

UCH-FC  
MAG-BMCN  
D932  
C.1



**Universidad de Chile**  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Postgrado

**PAPEL DEL SOBREPESO Y LA OBESIDAD EN EL DESBALANCE  
ENTRE PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS EN TEJIDO  
ENDOMETRIAL HUMANO**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR,  
CELULAR Y NEUROCIENCIAS

**CRISTÓBAL ANDRÉS DÜNNER MOSCA**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ALEJANDRA VILLAVICENCIO

**Santiago, Chile  
2010**



**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato:

**CRISTÓBAL ANDRÉS DUNNER MOSCA**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con Mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de tesis rendido el día 05 de Agosto de 2010.

**Directora de Tesis:**

Dra. Alejandra Villavicencio



**Comisión de Evaluación de la Tesis:**

Dr. Julio Alcayaga U.



Dr. Francisco Pérez Bravo







## AGRADECIMIENTOS

Primero, agradezco a mi familia que estuvo conmigo en cada fase de mi formación profesional y en especial a mi mujer que me apoyó en todo momento. Segundo, agradezco a mi tutor por permitirme la oportunidad de trabajar juntos, su paciencia y apoyo.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Página

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	19
1.1. Generalidades del sobrepeso y la obesidad en el mundo y en Chile .....	20
1.2. Relación entre sobrepeso, obesidad y cáncer .....	20
1.3. Bases moleculares de la asociación entre sobrepeso, obesidad y carcinoma endometrial.....	21
1.3.1. Leptina.....	21
1.3.2. Estrógenos .....	22
1.4. Homeostasis endometrial y su relación con la obesidad. ....	23
1.4.1. Proliferación.....	23
1.4.2. Apoptosis .....	25
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	28
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	28
3.1.1. Objetivo general .....	28
3.1.2. Objetivos específicos .....	28
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	29
4.1. Obtención de las muestras .....	29
4.1.1. Grupos con histología endometrial normal (HEN) .....	29
4.1.2. Grupos con CE tipo I .....	30
4.2. Evaluación de la concentración sérica de leptina .....	31
4.3. Inmunohistoquímica para el receptor de leptina .....	31
4.4. Estudio de la proliferación celular.....	32
4.5. Estudio de la apoptosis por medio de la marcación de los extremos fragmentados del DNA con nucleótidos biotinilados a través de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling).....	33
4.6. Determinación de los niveles de expresión proteica de Bcl-2, Bax, Caspasa-3 activa, y Survivina.....	34
4.7. Inmunohistoquímica para las proteínas AKT fosforilada (pAKT) y Aromatasa(P450 <sub>arom</sub> ) .....	35
4.8. Cálculo del tamaño de muestra y análisis estadístico.....	35
<b>5. RESULTADOS</b> .....	36
5.1. Características clínicas y endocrinológicas de las mujeres en estudio .....	36
5.2. Medición de la concentración sérica de leptina en mujeres con HEN y con CE tipo I	38



5.3.	Expresión del receptor de leptina en tejido endometrial de mujeres con HEN y con CE tipo I .....	40
5.4.	Determinación del balance entre proliferación y apoptosis en el tejido endometrial.....	42
5.4.1.	Expresión de la proteína histona H3 fosforilada (pH3) en mujeres con HEN y en mujeres con CE de tipo I.....	42
5.4.2.	Análisis de apoptosis por TUNEL en el tejido endometrial de mujeres con HEN y con CE tipo I.....	44
5.4.3.	Evaluación del desbalance entre proliferación y apoptosis en células epiteliales de mujeres con HEN y con CE tipo I.....	45
5.5.	Expresión de las proteínas Bcl-2, Bax y Caspasa-3 activa en tejido endometrial obtenido de mujeres con HEN y con CE tipo I.....	46
5.6.	Expresión de la proteína Survivina en tejido endometrial obtenido de mujeres con HEN y con CE tipo I. ....	48
5.7.	Expresión de la proteína AKT en tejido endometrial obtenido de las mujeres con HEN y de las mujeres con CE tipo I. ....	50
5.8.	Expresión de la enzima aromatasas (P450 <sub>arom</sub> ) en tejido endometrial de mujeres con HEN y con CE tipo I. ....	52
5.9.	Correlación entre la concentración sérica de leptina y la expresión de su receptor, con el índice de proliferación y apoptosis en las mujeres en estudio. ....	54
6.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	55
7.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	62
8.	<b>REFERENCIAS</b> .....	65
	<b>Anexo I</b> .....	78



## LISTA DE TABLAS

Página

<b>Tabla 1.</b> Características generales de los seis grupos de mujeres a estudiar .....	29
<b>Tabla 2.</b> Características clínicas y endocrinológicas de las mujeres con HEN. ....	37
<b>Tabla 3.</b> Características clínicas y endocrinológicas de las mujeres con CE tipo I.....	38
<b>Tabla 4.</b> Evaluación de la fragmentación del DNA en las mujeres en estudio.....	45



## LISTA DE FIGURAS

Página

<b>Figura 1.</b> Concentración sérica de leptina en mujeres con histología endometrial normal (HEN) y con CE tipo I con distintos índices de masa corporal.....	39
<b>Figura 2.</b> Inmunodetección del receptor de leptina fosforilado (RL-p) en secciones de endometrio de mujeres con histología endometrial normal (HEN) y de mujeres con CE tipo I..	41
<b>Figura 3.</b> Inmunodetección de la proteína histona H3 fosforilada (pH3) en secciones de tejido endometrial de mujeres con histología endometrial normal (HEN) y con CE tipo I. ....	43
<b>Figura 4.</b> Microfotografías que ilustran la fragmentación del DNA por la técnica de TUNEL en secciones de endometrio incluidas en parafina de mujeres con HEN .....	44
<b>Figura 5.</b> Evaluación del desbalance entre proliferación y apoptosis teniendo en cuenta la razón pH3/TUNEL en células epiteliales de mujeres con HEN y en mujeres con CE tipo I.....	46
<b>Figura 6.</b> Evaluación de la razón Bcl-2/Bax en células epiteliales de mujeres con HEN y de mujeres con CE tipo I.....	47
<b>Figura 7.</b> Expresión de la Caspasa-3 activa en tejido endometrial de mujeres con HEN y de mujeres con CE tipo I.....	48
<b>Figura 8.</b> Estudio de la expresión de Survivina en tejido endometrial de mujeres con HEN y de mujeres con CE tipo I.....	49
<b>Figura 9.</b> Inmunodetección de la proteína pAKT en secciones de endometrio incluidas en parafina de mujeres con HEN y de mujeres con CE tipo I.....	51
<b>Figura 10.</b> Inmunodetección de la enzima aromatasa (P450 <sub>arom</sub> ) en secciones de endometrio incluidas en parafina de mujeres con HEN y de mujeres con CE tipo I.....	53

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

A <sub>4</sub>	Androstenediona
BCA	Ácido bicincrónico
CE	Carcinoma endometrial
C	Citoplasma
DAB	Diaminobencidina
DNA	Acido desoxirribonucleico
E <sub>1</sub>	Estrona
E <sub>2</sub>	Estradiol
EEM	Error estándar de la media
FP	Fase proliferativa
FUR	Fecha de la última regla
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HCSBA	Hospital Clínico San Borja Arriarán
HEN	Histología endometrial normal
HRP	Peroxidasa de rábano
IAL	Índice de andrógenos libres
IMC	Índice de masa corporal
IRMA	Ensayo inmunoradiométrico
JAK	Kinasa Janus
MAPK	Proteína kinasa activada por mitógeno

