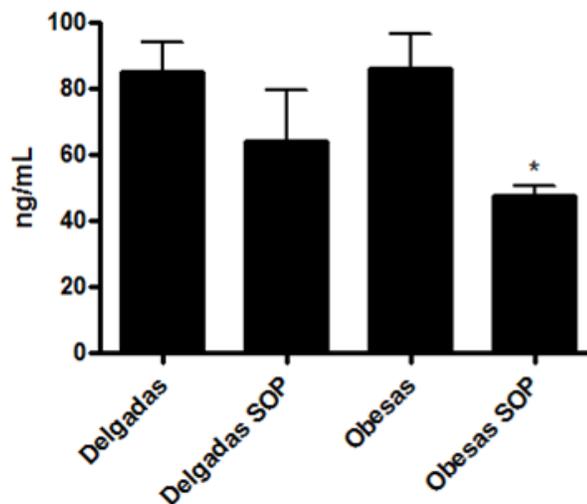


Figura 7. Niveles circulantes de adiponectina en mujeres Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP mediante ELISA. Muestras de suero provenientes de pacientes fueron utilizados para determinar, por ELISA, los niveles circulantes de adiponectina (n=7 para cada grupo; *P value<0.05 Obesas-SOP vs los otros grupos).

Por otro lado, diversos estudios indican que en pacientes obesas con o sin SOP, bajos niveles de adiponectina se relacionan con altos niveles de TNF- α en suero y tejido adiposo, entre otros modelos celulares [36-41,68,75-77]. Sin embargo, la Figura 8 muestra que los niveles de TNF- α encontrados en sueros de mujeres provenientes de los 4 grupos de estudio son similares, lo que podría significar que las condiciones patológicas presentes en nuestras pacientes no se traducen en cambios a nivel sistémico de TNF- α . Este resultado fue incluido en el artículo *Proinflammatory environment and role of TNF- α in endometrial*

function of obese women having polycystic ovarian syndrome (PCOS) en la revista International Journal of Obesity [31].

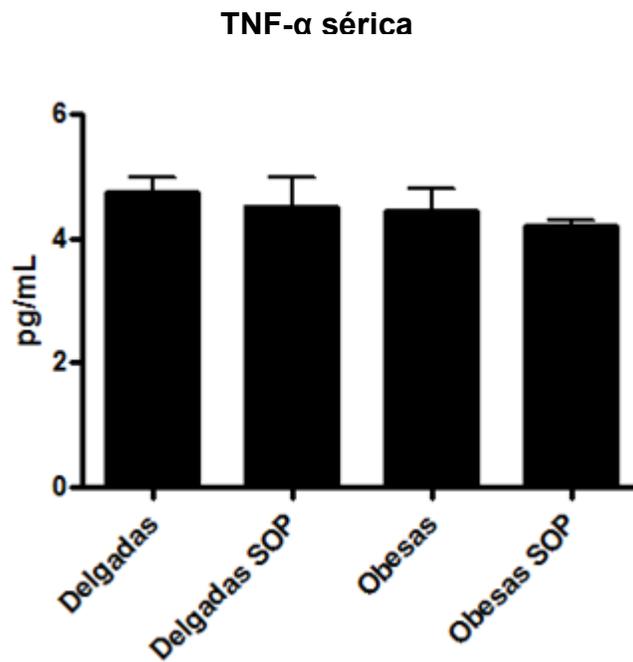


Figura 8. Niveles circulantes de TNF- α en mujeres Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP mediante ELISA. En muestras de suero provenientes de pacientes se determinó, por ELISA, los niveles circulantes de TNF- α (n=7 para cada grupo).

V.1.2 Detección de moléculas involucradas en la vía de señalización de adiponectina en tejido endometrial

Los menores niveles de adiponectina en suero de pacientes Obesas-SOP tendrían efectos sobre la acción de insulina a nivel de los tejidos. Sin embargo, se desconoce si estos cambios pueden repercutir en el metabolismo de tejidos sensibles a la insulina, como es el endometrio. Para ésto, como parte del segundo objetivo, se evaluaron los niveles de adiponectina y de moléculas relacionadas con su vía de señalización en los endometrios de los 4 grupos de estudio, a través de IHQ, WB o qPCR.

En primer lugar, se evaluó mediante IHQ la localización de adiponectina y moléculas relacionadas con su vía de señalización en tejido endometrial proveniente de los 4 grupos de estudio (Figura 9). Los resultados muestran la localización y niveles proteicos de adiponectina, AdipoR1, AdipoR2 y APPL1 en el tejido endometrial de mujeres Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP. La microfotografía muestra que todas las proteínas analizadas presentan marca inmuno-positiva tanto en el compartimento estromal como en el epitelial del tejido, indicando la capacidad del endometrio de expresar las moléculas involucradas en la vía de señalización. Lo anterior sugiere que esta vía está activa en el endometrio de las pacientes pertenecientes a estos grupos de estudio. Se pueden observar variaciones en la intensidad de la tinción, los que

fueron mejor analizados de forma semi-cuantitativa mediante western blot, datos mostrados más adelante.

Sin embargo, a grandes rasgos se puede observar una disminución de APPL1 y AdipoR1 bajo una condición de SOP y Obesidad. Con respecto a los receptores, estos se observan principalmente en la periferia de la célula (cara basal al lumen glandular), esto principalmente en mujeres sin SOP (Delgadas y Obesas), por lo que no se descarta que el SOP tenga un efecto sobre la localización subcelular de estas moléculas alterando, en cierto grado, el correcto funcionamiento del tejido endometrial (Figura 9).

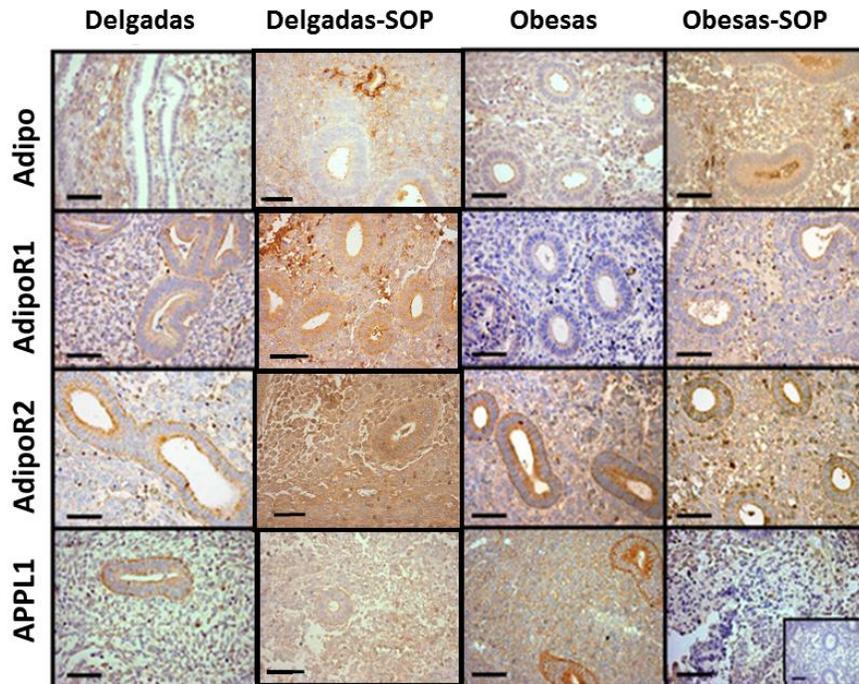


Figura 9. Detección de moléculas involucradas con la vía de señalización de adiponectina. Imágenes de tejido endometrial provenientes de los cuatro grupos de estudio, los que fueron utilizados para determinar mediante IHQ: adiponectina, AdipoR1, AdipoR2 y APPL1; (n = 7; Inserto: control negativo; Barra = 50 μm).

Para un mejor análisis sobre los cambios de estas moléculas en el tejido endometrial, se realizó la determinación de los niveles proteicos de adiponectina y sus receptores mediante WB. Por la dificultad en obtener muestras del grupo de mujeres Delgadas SOP, este análisis se realizó sólo en muestras provenientes de los grupos: Delgadas, Obesas y Obesas-SOP.

En la Figura 10 se muestra los niveles endometriales de adiponectina y de manera relevante se puede observar que éstos son menores en endometrios de mujeres Obesas-SOP, comparado con los demás grupos ($p < 0,05$). Esto se condice con los resultados obtenidos en suero, indicando que los cambios no sólo se observan a nivel sistémico, sino que también a nivel local, como es el caso del endometrio; sin embargo, los niveles séricos y endometriales de adiponectina no mostraron cambios en Obesas versus Delgadas (Figuras 7 y 10).

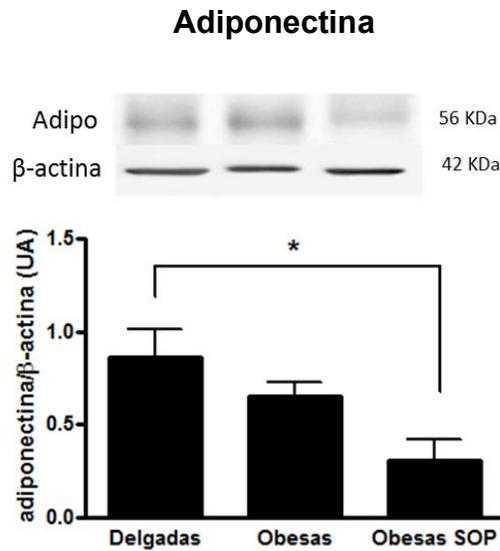


Figura 10. Niveles proteicos de Adiponectina en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Obesas y Obesas-SOP. Muestras de proteínas totales extraídas de tejido endometrial provenientes de los tres grupos de estudio fueron utilizadas para determinar los niveles proteicos de adiponectina (banda de 56 KDa), mediante western blot. Los datos fueron normalizados utilizando los niveles proteicos de β-actina en cada muestra (n = 5; *P *value* < 0,05 Delgadas vs Obesas-SOP).

Luego, se determinaron los niveles proteicos y transcrito de los receptores de adiponectina en endometrios de los tres grupos de estudio (Delgadas, Obesas y Obesas-SOP). En la Figura 11 se observa que existe un aumento de AdipoR1 en endometrios de mujeres Obesas con respecto al grupo de Delgadas ($p < 0,05$), mientras que los niveles en Obesas-SOP no varían en comparación con Delgadas. Con respecto a AdipoR2, no se observaron cambios en los niveles de proteínas en ningún grupo estudiado con respecto al control (grupo Delgadas), lo que está de acuerdo con trabajos de otros autores, con respecto a la expresión de ambos receptores en endometrios en fase proliferativa del ciclo [51] (Figura 11).

Por otro lado, diversos estudios indican que condiciones patológicas relacionadas con el metabolismo alteran, no solo la secreción y niveles proteicos de adipoquinas relacionadas con la insulina, sino que también se observan cambios en los niveles de transcrito de estas moléculas [75,77,82]. Por ello, se determinaron los niveles de mRNA de ambos receptores de adiponectina mediante qPCR. En la Figura 12 se observan los niveles de mRNA de AdipoR1 y AdipoR2, los cuales no muestran cambios estadísticamente significativos entre los grupos estudiados. Sin embargo, la tendencia de los niveles de AdipoR1 se relaciona con los niveles proteicos observados en la Figura 11.

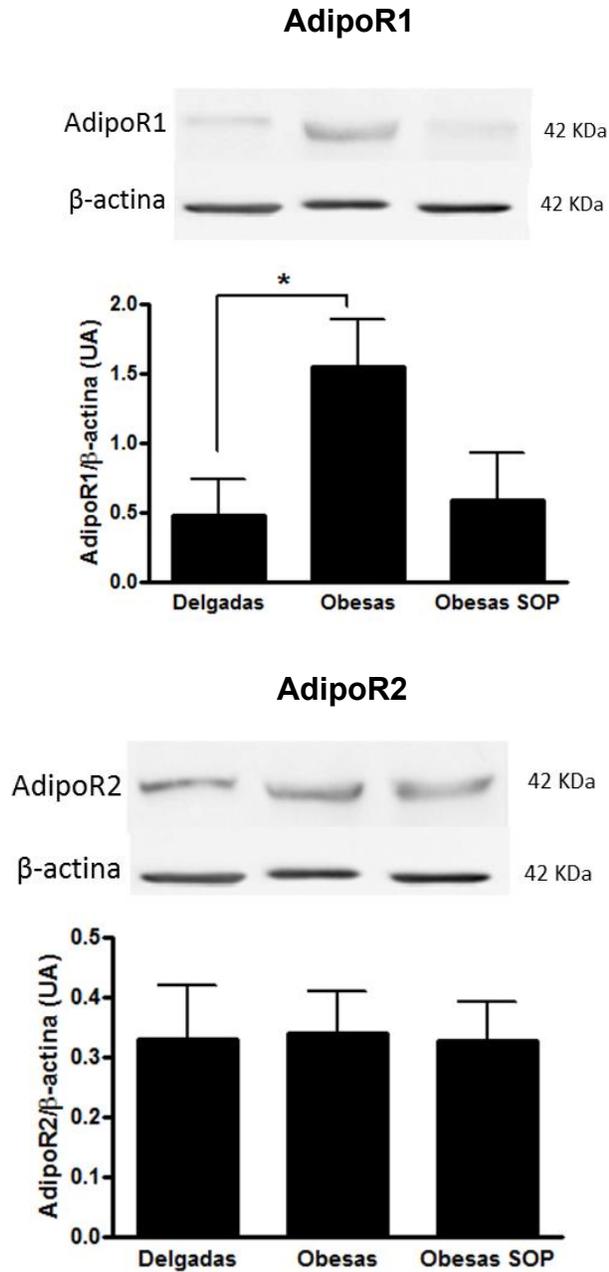


Figura 11. Niveles proteicos de receptores de adiponectina (AdipoR1 y AdipoR2) en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Obesas y Obesas-SOP. Muestras de proteínas totales extraídas de tejido endometrial fueron utilizadas para el análisis de los niveles proteicos AdipoR1 y AdipoR2, cada uno identificado por una banda de 42 KDa, mediante western blot. Los datos fueron normalizados utilizando los niveles proteicos de β -actina en cada muestra (n = 5; *P value < 0,05 Delgadas vs Obesas-SOP).

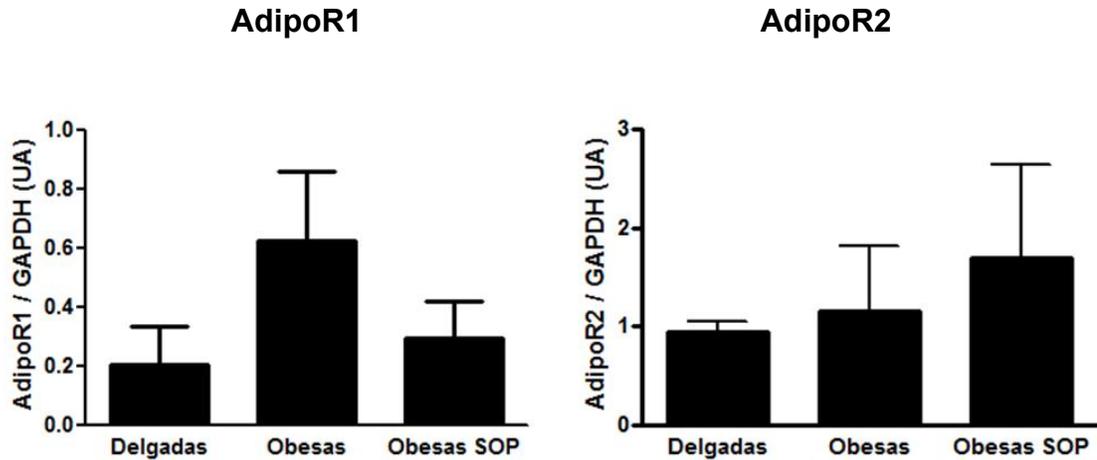


Figura 12. Niveles de mRNA de receptores de adiponectina (AdipoR1 y AdipoR2) en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Obesas y Obesas-SOP. Muestras de RNA total extraídas de tejido endometrial proveniente de pacientes fueron utilizadas para determinar los niveles de RNA mensajero de AdipoR1 y AdipoR2, mediante qPCR. Los datos fueron normalizados usando los niveles de mRNA de GAPDH en cada muestra (n = 5).

Con el objetivo de evaluar si la vía de señalización de adiponectina está alterada bajo una condición SOP y/u obesidad, se determinaron los niveles de APPL1, molécula adaptadora que transduce la señal río abajo del receptor de adiponectina. Una disminución en los niveles de APPL1 se ha relacionado con una disminución en la vía de señalización de adiponectina [47]. El análisis de los niveles proteicos y del mRNA de APPL1 se llevó a cabo mediante WB y qPCR, respectivamente. En la Figura 13 se muestran los niveles proteicos de APPL1, los cuales disminuyen en endometrios del grupo Obesas y Obesas-SOP, con respecto al grupo Delgadas ($p < 0,01$). Este resultado se condice con lo obtenido por IHQ (Figura 9), en donde se observa una notable disminución de APPL1 en Obesas y Obesas-SOP, con respecto al grupo control (Delgadas). En

relación a los niveles de mRNA de APPL1, los resultados no mostraron cambios estadísticamente significativos, indicando que los cambios en la expresión de APPL1 son a nivel post transcripcional (Figura 14).

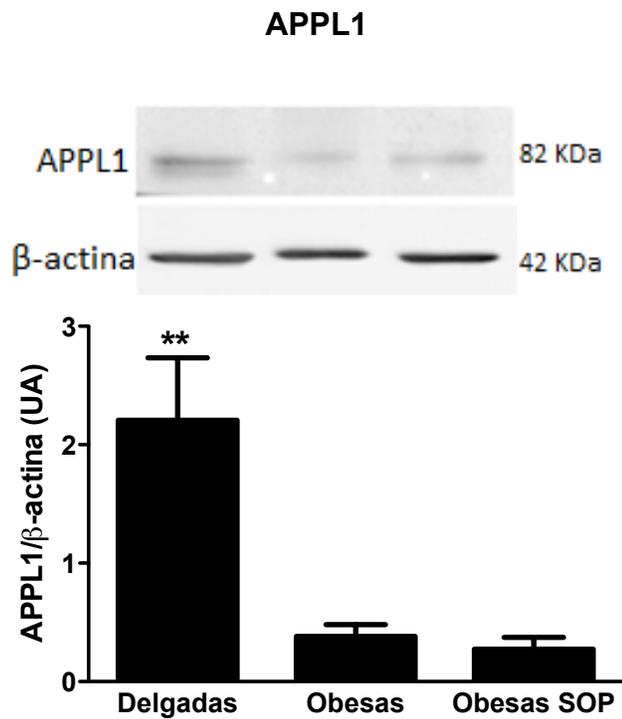


Figura 13. Niveles proteicos de APPL1 en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Obesas y Obesas-SOP. Muestras de proteínas totales extraídas de tejido endometrial fueron utilizadas para el análisis de los niveles de proteína de APPL1 (82 KDa), mediante western blot. Los datos fueron normalizados utilizando los niveles proteicos de β-actina en cada muestra (n = 5; **P value<0,01 Delgadas vs los otros grupos).

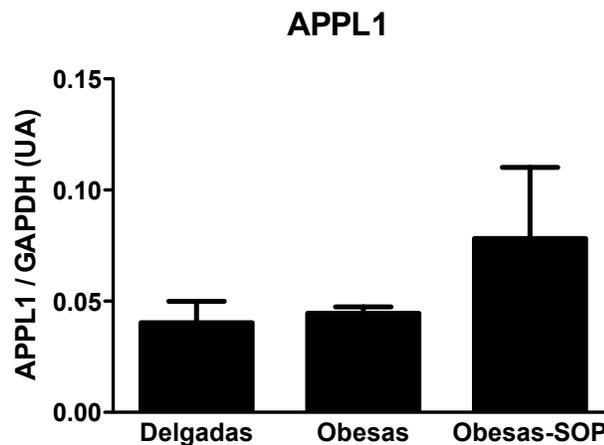


Figura 14. Niveles de mRNA de APPL1 en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Obesas y Obesas-SOP. Muestras de RNA total extraídas de tejido endometrial fueron utilizadas para determinar los niveles de RNA mensajero de APPL1, los que fueron obtenidos mediante qPCR. Los datos fueron normalizados usando el nivel de mRNA de GAPDH en cada muestra (n = 5).

Los resultados mostrados en las Figuras 9, 10, 11, 12, 13 y 14 han sido publicados en el artículo *Endometria from obese PCOS women with hyperinsulinemia exhibit altered adiponectin signaling*, publicado en la revista *Hormone and Metabolic Research*, 2015 [29].

Adicionalmente y aunque no estaba propuesto en el proyecto original, moléculas de la vía de señalización de adiponectina fueron determinadas (Anexos, Figura A1); estos protocolos fueron parte del proyecto de tesis de pregrado para obtener el título de Bioquímico de Isis Astorga en los cuales tuve directa participación. Los resultados muestran los niveles proteicos de moléculas relacionadas con la señalización de adiponectina a través de la molécula adaptadora, APPL1 y la formación de un complejo proteico compuesto por TAK1, MEK3 y p38-MAPK, asociado a una mayor translocación de GLUT-4

a la membrana celular y un aumento de la sensibilidad a la insulina por parte de la célula blanco [98]. Lo observado sugiere que diversas moléculas relacionadas con las acciones insulino-sensibilizantes de adiponectina estarían afectadas en estos endometrios (Anexos, Figura A1).

V.1.3 Detección de moléculas involucradas en la vía de señalización de TNF- α en tejido endometrial

Como se ha mencionado, la obesidad puede generar un estado pro-inflamatorio leve pero crónico, caracterizado por una alteración en el patrón de expresión de adipocinas, moléculas secretadas por los adipocitos. Además, cambios en la expresión de adipocinas, como adiponectina, TNF- α , IL-6, entre otras, no solo se observan en tejido adiposo, sino que en otros tejidos de importancia metabólica, como es el músculo esquelético o hígado [62,62,80,85]. Como ya fue descrito, en este trabajo se encontró que los niveles séricos de TNF- α no mostraron cambios entre ninguno de los grupos estudiados; no obstante, esto no descarta la participación de la citoquina en las alteraciones metabólicas observadas en endometrios de mujeres con SOP. Considerando estos antecedentes, se determinó si los niveles de expresión de TNF- α y de moléculas relacionadas con su vía de señalización, varían en endometrios provenientes de los cuatro grupos de estudio: Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP, mediante IHQ, como parte del objetivo específico 1.2.

En la Figura 15 se muestra la localización y los niveles proteicos de TNF- α . De forma interesante, en el análisis semi-cuantitativo se puede observar un aumento significativo de los niveles de TNF- α en endometrios provenientes del grupo Obesas-SOP ($p < 0,001$), indicando un posible efecto sobre el estado pro-inflamatorio del tejido cuando ambas condiciones están presentes: hiperinsulinemia e hiperandrogenemia.

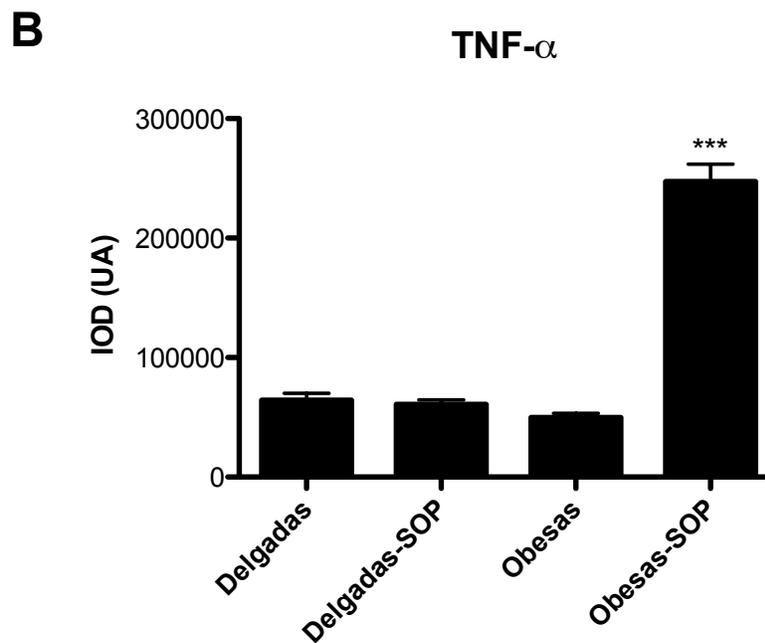
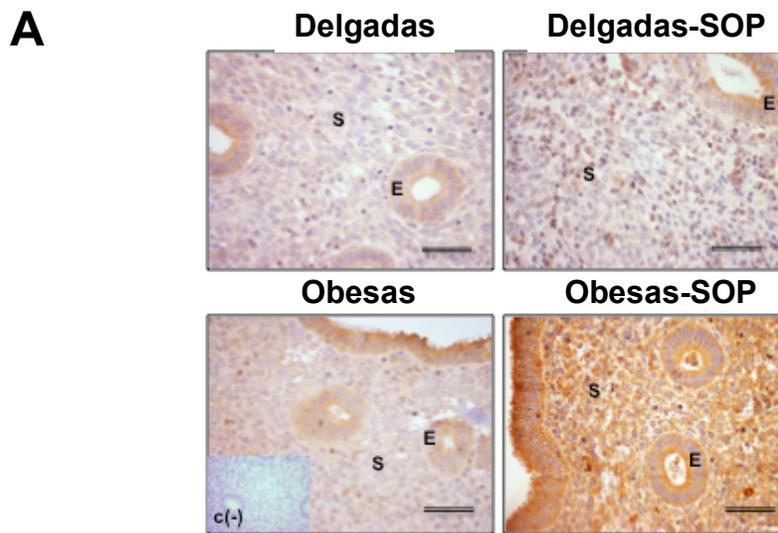


Figura 15. Localización y niveles proteicos de TNF- α en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP. A) Microfotografías de endometrios de los cuatro grupos de mujeres, los que fueron utilizados para determinar la localización y los niveles de TNF- α mediante IHQ. E: epitelio; S: estroma. B) Análisis semi-cuantitativo de la tinción inmuno-positiva usando la herramienta IOD. Los valores se presentan como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo; (n=7); ***P *value*<0,001 Obesas-SOP vs los demás grupos; Inserto: control negativo; Barra= 50 μ m).

Con el interés de evaluar la vía de señalización de TNF- α en tejido endometrial, se determinó la localización y los niveles de proteínas de los receptores tipo 1 y tipo 2 de TNF- α (TNFR1 y TNFR2, respectivamente).

En la Figura 16 se muestra la localización y los niveles de proteína de TNFR1, mediante IHQ. TNFR1 se encuentra localizado tanto en epitelio como en estroma endometrial; sin embargo, el análisis semi-cuantitativo mostró una disminución en los niveles proteicos en endometrios de mujeres Delgadas respecto a los demás grupos (UA IOD, $p < 0,001$), indicando que tanto la obesidad como el SOP inducen un aumento del receptor en el tejido endometrial (Figura 16). Es importante considerar que este aumento en los niveles de TNFR1 se hace más evidente en presencia del SOP, dado que en ambos grupos con SOP los niveles son mayores que en los grupos de Delgadas u Obesas que no presentan el síndrome (Delgadas-SOP vs Delgadas $p < 0,001$; Obesas-SOP vs Obesas $p < 0,05$). Esto sugiere que no sólo la obesidad, sino que también el hiperandrogenismo pueden alterar el ambiente pro-inflamatorio en el endometrio. De hecho, los niveles de TNFR1 son mayores en endometrios de mujeres Delgadas-SOP en comparación con Obesas-SOP ($p < 0,01$), corroborando el efecto del SOP sobre la expresión de esta molécula (Figura 16).

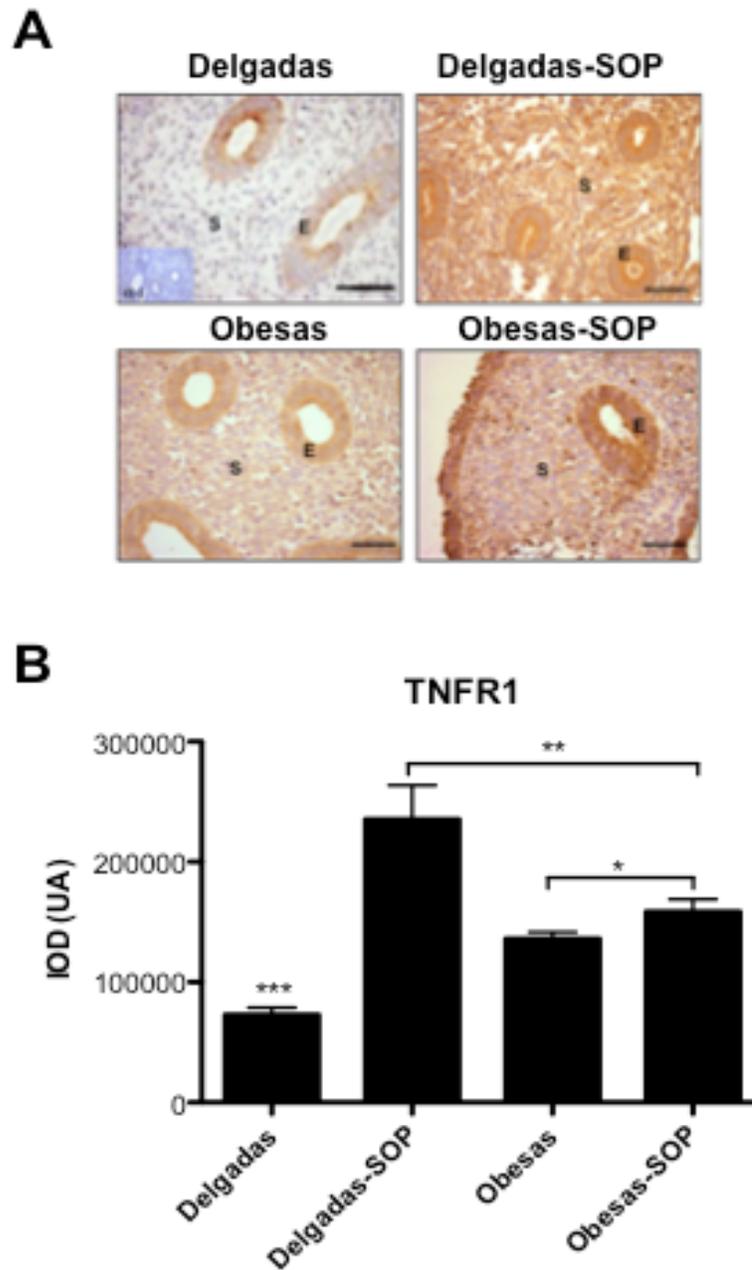


Figura 16. Localización y niveles proteicos del receptor 1 de TNF- α (TNFR1) en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP. A) Imágenes de tejido endometrial de los cuatro grupos de mujeres, los que fueron utilizados para determinar los niveles y localización de TNFR1 mediante IHQ. E: epitelio; S: estroma. **B)** Análisis semi-cuantitativa de la tinción inmuno-positiva usando la herramienta IOD. Los valores se presentan como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo; (n=7; ***P value<0,001; **P value<0,01; *P value<0,05; Inserto: control negativo; Barra= 50 μ m).