MHO	Obeso metabólicamente sano
N	Normopeso
Nu:	núcleo
ng/ml	Nanogramos/mililitro
O	Obesas
O1, O2	Obesas 1, Obesas 2
OMS	Organización Mundial de la Salud
P <sub>4</sub>	Progesterona
pg/ml	Picogramos/mililitro
P450 <sub>arom</sub>	P450 aromatasa
pAKT	Proteína kinasa B fosforilada
PBS	Buffer salino fosfato
pH3	Histona H3 fosforilada
PI3K	Fosfatidil inositol 3- kinasa
PKA	Proteína kinasa A
RL	Receptor de Leptina
RL-P	Receptor de Leptina fosforilado
RL-T	Receptor de Leptina total
S	Sobrepeso
SHBG	Globulina que une a esteroides sexuales
STAT	Transductores de Señal y Activadores de Transcripción
TdT	Desoxinucleotidil transferasa terminal

TUNEL Marcación de los extremos fragmentados del DNA con nucleótidos biotinilados a través de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal.

## RESUMEN

**Introducción:** Se ha constatado la asociación entre el sobrepeso y la obesidad con diferentes tipos de cáncer, en especial con el carcinoma endometrial (CE) tipo I debido a que es el que presenta mayor riesgo relativo. Además, debido a que en Chile y en el mundo el sobrepeso y la obesidad han aumentado considerablemente en las últimas décadas, es que la búsqueda de un nexo molecular entre estas condiciones suscita gran interés. Se piensa que algunas adipoquinas tales como leptina se encuentran elevadas en estas mujeres, de manera que podrían actuar directamente sobre las células endometriales iniciadas, incrementando la proliferación, alterando la homeostasis tisular y contribuyendo a la promoción del CE tipo I.

**Hipótesis:** El sobrepeso y la obesidad conducen a un desbalance en los procesos de proliferación y apoptosis celular en el tejido endometrial, que se asocia con altos niveles séricos de leptina, lo que en muchas mujeres establece condiciones favorables para la promoción del CE tipo I.

**Objetivo general:** Evaluar en mujeres con sobrepeso y obesidad (sin CE tipo I), si existe desregulación en la homeostasis endometrial y si esto se asocia con concentraciones alteradas de leptina, al comparar con mujeres normopeso, favoreciendo así la promoción del CE tipo I.

**Metodología:** Se trabajó con muestras de sangre periférica y de tejido endometrial obtenidas de los siguientes grupos de mujeres: I) mujeres cíclicas fértiles (MCF) con índice de masa corporal (IMC) normal e histología endometrial normal (HEN), II) MCF con sobrepeso e HEN, III) MCF obesas e HEN, IV) mujeres posmenopáusicas con CE tipo I e IMC normal, V) mujeres posmenopáusicas con CE tipo I y sobrepeso, y VI) mujeres posmenopáusicas obesas con CE tipo I. La concentración de leptina se determinó mediante ensayo inmunoradiométrico en el suero de estas mujeres. En el tejido endometrial de los sujetos en estudio se investigó mediante

inmunohistoquímica la expresión del receptor de leptina, histona H3 fosforilada (pH3) (marcador de proliferación), AKT fosforilada (pAKT) y Aromatasa (P450<sub>arom</sub>) (encargada de la síntesis de estrógenos). A través del análisis de Western blot se evaluó la expresión de Bcl-2 (antiapoptótico), Bax (proapoptótico), Caspasa-3 (proteína efectora final de la apoptosis) y Survivina (proteína inhibidora de la apoptosis), en extractos proteicos obtenidos del tejido endometrial de los grupos en estudio. La fragmentación del DNA se determinó en el tejido endometrial mediante el método de marcación de los extremos fragmentados del DNA con nucleótidos biotinilados a través de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL).

**Resultados:** La concentración sérica de leptina aumentó significativamente en las mujeres con sobrepeso y en mujeres obesas con HEN y con CE, al comparar con el grupo normopeso. En tanto que la expresión endometrial del receptor para esta adipocina se incrementó en relación directa al IMC de las mujeres con HEN. Lo anterior permite sugerir que leptina (conocida por modular la proliferación endometrial) podría actuar directamente sobre las células endometriales iniciadas de estas mujeres. La expresión de tal receptor no mostró variación al comparar los grupos HEN con los grupos con CE tipo I.

Por otro lado, al evaluar la relación entre proliferación y apoptosis endometrial a través de la razón pH3/TUNEL, fue posible distinguir dos subgrupos de mujeres obesas (O1 y O2) entre las mujeres con HEN. El grupo O1 presentó un aumento de 32,7 % en dicha razón *versus* el grupo O2 ( $p < 0,05$ ). A su vez, las mujeres O1 exhibieron un incremento en la razón pH3/TUNEL de 56,4% y 33,8 % al comparar con el grupo normopeso (N) y sobrepeso (S), respectivamente ( $p < 0,05$ ). Interesantemente, la razón pH3/TUNEL fue similar entre los grupos N y O2, y semejante entre las mujeres obesas con HEN y los grupos de mujeres con CE tipo I ( $p > 0,05$ ).

Además, dicha razón se correlacionó con el IMC ( $R=0,53$ ,  $p<0,05$ ) y con los niveles séricos de leptina ( $R=0,47$ ,  $p<0,05$ ) de las pacientes de los grupos N, S y O1 (con HEN). Similarmente, el IMB fue correlacionado con BMI fue correlacionado con la leptina serica ( $R = 0,83$ ,  $p <0.05$ ).

Por otro lado, al estudiar la expresión endometrial de Bcl-2 y Bax se observó que en el grupo O1 existe un incremento de la razón Bcl-2/Bax de 86,9% y 168,7 %, respectivamente, en relación al grupo N y O2 ( $p<0,05$ ). Lo anterior adquiere especial relevancia al observar que en las mujeres con CE la razón Bcl-2/Bax fue similar a la encontrada en las mujeres obesas 1 con HEN ( $p>0,05$ ). En el caso de la Caspasa-3 activa no se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos de mujeres con HEN y con CE tipo I.

Survivina incrementó su expresión endometrial en el grupo O1 (454,5 %, 93,6 % y 121,8 %) al comparar con el grupo N ( $p<0,001$ ), S ( $p<0,01$ ) y O2 ( $p<0,01$ ), respectivamente. En las mujeres con CE, la expresión de Survivina se incrementó en forma proporcional al IMC.

Respecto a las vías de señalización que darían cuenta de la mayor proliferación endometrial, estudiamos la expresión nuclear (Nu) y citoplasmática (C) de la proteína AKT en los endometrios de interés. Dicha proteína se activa por fosforilación, y encontramos un incremento en la razón Nu/C de pAKT en las mujeres O1 (56,9%,  $p<0,05$ ) *versus* el grupo N y O2, respectivamente. La expresión de pAKT fue similar entre los grupos O2 y N con HEN, y entre las mujeres obesas obesas del grupo 1 sin CE y entre las mujeres obesas con CE ( $p>0,05$ ).

Por otra parte, fue necesario considerar la disponibilidad *in situ* de estrógenos (cuyos niveles circulantes se encuentran elevados en las mujeres O1) originada en la actividad y/o expresión de la enzima aromatasa. Al respecto, se estudió la expresión endometrial de esta enzima, detectándose un incremento 14 y 5,4 veces en las mujeres O1 respecto al grupo N ( $p<0,001$ ) y S

( $p < 0,01$ ), respectivamente. En forma concordante con resultados anteriores, la expresión de  $P450_{arom}$  en el grupo O2 fue semejante a la de las mujeres del grupo N ( $p > 0,05$ ), y 2,5 veces menor ( $p < 0,05$ ) al comparar con el grupo O1. Las mujeres obesas del grupo 1 con HEN presentaron un nivel de expresión de la  $P450_{arom}$  similar al de las mujeres obesas con CE ( $p > 0,05$ ). Este aporte extra de estrógenos se traduciría en una mayor biodisponibilidad de estrógenos, que junto con las concentraciones alteradas de leptina circulantes, podrían ejercer acciones regulatorias en el ciclo celular, controlar la proliferación de las células epiteliales endometriales y contribuir a la promoción del CE tipo I en las mujeres obesas del grupo 1.

**Conclusión:** Sobre la base de nuestros resultados, es claro que las células epiteliales endometriales principalmente de las mujeres obesas del grupo 1, son más propensas a incrementar su proliferación debido a que están expuestas a niveles circulantes elevados de leptina y a un ambiente estrogénico alterado tanto a nivel sistémico como local. De mantenerse en el tiempo tales condiciones, dicha proliferación celular incrementada puede aumentar la incidencia de mutaciones y de esta forma las células pueden escapar del control normal de la proliferación y volverse neoplásicas.

Dado que la terapia para el CE involucra cirugía lo cual deteriora la capacidad reproductiva y reduce la calidad de vida de las mujeres, es absolutamente necesario desarrollar protocolos y pruebas para identificar a mujeres obesas con mayor susceptibilidad para el potencial desarrollo de CE. Los resultados obtenidos en esta tesis nos permitieron identificar a tales mujeres, comprender algunos de los mecanismos involucrados en la mayor proliferación endometrial y proporcionar las bases para el diseño de estrategias de diagnóstico temprano. Por lo tanto, esperamos que en un futuro no muy lejano, estas mujeres obesas puedan ser segregadas para

recibir mayor vigilancia. Lo anterior, es especialmente relevante si consideramos que menos del 20% de las mujeres con CE avanzado sobreviven.

## ABSTRACT

**Introduction:** The connection between overweight and obesity with different types of cancer has been corroborated, especially with type-I endometrial carcinoma (EC) as it is the kind that presents the highest relative risk. Furthermore, due to the considerable increase in overweight and obesity observed during recent decades in both Chile and across the globe, the search for a molecular link between these conditions raises great interest. It is thought that some adipokines such as leptin are elevated in these women, which could act directly on initiated endometrial cells increasing the proliferation, altering tissue homeostasis and contributing to the type- I EC promotion.

**Hypothesis:** Overweight and obesity lead to an imbalance in the processes of proliferation and cellular apoptosis in the endometrial tissue, which is associated with high serum levels of leptin, establishing favorable conditions for the development of type I EC in many women.

**General objective:** To evaluate whether there is deregulation in endometrial homeostasis in overweight and obese women (without type-I EC), and whether if it is associated with altered concentrations of leptin when compared with normal-weight women, thereby facilitating the type-I EC promotion.

**Methodology:** Blood and endometrial samples were obtained from the following groups of women: I) cycling premenopausal women (CPW) with normal body mass index (BMI) and normal endometrial histology (NEH), II) CPW with overweight and NEH, III) obese CPW with NEH, IV) postmenopausal women with type I EC and normal BMI, V) postmenopausal women

with type I EC and overweight, and VI) obese postmenopausal women with type I EC. Leptin concentration was determined in the serum of these patients by immunoradiometric assay. In addition, we investigated the expression of leptin receptor, phosphorylated histone H3 (pH3) (proliferation marker), phosphorylated AKT (pAKT) and Aromatase (P450<sub>arom</sub>) (responsible for the estrogen synthesis), in the endometrial samples of these subjects through immunohistochemistry. Moreover, we evaluated the Bcl-2 (antiapoptotic), Bax (proapoptotic), Caspase-3 (final effector of apoptosis) and survivin (apoptosis inhibitor) expression in protein extracts obtained from endometrial tissue of the study groups by Western blot analysis. DNA fragmentation was determined by TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) in endometrial samples.

**Results:** Circulating levels of leptin were significantly elevated in overweight and women with NEH, with respect to the normal-weight group. At the same time, the endometrial expression of the leptin receptor increased in direct relation to the BMI of these women. This would suggest that leptin (known for modulating endometrial proliferation) could act directly on initiated endometrial cells. In the case of type I EC groups, the expression of this receptor showed no change when compared with NEH groups.

Furthermore, when evaluating the relationship between endometrial proliferation and apoptosis through the pH3/TUNEL ratio, was possible to distinguish two subgroups of obese women (Ob1 and Ob2) with NEH. The Ob1 group presented an increase (32.7%,  $p < 0.05$ ) in this ratio *versus* the Ob2 group. In turn, Ob1 women exhibited an increase of 56.4% and 33.8% with respect to the normal-weight (N) and overweight (O) groups respectively ( $p < 0.05$ ). Interestingly, the pH3/TUNEL ratio was similar between N and Ob2 groups, and between obese women with NEH and women with type -I EC. Furthermore, this ratio was correlated with BMI ( $R = 0.53$ ,  $p$

<0.05) and serum leptin levels ( $R = 0.47$ ,  $p < 0.05$ ) found in these women's groups (groups N, S and O1). Similarly, BMI was correlated with serum leptin ( $R = 0.83$ ,  $p < 0.05$ ).

On the other hand, an increase of endometrial Bcl-2/Bax ratio (86.9% and 168.7%, respectively) was detected in Ob1 group in relation to N and Ob2 groups ( $p < 0.05$ ). This becomes particularly relevant when observing that in patients with EC, the Bcl-2/Bax ratio was similar to that found in Ob1 with NEH. With respect to the active Caspase-3 there were no differences between groups of women with NEH and type I EC.

Endometrial expression of survivin increased in Ob1 group (454.5%, 93.6% and 121.8%) when compared with the N ( $p < 0.001$ ), O ( $p < 0.01$ ) and Ob2 ( $p < 0.01$ ) groups, respectively. In patients with EC, the expression of survivin was increased proportionally to the BMI.

Regarding the signalling pathways that would explain the higher endometrial proliferation, we studied the nuclear (Nu) and cytoplasmic (C) expression of AKT protein in the studied endometria. This protein is activated by phosphorylation, and we found an increase in the Nu/C ratio of pAKT in Ob1 patients (56.9%) *versus* the N and Ob2 groups ( $p < 0.05$ ), respectively. pAKT expression was similar between Ob2 and N groups with NEH, and between obese women with and without EC.