Al igual que con TNFR1, el receptor 2 de TNF- α (TNFR2) presenta menores niveles en el grupo Delgadas comparado con los otros grupos ($p < 0,001$; Figura 17). Sin embargo, el análisis del tejido total muestra un notorio aumento de TNFR2 en el grupo de Obesas-SOP, con respecto a Obesas ($p < 0,001$) y Delgadas-SOP ($p < 0,01$), indicando que ambas condiciones, SOP y obesidad, pueden exacerbar cambios en la expresión de esta molécula en el endometrio. Estos resultados (Figura 15, 16 y 17) fueron incorporados en el artículo *Proinflammatory environment and role of TNF- α in endometrial function of obese women having polycystic ovarian syndrome (PCOS)*, actualmente en prensa en la revista International Journal of Obesity [31].

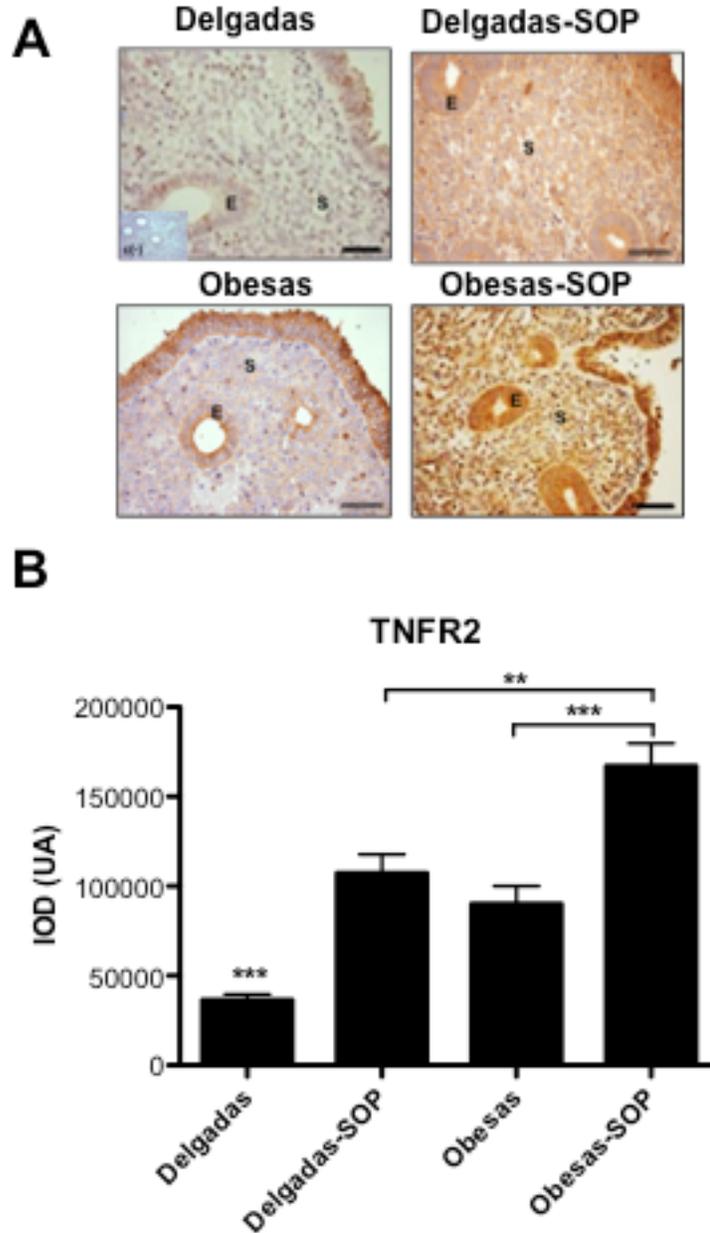


Figura 17. Localización y niveles proteicos del receptor 1 de TNF- α (TNFR1) en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP. A) Imágenes de de tejido endometrial de los cuatro grupos de mujeres, los que fueron utilizados para determinar los niveles y localización de TNFR2 mediante IHQ. E: epitelio; S: estroma. **B)** Análisis semi-cuantitativa de la tinción inmuno-positiva usando la herramienta IOD. Los valores se presentan como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo; (n=7; ***P value<0,001; **P value<0,01; Inserto: control negativo; Barra= 50 μ m).

V.1.4 Determinación de moléculas relacionadas con la activación de NFκB como integrante de la vía canónica de TNF-α

Para evaluar si moléculas que pertenecen a la vía de señalización clásica de TNF-α varían su expresión en endometrios provenientes de los distintos grupos de estudio, como parte del objetivo específico 1.3 se evaluó, mediante IHQ la localización y niveles proteicos del factor de transcripción NFκB y moléculas relacionadas con su activación (IKKs, IκBα).

En primer lugar, se determinó la localización y contenido nuclear de NFκB en tejido endometrial de los cuatro grupos de estudio (Figura 18), resultado publicado recientemente en la revista International Journal of Obesity [31]. Los resultados muestran un aumento significativo de p65 nuclear en células de tejido endometrial provenientes de mujeres Obesas-SOP con respecto a los otros grupos ($p < 0,001$). Esto se asocia fuertemente con los altos niveles de TNF-α encontrados en endometrios de mujeres Obesas-SOP (Figura 15). Paralelamente, se evaluó la presencia de p65 en endometrios de mujeres Delgadas y Obesas por Inmunofluorescencia (Anexos, Figura A2). La técnica no mostró cambio en la localización y niveles de la marca fluorescente entre ambos grupos, probablemente debido a problemas de protocolo.

Con el objetivo de determinar la activación de NFκB en estos endometrios, se evaluó los niveles de la quinasa IKK mediante IHQ (Figura 19). IKK es una quinasa que presenta tres subunidades (α , β y γ) que en su conjunto forman el

complejo denominado NEMO, el cual fosforila y promueve la degradación del inhibidor de NFκB, IκB [83]. En la Figura 19 se observan los niveles de IKK fosforilado en residuos de serinas (S180/181), los cuales son mayores en endometrios de mujeres Obesas-SOP con respecto a los demás grupos ($p < 0,01$). No fue posible detectar los niveles de IκB en el tejido endometrial. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta ahora en endometrios de mujeres Obesas-SOP nos indican que existe una mayor actividad de la vía de señalización de TNF- α , reflejado no solo por los altos niveles de ligando, sino que también por los niveles de TNFR2 observados y una mayor activación y presencia nuclear de NFκB en estos tejidos. Esto daría cuenta de un mayor ambiente pro-inflamatorio en estos endometrios, lo que será examinado a continuación.

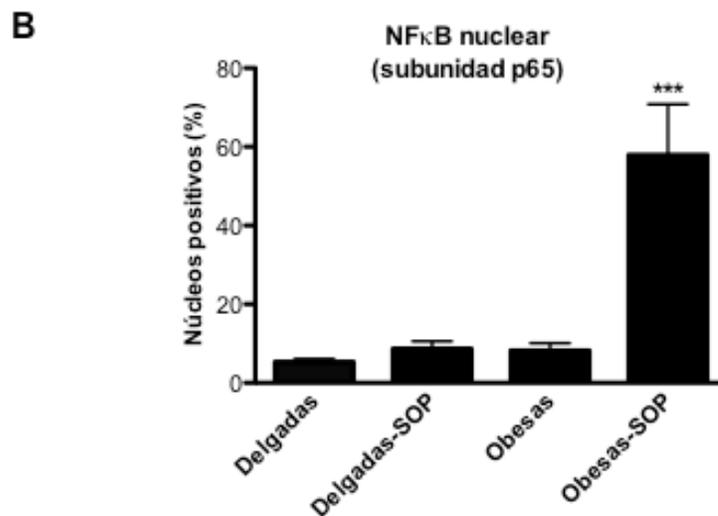
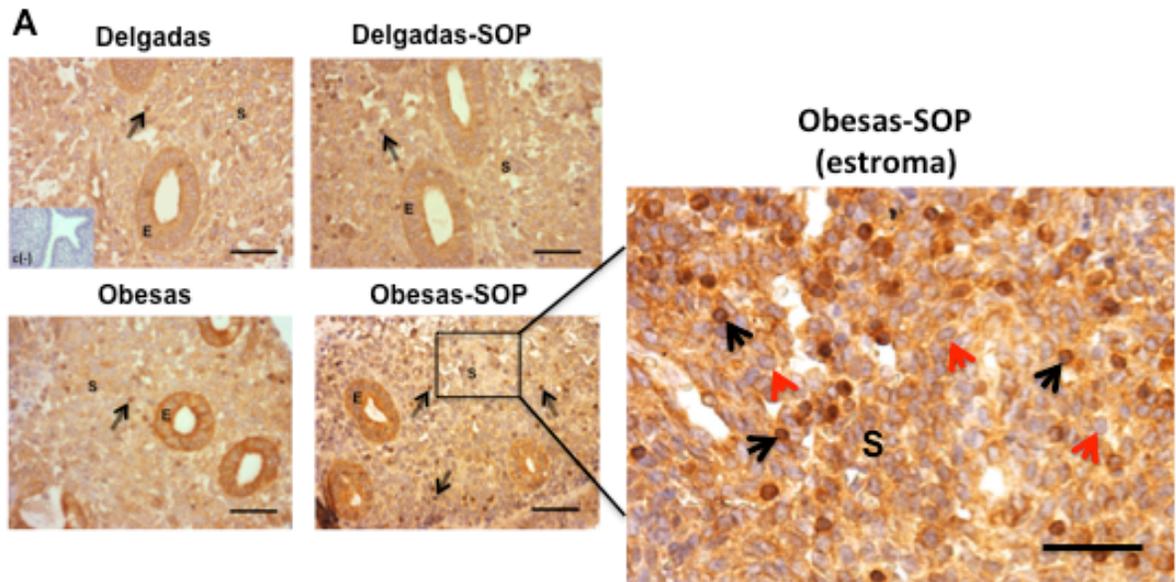


Figura 18. Porcentaje de núcleos positivos para la subunidad p65 de NFκB en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP. A) Imágenes de tejido endometrial de los cuatro grupos de estudio, los que fueron utilizados para determinar la presencia de p65 en el núcleo mediante IHQ. Las flechas negras indican tinción inmuno-positiva de p65 en un núcleo y las flechas rojas indican núcleos negativos para p65. E: epitelio; S: estroma. **B)** Análisis semi-cuantitativa de la tinción inmuno-positiva usando la herramienta IOD. Los valores se presentan como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo; (n=5; ***P *value*<0,001; Inserto: control negativo; Barra= 50 μ m).

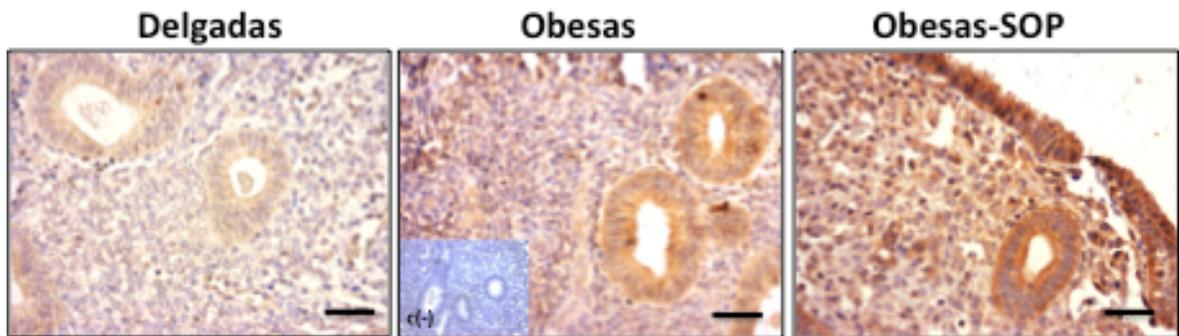
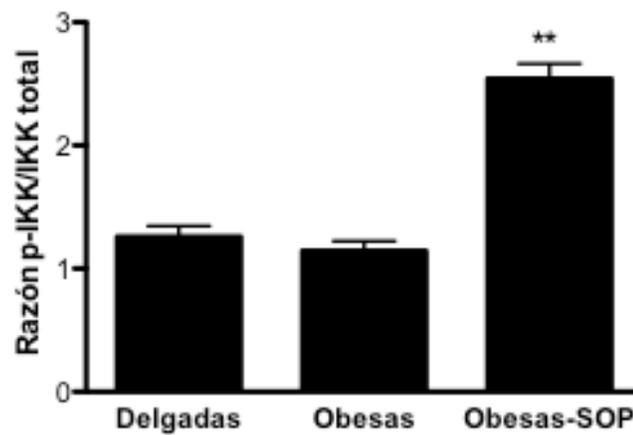
A**B**

Figura 19. Niveles de p-IKK S180/181 en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Obesas y Obesas-SOP. A) Microfotografías de tejido endometrial de tres grupos de estudio, los que fueron utilizados para determinar la presencia de IKK fosforilado mediante IHQ. **B)** Análisis semi-cuantitativo de la tinción inmuno-positiva usando la herramienta IOD. Los valores se presentan como la razón de las unidades arbitrarias (UA) para p-IKK con respecto a UA de IKK total y corresponden a la media \pm EE de cada grupo; (n=5; **P value<0,01; Inserto: control negativo; Barra= 50 μ m).

V.1.5 Evaluación del ambiente pro-inflamatorio en tejido endometrial: detección de macrófagos a través de la proteína CD68

Los resultados expuestos hasta ahora sugieren que existiría un mayor ambiente pro-inflamatorio en el endometrio de pacientes obesas con SOP. Con el fin de aumentar el conocimiento al respecto, se planteó el objetivo de determinar los niveles proteicos de CD68 en el endometrio de estas mujeres (objetivo específico 1.4). CD68 corresponde a una proteína de membrana altamente glicosilada, que se expresa en la superficie de los macrófagos y, por lo tanto, es utilizada como marcador de macrófagos en diversos estudios [95]. En la Figura 20 se observa que los niveles de CD68 son menores en endometrios de mujeres Delgadas con respecto a los otros grupos ($p < 0,05$). Sin embargo, los endometrios provenientes de mujeres donde co-existen obesidad, hiperandrogenismo e hiperinsulinismo (grupo Obesas-SOP), presentan un número significativamente mayor de macrófagos en el tejido respecto de los otros grupos ($p < 0,05$). Lo anterior es compatible con un mayor ambiente pro-inflamatorio inducido por la obesidad, el que sería exacerbado en presencia de una condición SOP. Este resultado (Figura 20) fue publicado en el artículo *Proinflammatory environment and role of TNF- α in endometrial function of obese women having polycystic ovarian syndrome (PCOS)* [31]. Además, se quiso visualizar la presencia de CD68 en tejido endometrial usando microscopía de epifluorescencia. La técnica permitió la detección de CD68 en

tejido de mujeres Delgadas y Obesas, siendo mayor la marca fluorescente en este último grupo (Anexos, Figura A3), lo que está de acuerdo con lo observado por IHQ (Figura 20).

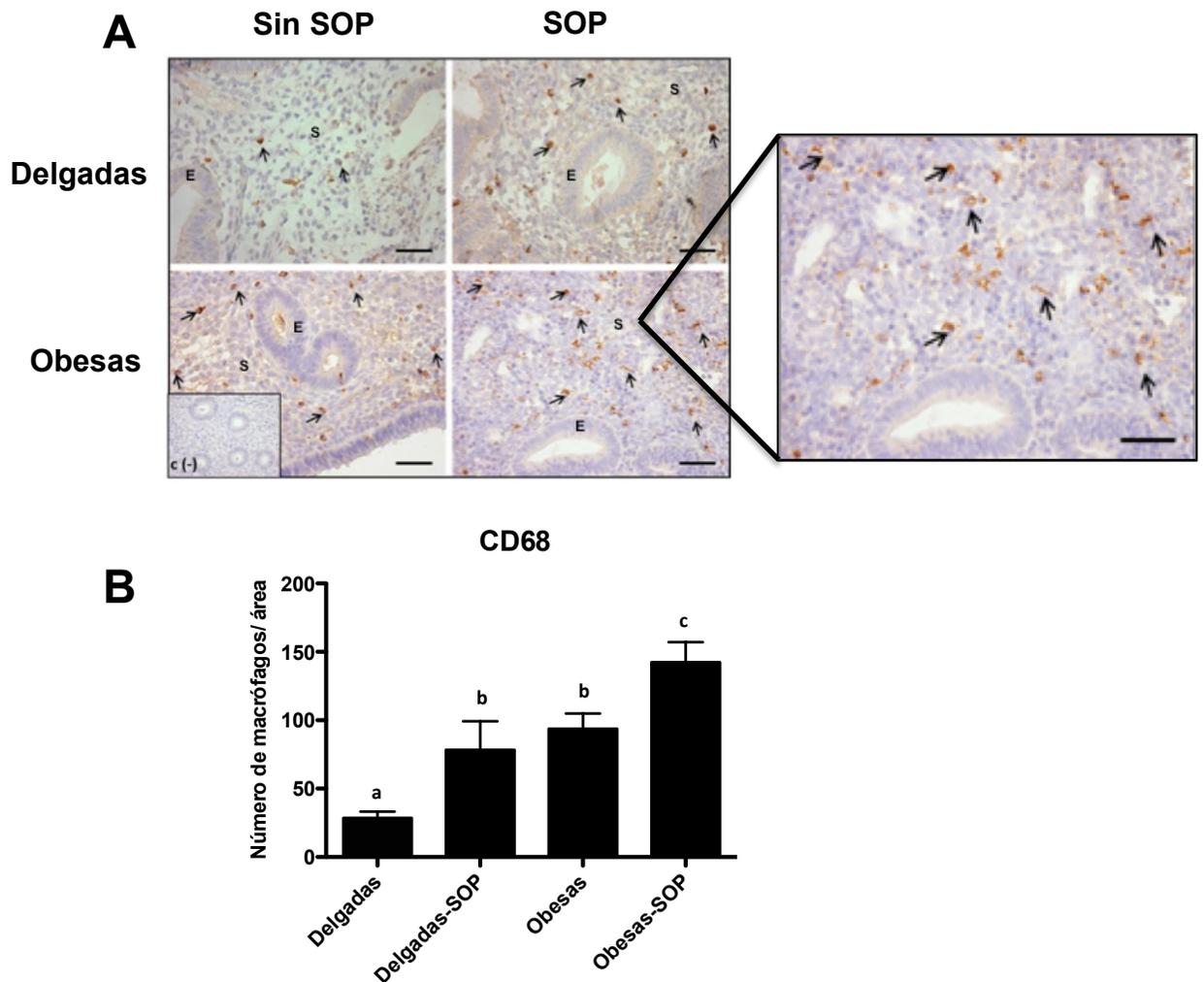


Figura 20. Número de macrófagos detectados a través de la proteína CD68 en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP. A) Imágenes de tejido endometrial, los que fueron utilizados para determinar los niveles de CD68 mediante IHQ. Las flechas indican la tinción inmuno-positiva de CD68. E: epitelio; S: estroma. La imagen ampliada corresponde a la microfotografía del grupo Obesas-SOP para mostrar la marca inmunopositiva cafe (flechas) para CD68. **B)** Número de macrófagos por área de tejido. Los resultados corresponden a la media \pm EE de cada grupo; (n=7; a \neq b \neq c diferencias significativas con un P value<0,05; Inserto: control negativo; Barra= 50 μ m).

V.1.6 Determinación de niveles proteicos de TNF- α , TNFR2 y CD68 en tejido endometrial en fase secretora del ciclo

Como ya se ha mencionado, la mayoría de las mujeres con SOP presentan endometrios en un estado compatible con la fase proliferativa del ciclo menstrual (Figura 1). Sin embargo, a pesar de la oligo o anovulación que presentan estas pacientes, fue posible obtener un pequeño grupo de endometrios en fase secretora provenientes de mujeres obesas con SOP (Obesas-SOP), además de endometrios secretores provenientes de mujeres obesas sin el síndrome (Obesas) (Anexos, Tabla 5: *Parámetros clínicos y metabólicos de pacientes Obesas y Obesas-SOP en fase secretora del ciclo menstrual*). En estos tejidos se determinó los niveles proteicos por IHQ de TNF- α , TNFR2 y CD68 (Figura A4 de Anexos). De forma relevante, se puede observar que los niveles de TNF- α tienden a disminuir en Obesas-SOP, mientras que TNFR2 disminuye significativamente en endometrios de este grupo con respecto a Obesas ($p < 0,05$; Figura A4). Por último, se observa que los niveles de CD68 no varían en ninguno de los grupos. Esto indicaría una alteración del sistema de TNF- α y del ambiente pro-inflamatorio, los cuales son necesarios en el proceso de implantación del embrión [62,99]. Estos resultados fueron incluidos en el artículo *Proinflammatory environment and role of TNF- α in endometrial function of obese women having polycystic ovarian syndrome (PCOS)* [31].

V.1.7 Determinación de IL-6 en suero y endometrios de mujeres Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP

El mayor ambiente pro-inflamatorio y los menores niveles de adiponectina en endometrios de mujeres Obesas-SOP puede ser la consecuencia del aumento de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , entre otras [38,40,41,63,74,75]. En este mismo sentido, diversos estudios relacionan el aumento de la citoquina pro-inflamatoria Interleuquina-6 (IL-6) con la obesidad y la condición de insulino-resistencia. Como ya se ha mencionado, mayores niveles séricos de IL-6 se asocian a menores niveles de adiponectina, tanto en sangre como en modelos *in vitro* de adipocitos humanos [42,76,79,81,82]. Por ello, de manera adicional, incorporamos mediciones para determinar los niveles séricos de IL-6 en mujeres provenientes de los cuatro grupos de estudios (Figura 21). Los resultados muestran un aumento importante en ambos grupos de Obesas con respecto a Delgadas ($p < 0,01$ Delgadas vs Obesas; $p < 0,05$ Delgadas vs Obesas-SOP). De forma interesante, se observa un leve aumento de IL-6 sérica en mujeres Delgadas-SOP con respecto a Delgadas ($p < 0,05$), sugiriendo un efecto hiperandrogénico sobre la expresión y/o secreción de esta citoquina (Figura 21).

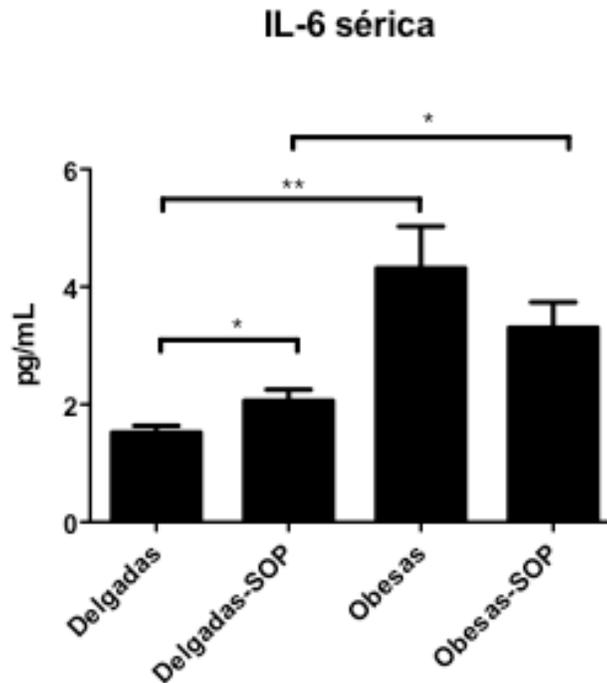


Figura 21. Niveles circulantes de IL-6 en mujeres Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP mediante ELISA. Muestras de suero provenientes de pacientes fueron utilizados para determinar, por ELISA, los niveles circulantes de IL-6 (n=7 para cada grupo); *P *value*<0.05 Delgadas vs Delgadas SOP y Delgadas-SOP vs Obesas-SOP; **P *value*<0.01 Delgadas vs Obesas).

Luego, para evaluar la señalización de IL-6 a nivel local, se determinaron los niveles proteicos de IL-6 y su receptor (IL-6R) en tejido endometrial de los cuatro grupos de estudio (Figura 22). Los resultados muestran un aumento de IL-6 en ambos grupos de Obesas (con y sin SOP) y en Delgadas-SOP con respecto al grupo control (Delgadas) ($p < 0,05$), lo que sugiere que tanto la obesidad como el SOP pueden alterar el contenido proteico de IL-6 en el tejido endometrial, así como lo observado con los niveles séricos de la citoquina (Figura 21). Sin embargo, el análisis del IOD no mostró cambios con respecto a

los niveles proteicos y localización de IL-6R endometrial en los cuatro grupos de estudio (Figura 22).

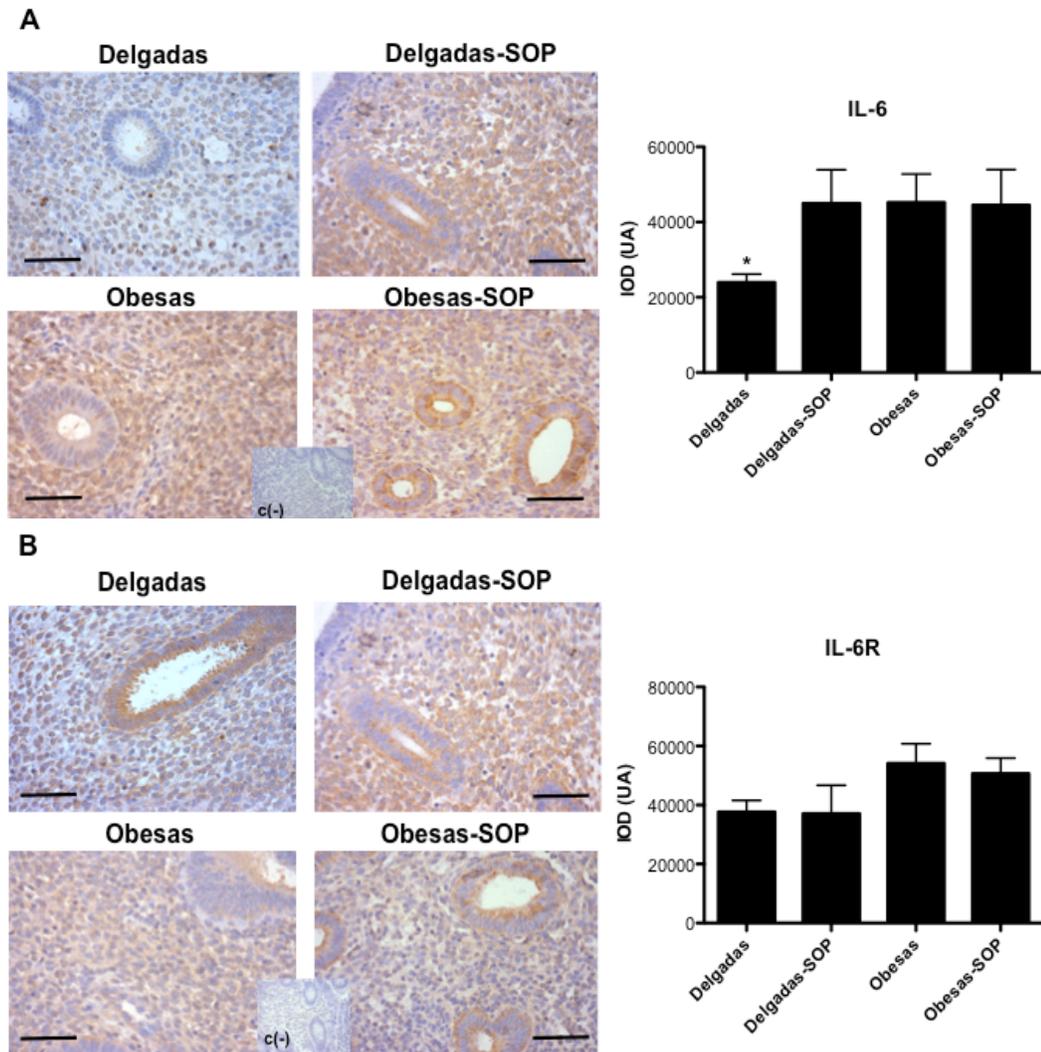


Figura 22. Localización y niveles proteicos de IL-6 y su receptor (IL-6R) en tejido endometrial de mujeres Delgadas, Delgadas-SOP, Obesas y Obesas-SOP. Cortes de tejido endometrial provenientes de los cuatro grupos de estudio fueron utilizados para determinar la localización y niveles proteicos de IL-6 (A) e IL-6R (B), mediante IHQ. Los resultados corresponden a los valores de IOD en unidades arbitrarias (UA) y se presentan como la media \pm EEM (error estándar de la media) para cada grupo; n=5 por grupo; *P *value*<0.05 Delgadas vs los otros grupos en IL-6 (A); Inserto: control negativo; Barra = 50 μ m.

V.2 ENSAYOS *IN VITRO*

El presente trabajo involucra estudios *in vitro* en su segundo Objetivo General, para lo cual se utilizó cultivos de células estromales endometriales humanas, en su mayoría correspondiente a la línea celular T-HESC [92]. Además, algunos ensayos fueron realizados usando la línea celular St-T1b, que al igual que las T-HESC, corresponden a células estromales endometriales humanas [93]. Es relevante considerar que la respuesta de la línea celular St-T1b a los distintos estímulos usados en este trabajos y en trabajos previos de nuestro laboratorio, es similar a la observada en T-HESC (parte de los resultados se muestran en Anexos, Figura A5).

Las células en cultivo fueron tratadas con insulina y testosterona para simular de forma parcial, el ambiente hiperinsulínico e hiperandrogénico presente en el grupo de Obesas-SOP. Además, con el fin de emular la condición pro-inflamatoria observada en endometrios de mujeres Obesas-SOP, se evaluó el efecto de TNF- α sobre la expresión de moléculas involucradas en su propia vía de señalización. También, se determinó los niveles de moléculas asociadas a la vía de adiponectina e insulina bajo condiciones hiperandrogénicas e hiperinsulínicas. En trabajos previos del laboratorio [27,30] se han determinado las concentraciones supra-fisiológicas y el tiempo de estímulo de testosterona e insulina que otorgan las condiciones hiperandrogénicas e hiperinsulínicas al

ambiente *in vitro*, los cuales indican que con 100 nM de cada hormona en tiempos de 24 y/o 48 h las células muestran respuesta a nivel molecular.

V.2.1 Determinación de los niveles proteicos de moléculas relacionadas con la vía de adiponectina

Con el fin de caracterizar el modelo *in vitro* bajo condiciones hiperandrogénicas e hiperinsulínicas sobre la expresión de moléculas asociadas a la vía de señalización de adiponectina, se propuso como objetivo determinar los niveles proteicos de: adiponectina, AdipoR1, AdipoR2 y APPL1 en cultivos de T-HESC tratados con insulina y testosterona, mediante Inmunocitoquímica (ICQ). Los resultados de la Figura 23 muestran que los niveles proteicos de adiponectina, AdipoR1 y APPL1 se encuentran disminuidos cuando las células están bajo condiciones hiperandrogénicas e hiperinsulínicas (T + I) con respecto a los tratamientos con las hormonas por separado o al basal ($p < 0,05$). Además, a pesar de no presentar diferencias estadísticamente significativas, AdipoR2 mantiene la misma tendencia en sus niveles de expresión. Estos resultados se condicen con lo obtenido en endometrios de mujeres Obesas-SOP, únicas que presentan hiperandrogenemia e hiperinsulinemia, donde menores niveles de adiponectina fueron observados (Figura 10). Estos resultados (Figura 23) fueron publicados en el artículo *Endometria from obese PCOS women with*

hyperinsulinemia exhibit altered adiponectin signaling, publicado en la revista *Hormone and Metabolic Research*, 2015 [29].