Moreover, it was necessary to consider the *in situ* availability of estrogens (whose circulating levels are elevated in Ob1 women) originated in the activity and/or expression of the aromatase enzyme. In this regard, we studied the endometrial expression of this enzyme finding an increment of 14 and 5.4 times in Ob1 patients compared to the N ( $p < 0.001$ ) and O ( $p < 0.01$ ) groups, respectively. In concordance with previous findings, the expression of P450<sub>arom</sub> in the Ob2 group was similar to that of women in the N group, and 2.5 times lower ( $p < 0.05$ ) when compared with the Ob1 group. Obese women with NEH had a level of expression of P450<sub>arom</sub>

similar to obese women with EC. This extra contribution of estrogens would lead to higher bioavailability of estrogens that, together with altered concentrations of circulating leptin, could exert regulatory actions in the cell cycle, controlling the epithelial endometrial proliferation and contributing to the type I EC promotion in Ob1 patients.

**Conclusion:** Based on our results, it is clear that endometrial epithelial cells (predominantly from Ob1 women) are more likely to increase their proliferation due to their exposition to elevated circulating levels of leptin and altered estrogenic environment (systemic and local). If such conditions were to be maintained in time, the increased cell proliferation may enhance the incidence of mutations, therefore permitting the cells to escape normal control of proliferation and become malignant. Given that the therapy for EC involves surgery deteriorating the reproductive capacity and reducing women's life quality, it becomes absolutely necessary to develop protocols and proofs to identify obese patients with higher susceptibility for the potential development of EC. The results obtained from this thesis allowed us to identify such patients, understanding some of the mechanisms involved in increased endometrial proliferation and providing with the basis for the design of early diagnosis strategies. Thus, we hope that in the not too distant future, these obese women may be segregated to receive greater supervision. This is particularly relevant if we consider that less than 20% of patients with advanced EC are able to survive.

## 1. INTRODUCCIÓN

El endometrio humano es uno de los tejidos cuya función se encuentra principalmente regulada por esteroides sexuales y por otras hormonas de la circulación (1). En efecto, durante la fase proliferativa el estradiol producido por los folículos en desarrollo induce la proliferación celular en el endometrio, y luego de la ovulación la progesterona producida por el cuerpo lúteo promueve la diferenciación de las células endometriales durante la fase secretora. Además, el tejido endometrial, el que está conformado por un compartimiento epitelial y estromal, es capaz de secretar factores de crecimiento, citoquinas y péptidos que actúan como reguladores paracrinos y autocrinos de la proliferación, diferenciación y apoptosis (2, 3, 4).

Por otro lado, en los últimos años se ha destacado la función endocrina y metabólica del tejido adiposo, caracterizada por la producción de una serie de hormonas y citoquinas -que actúan de manera endocrina, paracrina y autocrina- y que en conjunto se han llamado adipoquinas (5). Dichas adipoquinas integran una red de señales que participan en la regulación de funciones celulares en órganos distantes, como es el caso del endometrio (6). Es por ello, que en situaciones endocrino-metabólicas asociadas a anormalidades en la concentración sanguínea de adipoquinas como es el caso de la obesidad, los procesos que normalmente ocurren en el endometrio y la respuesta de las células endometriales a los estímulos biológicos alterados, pueden verse afectados, lo que podría establecer condiciones favorables para el desarrollo del carcinoma endometrial (CE) tipo I.

### *1.1. Generalidades del sobrepeso y la obesidad en el mundo y en Chile*

La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial que se define como el exceso de masa adiposa, siendo perjudicial para la salud (7). Teniendo en cuenta el índice de masa corporal (IMC), la Organización Mundial de la Salud (OMS) define como normal un IMC de 18 a 24,9 kg/m<sup>2</sup>, como sobrepeso un IMC de 25 a 29,9 kg/m<sup>2</sup> y como obesidad un IMC mayor o igual a 30 kg/m<sup>2</sup> (8). A nivel mundial, alrededor de 400 millones de adultos son obesos y un billón tiene problemas de sobrepeso (9). En cuanto a Chile, la última Encuesta Nacional de Salud 2003 exhibió que 38% de la población adulta presenta sobrepeso y un 22% presenta obesidad, lo cual ha ido aumentando a través de los años como consecuencia de la dieta inadecuada y de una actividad física insuficiente (10).

### *1.2. Relación entre sobrepeso, obesidad y cáncer*

Estudios epidemiológicos han demostrado que existe una asociación entre el sobrepeso y la obesidad con diferentes tipos de cáncer: endometrio (tanto en mujeres pre- como posmenopáusicas), mama (en mujeres posmenopáusicas), colon, recto, esófago, riñón, páncreas, vesícula, ovario, hígado y próstata (11, 12).

Dentro de los cánceres asociados a sobrepeso y obesidad, el CE ha recibido especial atención, debido a que es el que presenta mayor riesgo relativo (12). Es así como la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, reportó que el sobrepeso y la obesidad están asociados con un riesgo de 2 y 3,5 veces, respectivamente, de desarrollar CE (12).

Por otro lado, es importante mencionar que se han descrito dos tipos de CE: I y II (13). El CE tipo I representa alrededor del 70-80% de los CE, y se encuentra vinculado al estímulo estrogénico, obesidad e hiperplasia endometrial. En tanto que el 10-20% de los CE, corresponde

al tipo II, el cual es menos común, no está relacionado con estimulación estrogénica y es más agresivo. Dada la asociación con el sobrepeso y la obesidad, en esta tesis nos enfocamos en el CE tipo I.

### *1.3. Bases moleculares de la asociación entre sobrepeso, obesidad y carcinoma endometrial*

La mayor susceptibilidad de las mujeres con sobrepeso y obesidad para desarrollar CE tipo I se encuentra asociada a la influencia que ejercen diversos factores tales como las adipoquinas, estrógenos y factores de crecimiento, los cuales actuarían directamente sobre las células endometriales iniciadas, incrementando la proliferación y contribuyendo así a la promoción del CE tipo I.

#### *1.3.1. Leptina*

Entre las adipoquinas que nos interesa destacar se encuentra leptina puesto que sus niveles séricos se correlacionan tanto con el peso corporal como con el IMC (14), y porque está relacionada con la patogénesis del CE (15). A su vez, la expresión de leptina y su receptor han sido detectados tanto en endometrio normal como en CE (16, 17, 18).

Reportes previos indican que leptina al unirse a su receptor desencadena la activación de la vía de señalización Janus Kinasa/Transductores de Señal y Activadores de la Transcripción (JAK/STAT) mediante una serie de fosforilaciones que a su vez pueden activar la vía de las proteínas kinasas activadas por mitógeno (MAPK) y de fosfatidil inositol 3- kinasa (PI3K) (19); ambas vías involucradas en la activación de genes relacionados con la proliferación celular (20, 21). De esta forma, esta adipoquina ha sido implicada en la regulación de la proliferación en células de cáncer mamario (22), prostático (23), y endometrial (24, 25).

Por otro lado, recientemente ha sido reportado que a concentraciones séricas fisiológicas leptina puede regular la remodelación del epitelio endometrial humano estimulando no solo la proliferación sino también la apoptosis (a través del ligando Fas) (26).

Todos estos reportes sugieren que leptina puede ser un potencial candidato que contribuya al desbalance entre proliferación y apoptosis en endometrios de mujeres con sobrepeso y obesidad, y predisponer así a la promoción del CE tipo I.

### 1.3.2. *Estrógenos*

Aunque los ovarios constituyen la principal fuente de estrógenos circulantes en mujeres premenopáusicas, en la condición de sobrepeso y obesidad existe una asociación entre la mayor aromatización de los estrógenos en el tejido adiposo y los reducidos niveles séricos de la globulina que une a esteroides sexuales (SHBG), lo que resulta en niveles elevados de estrógenos circulantes que podrían alcanzar el tejido endometrial (27).

Estudios previos indican que la expresión génica y proteica de la enzima aromataasa ( $P450_{arom}$ ) es baja o ausente en endometrio humano normal (28, 29) y en hiperplasia endometrial (generalmente precursora del CE tipo I) (30, 31). Sin embargo, no hay estudios que muestren si la expresión endometrial de esta enzima se modifica a medida que se incrementa el IMC. Por otro lado, se demostró que la actividad de la  $P450_{arom}$  es significativamente mayor en endometrio neoplásico al comparar con endometrio normal (29, 32, 33, 34), lo que indica que la  $P450_{arom}$  intratumoral desempeña un papel en la progresión tumoral. Es importante además destacar que leptina incrementa la expresión de esta enzima en células ováricas de la granulosa, células estromales adiposas, en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (35, 36, 37) y, posiblemente ocurra de igual forma en el tejido endometrial.

Además, varios estudios señalan que los estrógenos producidos por aromatización en el tejido endometrial pueden funcionar como factores mitogénicos y de crecimiento, independiente de la concentración sérica de estrógenos (38, 39). Sin embargo, más allá de la producción de estrógenos en el tejido endometrial, no se puede descartar que una exposición del tejido a elevadas concentraciones de estrógenos por periodos prolongados (como es el caso de la obesidad), pueda constituir un factor de riesgo importante en el desarrollo de CE tipo I en estas mujeres.

#### *1.4. Homeostasis endometrial y su relación con la obesidad.*

La homeostasis tisular es el proceso fisiológico coordinado entre la proliferación y la muerte celular programada o apoptosis. La proliferación celular se define como el aumento del número de células resultado del crecimiento y multiplicación celular, en tanto que la apoptosis o muerte celular programada es un fenómeno fisiológico y/o fisiopatológico en el cual las células se comprometen a morir ante un estímulo específico.

##### *1.4.1. Proliferación*

En el tejido endometrial la proliferación se encuentra regulada principalmente por los niveles circulantes de estrógeno y progesterona, así como por factores de crecimiento y adipoquinas (40, 41, 42). En condiciones normales, los estrógenos son los responsables de la proliferación de las células endometriales y de la síntesis de receptores de progesterona durante la fase proliferativa del ciclo menstrual, dando paso a la fase secretora regida por esta última hormona (43). Sin embargo, en la condición de obesidad se ha observado un aumento considerable en los niveles circulantes de estrógenos, sin oposición de progesterona, lo que juega un papel importante en la mayor exposición endometrial a estrógenos y por ende en la etiología del CE (43). Al respecto,

se ha reportado que los estrógenos incrementan la proliferación en células con CE (44), cáncer de mama (45), en células vaginales endoteliales (46) y en espermatozoide humano (47), mediante dos mecanismos: uno genómico en el cual genes como *ciclina D1* y *c-myc* promueven el avance del ciclo celular desde la fase G1 a la fase S (48), y otro no genómico en el cual se activan vías de señalización intracelular como la de la proteína kinasa A (PKA) (49), MAPK (20) y PI3K (50).

Dentro de la vía de las PI3K se encuentra la proteína kinasa B o AKT, que tiene efectos directos sobre la proliferación celular mediante, por ejemplo, la inhibición de la proteína apoptótica Bad (51, 52). Esta última proteína puede inhibir a la proteína Bcl-2, razón por la cual AKT favorece la activación de Bcl-2 (53). A su vez, AKT tiene efectos sobre la transcripción de genes forkhead implicados en la progresión del ciclo celular y en la supervivencia celular (54). Se ha constatado la expresión de AKT en células endometriales del estroma, epitelio y decidua (55). Además, se ha observado que en condiciones normales existe una alta expresión endometrial nuclear de AKT fosforilada en el residuo serina (pAKT) durante la fase proliferativa, lo que sugiere que pAKT está siendo estimulada principalmente por los estrógenos los cuales tienen su pick en esta fase del ciclo menstrual (56, 57). Por lo tanto, los estrógenos pueden activar a AKT y de esta forma influir en los procesos de proliferación y supervivencia celular en el endometrio (20, 58). Por otra parte se ha descrito que la vía de transducción de señales correspondiente a PI3K/AKT puede ser activada por leptina. La unión de esta adipoquina a su receptor gatilla la fosforilación de la proteína JAK-2 (de la vía de las JAK) con lo que se induce la activación de la vía de las PI3K con la consiguiente fosforilación y activación de la proteína AKT (59, 60).

En base a esto se podría sugerir que en la condición de obesidad, y con niveles elevados de leptina y estrógenos circulantes, la expresión de pAKT estaría incrementada en el endometrio, de

tal manera que pAKT podría modular la homeostasis endometrial. Por lo mismo, es importante determinar la expresión de la proteína pAKT en el endometrio de mujeres con sobrepeso y obesidad, de manera de relacionar dicha expresión con la de los marcadores de apoptosis y proliferación en el endometrio.

Varios métodos se han utilizado para evaluar la proliferación celular en el tejido endometrial. Entre ellos, se encuentra la detección del antígeno nucleolar Ki67 el cual se expresa durante las fases G1, S, G2 y M del ciclo celular (61, 62). Resultados preliminares de nuestro laboratorio, realizados en base a la detección de este antígeno en mujeres con diferente IMC, revelaron una mayor expresión de esta proteína en mujeres con sobrepeso y en mujeres obesas al comparar con mujeres normopeso. La información anterior se complementó, en esta tesis, con la evaluación del marcador de proliferación Histona H3 fosforilada en Serina 10 (pH3). Dicho marcador otorga información adicional al identificar a células en fase M y que por lo tanto han completado el ciclo celular, debido a que pH3 es fosforilada en Serina 10 cuando los cromosomas se condensan durante la profase, y permanece fosforilada hasta la telofase (63).

#### *1.4.2. Apoptosis*

En el endometrio la apoptosis ocurre de manera fisiológica durante el remodelamiento tisular (64,65). Su activación puede ser regulada por el ligando FAS y comenzar a nivel de la membrana (vía extrínseca) (66). También puede ocurrir una activación independiente del ligando (vía mitocondrial o vía intrínseca), la cual está dada por el desbalance entre las proteínas correspondientes a la familia Bcl-2: las proapoptóticas como Bax y Bad, y las anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-X1 y Bcl-Xs (67). Tanto la vía intrínseca como extrínseca convergen en la activación de las Caspasas-3, -6 y -7, siendo la principal la Caspasa-3 (68).