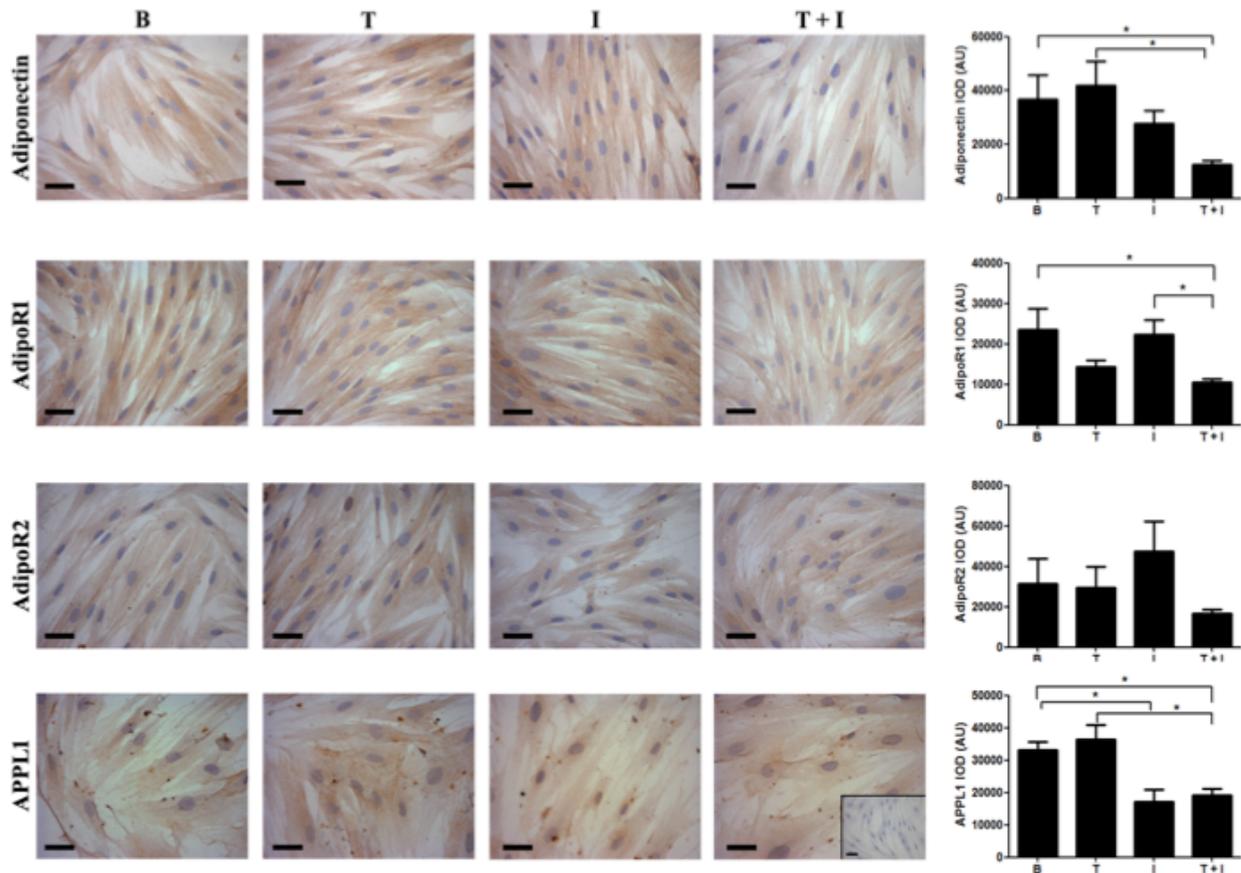


Figura 23. Detección de moléculas asociadas a la vía de señalización de adiponectina en cultivos de células estromales endometriales humanas (T-HESC). A) Microfotografías de células T-HESC tratadas con: I, insulina (100 nM); T, testosterona (100 nM); tratamiento combinado (I + T); B, Basal (medio sin suero) por 24 h para detectar los niveles proteicos de adiponectina, AdipoR1, AdipoR2 y APPL1, mediante ICQ. **B)** Análisis semi-cuantitativo de la tinción inmuno-positiva usando la herramienta IOD. Los valores se presentan como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo; (n=3, en duplicado; *P *value*<0,05; Inserto: control negativo; Barra= 50 μ m).

V.2.2 Efecto de TNF- α sobre la expresión de moléculas relacionadas con la vía de Adiponectina

Tal como se expuso en la Figura 16, los ensayos *ex vivo* mostraron altos niveles de TNF- α en endometrios de mujeres Obesas-SOP con respecto a los demás grupos. Con el fin de evaluar el efecto de TNF- α sobre la expresión de moléculas relacionadas con la vía de adiponectina y como parte del segundo objetivo de los ensayos *in vitro*, se utilizaron cultivos de T-HESC tratados con insulina, testosterona y/o TNF- α , emulando parcialmente las condiciones presentes en el SOP y en la obesidad.

En primer lugar, se realizó un ensayo para determinar la dosis y tiempo adecuado de tratamiento con TNF- α en cultivos de T-HESC. Para esto, se realizó ensayos de viabilidad, en los cuales cultivos de T-HESC se trataron con distintas dosis de TNF- α . Dado que altas concentraciones y tiempos prolongados de tratamiento con TNF- α podrían ser tóxicos para las células [61], los ensayos se realizaron con 10, 50 y 100 ng/mL de la citoquina por 24 y 48 h. Además, se determinó la viabilidad en células tratadas con insulina, insulina / testosterona y cultivos co-estimulados con insulina / testosterona / TNF- α .

Los resultados muestran que la viabilidad celular, expresada como veces el control (basal), no es afectada con los tratamientos (Figura 24). Por otro lado, se observa que a las 48 h de estímulo el porcentaje de células vivas aumenta

en presencia de TNF- α y de insulina ($p < 0,05$), indicando que tanto TNF- α como insulina en estas concentraciones, actuarían como agentes que promueven la proliferación. Una tendencia similar fue observada para los tratamientos a las 24 h (Figura 24). Además, como control positivo de la técnica, se utilizó el fármaco quimioterapéutico Mitoxantrona a una concentración usada para inducir muerte celular [94], lo que se demuestra tanto a las 24 como 48 h de tratamiento, con una disminución significativa de la viabilidad respecto al basal ($p < 0,05$; Figura 24).

Adicionalmente, se realizó una curva dosis-respuesta determinando la captación de glucosa por las células endometriales de la línea T-HESC tratadas con 10, 50 y 100 ng/mL de TNF- α por 24 y 48 h. Los resultados se exponen más adelante en la Figura 39.

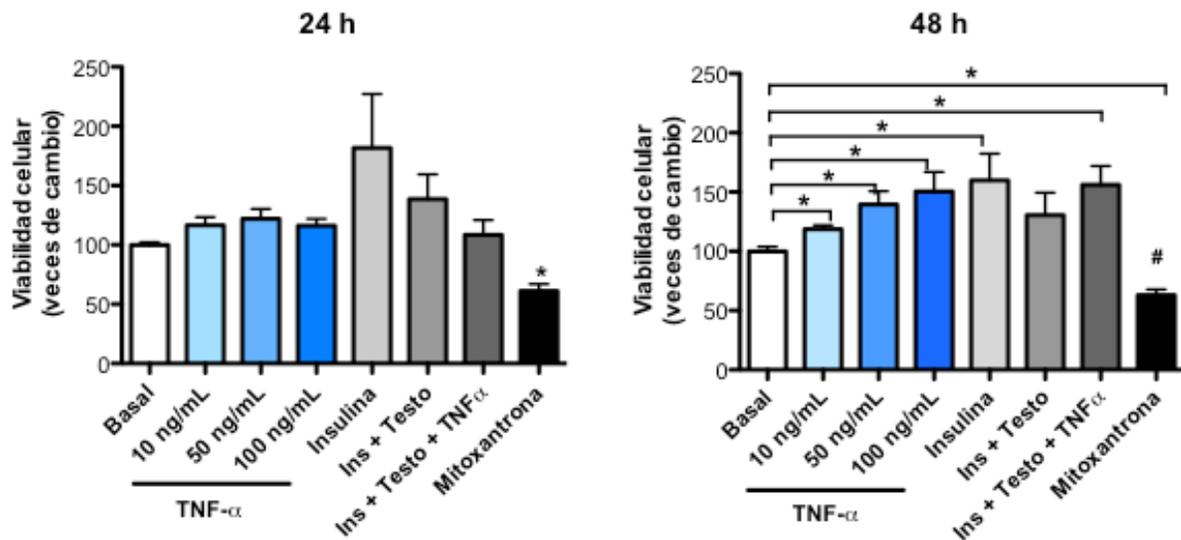


Figura 24. Ensayo de viabilidad. Los gráficos muestran las veces de cambio en la viabilidad de células estromales endometriales humanas de la línea T-HESC tratadas con distintos estímulos con respecto a una condición basal (medio sin suero). Los estímulos fueron: 0, 10, 50 y 100 ng/mL de TNF- α ; Insulina (100 nM); Insulina (Ins) + Testosterona (Testo) (100 nM), un tratamiento combinado usando los tres estímulos (Ins + Testo + 100 ng/mL de TNF- α) y con Mitoxantrona como control positivo, por 24 y 48 h. Los datos se obtuvieron midiendo la absorbancia a 570 y 605 nm, razón que refleja la proporción de células vivas y muertas, respectivamente. Los resultados son presentados como veces de cambio con respecto al basal (control) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo (n = 3, en cuadruplicado; *P value<0,05 vs el basal; #P value<0,05 vs el basal).

Por lo tanto, considerando que ninguna de las concentraciones usadas afectan la viabilidad de las células bajo las condiciones *in vitro* antes señaladas (dosis: 100 ng/mL de TNF- α ; tiempo: 24/48 h), se determinó mediante WB, los niveles proteicos de algunas moléculas que participan en la vía de adiponectina: adiponectina, AdipoR1, AdipoR2, APPL1 y AMPK fosforilado (p-AMPK T172). Los resultados obtenidos son concordantes con lo observado por ICQ en la Figura 23. Se puede observar que a las 24 h de estímulo el contenido proteico de adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2 son menores cuando las células son co-

tratadas con insulina y testosterona ($p < 0,05$; Figuras 25, 26 y 27, respectivamente). Con respecto al efecto de TNF- α sobre la expresión de estas moléculas, se observa una disminución significativa de los niveles de adiponectina y sus receptores a las 24 h de tratamiento con la citoquina ($p < 0,05$; Figura 25). De manera interesante, el co-estímulo de insulina, testosterona y TNF- α muestra una disminución significativa de AdipoR1 ($p < 0,01$; basal vs I + T + TNF- α ; Figura 26). De lo anterior se deduce que en presencia de los tres estímulos, los efectos sobre la vía de adiponectina podrían exacerbarse.

Por otro lado, el efecto de TNF- α sobre los niveles proteicos de AdipoR1 y AdipoR2 se mantiene a las 48 h de estímulo con TNF- α ($p < 0,05$; Figura 26 y 27); no así con adiponectina, en que no se observan cambios en sus niveles a las 48 h con ninguno de los tratamientos (Figura 25). Estos resultados indicarían que la presencia de TNF- α afecta negativamente la señalización de adiponectina a nivel del ligando y de ambos receptores y que estos cambios son más evidentes a las 24 horas de tratamiento.

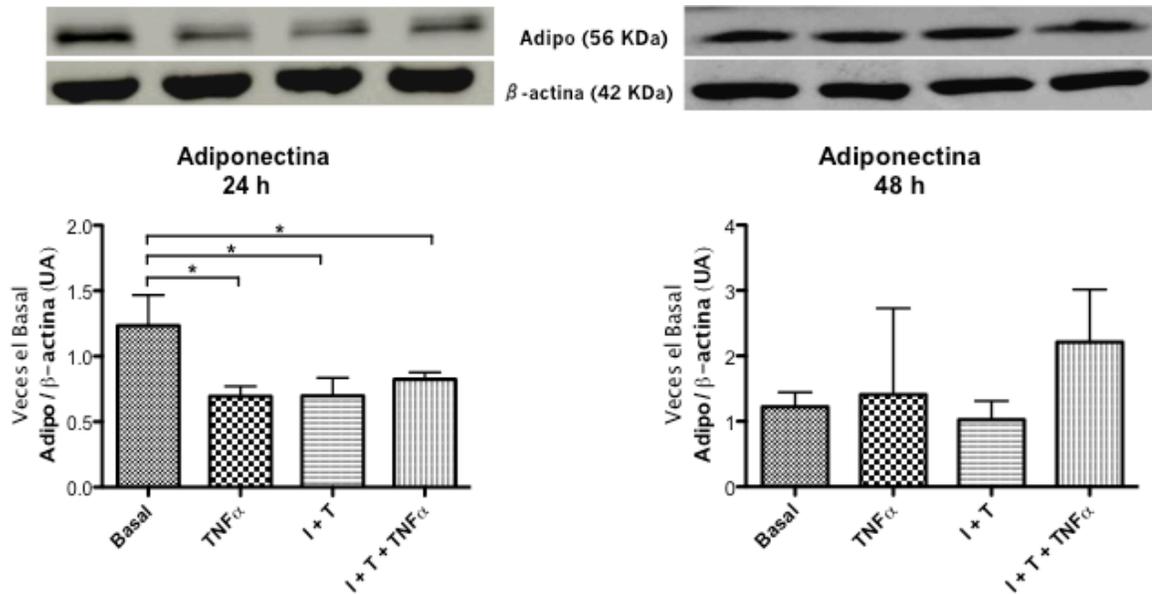


Figura 25. Niveles proteicos de Adiponectina en cultivos de T-HESC. Los gráficos muestran los niveles de proteína de adiponectina (banda de 56 KDa) en células estromales endometriales humanas tratadas con: 100 ng/mL de TNF- α , Insulina (I), Testosterona (T) o estímulos combinados por 24 y 48 h, mediante WB. Los datos fueron normalizados utilizando los niveles proteicos de β -actina (42 KDa) en cada muestra. Los resultados son presentados como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo con respecto al basal (n = 3, en duplicado; *P *value* < 0,05; **P *value* < 0,01).

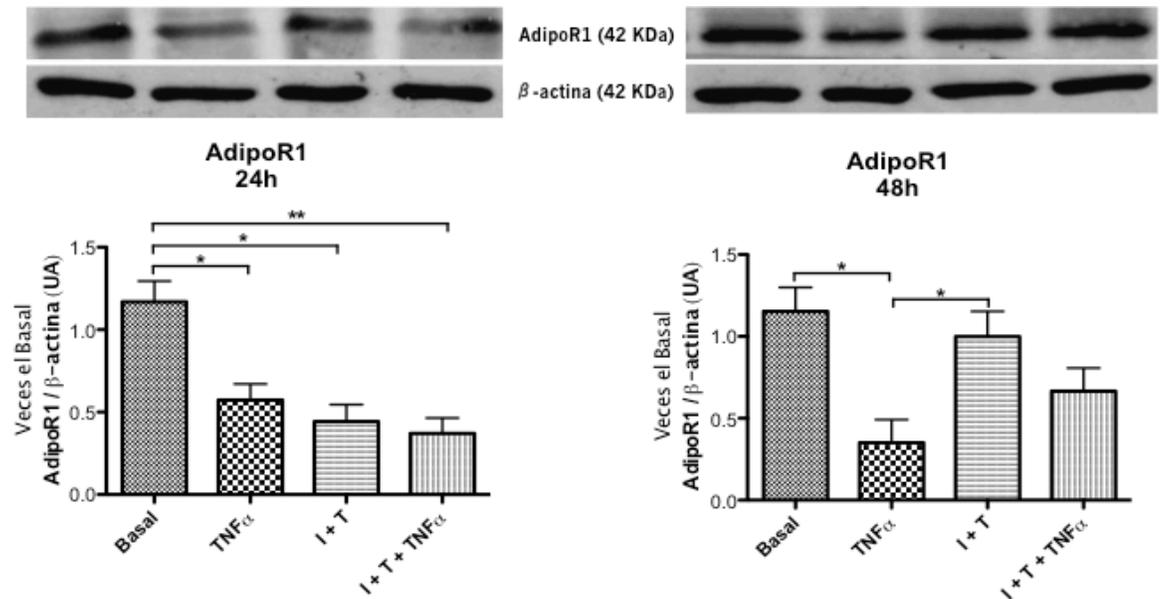


Figura 26. Niveles proteicos de AdipoR1 en cultivos de T-HESC. Los gráficos muestran los niveles de proteína del receptor 1 de adiponectina, AdipoR1 (banda de 42 KDa) en células estromales endometriales humanas tratadas con: 100 ng/mL de TNF- α , Insulina (I), Testosterona (T) o estímulos combinados por 24 y 48 h, mediante WB. Los datos fueron normalizados utilizando los niveles proteicos de β -actina (42 KDa) en cada muestra. Los resultados son presentados como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo con respecto al basal (n = 3, en duplicado; *P *value* < 0,05; **P *value* < 0,01).

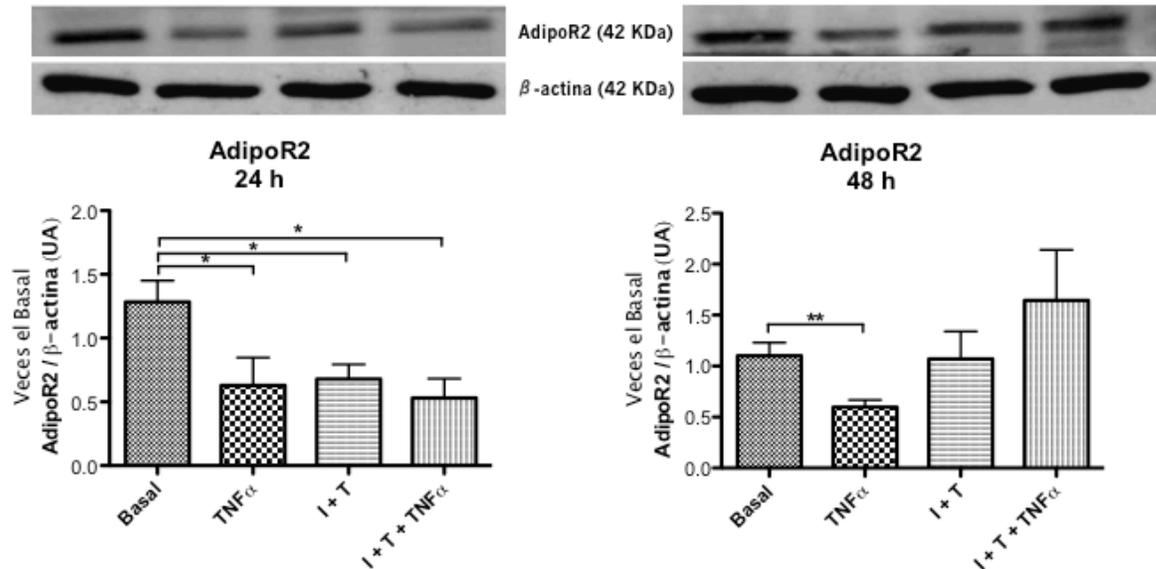


Figura 27. Niveles proteicos de AdipoR2 en cultivos de T-HESC. Los gráficos muestran los niveles de proteína del receptor 2 de adiponectina, AdipoR2 (banda de 42 KDa) en células estromales endometriales humanas tratadas con: 100 ng/mL de TNF- α , Insulina (I), Testosterona (T) o estímulos combinados por 24 y 48 h, mediante WB. Los datos fueron normalizados utilizando los niveles proteicos de β -actina (42 KDa) en cada muestra. Los resultados son presentados como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo con respecto al basal (n = 3, en duplicado; *P *value*<0,05; **P *value*<0,01).

Considerando que los cambios en respuesta de las células se evidenciaron de manera relevante a las 24 h de estímulo, los siguientes experimentos fueron realizados en este tiempo de incubación.

Con respecto a los niveles proteicos de la proteína adaptadora APPL1, los resultados muestran una disminución cuando las células fueron estimuladas con TNF- α o con insulina más testosterona; así mismo, una disminución similar se observa con el co-tratamiento de insulina / testosterona / TNF- α (Figura 28). Sin embargo, es posible observar que sin existir una diferencia estadísticamente significativa, en presencia de TNF- α los niveles de APPL1 son

alrededor de 40% menores con respecto al tratamiento de insulina más testosterona (Figura 28).

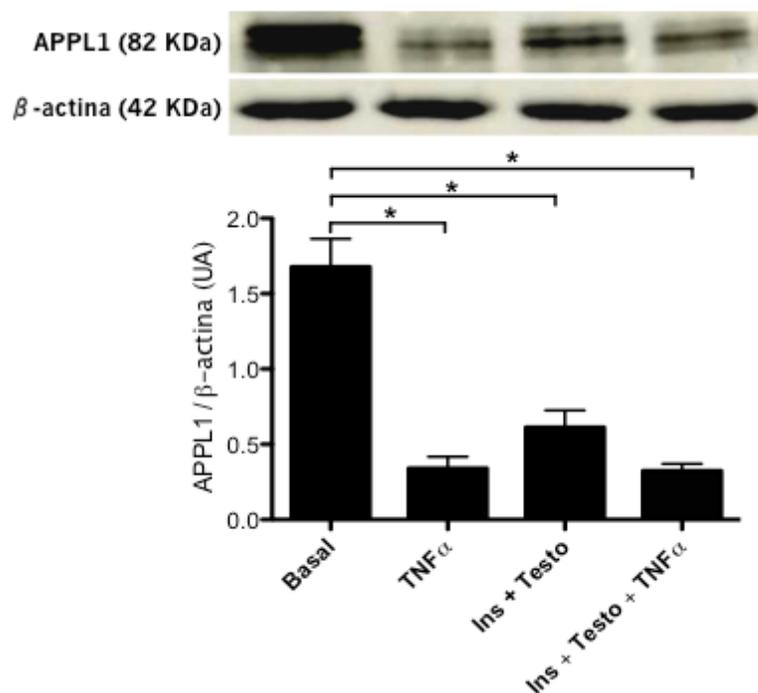


Figura 28. Niveles proteicos de APPL1 en cultivos de T-HESC. Los gráficos muestran los niveles de proteína de APPL1 (banda de 82 KDa) en células estromales endometriales humanas tratadas con: 100 ng/mL de TNF- α , Insulina (I), Testosterona (T) o estímulos combinados por 24 h, mediante WB. Los datos fueron normalizados utilizando los niveles proteicos de β -actina (42 KDa) en cada muestra. Los resultados son presentados como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo (n = 5, en duplicado; *P *value* < 0,05).

Además de APPL1, en la señalización de adiponectina se encuentra AMPK, quinasa que entre otras funciones relaciona la vía de adiponectina con la vía de insulina. En efecto, AMPK además de ser un factor clave en la regulación de la homeostasis energética en las células, también es importante en la vía de señalización de adiponectina que conlleva un aumento en la sensibilidad a la insulina [50,98].

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que endometrios de mujeres hiperinsulínicas con SOP presentan menores niveles de AMPK activo (p-AMPK T172) [28]. Por lo tanto, en esta tesis se determinó el efecto de TNF- α sobre los niveles proteicos de p-AMPK T172 en células estromales bajo condiciones hiperandrogénicas e hiperinsulínicas. Los resultados se observan en la Figura 29, y muestran que solo el co-tratamiento de insulina / testosterona / TNF- α disminuyó significativamente los niveles de p-AMPK T172, con respecto al estado basal o comparado con el tratamiento con TNF- α solo ($p < 0.05$). Por lo tanto, la presencia de estas condiciones que son semejantes a las observadas *in vivo*, podrían explicar en parte la alteración en la vía de adiponectina, la que a su vez afectaría negativamente la acción de insulina en las células endometriales.

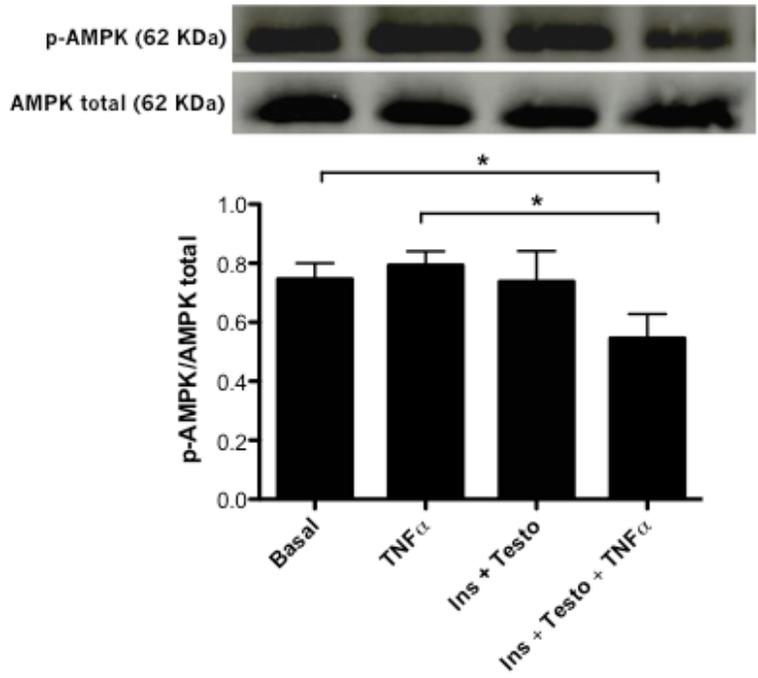


Figura 29. Niveles proteicos de p-AMPK (T172) en cultivos de T-HESC. Los gráficos muestran los niveles de proteína de AMPK fosforilado en T172 (banda de 62 KDa) en células estromales endometriales humanas tratadas con: 100 ng/mL de TNF- α , Insulina (I), Testosterona (T) o estímulos combinados por 24 h, mediante WB. Los datos fueron normalizados utilizando los niveles proteicos de AMPK total (62 KDa) en cada muestra. Los resultados son presentados como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo (n = 4, en duplicado; *P *value* < 0,05).

V.2.3 Efecto de TNF- α sobre la expresión de moléculas relacionadas con su vía de señalización canónica

Diversos estudios han demostrado que los efectos de TNF- α pueden verse exacerbados debido a que la citoquina es capaz de inducir su propia expresión y la de sus receptores en la célula blanco [61,65,68,83]. Considerando que homogenizados de proteína total provenientes de endometrios de mujeres Obesas-SOP mostraron un aumento significativo de los niveles de TNF- α con respecto a los demás grupos, se evaluó el efecto de la citoquina sobre la expresión de ambos receptores (TNFR1 y TNFR2); además, se determinó mediante WB el contenido proteico del principal efector intracelular de la vía de señalización de TNF- α : NF κ B, y moléculas relacionadas con su activación (IKK e I κ B) en cultivos T-HESC tratados con los distintos estímulos. Dado que los resultados obtenidos a las 48 h no mostraron cambios relevantes para moléculas de la vía de TNF- α , a continuación se muestra lo obtenido con 24 h de tratamiento con la citoquina.

En la Figura 30 se observan los niveles proteicos de TNFR1 a las 24 h de estímulo, los cuales aumentan en presencia de TNF- α , ya sea por sí solo o con la co-estimulación de insulina / testosterona / TNF- α ($p < 0,05$). Este mismo comportamiento es observado cuando analizamos los niveles de proteína de TNFR2 ($p < 0,05$; Figura 31).

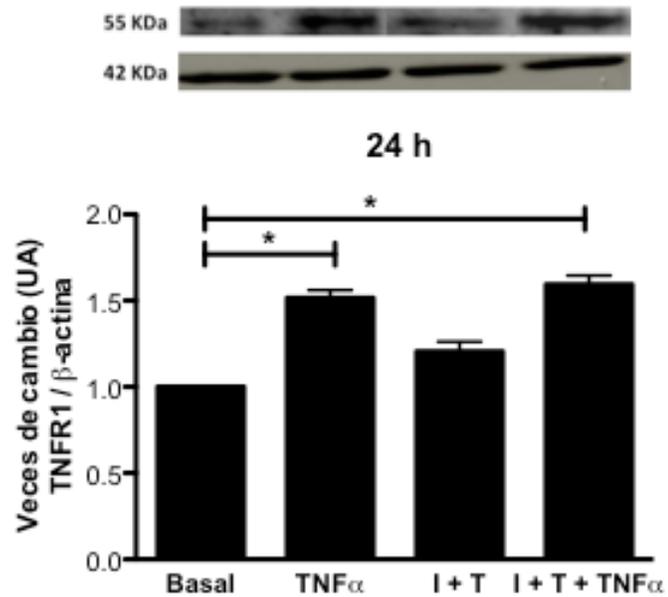


Figura 30. Niveles proteicos de TNFR1 en cultivos de T-HESC. Los gráficos muestran los niveles de proteína del receptor 1 de TNF- α (banda de 55 KDa) en células estromales endometriales humanas tratadas con: 100 ng/mL de TNF- α , Insulina (I), Testosterona (T) o estímulos combinados por 24 h, mediante WB. Los datos fueron normalizados utilizando los niveles proteicos de β -actina (42 KDa) en cada muestra. Los resultados son presentados como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo (n = 3, en duplicado; *P *value* < 0,05).

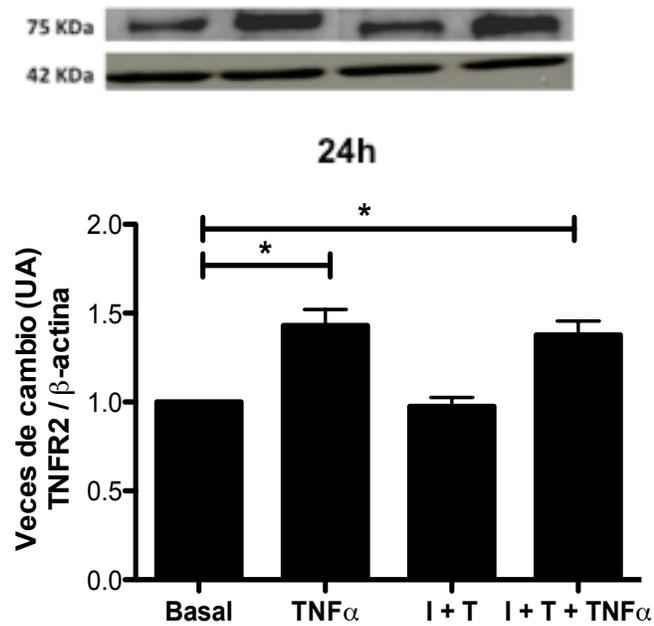


Figura 31. Niveles proteicos de TNFR2 en cultivos de T-HESC. Los gráficos muestran los niveles de proteína del receptor 2 de TNF- α (banda de 75 KDa) en células estromales endometriales humanas tratadas con: 100 ng/mL de TNF- α , Insulina (I), Testosterona (T) o estímulos combinados por 24 h, mediante WB. Los datos fueron normalizados utilizando los niveles proteicos de β -actina (42 KDa) en cada muestra y se analizan como veces de cambio con respecto al basal. Los resultados son presentados como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo (n = 3, en duplicado; *P *value* < 0,05).

Luego, se determinaron los niveles proteicos de la subunidad p65 de NF κ B, principal subunidad activa del complejo p65/p55 de NF κ B que se transporta al núcleo donde regula la expresión de numerosos genes, como ya fue mencionado [83]. La Figura 32 muestra que la presencia de TNF α (sólo o sumado a insulina y testosterona) aumenta los niveles proteicos de p65

comparado con la condición basal o con insulina más testosterona ($p < 0,05$), similar a lo observado para ambos receptores (Figura 30 y 31).

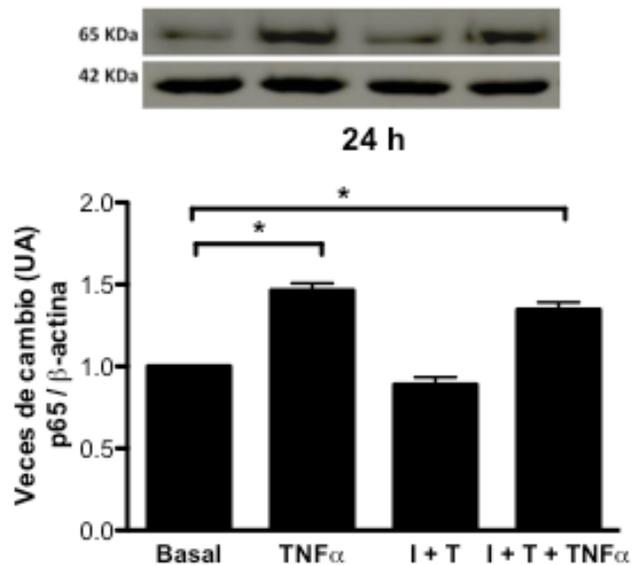


Figura 32. Niveles proteicos de NF κ B (subunidad p65) en cultivos de T-HESC. Los gráficos muestran los niveles de proteína de la subunidad p65 de NF κ B (banda de 65 KDa) en células estromales endometriales humanas tratadas con: 100 ng/mL de TNF- α , Insulina (I), Testosterona (T) o estímulos combinados por 24 h, mediante WB. Los datos fueron normalizados utilizando los niveles proteicos de β -actina (42 KDa) en cada muestra y se analizan como veces de cambio con respecto al basal. Los resultados son presentados como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo (n = 3, en duplicado; *P value < 0,05).

A continuación, se determinó el efecto de TNF- α sobre moléculas relacionadas con la activación de NF κ B en el citoplasma: IKK e I κ B. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 33, y muestran que no existen cambios estadísticamente significativos con respecto a los niveles de IKK activo (p-IKK S180/181) al tratar las células con los diferentes estímulos por 24 h. Con

respecto a I κ B, la técnica utilizada no permitió discriminar entre fracción fosforilada y proteína total de I κ B; sin embargo, los resultados (Figura 34) muestran que en células estimuladas por 24 h con TNF- α , los niveles de I κ B total disminuyen con respecto al basal ($p < 0,05$). De forma excepcional, el tratamiento por 48 h mostró resultados relevantes (Figura 34), en los cuales se observa que en presencia de TNF- α , solo o junto con insulina y testosterona, los niveles de I κ B total disminuyen *versus* el basal o *versus* insulina / testosterona ($p < 0,05$).

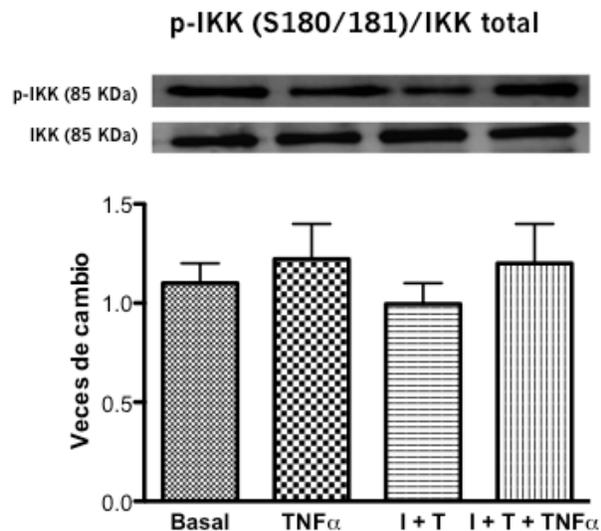


Figura 33. Niveles proteicos de p-IKK S180/181 en cultivos de T-HESC. Los gráficos muestran los niveles de proteína de IKK fosforilada en S180/181 (banda de 85 KDa) en células estromales endometriales humanas tratadas con: 100 ng/mL de TNF- α , Insulina (I), Testosterona (T) o estímulos combinados por 24 h, mediante WB. Los datos fueron normalizados utilizando los niveles proteicos de IKK total (85 KDa) en cada muestra y se analizan como veces de cambio con respecto al basal. Los resultados son presentados como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo ($n = 3$, en duplicado).

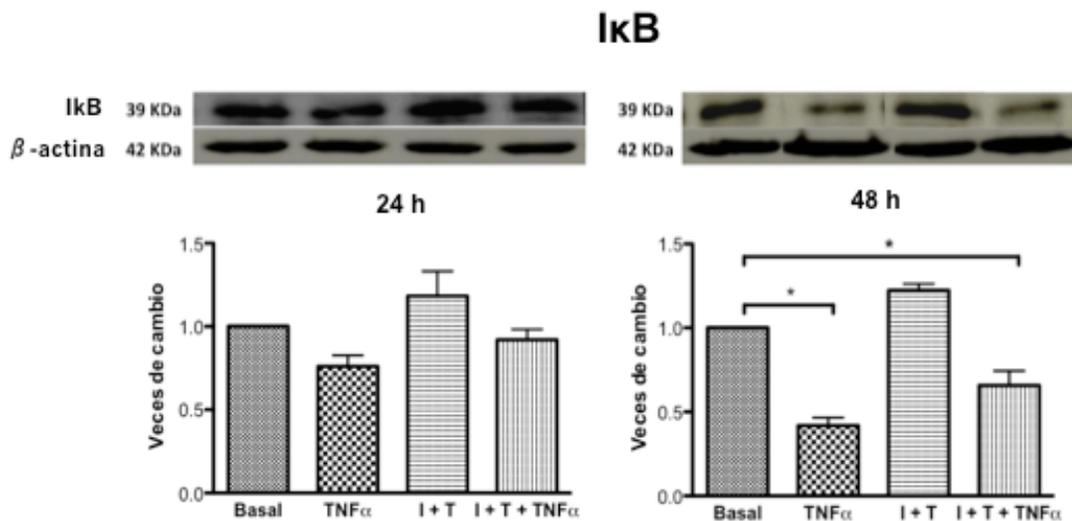
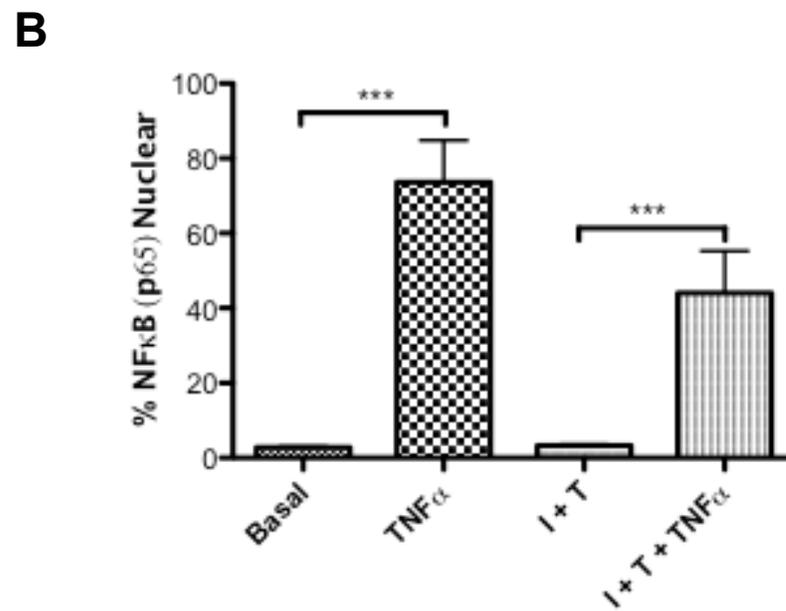
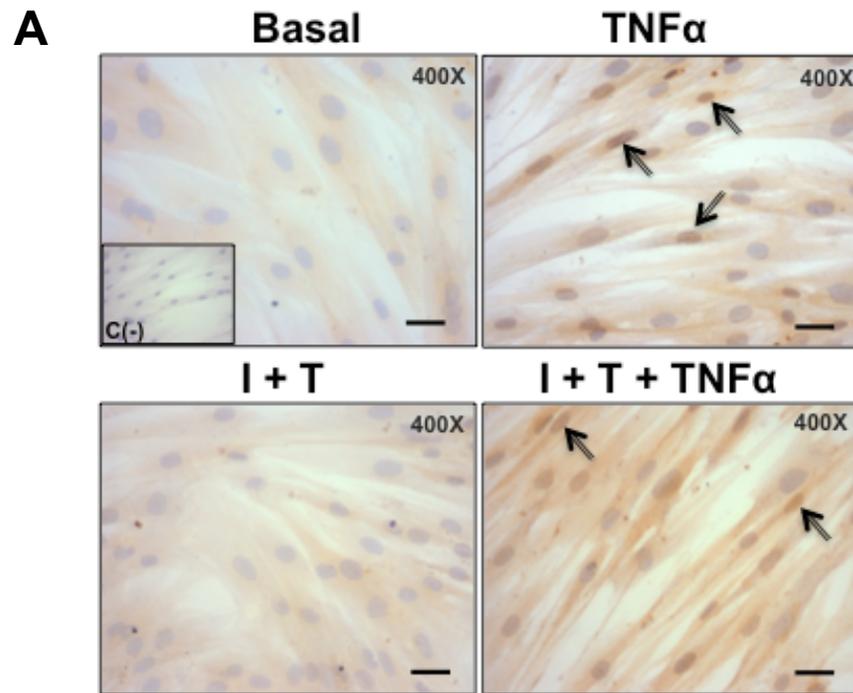


Figura 34. Niveles proteicos de IκB en cultivos de T-HESC. Los gráficos muestran los niveles de proteína de IκB (banda de 85 KDa) en células estromales endometriales humanas tratadas con: 100 ng/mL de TNF- α , Insulina (I), Testosterona (T) o estímulos combinados por 24 y 48 h, mediante WB. Los datos fueron normalizados utilizando los niveles proteicos de β -actina (42 KDa) en cada muestra y se analizan como veces de cambio con respecto al basal. Los resultados son presentados como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo (n = 3, en duplicado; *P value<0,05).

De esta forma, los resultados obtenidos están de acuerdo con lo que se ha reportado del efecto positivo que presenta TNF- α sobre su propia vía de señalización, lo cual se repite en células endometriales bajo condiciones hiperandrogénicas / hiperinsulínicas, donde la citoquina induce su vía canónica de señalización, participando TNFR1, TNFR2 y NFκB activo.

V.2.4 Efecto de TNF- α sobre la localización subcelular de NF κ B en células estromales endometriales humanas

Para determinar si TNF- α induce la activación y posterior translocación de NF κ B al núcleo, se planteó determinar el efecto de la citoquina sobre el contenido nuclear de la subunidad p65 de NF κ B en cultivos de T-HESC. En la Figura 35 se observa que con TNF- α , solo o en conjunto con insulina / testosterona, el porcentaje de núcleos positivos aumentan significativamente con respecto a la condición basal o al tratamiento de insulina más testosterona ($p < 0,001$). De esta forma, es muy probable que TNF- α a través de la activación de su vía de señalización, ejerza efectos negativos sobre la acción de la insulina en éstas células, ya sea de forma indirecta, disminuyendo la expresión de moléculas insulino-sensibilizantes como adiponectina y moléculas propias de su vía de señalización, y/o de forma directa afectando la expresión de GLUT-4, principal transportador de glucosa en células sensibles a insulina. Además, se evaluó mediante IF la presencia de p65 nuclear en células T-HESC tratadas con Insulina, Testosterona o TNF- α , resultados que se muestran en Anexos (Figura A2), en los cuales se observa una mayor inmunofluorescencia cuando las células son estimuladas ya sea con insulina / testosterona o insulina /testosterona / TNF- α *versus* la condición basal (Figura A2).



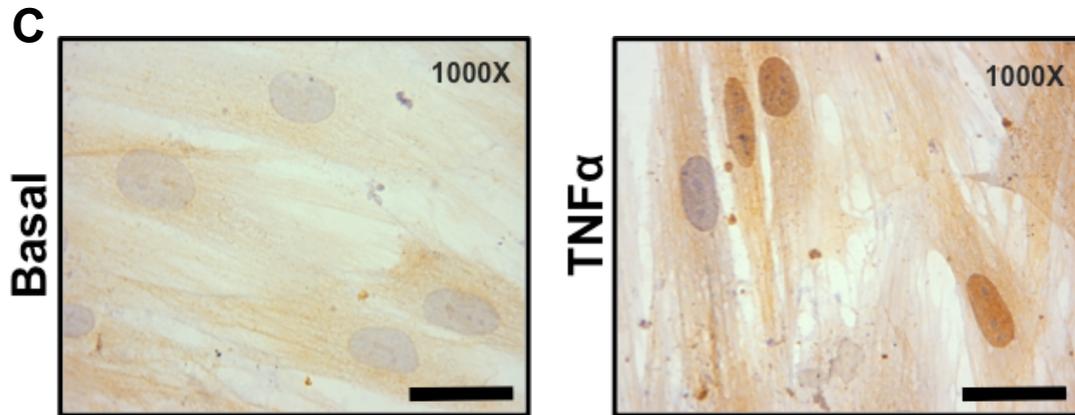


Figura 35. Localización sub-celular de la subunidad p65 de NFκB en células estromales endometriales humanas (T-HESC). **A)** Microfotografías de células T-HESC tratadas con: 100 ng/mL de TNF-α, Insulina (I), Testosterona (T) o estímulos combinados por 24 h para la detección de p65 nuclear, mediante ICQ. Las flechas indican núcleos positivos para p65. **B)** Análisis semi-cuantitativo de la tinción inmuno-positiva usando la herramienta IOD. Los valores se presentan como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media ± EE de cada grupo (n=3, en duplicado; ***P *value*<0,001; Inserto: control negativo; Barra= 50 μm). **C)** Microfotografías ampliadas que muestran la localización nuclear de p65 en células bajo una condición basal o tratadas con TNF-α (Amplificación: 1000X; Barra= 50 μm).

V.2.5 Efecto de Pirrolidina Ditiocarbamato (PDTC, inhibidor de NFκB) sobre los niveles proteicos de adiponectina en células T-HESC tratadas con TNF-α, insulina y/o testosterona

Con el fin de evaluar la participación de NFκB sobre los niveles de adiponectina observados en este trabajo se utilizó una herramienta farmacológica para inhibir la activación de NFκB a través de la adición de Pirrolidina Ditiocarbamato (PDTC) a los cultivos celulares. PDTC corresponde a un antioxidante que evita la degradación vía proteosoma del inhibidor de NFκB, denominado IκB [96,97]. Para este ensayo y debido a que su comportamiento no varía al de los cultivos de T-HESC bajo estos estímulos, se utilizó cultivos de la línea celular St-T1b tratadas con insulina, testosterona o TNF-α por 24 h.

En primer lugar se realizó una curva dosis respuesta para determinar la dosis de PDTC adecuada (Figura 36). Para ello, cultivos de St-T1b fueron previamente tratados con PDTC por 1 h y posteriormente estimulados con TNF-α por 24 h. Luego, se determinó mediante ICQ los niveles proteicos de adiponectina. Los resultados muestran que TNF-α disminuye los niveles de adiponectina ($p < 0,05$), mientras que PDCT, con todas las dosis utilizadas, produce el restablecimiento de estos niveles alcanzando los niveles del basal (Figura 36), lo que sugiere que TNF-α es capaz de disminuir la expresión de adiponectina, probablemente a través de la activación y posterior control transcripcional de NFκB.

Luego, se determinó el efecto de PDTC sobre los niveles de adiponectina en cultivos bajo condiciones hiperandrogénicas e hiperinsulínicas (Figura 37). Los resultados muestran que, al igual que TNF- α , la presencia de insulina y testosterona disminuyen los niveles de adiponectina ($p < 0,05$). De forma interesante, el tratamiento con 50 μ M de PDTC, revierten estos niveles de forma similar a lo observado en la Figura 36 (Figura 37). Esto sugiere que el efecto de insulina más testosterona o de TNF- α , por si solo, sobre los niveles de adiponectina, son a través de vías independientes, como ya fue mencionado (Figura 25). Sin embargo, el estímulo con PDTC es suficiente para revertir los niveles de adiponectina en células bajo un ambiente hiperandrogénico e hiperinsulínico en presencia de altas concentraciones de TNF- α , todas condiciones observadas en endometrios de mujeres Obesas-SOP.

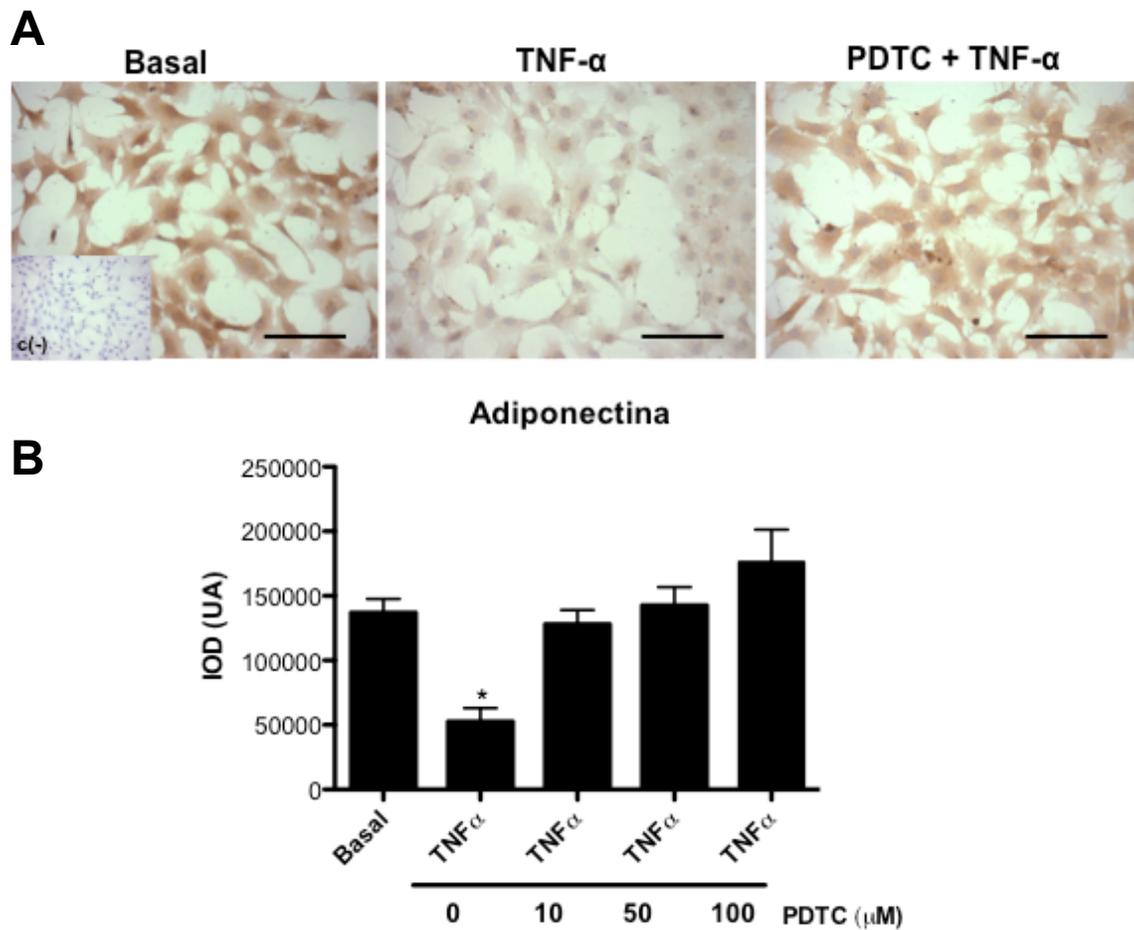
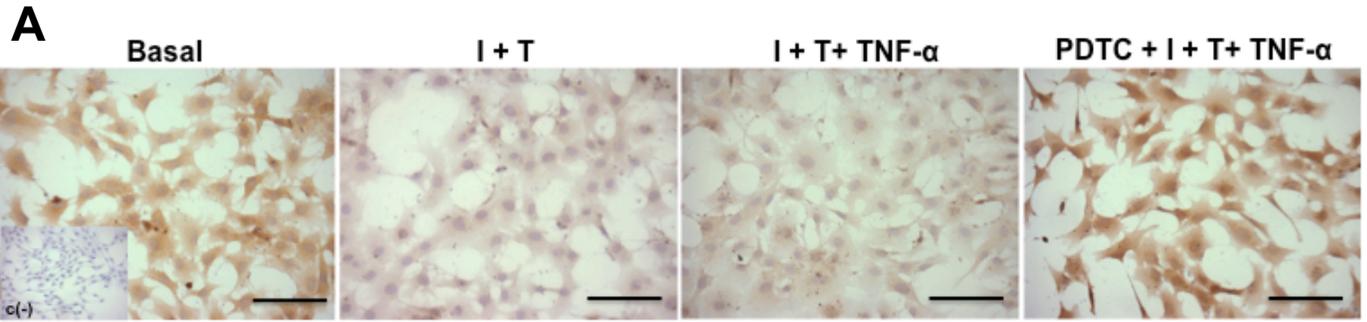


Figura 36. Curva dosis-respuesta. Detección y niveles de adiponectina en células estromales endometriales humanas (St-T1b) pre-tratadas con PDTC. A) Microfotografías de células St-T1b previamente tratadas con PDCT por 1h y luego tratadas con TNF- α por 24 h, además de una condición basal, para la detección por ICQ de adiponectina. **B)** Análisis semi-cuantitativo de la tinción inmuno-positiva usando la herramienta IOD en células pre-tratadas con PDCT (10, 50 y 100 μ M) por 1 h y luego tratadas con 100 ng/mL de TNF- α por 24 h. Los valores se presentan como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo. n=3, en duplicado; *P *value*<0,05; Inserto: control negativo; Barra= 50 μ m.



Adiponectina

B

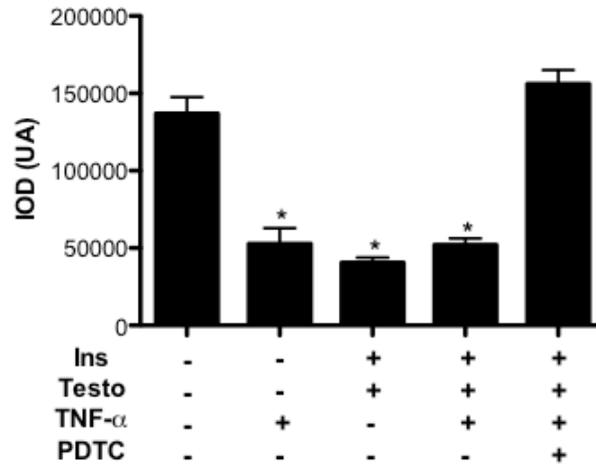


Figura 37. Detección y niveles de adiponectina en células estromales endometriales humanas (St-T1b) pre-tratadas con PDTC. A) Microfotografías de células St-T1b previamente tratadas con 50 μ M de PDCT por 1h y luego tratadas con: Insulina + Testosterona (I + T, 100 nM c/u) o Insulina + Testosterona + TNF- α , por 24 h (además de una condición basal), para la detección por ICQ de adiponectina. **B)** Análisis semi-cuantitativo de la tinción inmuno-positiva usando la herramienta IOD. Los valores se presentan como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo. n=3, en duplicado; *P *value*<0,05; Inserto: control negativo; Barra= 50 μ m.

V.2.6 Efecto de TNF- α sobre la captación de glucosa en células estromales endometriales humanas

La captación de glucosa corresponde a una de las etapas finales de la acción de adiponectina o insulina en las células. Para determinar si los altos niveles de TNF- α encontrados en endometrios de mujeres Obesas-SOP tienen efectos sobre la homeostasis energética del tejido, se evaluó la capacidad de captar glucosa por parte de células estromales endometriales humanas tratadas con TNF- α , insulina y/o testosterona, mediante la detección de la incorporación por parte de las células de glucosa tritiada usando un contador de centelleo. Dado que uno de los puntos esenciales en el metabolismo energético relacionado con la captación de glucosa es la presencia de GLUT-4 y considerando que los niveles de este transportador se encuentran disminuídos en endometrios de mujeres hiperinsulínicas con SOP [28], se procedió a determinar el efecto de TNF- α sobre la presencia y niveles proteicoas de GLUT-4 en cultivos de células estromales endometriales humanas de la línea St-T1b. De forma interesante, los resultados muestran que la presencia de TNF- α solo o con insulina más testosterona ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente), los niveles de GLUT-4 disminuyen en células de la línea St-T1b a las 24 horas de estímulo (Figura 38). Este resultado indica que los mayores niveles de TNF- α encontrados en endometrios de mujeres Obesas-SOP pueden ser la causa de los menores

niveles de GLUT-4 observados en tejido endometrial de mujeres hiperinsulínicas (con un alto IMC) y con SOP [28].

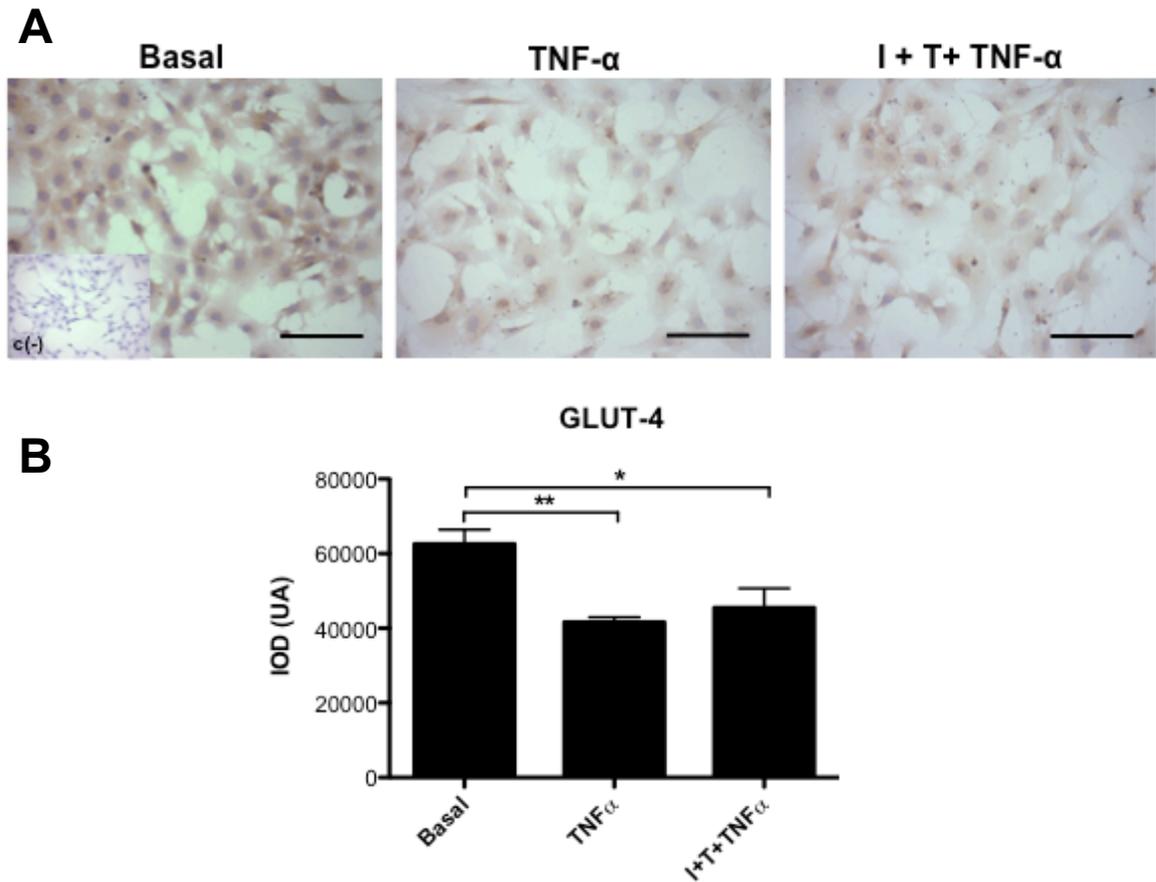


Figura 38. Detección y niveles de GLUT-4 en células estromales endometriales humanas (St-T1b). **A)** Microfotografías de células St-T1b tratadas con 100 ng/mL de TNF- α o Insulina + Testosterona (100 nM c/u) + TNF- α por 24 h (además de una condición basal), para la detección por ICQ de GLUT-4. **B)** Análisis semi-cuantitativo de la tinción inmunopositiva usando la herramienta IOD. Los valores se presentan como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo. n=3, en duplicado; *P *value*<0,05; ** P *value*<0,01; Inserto: control negativo; Barra= 50 μ m.

Para los ensayos de captación de glucosa, en primer lugar se realizó una curva tiempo / respuesta en cultivos de células estromales endometriales humanas (T-HESC) tratados con distintas dosis de TNF- α , esto para determinar el tiempo adecuado de tratamiento considerando que los resultados hasta ahora han sido variables con respecto al tiempo de tratamiento con TNF- α . La Figura 39 muestra que las células disminuyen significativamente su capacidad de captar glucosa a las 48 h de tratamiento, observándose una disminución de alrededor del 30% con 50 ng/mL y de 50% con 100 ng/mL de TNF- α , respecto a la condición basal (TNF- α 100 ng/mL, $p < 0,05$). Estos datos señalan claramente que TNF- α afecta la acción de la insulina, no solo en células con una alta tasa metabólica, como células adiposas o hepáticas, sino que también en células de tejidos de gran importancia reproductiva, como son células estromales de endometrio humano.

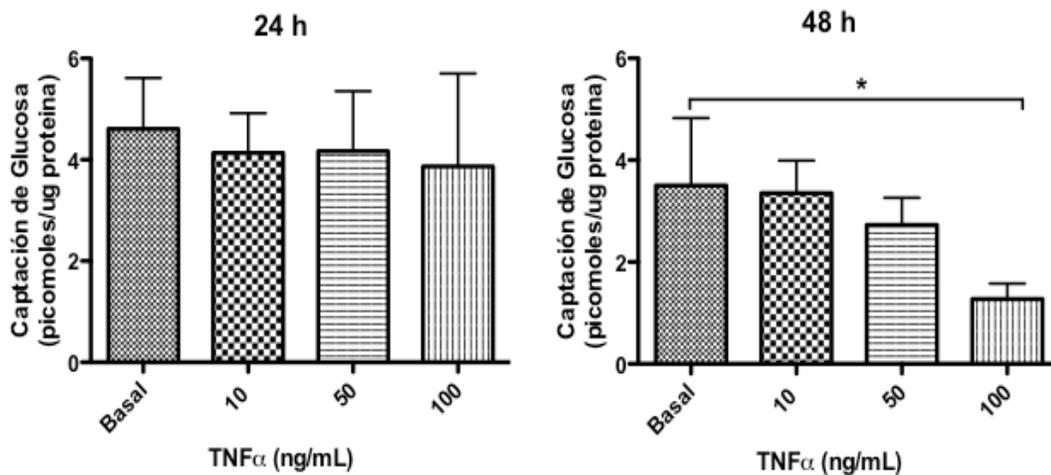


Figura 39. Ensayos de captación de glucosa en células estromales endometriales humanas (T-HESC) tratadas con TNF- α . Los gráficos muestran los niveles de glucosa tritiada obtenidos de células estromales endometriales humanas previamente tratadas con: 10, 50 y 100 ng/mL de TNF- α por 24 y 48 h. Los datos fueron normalizados utilizando los niveles de proteína total en cada pocillo. Los resultados son presentados como picomoles de glucosa internalizada en razón de la cantidad de proteína total (μg) / pocillo. Los valores por grupo corresponden a la media \pm EE (n = 3, en duplicado; *P *value*<0,05).