En relación a la proteína Bcl-2, se ha observado que en condiciones normales su expresión es máxima en células epiteliales endometriales durante la fase proliferativa y decrece durante la fase secretora, lo que sugiere que Bcl-2 se encuentra regulada por los esteroides sexuales durante el ciclo menstrual (69). Existe evidencia de que la sobreexpresión de esta proteína bloquea la apoptosis jugando un importante rol en el carcinoma mamario (70), gástrico (71), prostático (72) y endometrial (73). Otros estudios han demostrado que el incremento en la expresión endometrial de esta proteína en mujeres posmenopáusicas con hiperplasia y con CE favorece la proliferación celular endometrial (74). Además, se ha descrito una correlación positiva entre los niveles de expresión de la proteína Bcl-2 en el ovario y la expresión del receptor de estrógenos y progesterona en dicho tejido.

En el caso de la proteína Bax, se ha determinado que se expresa mayoritariamente en las células epiteliales endometriales durante la fase secretora en condiciones normales (75). Sin embargo, se ha observado un incremento de su expresión en hiperplasia endometrial y en CE, al comparar con tejido endometrial normal (73).

Por otro lado, se ha reportado que Bcl-2 forma heterodímeros con Bax *in vivo* tanto en endometrio normal (76) como con CE (77), siendo mayor la razón Bcl-2/Bax en el caso del CE. De esta manera la relación entre ambas proteínas determina el destino final del tipo celular estudiado, y por lo mismo en este trabajo de tesis se abordó el estudio de ambos marcadores en el tejido endometrial de mujeres obesas y de mujeres con sobrepeso, debido a que un incremento en la razón Bcl-2/Bax contribuiría a un desbalance de la homeostasis endometrial, a favor de la proliferación celular.

Por su parte, la Caspasa-3 actúa como proteína efectora final produciendo la activación de las endonucleasas encargadas de la degradación del DNA cromosomal (78). Está mayormente expresada en endometrio de fase secretora (79) y en adenocarcinoma endometrial temprano (80). Dentro de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) se encuentra Survivina, la cual es capaz de regular tanto la proliferación como la apoptosis (81, 82). En diferentes tipos de cánceres (83, 84) incluido el CE (85), se ha demostrado que su sobreexpresión confiere protección contra el estímulo apoptótico, en tanto que la pérdida o reducción en su expresión sensibiliza a las células para la apoptosis. Survivina muestra diferencias cíclicas a lo largo del ciclo menstrual, siendo mayor su expresión en endometrio de fase proliferativa que en fase secretora (86), lo que sugiere que los esteroides se encuentran regulando su expresión. En este mismo estudio se observó que en las células epiteliales endometriales existe una asociación entre Survivina y la proteína AKT, ya que luego de utilizar un inhibidor de la proteína PI3K se produjo la inhibición de la fosforilación de AKT y la expresión de Survivina (87). Por lo planteado anteriormente, y dada la relevancia de esta proteína en la homeostasis endometrial, es importante determinar su nivel de expresión endometrial en las mujeres con sobrepeso y obesidad.

Con los antecedentes expuestos, en esta tesis se propuso estudiar el posible desbalance entre proliferación y apoptosis en endometrios obtenidos de los grupos de mujeres con sobrepeso y obesidad, e investigar si los niveles circulantes de leptina en estas mujeres se encuentran asociados con tal desbalance. Estos resultados ayudarán a comprender desde un punto de vista bioquímico/molecular la asociación entre la obesidad y el CE tipo I.

## 2. HIPÓTESIS

“El sobrepeso y la obesidad conducen a un desbalance en los procesos de proliferación y apoptosis celular en el tejido endometrial, que se asocia con altos niveles séricos de leptina, lo que en muchas mujeres establece condiciones favorables para la promoción del CE tipo I”

## 3. OBJETIVOS

### 3.1.1. *Objetivo general*

Evaluar en mujeres con sobrepeso y obesidad (sin CE tipo I), si existe desregulación en la homeostasis endometrial y si esto se asocia con concentraciones alteradas de leptina, al comparar con mujeres normopeso, favoreciendo así la promoción del CE tipo I.

### 3.1.2. *Objetivos específicos*

- Determinar la concentración sanguínea de leptina en los seis grupos de mujeres que se estudiarán. Además, investigar el perfil de expresión endometrial del receptor de dicha adipocina en los grupos en estudio.
- Estudiar el grado de apoptosis en base a la fragmentación del DNA y a la expresión de Caspasa-3 activa, Bcl-2, Bax, Survivina (Western blot y/o inmunohistoquímica), así como el grado de proliferación celular (inmunohistoquímica de Histona H3 fosforilada), en endometrios obtenidos de los grupos de mujeres en estudio.
- Relacionar los cambios en las concentraciones séricas de leptina y la expresión de su receptor con el índice de proliferación y apoptosis en los grupos de mujeres considerados en esta tesis.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Obtención de las muestras

A cada mujer se le solicitó una muestra de sangre venosa (en ayunas) y una muestra de tejido endometrial. Dichas muestras fueron obtenidas de mujeres pertenecientes a 6 grupos (Tabla 1), previo consentimiento escrito e informado (formato adjunto, Anexo1). Este proyecto fue aprobado por los Comité de Ética Científico del Área Oriente y del INTA.

**Tabla 1.** Características generales de los seis grupos de mujeres a estudiar

Grupo	N (n=10)	S (n=9)	O (n=17)	N (n=10)	S (n=9)	O (n=12)
Características clínicas	Mujeres cíclicas fértiles	Mujeres cíclicas fértiles	Mujeres cíclicas fértiles	Mujeres posmenopáusicas	Mujeres posmenopáusicas	Mujeres posmenopáusicas
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	18 a 24,9	25 a 29,9	≥ 30	18 a 24,9	25 a 29,9	≥ 30
Histología endometrial	Normal	Normal	Normal	CE tipo I	CE tipo I	CE tipo I

Nota: Según lo establecido por la OMS, el IMC normal corresponde a 18-24,9 kg/m<sup>2</sup> (N), el sobrepeso corresponde a un IMC de 25 a 29,9 kg/m<sup>2</sup> (S), y la obesidad a un IMC mayor o igual a 30 kg/m<sup>2</sup> (O).

#### 4.1.1. Grupos con histología endometrial normal (HEN)

Corresponden a voluntarias cíclicas normales (n=36) con diferente IMC, fertilidad probada, sin terapia con anticonceptivos hormonales por lo menos tres meses antes de la obtención de la muestra y en fase proliferativa del ciclo menstrual. Ellas fueron sometidas a histerectomía por causas no neoplásicas y por indicación médica en el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico San Borja Arriarán (HCSBA), Campus Centro, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Reportes previos del laboratorio indicaron la existencia de dos grupos de mujeres obesas con HEN (O1 y O2), las que presentaron un comportamiento diferencial cuando se evaluó la proliferación celular mediante la detección del antígeno nucleolar (Ki67): el grupo O1 presentó un elevado nivel de proliferación endometrial al compararse con el grupo normopeso, en tanto que en el grupo O2 el índice de proliferación fue similar al observado en el grupo normopeso. Dichos subgrupos de mujeres obesas con HEN fueron tenidos en cuenta en esta tesis.