A continuación se determinó el efecto de testosterona, insulina y el tratamiento combinado de testosterona más insulina sobre la captación de glucosa por parte de estas células. Los resultados en la Figura 40 muestran los cambios en la captación de glucosa al tratar con insulina o testosterona por 48 h, los cuales están de acuerdo con resultados obtenidos en ensayos previos de nuestro laboratorio, realizados a 24 y 48 h de tratamiento [27,30]. Se ha demostrado que estas células responden a esta concentración de insulina y como consecuencia se observa un aumento de un 45% aproximadamente en la captación de glucosa con respecto al basal ($p < 0,05$); al contrario, el tratamiento

con testosterona disminuye la captación de glucosa en casi un 70% (*versus* el basal; $p < 0,05$). Sin embargo, en la misma figura se observa que el tratamiento combinado de insulina / testosterona restablece de forma parcial esta disminución (50% menos que el basal; $p < 0,05$). Por otro lado, como ya se ha descrito, TNF- α también disminuye en un 50% el proceso de captación de glucosa por parte de la célula estromal en condiciones *in vitro* ($p < 0,05$; Figura 40), al igual que con el tratamiento combinado de insulina / testosterona / TNF- α , estos resultados fueron publicados en el artículo *Proinflammatory environment and role of TNF- α in endometrial function of obese women having polycystic ovarian syndrome (PCOS)* [31]. Estos datos sugieren que bajo estas condiciones, la citoquina por sí sola afecta la acción de insulina en estas células, probablemente a través de una vía independiente a la de testosterona, para provocar el mismo efecto.

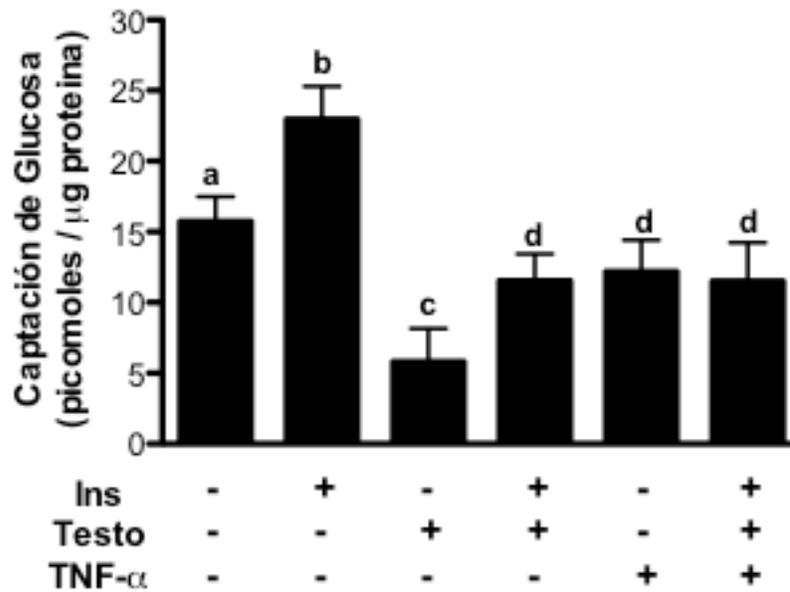


Figura 40. Ensayos de captación de glucosa en células estromales endometriales humanas (T-HESC). Los gráficos muestran los niveles de glucosa tritiada obtenidos de células estromales endometriales humanas previamente tratadas con: Insulina (Ins), Testosterona (Testo), 100 ng/mL de TNF- α o tratamientos combinados, por 48 h. Los datos fueron normalizados utilizando los niveles de proteína total en cada pocillo. Los resultados son presentados como picomoles de glucosa internalizada en razón de la cantidad de proteína total (μ g) / pocillo. Los valores por grupo corresponden a la media \pm EE (n = 3, en duplicado; a \neq b \neq c \neq d con un *P value < 0,05).

V.2.7 Efecto de TNF- α sobre la activación de moléculas capaces de modular la acción de insulina en células estromales endometriales humanas

Como ya se ha propuesto, TNF- α induciría un efecto negativo sobre la acción de insulina en células endometriales, ya sea de forma directa (afectando la expresión de GLUT-4 y/o la señalización y expresión de adiponectina y sus moléculas relacionadas) o de forma indirecta (activando moléculas que interfieran con la actividad de proteínas esenciales en la señalización de insulina). Con respecto a este último punto, se ha descrito que TNF- α puede activar distintas quinasas, como S6K y JNK, capaces de alterar la activación de IRS1. Esta acción la ejercerían a través de una disminución de las fosforilaciones activantes en residuos de tirosinas y/o por el aumento de fosforilaciones inactivantes de IRS1 en residuos de serinas, afectando la señalización de insulina. Todo lo anterior llevaría a una disminución en la capacidad de captar glucosa en células sensibles a la insulina [70-72].

Por ello, se determinó si los niveles de IRS1 fosforilado en serina o en tirosina cambian por efecto de TNF- α . Para ello, se utilizaron cultivos de T-HESC tratados con insulina, testosterona y/o 100 ng/mL de TNF- α a las 48 h de estímulo, y se midió mediante WB los niveles proteicos de IRS fosforilado en residuo de tirosina (p-IRS Y612; fosforilación activante) e IRS1 fosforilado en residuo de serina (p-IRS S270; fosforilación inactivante). La Figura 41 muestra

los niveles proteicos de ambas formas fosforiladas de IRS1, en la cual se observa que no existen cambios de p-IRS1 Y612 con ninguno de los tratamientos, mientras que los niveles de p-IRS1 S270 aumentan significativamente en presencia de los tres estímulos: insulina / testosterona / TNF- α , con respecto al basal ($p < 0,05$). Estos datos son relevantes dado que indican una disminución de IRS1 activo, lo que sugiere fallas en la señalización de insulina y una consecuente disminución en la captación de glucosa por parte de éstas células.

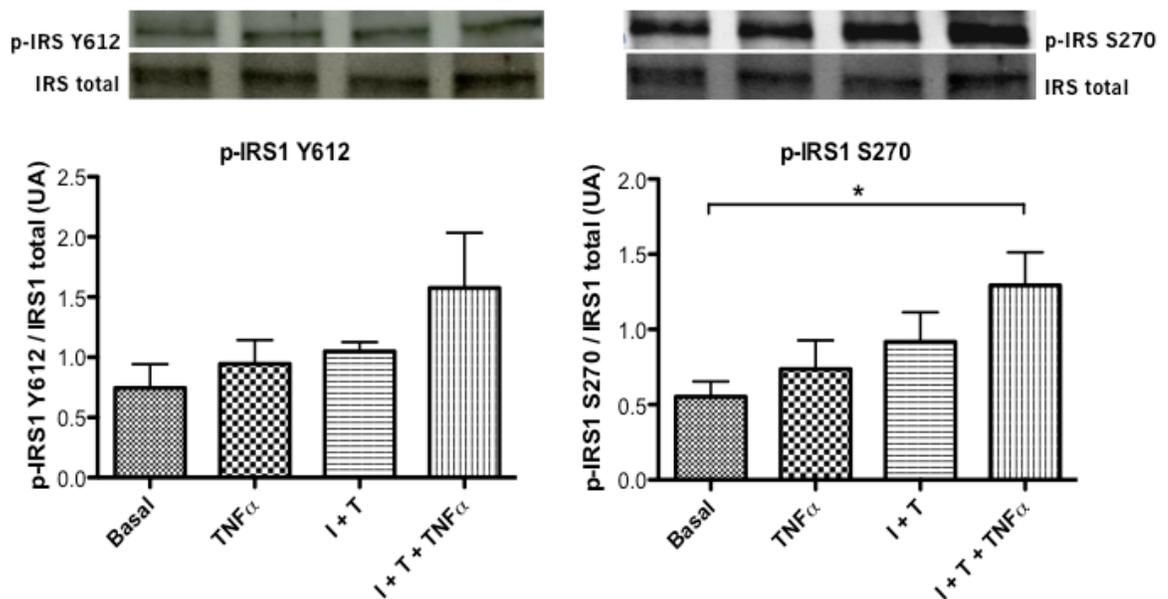


Figura 41. Niveles proteicos de p-IRS1 (Y612) y p-IRS1 (S270) en cultivos de T-HESC. Los gráficos muestran los niveles de proteína de IRS1 (banda de 165 KDa apróx.) fosforilado en Y612 (gráfico izquierdo) o en S270 (gráfico derecho), en muestras de proteína total de células estromales endometriales humanas tratadas con: Insulina (I), Testosterona (T), 100 ng/mL de TNF- α o tratamientos combinados por 48 h, mediante WB. Los datos fueron normalizados utilizando los niveles proteicos IRS1 total (170-185 KDa) en cada muestra. Los resultados son presentados como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo ($n = 3$, en duplicado; * P value $<0,05$).

En base a este resultado, y para determinar si ambas quinasas están siendo afectadas por la acción de la citoquina, se determinó mediante WB el efecto de TNF- α sobre el contenido proteico de las fracciones fosforiladas (activas) de S6K (p-S6K T389) y de JNK (p-JNK T183/Y185). En primer lugar, se determinó los niveles proteicos de p-S6K T389 en cultivos tratados con insulina, testosterona y/o 100 ng/mL de TNF- α a las 48 h de estímulo. Los resultados se observan en la Figura 42 y muestran que TNF- α aumenta los niveles de p-S6K activo ($p < 0,05$), mientras que con el tratamiento de testosterona más insulina, estos niveles disminuyen con respecto al basal ($p < 0,05$). De manera relevante, el co-tratamiento de testosterona / insulina / TNF- α restablecen parcialmente los niveles de S6K fosforilado con respecto a testosterona / insulina, indicando que células estromales endometriales humanas en presencia de TNF- α presentarán un mayor contenido de S6K activo.

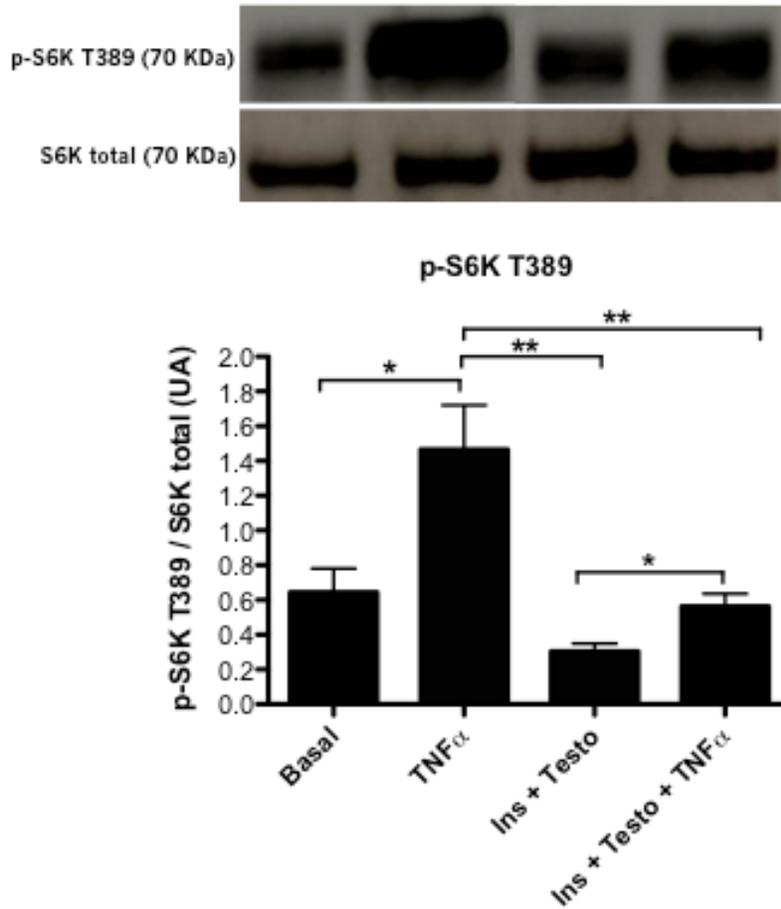


Figura 42. Niveles proteicos de p-S6K (T389) en cultivos de T-HESC. Los gráficos muestran los niveles de proteína de S6K (banda de 70 KDa) fosforilada en T389 en muestras de proteína total de células estromales endometriales humanas tratadas con: Insulina (I), Testosterona (T), 100 ng/mL de TNF- α o tratamientos combinados por 48 h, mediante WB. Los datos fueron normalizados utilizando los niveles proteicos S6K total (70 KDa) en cada muestra. Los resultados son presentados como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo (n = 3, en duplicado; a \neq b \neq c con un *P *value*<0,05).

Al evaluar el contenido de JNK, se encontró que TNF- α aumenta los niveles de p-JNK activo (p-JNK T183/Y185) con respecto a la condición basal ($p < 0,05$; Figura 43). De forma interesante se observa que cuando las células son tratadas con los tres estímulos, estos niveles presentan un aumento mayor en comparación con los otros tratamientos ($p < 0,01$ vs Basal; $p < 0,01$ vs Ins + Testo; $p < 0,05$ vs TNF- α). Esto sugiere fuertemente que los efectos negativos relacionados con la activación de S6K y/o JNK sobre la señalización de la insulina podrían estar exacerbados cuando las tres condiciones están presentes: insulina / testosterona / TNF- α , situación similar a lo encontrado en el grupo de mujeres Obesas-SOP.

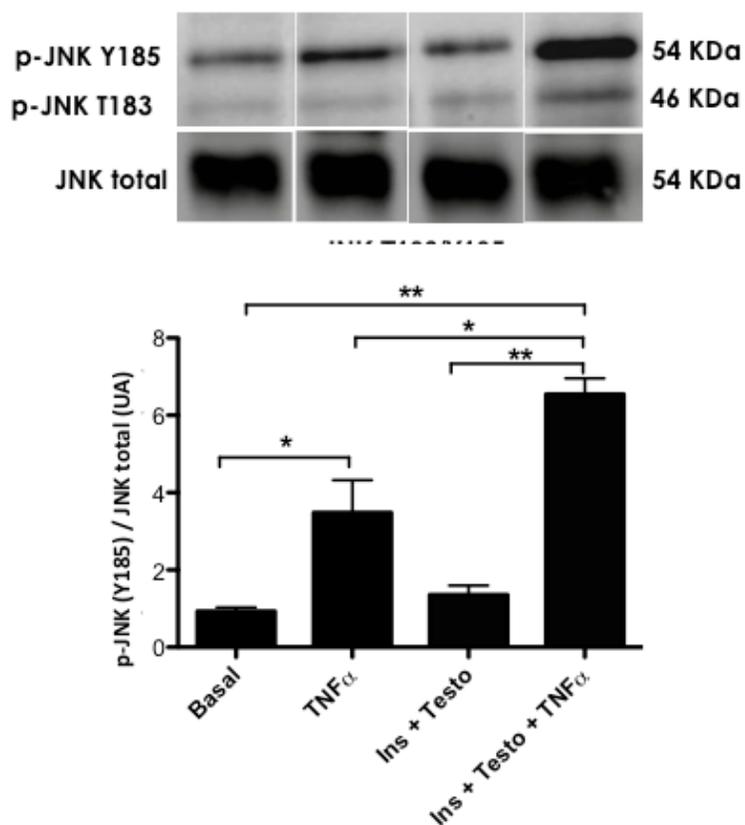


Figura 43. Niveles proteicos de p-JNK (T183/Y185) en cultivos de T-HESC. Los gráficos muestran los niveles de proteína de JNK fosforilada en T183 (46 KDa) y Y185 (54 KDa) en muestras de proteína total de células estromales endometriales humanas tratadas con: Insulina (I), Testosterona (T), 100 ng/mL de TNF- α o tratamientos combinados por 48 h, mediante WB. Los datos fueron normalizados utilizando los niveles proteicos JNK total (54 KDa) en cada muestra. Los resultados son presentados como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo (n = 3, en duplicado; *P *value*<0,05; **P *value*<0,01).

Bajo este mismo contexto, una molécula muy relacionada tanto con la actividad de TNF- α como con la señalización de la insulina, es AKT [71]. Por ello, se determinó mediante WB, los niveles proteicos de AKT fosforilado (p-AKT S473). Los resultados muestran que los diferentes tratamientos realizados a las células T-HESC por 48 h aumentan el contenido de p-AKT S473 activo con respecto al

basal ($p < 0,05$; Figura 44), sugiriendo la participación de AKT no solo río abajo de la señalización de insulina, sino que posiblemente siendo parte del sistema TNF- α /p-AKT/p-S6K o p-JNK, afectando la señalización de la insulina.

Además, se realizó un ensayo para determinar si este efecto de TNF- α sobre AKT activo se observa con concentraciones menores (10 y 50 ng/mL) y tiempos más cortos de tratamientos (6 y 24 h) (Figura 45). Los resultados muestran que TNF- α es capaz de disminuir el contenido proteico de p-AKT S473 a las 24 h con respecto a las células bajo la condición basal; además, es posible observar que el efecto sobre los niveles de AKT fosforilado es dependiente de la concentración de la citoquina ($p < 0,05$ con 10 ng/mL de TNF- α vs basal; $p < 0,001$ con 50 ng/mL de TNF- α vs basal; Figura 45).

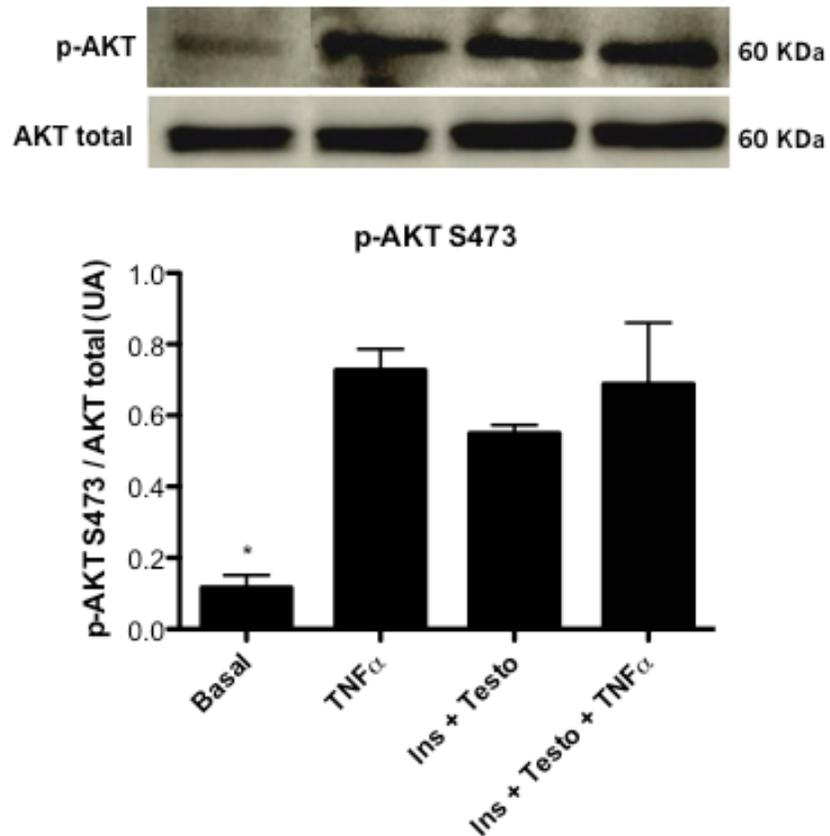


Figura 44. Niveles proteicos de p-AKT (S473) en cultivos de T-HESC. Los gráficos muestran los niveles de proteína de AKT (banda de 60 KDa) fosforilada en S473 en muestras de proteína total de células estromales endometriales humanas tratadas con: Insulina (Ins), Testosterona (Testo), 100 ng/mL de TNF- α o tratamientos combinados por 48 h, mediante WB. Los datos fueron normalizados utilizando los niveles proteicos AKT total (60 KDa) en cada muestra. Los resultados son presentados como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo (n = 3, en duplicado; *P *value* < 0,05).

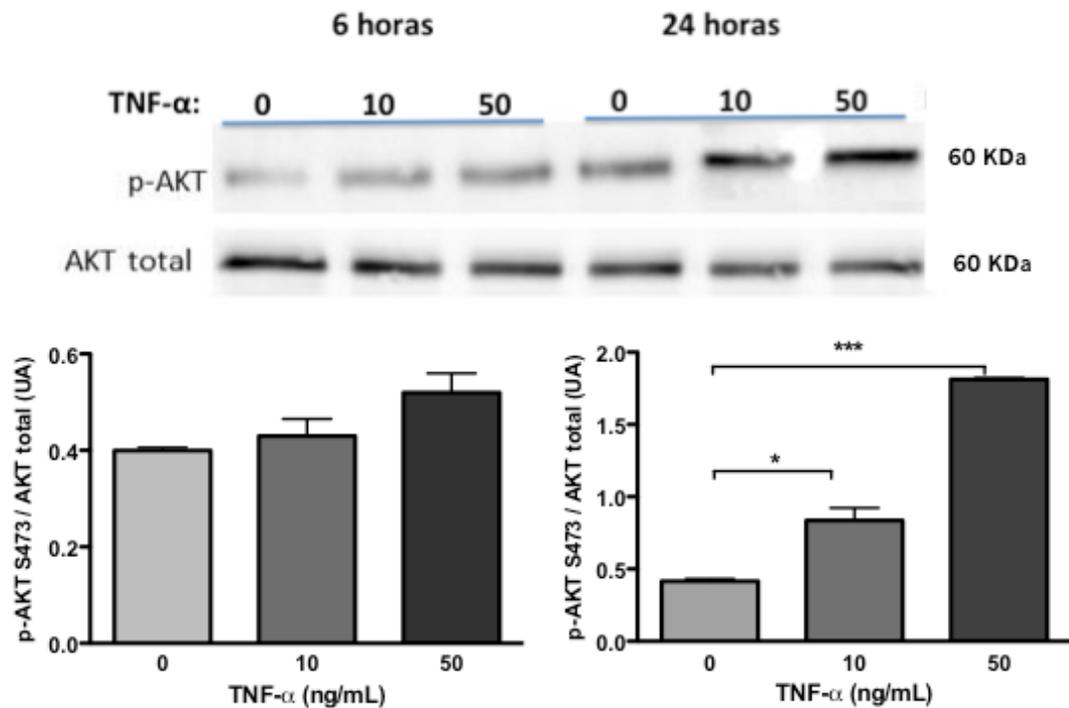


Figura 45. Determinación de niveles proteicos de p-AKT S473 en cultivos de T-HESC. Los gráficos muestran los niveles de p-AKT S473 (60 KDa) en células estromales endometriales humanas tratadas con: 0, 10 y 50 ng/mL de TNF- α por 6 y 24 h. Muestras de proteínas totales extraídas de estos cultivos fueron utilizadas para el análisis mediante western blot. Los datos fueron normalizados utilizando los niveles proteicos de AKT total (60 KDa) en cada muestra. Los resultados son presentados como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo (n = 5; *P value<0,05; ***P value<0,001).

VI. DISCUSIÓN

El Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) es un trastorno muy prevalente durante la edad reproductiva femenina, caracterizado por altos niveles de andrógenos y disfunción ovárica, entre otros signos [3]. En su conjunto esto conlleva a alteraciones no solo ováricas, sino que afectan tejidos que tienen un rol importante en la fertilidad femenina, como es el endometrio. De hecho, se ha demostrado que pacientes con SOP presentan una mayor tasa de abortos espontáneos que mujeres sanas [6,11,17].

Por otro lado, un porcentaje considerable de mujeres con SOP (70%) presentan un alto IMC u obesidad [1-3], condición asociada a un estado de insulino-resistencia presente en la mayoría de estas pacientes. Con respecto a la obesidad, se sabe que un aumento excesivo de tejido adiposo trae consigo alteraciones en el patrón de expresión y/o secreción de las moléculas denominadas adipoquinas, las que en su mayoría pueden presentar efectos negativos o positivos sobre la señalización de insulina [6]. Esto podría explicar en parte las alteraciones observadas por nuestro grupo sobre la señalización de insulina en endometrios de mujeres hiperinsulínicas con SOP [100], afectando el metabolismo y el normal funcionamiento del tejido y siendo posiblemente una causa importante de las fallas reproductivas en estas mujeres.

Con respecto a las adipoquinas y su rol en la acción de insulina, los resultados del presente trabajo mostraron que tanto los niveles séricos y endometriales de adiponectina, la principal adipoquina con efecto insulino-sensibilizante, están disminuídos en pacientes Obesas-SOP, junto con las principales moléculas de su vía de señalización. Esto sugiere que los altos niveles de andrógenos en estas pacientes pudiesen tener un rol negativo sobre la señalización de esta adipoquina. En relación a esto, se ha descrito en seres humanos una relación entre obesidad, SOP y los bajos niveles de adiponectina en plasma. Además, bajos niveles plasmáticos de adiponectina se han observado en mujeres delgadas, obesas y embarazadas, todas ellas con SOP [57,59,76,101-103].

En este trabajo se observó que los niveles séricos de adiponectina fueron menores en pacientes Obesas-SOP, único grupo que presenta los parámetros alterados de resistencia a la insulina (HOMA e ISI Composite alterados), además de altos valores de IAL (Tablas 1 y 2). Estos resultados están de acuerdo con otros trabajos que establecen que el IMC, la resistencia a la insulina y el IAL contribuyen a la alteración de los niveles de adiponectina en pacientes con SOP [59,103-104]. Este vínculo entre el IAL, resistencia a la insulina y los niveles de adiponectina puede existir por varias razones, una de ellas es que los andrógenos promueven la adiposidad central y el depósito adiposo visceral, depósitos que se caracterizan por una menor secreción de adiponectina a la circulación [105]. Las diferencias en la distribución de tejido adiposo pueden influir en la secreción de las diferentes adipocitoquinas y

proteínas pro-inflamatorias, tales como TNF- α e IL-6 [75,106,107]. En efecto, diferentes investigaciones señalan que los niveles de citoquinas pro-inflamatorias están alterados incluso en pacientes con SOP, lo que refleja un estado de inflamación crónica de bajo grado en el tejido adiposo subcutáneo [7,73,76,106]. Estas citoquinas pueden inducir la baja expresión de adiponectina [74,75,108].

Por otro lado, se ha reportado resultados contradictorios sobre el efecto de los estrógenos sobre los niveles circulantes de adiponectina, donde algunos trabajos reportan un aumento [109] y otros un descenso de las concentraciones circulantes de adiponectina [110]. Estas evidencias, además de trabajos que indican que los niveles de adiponectina en plasma permanecen estables a lo largo del ciclo menstrual [111,112], sugieren que otros factores, además de los hormonales, podrían ser responsables de los cambios en los niveles de adiponectina en las mujeres con SOP.

Con respecto a su expresión, diversos estudios que relacionan adiponectina con la reproducción humana han demostrado la expresión de la adipoquina en células de la teca y de la granulosa ováricas y cuerpo lúteo humano [54,113,114]. Aunque no hay informes disponibles que relacionen la adiponectina con el endometrio patológico de pacientes con SOP, el grupo de Takemura *et al.* [51] ha establecido que los receptores de adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2, se expresan en los compartimentos de células endometriales humanas, epitelio y estroma, a lo largo del ciclo menstrual, en

particular durante la fase secretora, lo que sugiere un posible papel en el proceso de implantación. De manera relevante, cabe destacar que este estudio es el primero en determinar la presencia de adiponectina y moléculas de su vía de señalización: sus receptores (AdipoR1 y AdipoR2), APPL1 y AMPK, entre otras, en endometrios controles y provenientes de mujeres Obesas con SOP. El análisis del contenido de adiponectina mostró que existen menores niveles en endometrios de Obesas-SOP con respecto a los otros grupos, lo que es consistente con lo observado en el modelo *in vitro* usando cultivos de las líneas celulares T-HESC o St-T1b. En dichos cultivos, concentraciones suprafisiológicas de insulina y testosterona provocaron una disminución en la expresión de la proteína. El mecanismo por el cual estas hormonas pueden afectar los niveles de adiponectina en el endometrio humano se desconoce, aunque en una condición SOP sumado a la obesidad, el estado pro-inflamatorio y la resistencia a la insulina, podrían inducir estrés de retículo (ER), lo que podría estar afectando la expresión y el correcto plegamiento de proteínas en éstas células [115,116]. Con respecto a esto último, diversas evidencias han demostrado que los andrógenos podrían regular la homeostasis del retículo endoplásmico y el metabolismo de la glucosa. En efecto, estudios de nuestro laboratorio han demostrado que el hiperandrogenismo induce una disminución de los niveles proteícos de GRP78, marcador de ER, en endometrios provenientes de mujeres con SOP, lo que se ha relacionada con una

disminución de la captación de glucosa por parte de estas células estromales endometriales humanas [30].

Con respecto a los altos niveles de AdipoR1 encontrados en endometrios de mujeres Obesas, se desconoce el mecanismo molecular que está implicado. De forma interesante, esta respuesta no se observa en mujeres Obesas-SOP, probablemente debido a sus condiciones de hiperinsulinismo e hiperandrogenismo. En efecto, existen estudios en ratones y en humanos que han demostrado una correlación negativa entre la hiperinsulinemia y los niveles de expresión de AdipoR1 / R2 en diferentes tipos celulares como el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo [117,118,119]. Sin embargo, la relación entre el hiperandrogenismo / hiperinsulinismo y la expresión de AdipoR1 / AdipoR2 en endometrio humano no se había abordado antes. Es importante destacar que, en nuestro modelo *in vitro*, la respuesta de las células a la acción de la insulina más testosterona muestra una disminución de los niveles de adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2, lo que sugiere que en el endometrio humano, la adiponectina y sus receptores pueden ser regulados hormonalmente. Por otra parte, la alteración en la expresión del sistema de la adiponectina y sus receptores en este tejido podría afectar los cambios endometriales que ocurren para la implantación. Como se ha descrito anteriormente, la adiponectina y sus receptores se incrementan en este tejido durante el período de implantación bajo condiciones normales; sin embargo, los

niveles proteicos y de mRNA de AdipoR1 y AdipoR2 disminuyen en mujeres que presentan falla implantacional con respecto a mujeres sanas [51,120].

Una de las moléculas cruciales río abajo del receptor de adiponectina, es APPL1. En el presente estudio se evaluó el contenido de APPL1, la cual tiene una función adaptadora, reclutando otras proteínas necesarias para la señalización [47,58,98,121]. Por primera vez, los resultados muestran una disminución en los niveles de APPL1 en endometrio humano de pacientes Obesas y Obesas-SOP. Estos resultados están de acuerdo con investigaciones anteriores que reportan una disminución de los niveles de esta molécula en condiciones de hiperglicemia y obesidad [122]. Además, en varios modelos animales con diabetes y obesidad, se ha observado una disminución de los niveles de APPL1 [123,124]. Por otro lado, se ha propuesto la participación de otra molécula adaptadora capaz de generar un efecto contrario a APPL1 al reprimir la cascada de señalización intracelular de adiponectina, denominada APPL2. Se ha propuesto que los niveles proteicos de APPL2 serían mayores en endometrios de mujeres obesas con SOP, lo que favorecería una condición de insulino resistencia en estos tejidos (tema de investigación en marcha en nuestro laboratorio como parte de la tesis de Magister de Isis Astorga) [125].

De forma interesante, estudios han indicado que adiponectina y sus receptores pueden inducir la activación de AMPK en las células epiteliales y estromales, lo que sugiere que adiponectina puede regular el equilibrio de energía en estos tipos celulares implicados en el proceso de la receptividad del endometrio y de

implantación [44,50,56]. Por lo tanto, los menores niveles encontrados en endometrios del grupo Obesas-SOP podrían ser un factor de riesgo relacionado con las fallas reproductivas de mujeres con SOP, las que se agravarían cuando también está presente la obesidad. Se ha descrito que en el mecanismo por el cual adiponectina, a través de la activación de AMPK, induce un efecto insulino-sensibilizante, participa la activación de su receptor y la molécula APPL1. Una vez activa AMPK, la vía de señalización se ha asociado con la represión, inducida por p-AMPK, del sistema mTOR/S6K. Al contrario, en ausencia de AMPK activo, S6K se activa y provoca el aumento de las fosforilaciones inactivantes en residuos de serinas y disminuye las fosforilaciones activantes en residuos de tirosinas de IRS1 [126]. Este es uno de los mecanismos que favorece la resistencia a la insulina y el riesgo de padecer diabetes. Por lo tanto, de forma indirecta, la activación de AMPK, ya sea inducida por adiponectina u otros estímulos como leptina o el ejercicio o por fármacos como metformina, puede contrarrestar el impacto de exceso de nutrientes sobre la acción de mTOR y S6K, favoreciendo así la acción de insulina en la célula.

Los datos discutidos hasta ahora en esta tesis sugieren que el tejido endometrial del grupo Obesas y Obesas-SOP presentan una alteración de la vía de señalización río abajo de los receptores de adiponectina. Estas alteraciones podrían aumentar la resistencia a la insulina y afectar el metabolismo de las células endometriales, a través de una disminución en la actividad de AMPK, molécula clave en controlar la homeostasis energética.

Además, otras moléculas relacionadas con la señalización de adiponectina se encontraron disminuídas en endometrios provenientes de mujeres Obesas-SOP, como p-TAK1 y p-MEK3, las cuales se activan vía adiponectina / AdipoR / APPL1 para inducir efectos insulino-sensibilizantes (Anexos, Figura A1). Como ya se mencionó, esta vía se relaciona con la activación, inducida por adiponectina, de moléculas MAPKs las cuales una vez activas favorecen la oxidación de ácidos grasos y la captación de glucosa [98]. Por lo tanto, los datos obtenidos sugieren que en endometrios patológicos provenientes de mujeres Obesas con SOP, la acción insulino-sensibilizante de adiponectina, a través de la activación de AMPK o la activación de MAPKs, se encuentra disminuída.

Considerando que la obesidad induce una condición pro-inflamatoria leve pero crónica, caracterizada por el aumento en el número de macrófagos y citoquinas pro-inflamatorias, como IL-6 y TNF- α , el estudio del efecto de estas moléculas sobre el metabolismo endometrial de mujeres Obesas-SOP resulta relevante. Con respecto a esto, se sabe que IL-6 y TNF- α inducen efectos negativos sobre la señalización de la insulina en distintos modelos de estudio [36,37,108,127]. Por otro lado, se ha demostrado que tanto IL-6 como TNF- α disminuyen los niveles de proteína y mRNA de adiponectina en tejido adiposo de pacientes obesas, así como, en modelos *in vitro* de células adiposas y musculares [6,75,77,82]. Aún más, es relevante la existencia de sitios de reconocimiento descritos para TNF- α en el promotor de adiponectina [74] , apoyando la teoría

de que a través del efecto inhibitor de TNF- α sobre la expresión de adiponectina, la acción de insulina en estos sistemas se ve afectada.

Por lo tanto, el aumento de TNF- α encontrado en endometrios de mujeres Obesas-SOP, podría explicar los bajos niveles de adiponectina endometrial en este mismo grupo de pacientes y en parte, las fallas en la acción de la insulina observada en estos tejidos. Otros estudios han demostrado que adiponectina es capaz a su vez de disminuir la expresión de TNF- α [47,55,56,127]; al contrario, factores asociados a la obesidad son capaces de activar quinasas las cuales activan factores de transcripción, como NF κ B, que pueden incrementar la expresión de TNF- α a nivel local o en tejidos distantes al tejido adiposo [83-85]. Esto podría dar cuenta del aumento de TNF- α en el tejido endometrial, que no pudo ser observado a nivel sistémico en estas mujeres. Por otro lado, la obesidad en estas pacientes fue determinada por el IMC > 30, lo que no descarta que la acumulación de grasa sea mayoritariamente subcutánea, siendo la grasa visceral la que aporta la mayor cantidad de TNF- α a la sangre, provocando un mayor ambiente inflamatorio en una condición de obesidad [105]. Sumado a lo anterior, los resultados de este trabajo muestran mayor presencia de macrófagos en endometrios de mujeres Obesas con respecto a las Delgadas, comprobando el efecto de la obesidad sobre la condición pro-inflamatoria en tejidos. La mayor presencia de macrófagos en endometrios de Obesas-SOP puede ser una de las causas del mayor contenido de TNF- α encontrado en estos tejidos [63].

Sin embargo, los resultados también muestran que en ausencia de obesidad existe un aumento del número de macrófagos en endometrios de mujeres Delgadas-SOP *versus* Delgadas, lo que sugiere que la condición hiperandrogénica tiene un efecto positivo sobre el ambiente pro-inflamatorio local en el endometrio. En relación a esto, existen controversias con respecto a si el SOP conlleva un proceso inflamatorio *per se* [7]. Estudios sobre niveles de proteína C reactiva, considerado un marcador de inflamación, han demostrado ser altos en mujeres con SOP en comparación con controles (ambos grupos coinciden en edad e IMC) [128]. Indudablemente, el endometrio del grupo de mujeres Obesas-SOP presenta el mayor porcentaje de macrófagos endometriales, lo que indicaría que ambas condiciones pueden exacerbar un estado inflamatorio en el tejido. Esto probablemente debido a otros factores que aumentan por el SOP, como la proteína C reactiva, sumado a estímulos propios de la obesidad, los que a través de una acción paracrina podrían activar vías pro-inflamatorias en otros tejidos.

Algunas investigaciones han demostrado que la expresión de TNF- α y sus receptores cambian durante el ciclo menstrual, siendo mayor en la fase secretora, indicando una participación activa en procesos de remodelación / proliferación, como parte de la función normal del endometrio (menstruación o proceso de implantación si el ovocito es fecundado) [62,99,129]. Dado que se conoce la importancia de la actividad de las células inmunes en el proceso de implantación, los niveles disminuídos de TNFR2 y CD68 observados en el

endometrio de mujeres Obesas-SOP durante la fase secretora en relación al grupo de Obesas y a lo encontrado en la fase proliferativa, podrían ser en parte, la causa de un anormal funcionamiento del endometrio, afectando la correcta implantación del embrión en este grupo de pacientes. Apoyando esta idea, la alteración del sistema de TNF- α en el endometrio de mujeres Obesas-SOP podría estar fuertemente relacionada con la condición hiperinsulínica presente en este grupo de estudio. De hecho, resultados del grupo de Jakubowicz *et al.* [130], indican que la hiperinsulinemia en mujeres con SOP en quienes la ovulación y fase lútea fue inducida por tratamiento con clomifeno, puede alterar el ambiente pro-inflamatorio y la receptividad del endometrio por una disminución de los niveles séricos de moléculas reguladoras de la respuesta inmune, tales como glicodelina (secretada principalmente por el endometrio) e IGFBP-1. Estas moléculas modulan el proceso de adhesión en la interfase materno-fetal; mientras que el tratamiento con metformina aumenta los niveles de ambas moléculas en estas mujeres [130].

Respecto al incremento en los niveles de TNF- α y TNFR2 en endometrios de mujeres Obesas-SOP en fase proliferativa del ciclo, éstos sugieren una elevada actividad de TNF- α bajo estas condiciones [62]. Estudios han determinado alteraciones genéticas asociadas con la presencia de SOP e hiperandrogenismo en mujeres, específicamente, polimorfismos de los genes que codifican para TNF- α y TNFR2 [131,132]. Esto último también se ha relacionado con un mayor contenido de TNFR2 soluble en la sangre y con

resistencia a la insulina en mujeres con un alto IMC, lo que contribuiría a un estado pro-inflamatorio y a la condición de resistencia a la insulina observada [132,133].

Por otra parte, debido a la presencia de un dominio de muerte, TNFR1 se asocia principalmente con señales apoptóticas inducidas por TNF- α ; mientras que TNFR2 se ha relacionado con efectos proliferativos a través de la activación de moléculas como NF κ B o AP-1 por parte de TNF- α [134,135]. En relación a los receptores de TNF- α , tanto los niveles de TNFR1 como de TNFR2 aumentaron en endometrios de pacientes Obesas con respecto a las Delgadas; mientras que el contenido de TNFR2 fue mayor en Obesas-SOP en comparación con el de TNFR1 en estos mismos tejidos. Esta mayor expresión de TNFR2 endometrial podría explicar el mayor porcentaje de células vivas observados en los ensayos de viabilidad, cuando las células fueron tratadas con TNF- α *versus* cultivos en condiciones basales.

Por otra parte, estudios sobre obesidad y resistencia a la insulina han identificado a TNFR2 y NF κ B como los principales efectores de TNF- α para inducir efectos inflamatorios en diversos sistemas [84,85,133,136]. Teniendo en cuenta que en nuestro estudio el único grupo que presenta hiperinsulinemia e hiperandrogenemia son las mujeres Obesas-SOP, es posible que cuando ambas condiciones están presentes, la expresión de TNF- α / TNFR2 y la activación de NF κ B aumenten significativamente, lo que sugiere un efecto sobre el estado pro-inflamatorio en estas mujeres y sobre la señalización de la

insulina. Nuestros resultados concuerdan con lo anterior dado que en endometrios de mujeres Obesas-SOP en relación a los otros grupos de estudio, existe mayor contenido nuclear de la subunidad p65 de NFκB, además de mayores niveles de p-IKK, quinasa que participa en la activación de NFκB.

La relación entre NFκB con estados de resistencia a la insulina e inflamación está apoyada por numerosas investigaciones. Estudios realizados en ratones obesos con una dieta alta en grasas, muestran gran actividad de NFκB hepática [85]. Además, NFκB se ha relacionado con resistencia a la insulina inducida por altas concentraciones de fructosa en la sangre (administrada comúnmente en la dieta actual como sacarosa), por un aumento de ácidos grasos libres en circulación u otros factores inherentes a la obesidad [84]. Por otro lado, se ha establecido la participación de NFκB en etapas iniciales y posteriores de la inflamación, siendo activado por especies reactivas de oxígeno u otros elementos relacionados con estrés y/u obesidad y una vez activado, como ya se ha mencionado, puede promover la expresión de citoquinas pro-inflamatorias [137]. De forma interesante, trabajos realizados en cultivos primarios de células estromales de endometrio humano han demostrado que el tratamiento con heparina puede inhibir la activación de NFκB inducido por TNF-α en estas células, lo que podría significar un posible tratamiento para mujeres con fallas implantacionales relacionadas con alteraciones en la función normal del endometrio [138].

Estos antecedentes postulan a NFκB como molécula *link* entre un estado inflamatorio y una condición de insulino-resistencia periférica, ambos factores asociados a obesidad, en el que no sólo existe un aumento en la secreción de citoquinas como TNF-α, sino que también existe un aumento en la liberación de AGL a la sangre; dicho aumento es producto de una mayor lipólisis del tejido. Estos AGL podrían actuar en tejidos distantes activando moléculas como NFκB [139,140], lo que a la vez induciría la expresión de moléculas que afectan negativamente la señalización de insulina, creando un círculo visioso, favoreciendo un estado de resistencia a la insulina en tejidos periféricos, por ejemplo en el endometrio [84,137]. Otro posible mecanismo que no es excluyente al mencionado anteriormente, es que la activación de NFκB, ya sea inducido por la alta presencia de TNF-α en endometrios de mujeres Obesas-SOP o por factores externos relacionados con el anormal funcionamiento del tejido adiposo en obesidad, inhiban la expresión de adiponectina o moléculas relacionadas con la captación de glucosa, como GLUT-4 [36,68,75,108].

Para esto y con el fin de determinar el efecto directo de TNF-α sobre moléculas de la vía de adiponectina y sobre su propia vía canónica, se utilizó un modelo *in vitro* de células estromales endometriales humanas sometidas a una condición hiperandrogénica e hiperinsulínica, condiciones presentes en mujeres hiperinsulinémicas con SOP. Además, se determinó el efecto de NFκB inducido por TNF-α sobre los niveles de expresión de adiponectina y el efecto de la citoquina sobre la capacidad de captar glucosa por parte de estas células

endometriales. Un aspecto relevante del trabajo fueron los tiempos de tratamientos usados en los ensayos *in vitro*. Considerando que un gran número de estudios que evalúan el efecto de TNF- α en diversas líneas celulares, se realizan a tiempos cortos de tratamiento (15, 30 o 60 minutos) [70-72], resulta interesante el hecho que en este trabajo se observen a las 24 horas de estímulo la mayoría de los cambios con respecto a la señalización de adiponectina y de moléculas de la vía canónica de TNF- α , mientras que a las 48 horas de estímulo recién podemos observar efectos sobre la señalización de insulina y una disminución significativa en la capacidad de captar glucosa por parte de este tipo celular (T-HESC), lo que podría estar indicando un mecanismo secuencial inducido por TNF- α para generar resistencia a la insulina en células estromales endometriales humanas en cultivo.

Con respecto a los resultados, lo observado en el modelo *in vitro* son concordantes con lo obtenido en los tejidos, dado que en condiciones hiperandrogénicas / hiperinsulínicas, las células presentan menor expresión de adiponectina y moléculas asociadas a su vía de señalización. Además, la adición de TNF- α , usado como marcador de obesidad, también disminuye la expresión de estas moléculas (adiponectina, AdipoR1, AdipoR2, APPL1 y p-AMPK); mientras que, en la mayoría de las observaciones, la adición simultánea de los tres estímulos (insulina / testosterona / TNF- α) mostró el mismo efecto en la disminución de la señalización de adiponectina. Lo anterior sugiere que en endometrios de Obesas-SOP, tanto el SOP como la obesidad,

son factores importantes capaces de alterar de forma independiente la acción de insulina y por lo tanto, el metabolismo glucosídico del endometrio.

Además, los ensayos *in vitro* mostraron que TNF- α es capaz de favorecer la activación de su propia vía canónica, aumentando la expresión de sus receptores y el contenido proteico total y nuclear de la subunidad p65 de NF κ B, además de disminuir I κ B, molécula inhibidora de NF κ B. El uso del antioxidante e inhibidor de NF κ B, PDTC, mostró por primera vez que TNF- α es capaz de disminuir los niveles proteicos de adiponectina a través de la activación de NF κ B en células estromales endometriales humanas sometidas o no a condiciones hiperandrogénicas e hiperinsulínicas, condiciones presentes en mujeres Obesas-SOP. No fue posible determinar si la disminución, inducida por TNF- α , de GLUT-4 en estas células es a través de la actividad de NF κ B; sin embargo, la presente investigación aporta la evidencia de que la disminución de GLUT-4 previamente observada en trabajos de nuestro laboratorio en endometrios de mujeres obesas e hiperinsulínicas con SOP [28], puede ser el resultado de los altos niveles de TNF- α presente en estos tejidos. El mismo estudio mostró que estos menores niveles de GLUT-4 pueden ser restablecidos con el tratamiento de metformina [28].

Con respecto a los ensayos de viabilidad, se puede inferir que TNF- α aumenta la proliferación de estas células o inhibe la apoptosis celular. De forma interesante, trabajos previos del laboratorio indican que endometrios de mujeres obesas con SOP muestran mayores niveles de CDK2 nuclear, aumento de AKT

fosforilado (p-AKT S473), una elevada expresión de Ras y un aumento de p27 en el citoplasma, lo que potencialmente podrían proporcionar una oportunidad para que las células del endometrio pierdan control sobre el ciclo celular y en una etapa posterior, convertirse en células hiperplásicas [12]. Por lo tanto, TNF- α no sólo podría afectar el metabolismo glucosídico del tejido, sino que además, podría inducir vías proliferativas a través de AKT, que explicarían el mayor riesgo de presentar hiperplasia endometrial en mujeres obesas con SOP. Esto es apoyado por un estudio que indica que TNF- α secretado por células adiposas induce la proliferación de células endometriales humanas co-cultivadas con adipocitos humanos [141]. De manera interesante, estudios usando cultivos primarios de células estromales endometrióticas humanas tratados con PDTC muestran que el compuesto es capaz de frenar el efecto proliferativo inducido por citoquinas pro-inflamatorias e incluso induce apoptosis en estas células [96], además de inhibir la expresión de moléculas pro-inflamatorias en un modelo *in vivo* de ratas tratadas con lipopolisacarido [97], lo que postula a esta molécula antioxidante como posible modulador terapéutico de los efectos de citoquinas pro-inflamatorias que actúen a través de NF κ B, como es TNF- α .

En el contexto metabólico del endometrio patológico, el aumento en la activación de p65-NF κ B en tejidos provenientes de mujeres Obesas-SOP, podría ser la causa de fallas de la acción de la insulina. Lo anterior está de acuerdo con los altos niveles de TNF- α y de TNFR2 en estos tejidos, resultados

que concuerdan con lo obtenido en los ensayos *in vitro*. De este modo, NFκB activo puede promover la expresión de genes que codifican para citoquinas pro-inflamatorias, como TNF-α e IL-6. Esto último podría agravar y perpetuar un estado de inflamación leve pero crónico en el endometrio. Además, la actividad de NFκB inducida por TNF-α podría participar en la transcripción del gen de adiponectina (o GLUT-4) , probablemente a través de la regulación positiva de co-represores [74,142], resultando en una defectuosa señalización de insulina y menor capacidad de captar la glucosa, como se observan en nuestros resultados.

Con respecto a esto último, se determinó el efecto de TNF-α sobre la captación de glucosa en la línea celular de estroma endometrial T-HESC, expuestas a un ambiente hiperandrogénico e hiperinsulínico similar al encontrado en el grupo de mujeres Obesas-SOP. La concentración suprafisiológica de andrógenos provocó la disminución de la captación de glucosa, hallazgo que se ha comprobado en diversos estudios de nuestro laboratorio [27,30]. En efecto, la testosterona disminuye la activación y expresión de efectores río abajo de la señalización de insulina, mientras que el co-tratamiento con testosterona / insulina revierte en parte este efecto. En el presente trabajo y en otros estudios de nuestro laboratorio, hemos demostrado que células T-HESC responden al tratamiento con insulina, aumentando significativamente la captación de glucosa [27,30]. Sin embargo, con los co-tratamientos, la insulina no fue capaz de revertir el efecto negativo de la testosterona o TNF-α sobre la captación de

glucosa. Por lo tanto, es probable que factores presentes en el ambiente del endometrio patológico, como TNF- α , alteren la acción de la insulina. En relación a esto último, TNF- α solo o en conjunto con testosterona e insulina, también fue capaz de disminuir la captación de glucosa en estas células, lo que corrobora el efecto negativo de la citoquina sobre la señalización de insulina, como se describe en otros estudios [143,144]. Sin embargo, no se observa un efecto exacerbado, lo que sugiere que el efecto negativo sobre la acción de la insulina de testosterona y TNF- α sea probablemente a través de distintas vías. Relacionado con lo anterior, el mayor ambiente inflamatorio en endometrios de mujeres Obesas-SOP y los elevados niveles de TNF- α no descartan la participación de otras citoquinas como IL-6, que también es elevada en suero de pacientes obesos y tiene un efecto negativo sobre la acción de la insulina [6,42,81]. De forma interesante, IL-6 inhibe la expresión de adiponectina y su propia expresión puede ser inducida por TNF- α / NF κ B [82,137]. La participación de IL-6 en las fallas de la acción de insulina en endometrios de pacientes Obesas-SOP se hace relevante si se consideran los elevados niveles séricos de IL-6 en pacientes Obesas y Obesas-SOP y la mayor expresión de IL-6 endometrial en mujeres Obesas con y sin SOP y Delgadas-SOP *versus* el grupo de Delgadas. Sin embargo, los niveles proteicos endometriales del receptor de IL-6 (IL-6R), no mostraron cambios en ninguno de los grupos analizados, lo que no descarta un efecto de la citoquina sobre la acción de la insulina en el tejido.

Por lo tanto, la alteración en la secreción de hormonas del tejido adiposo o adipocinas como TNF- α / adiponectina, son capaces de regular la homeostasis de la glucosa mediando el *crosstalk* no sólo entre el tejido adiposo y órganos metabólicos claves como el hígado, páncreas o músculo, sino que tejidos de importancia reproductiva como es el endometrio, pudiendo ser ésto un componente crítico para el desarrollo de alteraciones en la fertilidad presente en pacientes Obesas con SOP.

Hasta ahora, los resultados sugieren que el efecto de TNF- α sobre la señalización de insulina en endometrios, es a través de una disminución en la expresión de adiponectina y moléculas de su vía de señalización, además de una disminución de la expresión de GLUT-4. Esto lo puede realizar a través de la sobre-expresión de su propia vía de señalización (TNF- α / TNFR2 / NF κ B), afectando negativamente la acción de la insulina en endometrios expuestos a mayores concentraciones de TNF- α , como es el endometrio proveniente de mujeres Obesas-SOP.

Diversos mecanismos se han descrito para explicar la causa de una condición insulino-resistente en varios modelos de estudio. Cuando existe un exceso de nutrientes, se generan una serie de señales que resultan factores de riesgos para inducir resistencia a la insulina y diabetes, mientras que otras señales pueden mitigar este efecto, como la activación de AMPK por adiponectina, como ya fue mencionado. Entre las moléculas que participan se ha descrito a mTOR que consecuentemente activa a S6K, la que favorece la inactivación de

IRS1 disminuyendo la señalización de insulina en la célula [126]. Por otro lado, modelos *in vitro* de resistencia a la insulina han demostrado la participación de otras quinasas, las que pueden ser activadas por distintos factores como exceso de nutrientes, estrés oxidativo o moléculas provenientes del tejido adiposo patológico [70-72,85]. Con respecto a esto, trabajos realizados usando modelos *in vitro* de resistencia a la insulina inducida por TNF- α en pre-adipocitos, han demostrado que TNF- α afecta directamente la señalización de insulina, alterando las fosforilaciones activantes en residuos de tirosinas y favoreciendo las fosforilaciones inactivantes en residuos de serina de IRS1. De forma interesante, este mecanismo es a través de la activación de S6K o JNK, inducida por TNF- α [70,71].

Respecto a esto último, la presente investigación mostró que el co-tratamiento de cultivos T-HESC con insulina / testosterona / TNF- α , aumenta los niveles de IRS1 fosforilado en el residuo de serina (p-IRS1 S270), indicando que efectivamente TNF- α es capaz de afectar directamente la señalización de insulina río abajo del receptor de insulina. De manera interesante, estos resultados se apoyan con experimentos realizados en nuestro laboratorio en el marco de la investigación de Cristian Poblete (tesista del Programa de Magister en Biología de la Reproducción de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile), los cuales muestran menores niveles de IRS1 activo (p-IRS1 Y612) y mayores niveles de IRS1 inactivo (p-IRS1 S270) en endometrios provenientes de mujeres Obesas-SOP con respecto a endometrios de mujeres Delgadas u

Obesas. Además, se determinó que TNF- α aumenta significativamente el contenido de S6K activo, mientras que el tratamiento con insulina en conjunto con testosterona, lo disminuyen. De manera interesante, esta disminución es parcialmente revertida en presencia de la citoquina, sugiriendo que factores como la obesidad, que pueden inducir un aumento de TNF- α , también podrían exacerbar una condición de insulino-resistencia a través de la activación de S6K y la consecuente inactivación de IRS1.

Por otro lado, la condición de insulino-resistencia en pacientes Obesas con SOP también podría ser explicada por los elevados niveles de p-JNK inducida por TNF- α , aumento que se evidenció claramente en cultivos tratados simultáneamente con las tres moléculas (insulina, testosterona y TNF- α). Estos resultados indican que el aumento de p-IRS1 S270 inducido por TNF- α , posiblemente es a través de la activación de S6K y/o JNK, siendo esta última la que presenta una mayor activación en condiciones hiperandrogénicas e hiperinsulínicas sumado a una alta concentración de TNF- α .

Un aspecto importante del presente estudio fueron los altos niveles de p-AKT S473, tanto en cultivos tratados con TNF- α , insulina más testosterona o co-tratamientos con los tres estímulos, lo cual sugiere la participación de AKT sobre el metabolismo endometrial independiente de su rol en la cascada de señalización de insulina. Esto último se relaciona con trabajos previos del laboratorio, que asocian un aumento de la activación de AKT (p-AKT S473) con un mayor riesgo de hiperplasia de células endometriales, observado en

endometrios de mujeres obesas con SOP, como ya fue mencionado [12]. De manera relevante, el presente trabajo sugiere que el mayor riesgo de hiperplasia endometrial que presentan estas pacientes, pudiese estar dado de forma parcial, por el aumento en los niveles de TNF- α en el tejido, probablemente generado por una condición pro-inflamatoria inducida por la obesidad.

También, la activación de AKT se ha relacionado con resistencia a la insulina bajo ciertas condiciones experimentales. Con respecto a ésto, estudios muestran que la activación de AKT inducida por TNF- α se relaciona con la consecutiva fosforilación en serina e inactivación de IRS1 observado en modelos *in vitro* de resistencia a la insulina [71]. Otros estudios muestran que la activación de AKT es inducida por altas dosis de TNF- α y en tiempos cortos de tratamiento [145]; sin embargo, el presente trabajo demostró que 10 ng/mL de TNF- α son suficientes para inducir la activación de AKT en estas células a las 24 h de tratamiento. Estos resultados sugieren que AKT podría tener un rol más relevante en la resistencia a la insulina inducida por TNF- α . También, se ha observado que la resistencia a la insulina inducida por TNF- α , puede ser independiente de la activación de mTOR y dependiente de quinasas de la familia de las IKKs, las que también pueden activar a S6K río abajo de TNF- α [71]. Esto toma relevancia, si consideramos los altos niveles de IKK activo en endometrios de mujeres Obesas-SOP observados en este trabajo.

Se sabe que insulina puede regular su propia vía de señalización, mientras que concentraciones suprafisiológicas de la hormona pueden inducir una condición de resistencia a la insulina, lo que se ha relacionado con el aumento de IRS1 fosforilado por la quinasa S6K [126,146]. Con respecto a nuestro modelo *in vitro*, en general, los estímulos con insulina mostraron una regulación positiva de su propia vía de señalización, ésto observado por el aumento significativo de la captación de glucosa, los altos niveles de AKT fosforilado y los bajos niveles de p-S6K cuando se estimuló con insulina más testosterona. Esto tiene relación con otro estudio realizado en cultivos de células musculares de rata, que muestran que la misma concentración de insulina (100 nM) regula positivamente su vía de señalización, mientras que la condición de insulino resistencia sólo se observa cuando se pretratan las células con testosterona por 16 h [147]. En el mismo trabajo, y en concordancia con lo anterior, se observa que células pre-tratadas con dosis menores de 100 nM de testosterona, muestran un aumento de la activación de mTOR y S6K, mientras que con dosis del andrógeno mayores a 100 nM, este efecto disminuye [147]. Esto sugiere que en las condiciones experimentales usadas en este trabajo, prevalece la acción de insulina actuando a través de su vía canónica por sobre la acción negativa de testosterona sobre la vía de señalización de insulina, tal como se observa en trabajos previos del laboratorio [27,30]. Esto está de acuerdo con lo obtenido, en que bajos niveles de p-S6K y p-JNK son observados en presencia de insulina más testosterona, lo que sugiere que los cambios observados

cuando se co-estimuló con insulina, testosterona y TNF- α en el modelo *in vitro* son principalmente atribuibles al efecto negativo de TNF- α sobre moléculas de la vía de señalización de insulina. Por lo tanto, ciertas dosis de testosterona parecen elevar la fosforilación en serina de IRS1, de forma similar que TNF- α , AGL o aminoácidos, entre otros factores [147].

Los resultados obtenidos a partir del modelo *in vitro* sugieren que altos niveles de TNF- α pueden afectar negativamente la señalización de insulina, ya sea de forma indirecta, inhibiendo la expresión de adiponectina y moléculas de la vía de señalización de insulina, o de forma directa afectando la activación de IRS1 río abajo del receptor de insulina, y de esta forma alterando el metabolismo glucosídico en células endometriales humanas.

En conclusión, los datos del presente trabajo sugieren que el hiperandrogenismo y la hiperinsulinemia presente en mujeres con SOP, tienen un impacto sobre la función endometrial, a través de la alteración de las vías de señalización de adiponectina e insulina, lo que potencialmente podría afectar el proceso de implantación en este endometrio patológico. Además, un mayor ambiente inflamatorio del tejido, observado en mujeres delgadas u obesas con SOP, podría exacerbar las fallas en el metabolismo endometrial a través del efecto negativo de TNF- α sobre la acción de la insulina (Figura 46). En conjunto, estos hallazgos pueden explicar en parte, las fallas de fertilidad presente en mujeres hiperinsulínicas con SOP.

ENDOMETRIO DE MUJERES OBESAS-SOP

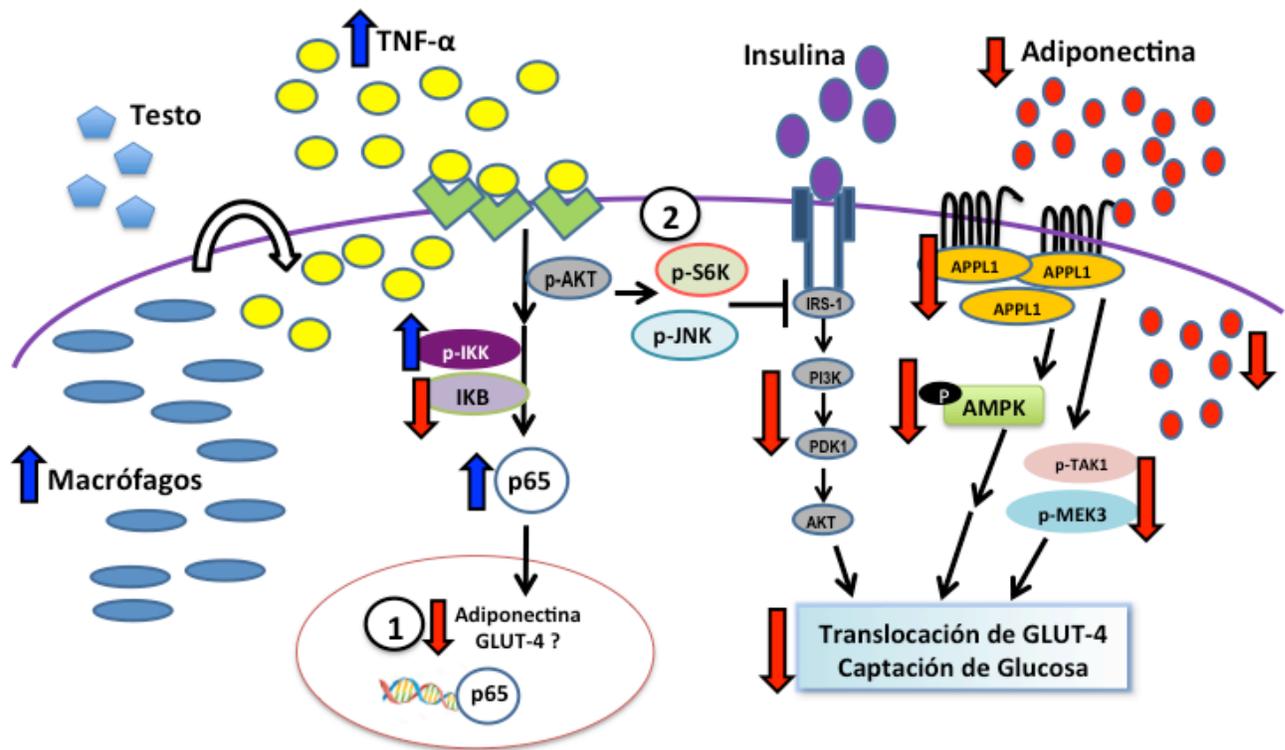


Figura 46. Esquema que muestra la interacción entre TNF- α , Adiponectina e Insulina en endometrios de mujeres Obesas e Hiperinsulínicas con Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP). El modelo propuesto es en base a evidencias entregadas en este trabajo de investigación y explica los posibles factores involucrados en la resistencia a la insulina presente en endometrios de mujeres Obesas con SOP. La condición de obesidad aumenta el ambiente pro-inflamatorio en estos tejidos y la producción de citoquinas que regulan negativamente la señalización de insulina, como es TNF- α . TNF- α puede sobre-expresar y activar su propia vía de señalización que a su vez puede inhibir la señalización de insulina de dos formas: **1)** Activando a NF κ B para que se transloque al núcleo y disminuya la expresión de adiponectina / GLUT-4; **2)** Activando quinasas, como S6K y/o JNK, que inducen fosforilaciones inactivantes en IRS1 afectando la señalización río abajo del receptor de insulina. Ambas formas (1 y 2), inducidas por TNF- α , provocan una inhibición de la señalización de la insulina con la consecuente disminución en la captación de glucosa lo que se traduce a fallas en el metabolismo glucosídico del tejido endometrial expuesto a condiciones propias del SOP y de la obesidad. Esta alteración en la homeostásis energética del endometrio podría explicar las fallas reproductivas observadas en estas mujeres.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Diamanti-Kandarakis E. Polycystic ovarian syndrome: pathophysiology, molecular aspects and clinical implications. *Expert Rev Mol Med* 2008; 10:e3.
2. Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, Azziz R. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7(4): 219-31.
3. The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycysticovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 2004; 19: 41-47.
4. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale H, Futterweit W, Janssen OE, *et al.* Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(11): 237-245.
5. Diamanti-Kandarakis E, Papavasiliou AG. Molecular mechanism of insulina resistance in polycystic ovary syndrome. *Trends Mol Med* 2006; 12 (7): 324-32.
6. Messinis IE, Messini CI. Obesity in PCOS and Infertility. In *Obesity: A ticking time bomb for reproductive health*. First Edit 2013; pp. 99-116.
7. Duleba AJ, Dokras A. Is PCOS an inflammatory process?. *Fertil Steril* 2012; 97(1): 7–12.