#### *4.1.2. Grupos con CE tipo I*

Se incluyeron a mujeres posmenopáusicas que se encontraban en etapas tempranas de la carcinogénesis endometrial (estadio G1) (88), sin tratamiento previo. Estas mujeres asistieron al Hospital Santiago Oriente Dr. Luis Tisné Brousse donde las muestras de tejido endometrial (n=31) fueron obtenidas posterior al procedimiento quirúrgico (pieza de histerectomía), según el criterio médico. El anatómo-patólogo separó una muestra de tejido tumoral endometrial puro de la pieza quirúrgica fresca (no embebida en formalina, ni incluida en parafina) para realizar los estudios correspondientes, siempre y cuando, la separación de dicha fracción no entorpeciera el diagnóstico histopatológico.

Se realizó un análisis morfológico (tinción de hematoxilina/eosina) a la muestra endometrial de los distintos grupos. Los tejidos de los grupos con HEN fueron clasificados de acuerdo a la fecha de la última regla (FUR), concentraciones plasmáticas de estradiol y progesterona, y mediante estudio histológico de acuerdo a los criterios de Noyes (89) realizado por un anatómo-patólogo. Por lo tanto, las observaciones histológicas fueron complementadas y comparadas con los datos clínicos de las mujeres en estudio. El diagnóstico histopatológico del CE tipo I fue realizado por

el anatómo-patólogo teniendo en cuenta la clasificación de la OMS y de la Sociedad Internacional de Patólogos Ginecológicos (90).

Una vez obtenidas las muestras endometriales de todos los grupos, una fracción fue fijada en formalina-PBS e incluida en parafina (estudios de proliferación celular, apoptosis y expresión proteica). El resto de las fracciones fueron congeladas en N<sub>2</sub> líquido y guardadas a -70°C (para estudios de expresión proteica). De las muestras sanguíneas obtenidas de los seis grupos de mujeres, se separó el suero mediante centrifugación a 1.800 g por 15 min el cual fue almacenado en alícuotas a -20°C para posteriormente realizar la medición de la concentración de leptina y de los esteroides de interés.

#### *4.2. Evaluación de la concentración sérica de leptina*

En los sueros obtenidos de las muestras de sangre de las mujeres en estudio, se midió la concentración de leptina por ensayo inmunoradiométrico (IRMA) (91). Los valores correspondientes a los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 4,6% y 6,2 %, respectivamente.

#### *4.3. Inmunohistoquímica para el receptor de leptina*

Para la determinación de la expresión endometrial del receptor de leptina en las mujeres de interés, se realizó el siguiente procedimiento experimental. Cortes de tejido endometrial de 5 µm fueron desparafinados en xilol y luego hidratados con una batería de alcoholes (100%, 95%, 85%, 70%, 50%). La recuperación antigénica se realizó en presencia de buffer citrato de sodio 10 mM pH=6 por 20 min a 95°C. Luego, la actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada por incubación con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 10 % por 5 min, seguida de lavados con buffer salino fosfato (PBS). Para el bloqueo de sitios inespecíficos se utilizó seroalbúmina

bovina (BSA) al 5% en PBS por 1 h a temperatura ambiente. A continuación, los cortes histológicos fueron incubados con un anticuerpo primario para el receptor de leptina total (Santa Cruz) (1:250) y el receptor fosforilado (Santa Cruz) (1:100) por 1h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la incubación con un segundo anticuerpo biotinilado (Dako) por 40 min a temperatura ambiente. Luego, mediante avidina-peroxidasa y utilizando como sustrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y como cromógeno diaminobencidina (DAB) se detectó la presencia del receptor total y fosforilado por la obtención de un precipitado de coloración café. A continuación se realizó una contratinción con hematoxilina. Cada placa contó con su correspondiente control negativo, al cual no se le agregó el primer anticuerpo.

Dos observadores independientes semicuantificaron a lo menos 1500 células por muestra a través de HScore el cual tiene en cuenta tanto el porcentaje de células positivas como la intensidad de la tinción. Dicha intensidad fue evaluada teniendo en cuenta las siguientes categorías de intensidad: - (no teñida), 1+ (tinción débil), 2+ (tinción moderada), 3+ (tinción intensa). Por lo tanto, el valor de HScore fue determinado a través de la siguiente fórmula:  $HSCORE = \sum P_i \times (i + 1)/100$ , descrita previamente por Bogusiewicz y cols 2006 (59) para el receptor de leptina. En la misma,  $P_i$  corresponde al porcentaje de células teñidas para cada categoría de intensidad, en tanto que la sigla  $i$  denota la intensidad de tinción definida de 1 a 3.

#### *4.4. Estudio de la proliferación celular*

Se realizó mediante la inmunodetección de la proteína pH3 (92) en el tejido endometrial obtenido de cada una de las mujeres de los grupos de interés. Para ello, las muestras fueron sometidas al mismo procedimiento de inmunohistoquímica que para la detección del receptor de leptina (descrito en el apartado de arriba). Se utilizó como anticuerpo primario anti-pH3 fosforilada en Serina 10 (Upstate) (1µg/ml) por 1 h a temperatura ambiente. Luego se utilizó



el segundo anticuerpo biotinilado durante 45 min a temperatura ambiente. En los pasos siguientes se procedió de la misma forma que para el receptor de leptina. Finalmente, por microscopia óptica se determinó el porcentaje de células positivas (coloración café) para esta proteína luego del conteo de aproximadamente 1500 células por muestra, realizado por 3 observadores independientes.

*4.5. Estudio de la apoptosis por medio de la marcación de los extremos fragmentados del DNA con nucleótidos biotinilados a través de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling).*

El método de TUNEL (Promega) identifica a las células apoptóticas *in situ* mediante el uso de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) encargada de la transferencia de biotina-dUTP a las cadenas fragmentadas de DNA (93). La biotina es detectada por la reacción con estreptavidina conjugada con peroxidasa (HRP) y visualizados por DAB (94).

En las muestras de tejido endometrial se estudió la fragmentación del DNA a través de este método. Para ello, se realizó la desparafinización con xilol seguido de la re-hidratación con diferentes grados de alcoholes. Posteriormente, los cortes de tejido endometrial se incubaron en cloruro de sodio (NaCl) 0,85% por 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se fijaron las secciones de tejido en paraformaldehído 4 % en PBS por 15 min a temperatura ambiente. Luego, se realizó la permeabilización de los tejidos utilizando proteinasa K (20 µg/ml) durante 20 min a temperatura ambiente. Luego se lavó con PBS y se refijaron las secciones de tejido. A continuación, los cortes se incubaron a temperatura ambiente por 1h en cámara húmeda, con la mezcla de buffer de equilibrio, nucleótidos biotinilados y la enzima TdT. Al control negativo no se le adicionó la enzima TdT. Para detener la reacción se incubó con una solución compuesta SSC 2X durante 15 min a temperatura ambiente y luego se lavó con PBS. El bloqueo de la

peroxidasa endógena se realizó con  $H_2O_2$  al 0,3 %. Posteriormente, se incubó con estreptavidina HRP por 30 min a temperatura ambiente; como sustrato se utilizó  $H_2O_2$  y como cromógeno DAB, por lo que la tinción se evidenció de color café. Se contratiñó con hematoxilina. Finalmente, por microscopia óptica se determinó el porcentaje de células con signos positivos de apoptosis luego del conteo de aproximadamente 1500 células por muestra, realizado por dos observadores independientes.