8. Svendsen PF, Christiansen M, Hedley PL, Nilas L, Pedersen SB, Madsbad S. Adipose expression of adipocytokines in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2012; 98(1): 235-41.
9. Homburg R. Polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2008; 22: 261-274.
10. Cheung AP. Ultrasound and menstrual history in predicting endometrial hyperplasia in polycystic ovary syndrome and cancer. *Obstet Gynecol* 2001; 7: 522-525.
11. Giudice LC. Endometrium in PCOS: implantation and predisposition to endocrine cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006; 20:235–244.
12. Villavicencio A, Goyeneche A, Telleria C, Bacallao K, Gabler F, Fuentes A, Vega M. Involvement of Akt, Ras and cell cycle regulators in the potential development of endometrial hyperplasia in women with polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Oncol* 2009; 115: 102–107.
13. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1950; 1: 3-25.
14. Frolova AI, Moley KH. Glucose transporters in the uterus: an analysis of tissue distribution and proposed physiological roles. *Reproduction* 2011; 142 (2): 211-20.
15. Mitchell A, Fantasia HC. Understanding the Effect of Obesity on Fertility Among Reproductive-Age Women. *Nurs Womens Health* 2016; 20(4): 368-76.

16. Maliqueo M, Clementi M, Gabler F, Johnson M, Palomino A, Sir Peterman T, Vega M. Expression of steroid receptors and proteins related to apoptosis in endometrial of women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2003; 80: 812-819.
17. Quezada S, Avellaira C, Johnson MC, Gabler F, Fuentes A, Vega M. Evaluation of steroid receptors, coregulators, and molecules associated with uterine receptivity in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2006; 85: 1017-1026.
18. Avellaira C, Villavicencio A, Bacallao K, Gabler F, Wells P, Romero C, Vega M. Expression of molecules associated with tissue homeostasis in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome. *Hum Rep* 2006; 21(12): 3116-3121.
19. Leon L, Bacallao K, Gabler F, Romero C, Valladares L, Vega M. Activities of steroid metabolic enzymes in secretory endometria from untreated women with Polycystic Ovary Syndrome. *Steroids* 2008; 73: 88-95.
20. Bacallao K, Leon L, Gabler F, Soto E, Romero C, Valladares L, Vega M. In situ estrogen metabolism in proliferative endometria from untreated women with polycystic ovarian syndrome with and without endometrial hyperplasia. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 110: 163–169.
21. Plaza F, Gabler F, Romero C, Vantman D, Valladares L, Vega M. The conversion of dehydroepiandrosterone into androst-5-ene-3 β ,17 β -diol (androstenediol) is increased in endometria from untreated women with polycystic ovarian síndrome. *Steroids* 2010; 75: 810-817.

22. Fornes R, Ormazabal P, Rosas C, Gabler F, Vantman D, Romero C, Vega M. Changes in the expression of insulin signaling pathway molecules in endometria from polycystic ovary syndrome women with or without hyperinsulinemia. *Mol Med* 2010; 16(3-4): 129-36.
23. Rosas C, Gabler F, Vantman D, Romero C, Vega M. Levels of Rabs and WAVE family proteins associated to translocation of GLUT4 to the cell surface in endometria from control and hyperinsulinemic PCOS women. *Hum Reprod* 2010; 25(11): 2870-7.
24. Kohan K, Carvajal R, Gabler F, Vantman D, Romero C, Vega M. Role of the transcriptional factors FOXO1 and PPARG on gene expression of SLC2A4 in endometrial tissue from women with polycystic ovary syndrome. *Reproduction* 2010; 140(1): 123-31.
25. Rivero R, Garin C, Ormazabal P, Silva A, Carvajal R, Gabler F, Romero C, Vega M. Protein expression of PKCZ (protein kinase C Zeta), Munc18c, and Syntaxin-4 in the insulin pathway in endometria of patients with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Reprod Biol Endocrinol* 2012; 10: 17.
26. Ormazabal P, Romero C, Gabler F, Quest AFG, Vega M. Decreased Phosphorylation of Y 14 Caveolin-1 in Endometrial Tissue of Polycystic Ovary Syndrome Patients may be Related with an Insulin Resistant State in this Tissue. *Horm Metab Res* 2013; 45: 291–296.
27. Ormazabal P, Romero C, Quest AFG, Vega M. Testosterone Modulates the Expression of Molecules Linked to Insulin Action and Glucose Uptake in Endometrial Cells. *Horm Metab Res* 2013; 45: 1–6.

28. Carvajal R, Rosas C, Kohan K, Gabler F, Vantman D, Romero C, Vega M. Metformin augments the levels of molecules that regulate the expression of the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the endometria of hyperinsulinemic PCOS patients. *Hum Reprod* 2013; 28(8): 2235-2244.
29. García V, Oróstica L, Poblete C, Rosas C, Astorga I, Romero C, Vega M. Endometria from obese PCOS women with hyperinsulinemia exhibit altered adiponectin signaling. *Horm Metab Res* 2015; 47: 901-909.
30. Rosas C, Oróstica ML, Poblete C, Carvajal R, Gabler F, Romero C, Lavandero S, Vega M. Hyperandrogenism Decreases GRP78 Protein Level and Glucose Uptake in Human Endometrial Stromal Cells. *Reprod Sci* 2016; 23(6): 761-70.
31. Oróstica L, Astorga I, Plaza-Parroquia F, Vera C, García V, Carvajal R, Gabler F, Romero C, Vega M. Proinflammatory environment and role of TNF- α in endometrial function of obese women having polycystic ovarian syndrome (PCOS). *Int J Obes* 2016: 1-8.
32. Who Global Report. Preventing Chronic Diseases a Vital Investment. Geneva, Switzerland (2005).
33. National Health, Lung and Blood Institute Clinical Guidelines on the identifications, evaluations and treatment of overweight and obesity in adult. The evidence report. *Obes Res* 1998; 6(suppl 2): S51-S290.
34. Jiz H, Lubetkin EI. The statewide burden obesity, smoking, low income and chronic diseases in the United States. *J Public Health* 2009; 31: 496-505.

35. Vio I, Albala C, Kain J. Nutrition transition in Chile revisited: mid-Term evaluation of obesity goals for the period 2000-2010. *Public Health Nutr* 2008; 11: 405-412.
36. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259(5091): 87-91.
37. Hauner H, Petruschke T, Russ M, Röhrig K, Eckel J. Effects of tumour necrosis factor α (TNF α) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. *Diabetologia* 1995; 38(7): 764-771.
38. Weisberg SP, Mccann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1796–1808.
39. Lee YH, Nair S, Rousseau E, Allison DB, Page GP, Tataranni PA, *et al.* Microarray profiling of isolated abdominal subcutaneous adipocytes from obese vs non-obese. Pima Indians: Increased expression of inflammation-related genes. *Diabetologia* 2005; 48: 1776-1783.
40. Wang B, Jenkins JR, Trayhurn P. Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: integrated response to TNF- α . *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E731–E740.
41. Wang B and Trayhurn P. Acute and prolonged effects of TNF- α on the expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture. *Eur J Physiol* 2006; 452: 418–427.

42. Fulghesu AM, Sanna F, Uda S, Magnini R, Portoghese E, Batetta B. IL-6 serum levels and production is related to an altered immune response in polycystic ovary syndrome girls with insulin resistance. *Mediators Inflamm* 2011; Article ID: 389317.
43. Rasmussen MS, Lihn AS, Pedersen SB, Bruun JM, Rasmussen M, Richelsen B. Adiponectin receptors in human adipose tissue: effects of obesity, weight loss, and fat depots. *Obesity* 2006; 14(1): 28-35.
44. 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. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002; 8: 1288–1295.
45. Kiddy DS, Sharp PS, White DM, Scanlon MF, Mason HD, Bray CS, *et al.* Differences in clinical and endocrine features between obese and non-obese subjects with polycystic ovary syndrome: an analysis of 263 consecutive cases. *Clin Endocrinol* 1990; 32: 213-220.
46. Clark AM, Ledger W, Galletly C, Tomlinson L, Blaney F, Wang X, *et al.* Weight loss results in significant improvement in pregnancy and ovulation rates in anovulatory obese women. *Hum Reprod* 1995; 10: 2705-2712.
47. Deepa SS and Dong LQ. APPL1: role in adiponectin signaling and beyond. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296(1): E22-36.
48. 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. Paracrine regulation of fat cell formation in bone marrow cultures via adiponectin and prostaglandins. *J Clin Invest* 2002; 109: 1303-1310.

49. McDonald EA and Wolfe MW. Adiponectin attenuation of endocrine function within human term trophoblast cells. *Endocrinology* 2009; 150: 4358-4365.

50. Fang X, Palanivel R, Cresser J, Schram K, Ganguly R, Thong FS, Tunei J, Xu A, Abel ED, Sweeney G. An APPL1-AMPK signaling axis mediates beneficial metabolic effects of adiponectin in the heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 299(5): E721-9

51. Takemura Y, Osuga Y, Yamauchi T, Kobayashi M, Harada M, Hirata T, Morimoto C, *et al.* Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium. *Endocrinology* 2006; 147(7): 3203-3210.

52. Lustig Y, Hemi R, Kanety H. Regulation and Function of Adiponectin Receptors in Skeletal Muscle (Chapter 4). In: *Vitamins and Hormones*. Elsevier Inc. 2012; Volume 90: 95-123.

53. Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, *et al.* Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 2003; 278: 9073–9085.

54. Pierre P, Froment P, Nègre D, Ramé C, Barateau V, Chabrolle C, Lecomte P, *et al.* Role of adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2, in the steroidogenesis of the human granulosa tumor cell line, KGN. *Hum Reprod* 2009; 24(11): 2890-2901.

55. Akingbemi BT. Adiponectin Receptors in Energy Homeostasis and Obesity Pathogenesis. In: Progress in Molecular Biology and Translational Science. Elsevier Inc 2013; Volume 114: 317-342.
56. Guerre-Millo M. Adiponectin: an update. Diabetes Metab 2008; 34: 12-18.
57. Mirza SS, Shafique K, Shaikh AR, Khan NA, Qureshi MA. Association between circulating adiponectin levels and polycystic ovarian syndrome. J Ovarian Res 2014; 7: 1-18.
58. Miaczynska M, Christoforidis S, Giner A, Shevchenko A, Uttenweiler-Joseph S, Habermann B, Wilm M, Parton RG, Zerial M. APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. Cell 2004; 116: 445–456.
59. Toulis KA, Goulis DG, Farmakiotis D, Georgopoulos NA, Katsikis I, Tarlatzis BC, *et al.* Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and a meta-analysis. Hum Reprod Update 2009; 15: 297-307.
60. Kamal M. M., Hamed H. O., Salama R. H. Adiponectin and Adiponectin Receptor-1 in Patients with Polycystic Ovarian Syndrome: Impact of Insulin Sensitization by Metformin. Ibmossina J Med BS 2013; 5(2): 52-61.
61. Vilcek J and Lee T. Tumor Necrosis Factor. J Biol Chem 1991; 266(12): 7313-7316.
62. Haider S and Knöfler M. Europe PMC Funders Group Human Tumour Necrosis Factor: Physiological and Pathological Roles in Placenta and

Endometrium. Placenta 2010; 30(2): 111-123.

63. Pass HI, Mew D, Pass HA, Temeck BK. The macrophage, TNF and other cytokines. Chest Surg Clin N Am 1995; 5: 73-90.

64. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachetin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. Cell 1998; 53: 45-53.

65. Wajant H, Pfizenmayer K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. Cell Death Differ 2003; 10: 45-65.

66. Chen G and Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. Science 2002; 296: 1634-1635.

67. Yui J, Hemmings D, Garcia-Iloret M, Guilbert L. Expression of the Human p55 and p75 Tumor Necrosis Factor Receptors in Primary Villous Trophoblasts and Their Role in Cytotoxic Signal Transduction. Biol Reprod 1996; 55: 400-409.

68. Sethi JK and Hotamisligil GS. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. Semi Cell Dev Biol 1999; 10(1): 19-29.

69. Carbo N, Costelli P, Tessitore L, Bagby GJ, Lopez-Soriano FJ, Baccino FM, Argiles JM. Anti-tumour necrosis factor-alpha treatment interferes with changes in lipid metabolism in a cachectic tumor model. Clin Sci 1994; 87: 349-355.

70. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor a inhibits signaling from the insulin receptor. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 4854-4858.

71. Zhang J, Gao Z, Yin J, Quon MJ, Ye J. S6K Directly Phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to Promote Insulin Resistance in Response to TNF- α Signaling through IKK2. *J Biol Chem* 2008; 283(51): 35375-35382.
72. Gual P, Marchand-Brustel YL, Tanti JF. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 2005; 87: 99-109.
73. Diamanti-Kandarakis E, Paterakis T, Kandarakis HA. Indices of low-grade inflammation in polycystic ovary syndrome. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1092: 175-186.
74. Liu M and Liu F. Transcriptional and post-translational regulation of adiponectin. *Biochem J* 2009; 425: 41–52.
75. Chazenbalk G, Trivax B, Yildiz B, Bertolotto C, Mathur R, Heneidi S, Azziz R. Regulation of Adiponectin Secretion by Adipocytes in the Polycystic Ovary Syndrome: Role of Tumor Necrosis Factor- α . *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 935-942.
76. Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M, González F. Circulating inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: a systematic review and metaanalysis. *Fertil Steril* 2011; 95(3): 1048-58.
77. Escobar-Morreale H, Calvo R, Sancho J, San Millan J. TNF- α and Hyperandrogenism: A Clinical, Biochemical and Molecular Genetic Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(8): 3761–3767.
78. Peral B, San Millán J, Castello R, Moguetti P, Escobar-Morreale H. The

methionine 196 arginine polymorphism in exon 6 of the TNF receptor 2 gene (TNFRSF1B) is associated with the polycystic ovary syndrome and hiperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(8): 3977–3983.

79. Erdogan M, Karadeniz M, Berdeli A, Alper G, Caglayan O, Yilmaz C. The relationship of the interleukin-6 -174G>C gene polymorphism with oxidative stress markers in Turkish polycystic ovary syndrome patients. *J Endocrinol Invest* 2008; 31: 624-629.

80. Aguila LF, Claffey KP, Kirwan JP, Aguila D, Luis F, Claffey KP, John P. TNF- α impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 276: E849-E855.

81. Vgontzas AN, Trakada G, Bixler EO, Lin H-M, Pejovic S, Zoumakis E, Chrousos GP, *et al.* Plasma interleukin 6 levels are elevated in polycystic ovary syndrome independently of obesity or sleep apnea. *Metabolism* 2006; 55(8): 1076-82.

82. Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J, Paschkea R. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 301: 1045–1050.

83. Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand P, Bergamini G, Croughton K, Cruciat C, *et al.* A physical and functional map of the human TNF- α /NF- κ B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol* 2004; 6(2): 97-105.

84. Rutledge A and Adeli K. Fructose and the Metabolic Syndrome: Pathophysiology and Molecular Mechanisms. *Nutr Rev* 2007; 65(6): 13-23.

85. Cai D, Yuan M, Frantz D, Melendez P, Hansen L, Lee J, Shoelson S. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nat Med* 2005; 11(2): 183-190.
86. Hu W, Qiao J, Yang Y, Wang L, Li R. Elevated C-reactive protein and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 157: 53-56.
87. Glinborg D, Andersen M, Richelsen B, Bruun J. Plasma monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and macrophage inflammatory protein-1a are increased in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) and associated with adiposity, but unaffected by pioglitazone treatment. *Clin Endocrinol* 2009; 71: 652–658.
88. Kim SH, Kim SR, Ihm HJ, Oh YS, Chae HD. Regulation of P21-Activated Kinase-4 by Progesterone and Tumor Necrosis Factor- α in Human Endometrium and Its Increased Expression in Advanced-Stage Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: E238–E248.
89. Islimye M, Kilic S, Zulfikaroglu E, Topcu O, Zergeroglu S, Batioglu S. Regression of endometrial autografts in a rat model of endometriosis treated with etanercept. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2011; 159: 184-189.
90. McAuley K, Mann J, Chase J, Lotz T, Shaw G. Point: HOMA--satisfactory for the time being: HOMA: the best bet for the simple determination of insulin sensitivity, until something better comes along. *Diabetes Care* 2007; 30(9): 2411-2413.

91. Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 1999; 22(9): 1462-70.
92. Krikun G, Mor G, Alvero A, Guller S, Schatz F, Sapi E, Rahman M, Caze R, Qumsiyeh M, Lockwood CJ. A Novel Immortalized Human Endometrial Stromal Cell Line with Normal Progestational Response. *Endocrinology* 2004; 145: 2291-2296.
93. Samalecos A, Reimann K, Wittmann S, Schulte HM, Brosens JJ, Bamberger AM, Gellersen B. Characterization of a novel telomerase-immortalized human endometrial stromal cell line, St-T1b. *Reprod Biol and Endocrinol* 2009; 7:76.
94. Luty M, Kwiecień E, Firlej M, Łabędź-Masłowska A, Paw M, Madeja Z, Czyż J. Curcumin augments the cytostatic and anti-invasive effects of mitoxantrone on carcinosarcoma cells in vitro. *Acta Biochim Pol* 2006; 63(3): 397–401.
95. Falini B, Flenghi L, Pileri S, Gambacorta M, Bigerna B, Durkop H *et al.* PGM1: A new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 molecule. *Am J Pathol* 1993; 142: 1359-72.
96. Zhang J, Xu Z, Zhang C, Dai H, Ji X, Wang X, Li C. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits nuclear factor-kB pathway activation, and regulates adhesion, migration, invasion and apoptosis of endometriotic stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2011; 17(3): 175–181.
97. Liu SF, Ye X, Malik AB. Inhibition of NF-kB Activation by Pyrrolidine Dithiocarbamate Prevents In Vivo Expression of Proinflammatory Genes.

Circulation 1990; 100: 1330-1337.

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

99. Tabibzadeh S, Satyaswaroop PG, von Wolff M, Strowitzki T. Regulation of TNF- α mRNA expression in endometrial cells by TNF- α and by oestrogen withdrawal. *Mol Hum Reprod* 1999; 5(12): 1141-1149.

100. Oróstica L, Rosas C, Plaza-Parrochia F, Astorga I, Gabler F, García V, Romero C, Vega M. Review: Altered Steroid Metabolism and Insulin Signaling in PCOS Endometria: Impact in Tissue Function. *Curr Pharm Des* 2016; 22: 1-11.

101. Sir-Petermann T, Echiburú B, Maliqueo M, Crisosto N, Sánchez F, Hitschfeld C, Cárcamo M, Amigo P, Pérez-Bravo F. Serum adiponectin and lipid concentrations in pregnant women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2007; 22(7): 1830-1836.

102. O'Connor A, Phelan N, Tun TK, Boran G, Gibney J, Roche HM. High-molecular-weight adiponectin is selectively reduced in women with polycystic ovary syndrome independent of body mass index and severity of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(3): 1378-1385.

103. Pangaribuan B, Yusuf I, Mansyur M, Wijaya A. Serum adiponectin and resistin in relation to insulin resistance and markers of hyperandrogenism in lean and obese women with polycystic ovary syndrome. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2011; 2(6): 235-45.

104. Yilmaz M, Bukan N, Demirci H, Oztürk C, Kan E, Ayvaz G, Arslan M. Serum resistin and adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2009; 25(4):246-52.
105. Cao H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *Journal of 475 Endocrinology* 2014; 220: T47–T59.
106. Carmina E, Orio F, Palomba S, Cascella T, Longo RA, Colao AM, Lombardi G, Lobo RA. Evidence for altered adipocyte function in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 2005; 152(3): 389-94.
107. Lacerte G, Langlois MF, Doyon M, Brown C, Carpentier AC, Hivert MF. Differential Impact of Changes in Adiposity Distribution on Insulin Resistance and Adiponectin Variations Over 4 Years in Normal Weight Young Adults. *Horm Metab Res* 2014; 46(5): 354-359.
108. Hajri T, Tao H, Wattacheril J, Marks-Shulman P, Abumrad NN. Regulation of adiponectin production by insulin: interactions with tumor necrosis factor- α and interleukin-6. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 300: E350–E360.
109. Chu MC, Cospers P, Orio F, Carmina E, Lobo RA. Insulin resistance in postmenopausal women with metabolic syndrome and the measurements of adiponectin, leptin, resistin, and ghrelin. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194(1):100-4.
110. Merki-Feld GS, Imthurn B, Rosselli M, Spanaus K. Serum concentrations of high-molecular weight adiponectin and their association with sex steroids in premenopausal women. *Metabolism* 2011; 60(2):180-5.

111. Rouen PA, Lukacs JL, Reame NE. Adipokine concentrations in nonobese women: a study of reproductive aging, body mass index, and menstrual cycle effects. *Biol Res Nurs* 2010; 12(1): 54-61.

112. Asimakopoulos B, Milousis A, Gioka T, Kabouromiti G, Gianisslis G, Troussa A, Simopoulou M, Katargari S, Tripsianis G, Nikolettos N. Serum pattern of circulating adipokines throughout the physiological menstrual cycle. *Endocr J* 2009; 56(3): 425-33.

113. Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, Dobias-Goff M, Palin MF, Murphy BD. Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. *Endocrinology* 2006; 147(11): 5178-86.

114. Bersinger NA and Wunder DM. Adiponectin isoform distribution in serum and in follicular fluid of women undergoing treatment by ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2010; 89(6): 782-8.

115. Zhou QG, Zhou M, Lou AJ, Xie D, Hou FF. Advanced oxidation protein products induce inflammatory response and insulin resistance in cultured adipocytes via induction of endoplasmic reticulum stress. *Cell Physiol Biochem* 2010; 26(4-5): 775-86.

116. Piperi C, Adamopoulos C, Dalagiorgou G, Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG. Crosstalk between advanced glycation and endoplasmic reticulum stress: emerging therapeutic targeting for metabolic diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(7): 2231-42.

117. Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, *et al.* Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and

adiponectin sensitivity. *J Biol Chem* 2004; 279: 30817-30822.

118. Civitarese AE, Jenkinson CP, Richardson D, Bajaj M, Cusi K, Kashyap S, *et al.* Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 2004; 47: 816–820.

119. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006; 116: 1784–1792.

120. Dos Santos E, Serazin V, Morvan C, Torre A, Wainer R, de Mazancourt P, Dieudonné MN. Adiponectin and leptin systems in human endometrium during window of implantation. *Fertil Steril* 2012; 97(3): 771-8.

121. 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. APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 516–523.

122. Marinho R, Ropelle ER, Cintra DE, De Souza CT, Da Silva AS, Bertoli FC, Colantonio E, D'Almeida V, Pauli JR. Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss. *J Cell Physiol* 2012; 227(7): 2917-2926.

123. Cheng KKY, Lam KSL, Wang Y, Huang Y, Carling D, Wu D, Wong C, Xu A. Adiponectin-induced endothelial nitric oxide synthase activation and nitric oxide production are mediated by APPL1 in endothelial cells. *Diabetes* 2007; 56(5):

1387-1394.

124. Cheng KK, Lam KS, Wu D, Wang Y, Sweeney G, Hoo RL, Zhang J, Xu A. APPL1 potentiates insulin secretion in pancreatic β cells by enhancing protein kinase Akt-dependent expression of SNARE proteins in mice. *Proc Natl Acad Sci* 2012; 109(23): 8919-24.

125. Astorga I, Oróstica L, Torres M, Carvajal R, Gabler F, García V, Romero C, Vega M. Relación entre obesidad y moléculas de la vía de señalización de adiponectina, (appl1/appl2) en endometriosis de mujeres hiperinsulinémicas con Síndrome de Ovario Poliquístico (PCOS). XXVII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo. Antofagasta – Chile, 2-5 Septiembre de 2016.

126. Patti ME and Kahn BB. Nutrient sensor links obesity with diabetes risk. *Nat Med* 2004; 10(10): 1049-1050.

127. Mitchell M, Armstrong DT, Robker RL, Norman RJ. Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction* 2005; 130: 583–597.

128. Kelly CC, Lyall H, Petrie JR, Gould GW, Connell JM, Sattar N. Low grade chronic inflammation in women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2453–2455.

129. Salama SA, Kamel MW, Diaz-Arrastia CR *et al.* Effect of tumor necrosis factor- α on estrogen metabolism and endometrial cells: potential physiological and pathological relevance. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(1): 285–293.

130. Jakubowicz DJ, Seppälä M, Jakubowicz S, Rodriguez-Armas O, Rivas-

Santiago A, Koistinen H, Koistinen R, Nestler JE. Insulin reduction with metformin increases luteal phase serum glycodelin and insulin-like growth factor-binding protein 1 concentrations and enhances uterine vascularity and blood flow in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(3): 1126-33.

131. Yun JH, Choi JW, Lee KJ, Shin JS, Baek KH. The promoter -1031(T/C) polymorphism in tumor necrosis factor-alpha associated with polycystic ovary syndrome. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9: 131.

132. Peral B, San Millán JL, Castello R, Moghetti P, Escobar-Morreale HF. The Methionine 196 Arginine Polymorphism in Exon 6 of the TNF Receptor 2 Gene (TNFRSF1B) Is Associated with the Polycystic Ovary Syndrome and Hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(8): 3977-3983.

133. Fernandez-Real JM, Broch M, Ricart W, Casamitjana R, Gutierrez C, Vendrell J, Richart C. Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptor 2 and insulin resistance. *Diabetes* 1998; 47: 1757-1762.

134. Markel TA, Crisostomo PR, Wang M, Herring CM, Meldrum DR. Activation of individual tumor necrosis factor receptors differentially affects stem cell growth factor and cytokine production. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293(4): G657-62.

135. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003; 25; 114(2): 181-190.

136. Johansson A, Ahrén B, Forsberg H, Olsson T. Testosterone and diurnal rhythmicity of leptin, TNF-alpha and TNF-II receptor in insulin-resistant myotonic

dystrophy patients. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26(10): 1386-1392.

137. Barnes P and Karin M. Mechanisms of Disease: Nuclear Factor- κ B - A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. In: *The New England Journal of Medicine*. Ed. Franklin Epstein 1997; Vol 336(15): 1066-1071.

138. Spratte J, Meyer Zu Schwabedissen H, Endlich N, Zygmunt M, Fluhr H. Heparin inhibits TNF- α signaling in human endometrial stromal cells by interaction with NF- κ B. *Mol Hum Reprod* 2013; 19(4): 227-36.

139. Boden G, She P, Mozzoli M, Cheung P, Gumireddy K, Reddy P, Xiang X, Luo Z, Ruderman. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes* 2005; 54(12): 3458-65.

140. Boden G. Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver. *Curr Diab Rep* 2006; 6(3): 177-81.

141. Nair S, Nguyen H, Salama S, Al-Hendy A. Obesity and the Endometrium: Adipocyte-Secreted Proinflammatory TNF α Cytokine Enhances the Proliferation of Human Endometrial Glandular Cells. *Obstet Gynecol Int* 2013; doi: 10.1155/2013/368543.

142. Ruan H, Miles PD, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, Lodish HF. Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance. *Diabetes* 2002; 51(11): 3176-88.

143. del Aguila LF, Claffey KP, Kirwan JP. TNF- α impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol* 1999; 276: E849-855.
144. Massaro M, Scoditti E, Pellegrino M, Carluccio MA, Calabriso N, Wabitsch M, Storelli C, Wright M, De Caterina R. Therapeutic potential of the dual peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) α/γ agonist aleglitazar in attenuating TNF- α -mediated inflammation and insulin resistance in human adipocytes. *Pharmacol Res* 2016; 107: 125-136.
145. Ozes ON, Akca H, Mayo LD, Gustin JA, Maehama T, Dixon JE, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98(8): 4640-4645.
146. Um SH, D'Alessio D, Thomas G. Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *Cell Metab* 2006; 3(6): 393-402.
147. Allemand MC, Irving BA, Asmann YW, Klaus KA, Tatpati L, Coddington CC, Nair KS. Effect of testosterone on insulin stimulated IRS1 Ser phosphorylation in primary rat myotubes--a potential model for PCOS-related insulin resistance. *PLoS One* 2009; 4(1): e4274.
148. Isis Paulina Astorga Leiva. La Obesidad en mujeres con Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) promueve una inhibición a nivel endometrial en la vía de señalización de adiponectina. Tesis para optar al título de Bioquímico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Directora de Tesis: Dra. Prof. Margarita Vega (Septiembre 2015).

VIII. ANEXOS

Sección V.1.2: *Determinación de niveles proteicos de moléculas relacionadas con la señalización de adiponectina en tejido endometrial*

Con el fin de complementar la presente investigación, incorporamos los siguientes ensayos, los que están incluidos en el artículo *Altered Steroid Metabolism and Insulin Signaling in PCOS Endometria: Impact in Tissue Function* [100] y son parte del trabajo de tesis de pregrado Isis Astorga, bioquímica y alumna del Programa de Magister Biología de la Reproducción de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile [148].

A partir de muestras de tejido endometrial de tres grupos de estudio: Delgadas, Obesas y Obesas-SOP, se determinaron los niveles de proteínas de moléculas relacionadas río abajo de la señalización de adiponectina a través de la molécula adaptadora, APPL1 y la formación de un complejo proteico constituido por TAK1, MEK3 y p38-MAPK, moléculas que se activan a través de fosforilaciones (p-TAK1 T184/187, p-MEK3 S189 y p38-MAPK T180/Y182). Esta vía se ha asociado a un aumento de la oxidación de ácidos grasos y de la captación de glucosa por parte de la célula blanco [98].

Los resultados obtenidos muestran que endometrios provenientes de pacientes Obesas-SOP presentan menores niveles de p-TAK1 T184/187 ($p < 0,01$) y p-

MEK3 S189 ($p < 0,05$) con respecto a endometrios controles (Delgadas), sugiriendo que en estos tejidos la señalización de adiponectina y consecuentemente, la acción de la insulina, están afectadas.

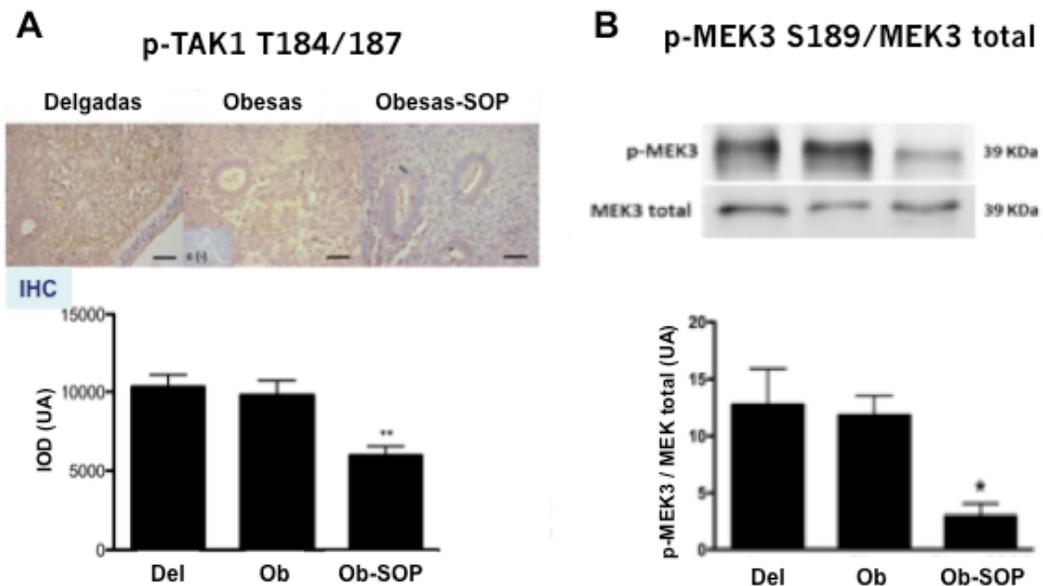


Figura A1. Determinación de niveles proteicos de p-TAK1 (T184/187) y p-MEK3 (S189) en endometrios de mujeres Delgadas, Obesas y Obesas-SOP. A) Microfotografías de tejido endometrial provenientes de mujeres Delgadas (Del, control), Obesas (Ob) y Obesas-SOP (Ob-SOP). Se observa marca inmunopositiva para p-TAK1 (T184/187) tanto en epitelio, como en estroma endometrial, mediante IHQ. El gráfico muestra el análisis semi-cuantitativo de la tinción immuno-positiva usando la herramienta IOD para cada tejido; ** $p < 0,01$ Ob-SOP vs los otros grupos; Inserto: control negativo; Barra = 50 μ m. **B)** Determinación de niveles proteicos de pMEK3 (S189) (banda de 39 KDa) en muestras de proteína total de endometrios de los tres grupos de estudio, mediante WB. Los datos fueron normalizados utilizando los niveles proteicos MEK3 total (39 KDa) en cada muestra; * $p < 0,05$ Ob-SOP vs los otros grupos. En ambos gráficos (A y B) los resultados son presentados como unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media \pm EE de cada grupo (n = 3, en duplicado).

Sección V.1.4 y V.2.4: Visualización de NFκB (subunidad p65) en tejido endometrial y cultivos celulares de T-HESC mediante Inmunofluorescencia (IF)

Con respecto a la subunidad p65 de NFκB, fue posible observar inmunofluorescencia en tejido endometrial de pacientes Delgadas y Obesas. La marca se observa en el citoplasma de estroma y epitelio endometrial, sin embargo, la técnica no mostró cambios aparentes, en cuanto al grado de fluorescencia y a la localización de la marca, entre ambos grupos (Figura A2). En la figura también se muestra la detección de p65 en células T-HESC tratadas con distintos estímulos: basal, insulina / testosterona e insulina / testosterona / TNF-α. De forma cualitativa, se puede observar una mayor marca inmunofluorescente verde en células tratadas con insulina/testosterona o con insulina/testosterona / TNF-α en comparación con la condición basal (Figura A2). A pesar que no fue posible discriminar la localización subcelular de p65 con la técnica, se puede observar que bajo estos estímulos (insulina / testosterona / TNF-α) la marca pareciera ser predominantemente nuclear o perinuclear; sin embargo, lo observado por IHQ para p65 en células T-HESC resultó ser más concluyente (Figura 35).

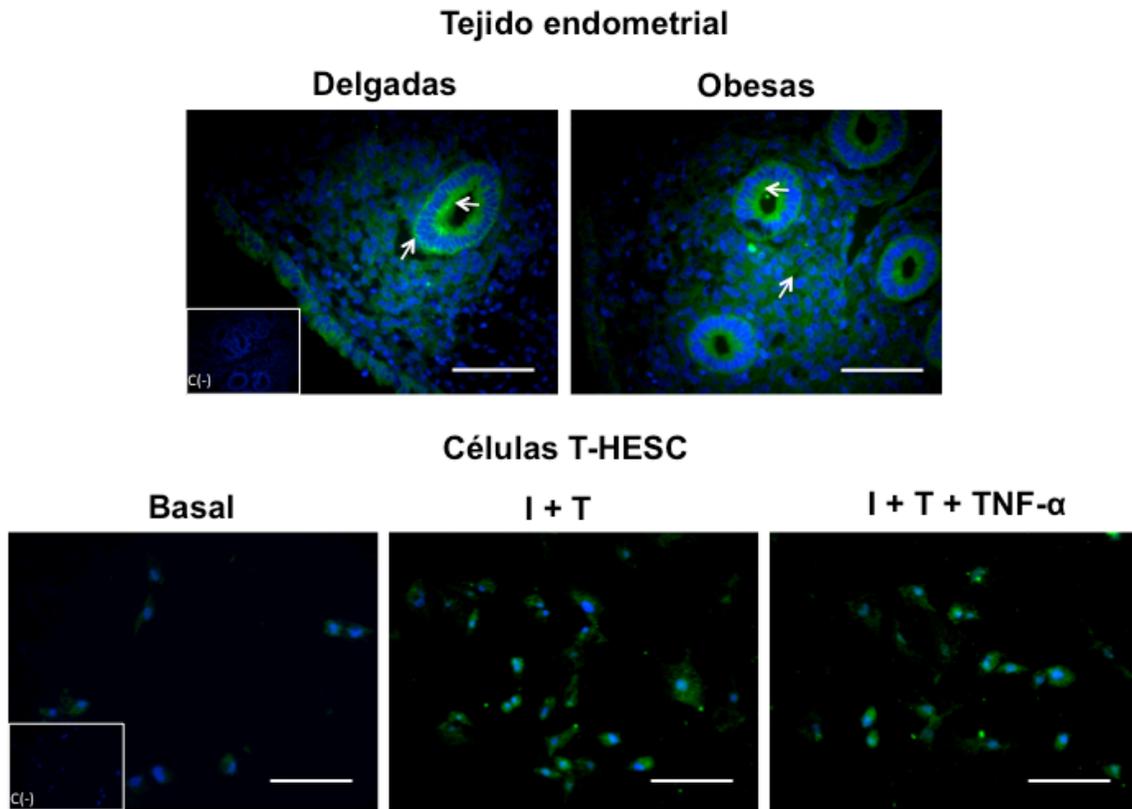


Figura A2. Detección de NFκB (p65) en tejido endometrial y células T-HESC por IF. Inmunofluorescencia para p65 en tejido endometrial provenientes de mujeres Delgadas (control) y Obesas y en cultivos de T-HESC tratados con Insulina y Testosterona (I + T) o Insulina, testosterona y TNF-α (I + T + TNF-α), además de una condición basal (solo medio). Se observa marca inmunopositiva verde para p65 (flechas). Núcleos azules: tinción DAPI; Barra = 50 μm; Inserto: control negativo.

Sección V.1.5: Visualización de CD68 en tejido endometrial mediante Inmunofluorescencia (IF)

Se determinó la presencia de CD68, mediante IF, en endometrios de mujeres Delgadas y Obesas. En la Figura A3 se puede observar una mayor marca inmunofluorescente roja en tejidos provenientes de mujeres Obesas, lo que indica una mayor presencia de CD68, sugiriendo un aumento en el número de macrófagos en estos tejidos *versus* endometrios de mujeres Delgadas.

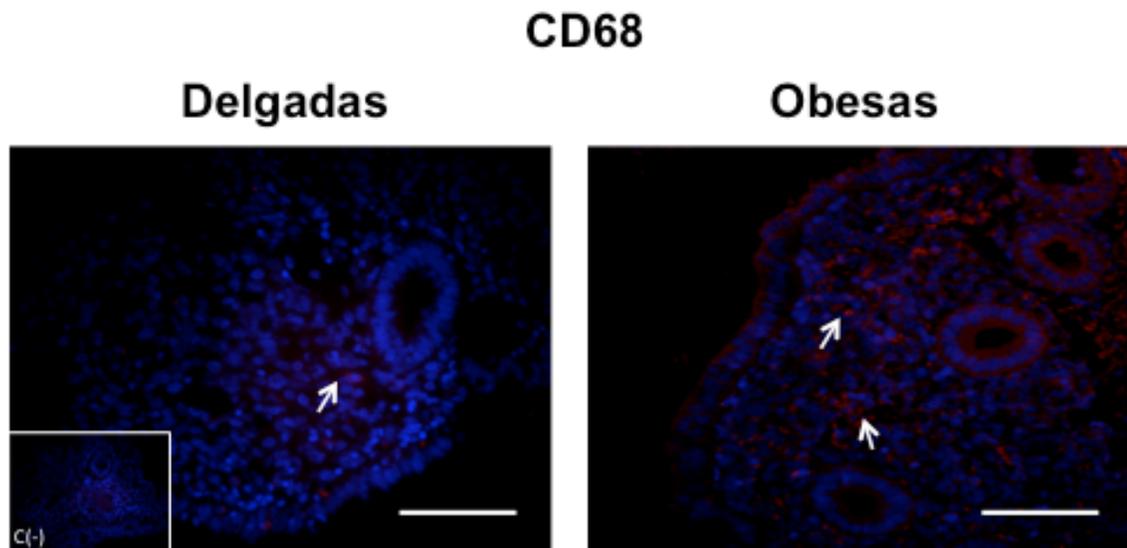


Figura A3. Detección de CD68 en endometrios de mujeres Delgadas y Obesas por IF. Microfotografías de tejido endometrial provenientes de mujeres Delgadas (control) y Obesas. Se observa marca inmunopositiva roja para CD68 (flechas) mediante IF; Núcleos azules: tinción DAPI; Barra = 50 μ m; Inserto: control negativo.

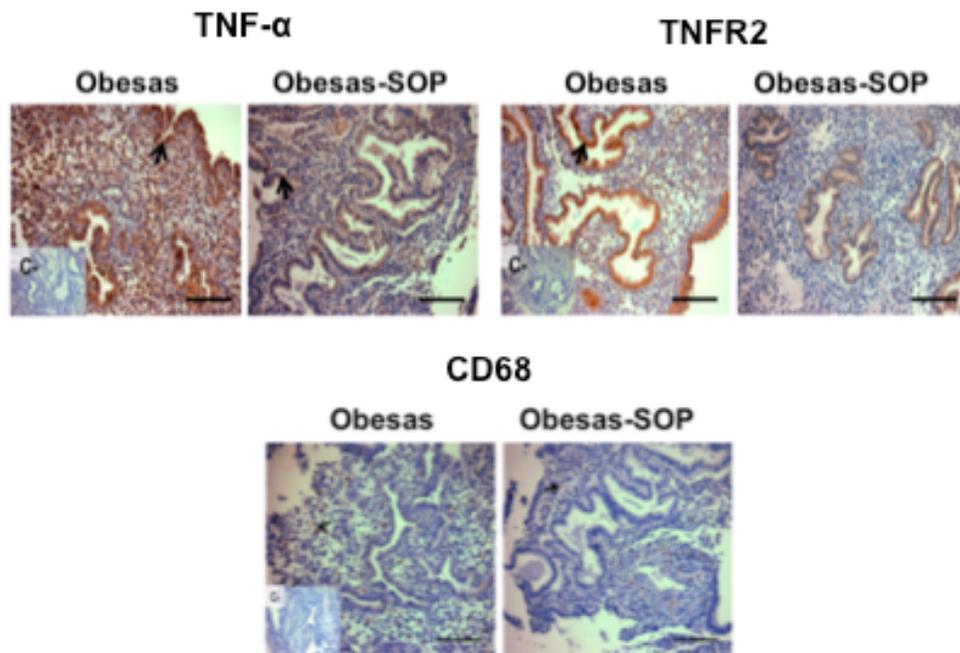
Sección V.1.6: Determinación de niveles proteicos de TNF- α , TNFR2 y CD68 en tejido endometrial en fase secretora del ciclo

Ensayos realizados en endometrios secretores provenientes de mujeres obesas sin SOP y con SOP (Obesas y Obesas-SOP, respectivamente). Las características clínicas y metabólicas se muestran a continuación en la Tabla 5. En estos tejidos se determinó los niveles proteicos por IHQ de TNF- α , TNFR2 y CD68 (Figura A4).

Tabla 5. Parámetros clínicos y metabólicos de pacientes Obesas y Obesas-SOP en fase secretora del ciclo menstrual

	Obesas n=7	Obesas-SOP n=7	Valores Ref. en fase lútea
Edad (años)	34,0 \pm 3,1 (21-46)	26,3 \pm 1,4 (24-30)	
IMC (kg/m ²)	32,5 \pm 3,2	34,0 \pm 1,9	
T (ng/dL)	16,3 \pm 3,1	36,3 \pm 7,4*	5,7 – 77
SHBG (nmol/L)	38,5 \pm 4,9	27,9 \pm 7,5	18 – 114
IAL	2,1 \pm 0,4	8,5 \pm 1,9*	< 4,5
A ₄ (ng/mL)	2,4 \pm 0,5	4,3 \pm 0,9*	0,5 – 3,7
DHEAS (μ g/dL)	125,5 \pm 29,4	239,2 \pm 76,3	35 – 430
E ₂ (pmol/L)	285,3 \pm 47,8	263,3 \pm 58,4	175 - 1130
P ₄ (nmol/L)	14 \pm 3,9	11,4 \pm 4,4	10 – 50
17-OH P ₄ (ng/mL)	1,9 \pm 0,4	3,1 \pm 0,7	0,3 - 4
Glucosa basal (mg/dL)	92,5 \pm 3,5	95,7 \pm 10,5*	Hasta 100
Insulina basal (μ UI/mL)	10,6 \pm 7,4	28,5 \pm 9,8*	Hasta 20
HOMA-IR	2,3 \pm 0,25	6,5 \pm 2,3*	< 2,77

IMC, Índice de Masa Corporal; T, Testosterona; SHBG, Globulina de unión a hormonas sexuales; IAL, Índice de Andrógenos Libres; A₄, androstenediona; DHEAS, dehidroepiandrostenediona sulfato; 17-OH P₄, 17-Hidroxiprogesterona. *P *value* < 0,05 Obesas-SOP vs Obesas



Proteína	Obesas (UA)	Obesas-SOP (UA)
TNF- α	18725 \pm 5156	7936 \pm 2955
TNFR2	17419 \pm 3821	4371 \pm 1275*
CD68	0.00041 \pm 0.0001	0.00057 \pm 0.0002

Figura A4. Determinación de niveles proteicos y localización de TNF- α , TNFR2 y CD68 en tejido endometrial de mujeres Obesas y Obesas-SOP por IHQ. Microfotografías de endometrios provenientes de mujeres Obesas y Mujeres Obesas con SOP usados para la detección de TNF- α , receptor 2 de TNF-a (TNFR2) y CD68 (marcador de macrófagos), mediante ICQ. Los datos son presentados como media \pm EEM (error estándar de la media) por cada grupo de estudio. Los valores corresponden al análisis semi-cuantitativo de la marca inmuno-positiva (flechas) a través de la herramienta IOD y son presentados como Unidades Arbitrarias (UA). Los datos corresponden a la media \pm EEM (error estándar de la media) por cada grupo de estudio. *P *value* < 0.05 Obesas vs Obesas-SOP; n = 5 por grupo; Inserto: control negativo; Barra = 50 μ m.

Sección V 2: Niveles proteicos de moléculas asociadas a la vía de señalización de adiponectina en cultivos de líneas celulares T-HESC y St-T1b tratadas con insulina y testosterona

Cultivos de células T-HESC y St-T1b tratadas con concentraciones suprafisiológicas de insulina y testosterona, fueron usadas para determinar los niveles proteicos y localización, mediante ICQ, de moléculas asociadas a la vía de adiponectina (adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2). Comparando ambas líneas celulares, los resultados no muestran diferencias importantes con respecto a la respuesta frente al estímulo, observándose que la condición hiperandrogénica e hiperinsulínica induce una disminución de moléculas de la vía de adiponectina en éstas células (Figura A5).

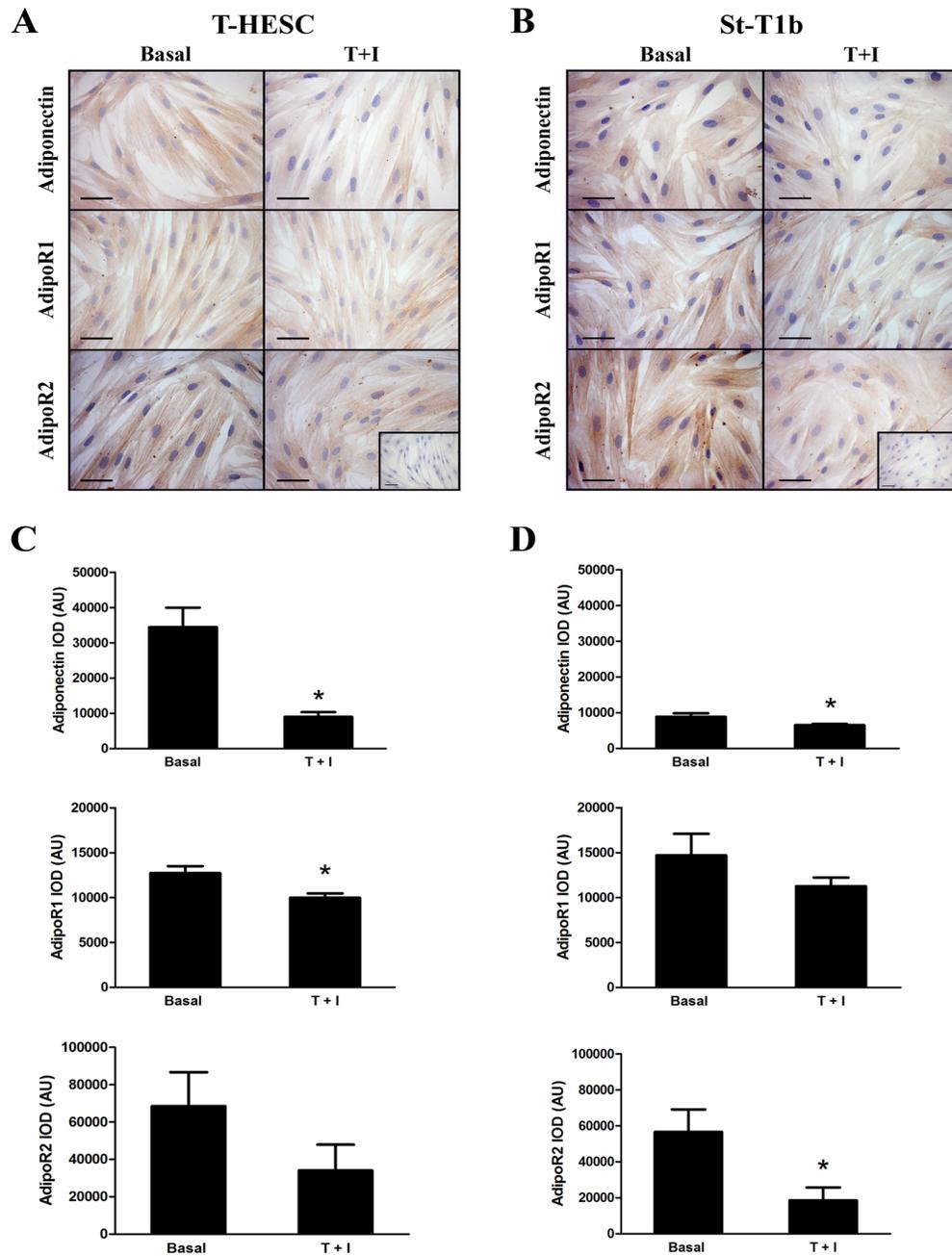


Figura A5. Determinación de niveles proteicos y localización de adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2 en cultivos de líneas T-HESC y St-T1b bajo condiciones hiperinsulínicas e hiperandrogénicas por ICQ. En la parte superior se muestran las microfotografías de cultivos T-HESC o ST-T1b bajo una condición basal (medio sin suero) o tratadas con testosterona más insulina (T+I, 100 nM cada una) usados para la detección de adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2, mediante ICQ. En la parte inferior se muestran la semi-cuantificación de la marca inmunopositiva usando la herramienta IOD y son presentados como Unidades Arbitrarias (UA). Los datos son presentados como media \pm EEM (error estándar de la media). Los valores corresponden a la media \pm EEM (error estándar de la media) por cada grupo de estudio. **P* value < 0.05; n = 3 en duplicado; Inserto: control negativo; Barra = 50 μ m.

Sección IV.1: Consentimientos Informados



24 ABR. 2013



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA OBTENCIÓN DE TEJIDO ENDOMETRIAL DE PACIENTES CONTROLES

Título del Proyecto: PARTICIPACIÓN DE ADIPONECTINA EN LA REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN METABÓLICA DEL ENDOMETRIO DE MUJERES OBESAS CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO E HIPERINSULINISMO

Nombre del Investigador Principal: Dra. Margarita Vega Blanco. Rut: 4.561.679-7
Nombre del Investigador Clínico: Dr. Rodrigo Carvajal G. Rut: 9.898.519-0

Servicio o Departamento: Laboratorio de Endocrinología y Biología Reproductiva, Departamento de Obstetricia y Ginecología. Hospital Clínico Universidad de Chile. Teléfonos: 2978 - 8304 / 2978 - 8460

Antes de tomar la decisión de participar en la investigación, lea atentamente este formulario.

Estimada paciente:

Le invitamos a participar en el estudio sobre el funcionamiento y la regulación del endometrio (tejido que recubre el útero por dentro) y su comportamiento anormal en enfermedades como el Síndrome de Ovario Poliquístico. Este estudio pretende conocer los mecanismos por los que la enfermedad afecta la fertilidad de numerosas mujeres.

Propósito: Conocer los mecanismos que regulan la función endometrial. Para ello, analizaremos hormonas y moléculas que están en el endometrio o participan en su funcionamiento en condiciones normales y patológicas.

Procedimiento: Durante la cirugía que su doctor ha indicado como parte de su tratamiento en la que se saca la matriz o útero (histerectomía), se le pedirá donar una muestra del tejido endometrial. La obtención del tejido endometrial se realizará después que se haya extraído el útero. Además, se le tomará una muestra de 10 mL de sangre (de la vena del brazo), equivalente a dos cucharadas de té, para realizar exámenes hormonales y metabólicos.

Confidencialidad: Todas las muestras, exámenes y biopsias serán codificados con un código numérico. La información de la ficha clínica sólo será conocida por su médico y los investigadores del proyecto y no se difundirá sin previo consentimiento; en comunicaciones del estudio no se divulgará su nombre o datos que pudieran identificarla.

Beneficios: Su participación en este estudio no involucra costos ni compensaciones; solamente la satisfacción de contribuir a aumentar la información sobre el funcionamiento de los órganos de la mujer y de una enfermedad relacionada. Los nuevos conocimientos pueden favorecer a las mujeres infértiles con nuevas posibilidades de diagnóstico o tratamiento. También, se le realizará el estudio hormonal, metabólico y anátomo-patológico del endometrio en forma gratuita.

Riesgos: La obtención de la muestra del tejido endometrial no significará ningún riesgo para usted, ya que se obtendrá después que se haya extraído el útero. Además, no interferirá con su estudio o tratamiento. Los riesgos relacionados con el procedimiento quirúrgico debe conversarlos con su médico tratante. La extracción de la muestra de sangre puede causar dolor (pinchazo) y eventualmente dejar un moretón que desaparecerá antes de 10 días, pero no presenta otros riesgos asociados con este estudio, ya que para la cirugía igualmente se requiere pinchar una vena para administrarle medicamentos.

Participación: Dada la importancia del estudio, la invitamos a participar voluntariamente. **Usted puede aceptar participar, o retirarse en cualquier momento, sin afectar de ninguna manera su atención médica.** En caso de retirarse, los datos y las muestras obtenidas no serán



24 ABR. 2013

10 MAYO 2013



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA OBTENCIÓN DE TEJIDO ENDOMETRIAL DE PACIENTES CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO

Título del Proyecto: PARTICIPACIÓN DE ADIPONECTINA EN LA REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN METABÓLICA DEL ENDOMETRIO DE MUJERES OBESAS CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO E HIPERINSULINISMO

Nombre del Investigador Principal: Dra. Margarita Vega Blanco. Rut: 4.561.679-7
Nombre del Investigador Clínico: Dr. Rodrigo Carvajal Gavilán. Rut: 9.898.519-0

Servicio o Departamento: Laboratorio de Endocrinología y Biología Reproductiva, Departamento de Obstetricia y Ginecología. Hospital Clínico Universidad de Chile. Teléfonos: 2978 - 8304 / 2978 - 8460

Antes de tomar la decisión de participar en la investigación, lea atentamente este formulario.

Estimada paciente:

Le invitamos a participar en el estudio sobre el funcionamiento y la regulación del endometrio (tejido que recubre el útero por dentro) y su comportamiento anormal en enfermedades como el Síndrome de Ovario Poliquístico. Este estudio pretende conocer los mecanismos por los que la enfermedad afecta la fertilidad de numerosas mujeres.

Propósito: Conocer los mecanismos que regulan la función endometrial. Para ello, analizaremos hormonas y moléculas que están en el endometrio o participan en su funcionamiento en condiciones normales y patológicas.

Procedimiento: Aprovechando su indicación médica de biopsia de endometrio como parte del estudio de su infertilidad, se le pedirá donar parte de esa muestra de tejido endometrial. Esta biopsia se obtendrá por cánula Pipelle previo test de embarazo en orina negativo. El endometrio es un tejido que recubre el interior del útero y que se desprende en cada menstruación. Además, para establecer el correcto diagnóstico de su enfermedad, se le solicitará una muestra de 10 mL de sangre (de la vena del brazo), equivalente a dos cucharadas de té, para realizar exámenes hormonales y metabólicos.

Confidencialidad: Todas las muestras, exámenes y biopsias serán codificados con un código numérico. La información de la ficha clínica sólo será conocida por su médico y los investigadores del proyecto y no se difundirá sin previo consentimiento; en comunicaciones del estudio no se divulgará su nombre o datos que pudieran identificarla.

Beneficios: Su participación en este estudio no involucra costos ni compensaciones; solamente la satisfacción de contribuir a aumentar la información sobre el funcionamiento de los órganos de la mujer y de una enfermedad relacionada. Los nuevos conocimientos pueden favorecer a las mujeres infértiles con nuevas posibilidades de diagnóstico o tratamiento. También, se le realizará el estudio hormonal, metabólico y anátomo-patológico del endometrio en forma gratuita.

Riesgos: La obtención de la muestra del tejido endometrial que se utilizará en este estudio no significará ningún riesgo para usted, ya que será parte de la muestra de endometrio obtenida para el estudio de su patología. Además, no interferirá con su estudio o tratamiento. Los riesgos relacionados con el procedimiento debe conversarlos con su médico tratante. La extracción de la muestra de sangre puede causar dolor (pinchazo) y eventualmente dejar un moretón que desaparecerá antes de 10 días, pero no presenta otros riesgos asociados con este estudio.

Participación: Dada la importancia del estudio, la invitamos a participar voluntariamente. **Usted puede aceptar participar, o retirarse en cualquier momento, sin afectar de ninguna**



24 ABR. 2013

10 MAYO 2013



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA OBTENCIÓN DE TEJIDO ENDOMETRIAL DE PACIENTES OBESAS

Título del Proyecto: PARTICIPACIÓN DE ADIPONECTINA EN LA REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN METABÓLICA DEL ENDOMETRIO DE MUJERES OBESAS CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO E HIPERINSULINISMO

Nombre del Investigador Principal: Dra. Margarita Vega Blanco. Rut: 4.561.679-7
Nombre del Investigador Clínico: Dr. Rodrigo Carvajal Gavilán. Rut: 9.898.519-0

Servicio o Departamento: Laboratorio de Endocrinología y Biología Reproductiva, Departamento de Obstetricia y Ginecología. Hospital Clínico Universidad de Chile. Teléfonos: 2978 - 8304 / 2978 - 8460

Antes de tomar la decisión de participar en la investigación, lea atentamente este formulario.

Estimada paciente:

Le invitamos a participar en el estudio sobre el funcionamiento y la regulación del endometrio (tejido que recubre el útero por dentro) y su comportamiento anormal en enfermedades como el Síndrome de Ovario Poliquístico. Este estudio pretende conocer los mecanismos por los que la enfermedad afecta la fertilidad de numerosas mujeres.

Propósito: Conocer los mecanismos que regulan el endometrio. Para ello analizaremos hormonas y moléculas que están en el endometrio o participan en su funcionamiento en condiciones normales y patológicas.

Procedimiento: Debido a que las pacientes con obesidad presentan un mayor riesgo de desarrollar cáncer de endometrio, el estudio de este tejido mediante una biopsia es importante para descartar la enfermedad. La biopsia será obtenida por cánula Pipelle en fase proliferativa según Fecha de la Última Regla. El endometrio es un tejido que recubre el interior del útero y que se desprende en cada menstruación. Si usted acepta participar voluntariamente del estudio se le pedirá donar parte de esa muestra de tejido endometrial y donar una muestra de 10 mL de sangre (de la vena del brazo), equivalente a dos cucharadas de té, para realizar exámenes hormonales y metabólicos.

Confidencialidad: Todas las muestras, exámenes y biopsias serán codificados con un código numérico. La información de la ficha clínica sólo será conocida por su médico y los investigadores del proyecto y no se difundirá sin previo consentimiento; en comunicaciones del estudio no se divulgará su nombre o datos que pudieran identificarla.

Beneficios: Su participación en este estudio no involucra costos ni compensaciones; solamente la satisfacción de contribuir a aumentar la información sobre el funcionamiento de los órganos de la mujer y de una enfermedad relacionada. Los nuevos conocimientos pueden favorecer a las mujeres infértiles con nuevas posibilidades de diagnóstico o tratamiento. También, se le realizará el estudio hormonal, metabólico y anátomo-patológico del endometrio en forma gratuita.

Riesgos: La obtención de la muestra del tejido endometrial que se utilizará en este estudio no significará ningún riesgo para usted, ya que será parte de la muestra de endometrio obtenida para el estudio de su patología. Además, no interferirá con su estudio o tratamiento. Los riesgos relacionados con el procedimiento debe conversarlos con su médico tratante. La extracción de la muestra de sangre puede causar dolor (pinchazo) y eventualmente dejar un moretón que desaparecerá antes de 10 días, pero no presenta otros riesgos asociados con este estudio.