#### *4.6. Determinación de los niveles de expresión proteica de Bcl-2, Bax, Caspasa-3 activa, y Survivina*

La expresión de estas proteínas se evaluó mediante Western blot. Para ello, trozos de tejido congelados de las mujeres estudiadas fueron homogeneizados y lisados a 4°C usando un buffer de lisis conteniendo: Hepes 20 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, Triton 1%, PMSF 5 mM,  $Na_3VO_4$  50  $\mu$ M (Sigma), además de un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche). Luego de la centrifugación a 10.000 g por 20 min a 4°C, se determinó la concentración de proteínas usando BCA kit (Pierce). Los extractos proteicos (50  $\mu$ g) fueron sometidos a electroforesis en geles al 12 %. Una vez finalizada la corrida los geles fueron electrotransferidos a membranas de PDVF. Luego de la transferencia, las membranas fueron bloqueadas y a continuación incubadas con el respectivo anticuerpo primario: para Bcl-2 (0,5 $\mu$ g/ml, Calbiochem), Bax (1:1000, DakoCytomation), Caspasa-3 (1:1000, BD Pharmingen) Survivina (1:1000, Santa Cruz) durante toda la noche a 4 °C. Luego, las membranas fueron lavadas con Buffer Tris Salino con Tween (TTBS) e incubadas por 1h a temperatura ambiente con un segundo anticuerpo monoclonal (1:5000, Amersham) para el caso de Bcl-2 y con un anticuerpo secundario policlonal (1:5000, Amersham) para el caso de Bax, Survivina y Caspasa-3. Luego se reveló por quimioluminiscencia. Finalmente, los niveles proteicos fueron analizados por densitometría

usando un programa UN-SCAN-IT (Versión 5.1) (94). Los resultados de Western blot se expresaron como la razón entre la intensidad de la banda de la proteína en estudio y la de  $\beta$ -Actina (utilizada como control interno).

#### *4.7. Inmunohistoquímica para las proteínas AKT fosforilada (pAKT) y Aromatasa(P450<sub>arom</sub>)*

Las muestras endometriales fueron sometidas al mismo procedimiento que para la inmunodetección del receptor de leptina y pH3, con las modificaciones que se detallan a continuación. Los cortes de tejido se incubaron con un anticuerpo primario (Cell Signaling) anti-pAKT serina 473 (1:2000) y anticuerpo primario anti- P450<sub>arom</sub> (Serotec) (1:600) por 1h a temperatura ambiente. De este paso en adelante se procedió de la misma manera que para el receptor de leptina y pH3. Finalmente, por microscopia óptica se determinó el porcentaje de células positivas (coloración café) para estas proteínas luego del conteo de aproximadamente 1500 células por muestra, el cual fue realizado por dos investigadores independientes.

#### *4.8. Cálculo del tamaño de muestra y análisis estadístico*

El número de mujeres en este estudio fue calculado asumiendo un  $\alpha=0,05$  y un  $\beta= 20\%$  y una diferencia entre promedios de 0,3 y una desviación estándar de 0,2 de acuerdo a nuestros resultados previos.

Para el análisis estadístico primero se realizó un test de normalidad (Kolmogorov), a fin de conocer la distribución de los datos. A continuación, para las comparaciones entre los distintos grupos en estudio se utilizó la prueba de ANOVA seguido de un post-test (Tukey para datos paramétricos y Kruskal-Wallis para datos no paramétricos). Además, se utilizó análisis de correlación multivariado para evaluar la asociación entre los niveles séricos de leptina y su receptor, con el índice de proliferación y apoptosis en las mujeres en estudio.

Se consideró como significativo un *valor p* menor a 0,05. Los resultados se encuentran expresados como promedio  $\pm$  EEM en todos los estudios. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa SPSS para Windows, versión 10.0 (SPSS Inc., IL).

## 5. RESULTADOS

### *5.1. Características clínicas y endocrinológicas de las mujeres en estudio*

Como se muestra en la Tabla 2 los grupos de mujeres con histología endometrial normal presentan edades similares. Se puede observar un aumento del índice de andrógenos libres (IAL) en las mujeres con sobrepeso y obesidad como consecuencia de la disminución de los niveles séricos de SHBG. Los niveles séricos de estrona ( $E_1$ ) y estradiol ( $E_2$ ) se incrementaron en forma significativa en las mujeres obesas 1 (58% y 48%, respectivamente) con respecto a las mujeres normopeso ( $p < 0,05$ ). En el caso de  $E_1$ , su concentración circulante en las mujeres con S fue 41,5% mayor ( $p < 0,05$ ) al comparar con el grupo N. Interesantemente, la concentración de  $E_2$  se incrementó en un 47% ( $p < 0,05$ ) en las mujeres O1 al comparar con las mujeres del grupo O2, en tanto que los valores séricos de  $E_2$  fueron similares entre los grupos O2 y N. En relación a progesterona ( $P_4$ ) no se observaron diferencias significativas entre los grupos.

Las características clínicas y endocrinológicas de las mujeres obesas con CE tipo I, usadas como control en este estudio, fueron inherentes a su estado posmenopáusico (Tabla 3).

**Tabla 2.** Características clínicas y endocrinológicas de las mujeres con HEN.

	<b>Histología endometrial normal</b>			
	<b>Normopeso (N, n= 10)</b>	<b>Sobrepeso (S, n= 9)</b>	<b>Obesas 1 (O1, n = 12)</b>	<b>Obesas 2 (O2, n = 5)</b>
<b>Edad (años)</b>	43,2 ± 1,90	44,8 ± 1,05	44,6 ± 0,60	45,0 ± 0,30
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	22,1 ± 0,80	27,2 ± 0,50 <sup>a</sup>	35,7 ± 1,20 <sup>a</sup>	33,9 ± 1,40 <sup>a</sup>
<b>A<sub>4</sub> (ng/ml)</b>	1,34 ± 0,21	1,33 ± 0,16	1,45 ± 0,14	1,38 ± 0,30
<b>T (ng/ml)</b>	0,28 ± 0,05	0,31 ± 0,03	0,35 ± 0,03	0,34 ± 0,05
<b>SHBG (nmol/l)</b>	54,8 ± 8,77	40,6 ± 4,28	32,9 ± 5,46 <sup>a</sup>	28,6 ± 11,0 <sup>a</sup>
<b>IAL</b>	1,88 ± 0,32	2,44 ± 0,30	3,37 ± 0,42 <sup>a</sup>	3,44 ± 0,80 <sup>a</sup>
<b>E<sub>2</sub> (pg/ml)</b>	28,0 ± 7,21	43,0 ± 13,76	66,7 ± 15,90 <sup>a</sup>	35,5 ± 3,5 <sup>b</sup>
<b>E<sub>1</sub> (pg/ml)</b>	34,3 ± 14,0	58,6 ± 10,6 <sup>a</sup>	66,1 ± 10,3 <sup>a</sup>	53,5 ± 15,7
<b>P<sub>4</sub> ( ng/ml)</b>	1,18 ± 0,20	0,98 ± 0,10	1,00 ± 0,30	0,77 ± 0,30

Los valores corresponden al promedio ± EEM. (a) p < 0,05 comparado con el grupo normopeso, b) p < 0,05 comparado con el grupo O1.

IAL e IMC: índice de andrógenos libres e índice de masa corporal, respectivamente.

A<sub>4</sub>, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>: androstenediona, estrona, estradiol y progesterona, respectivamente.

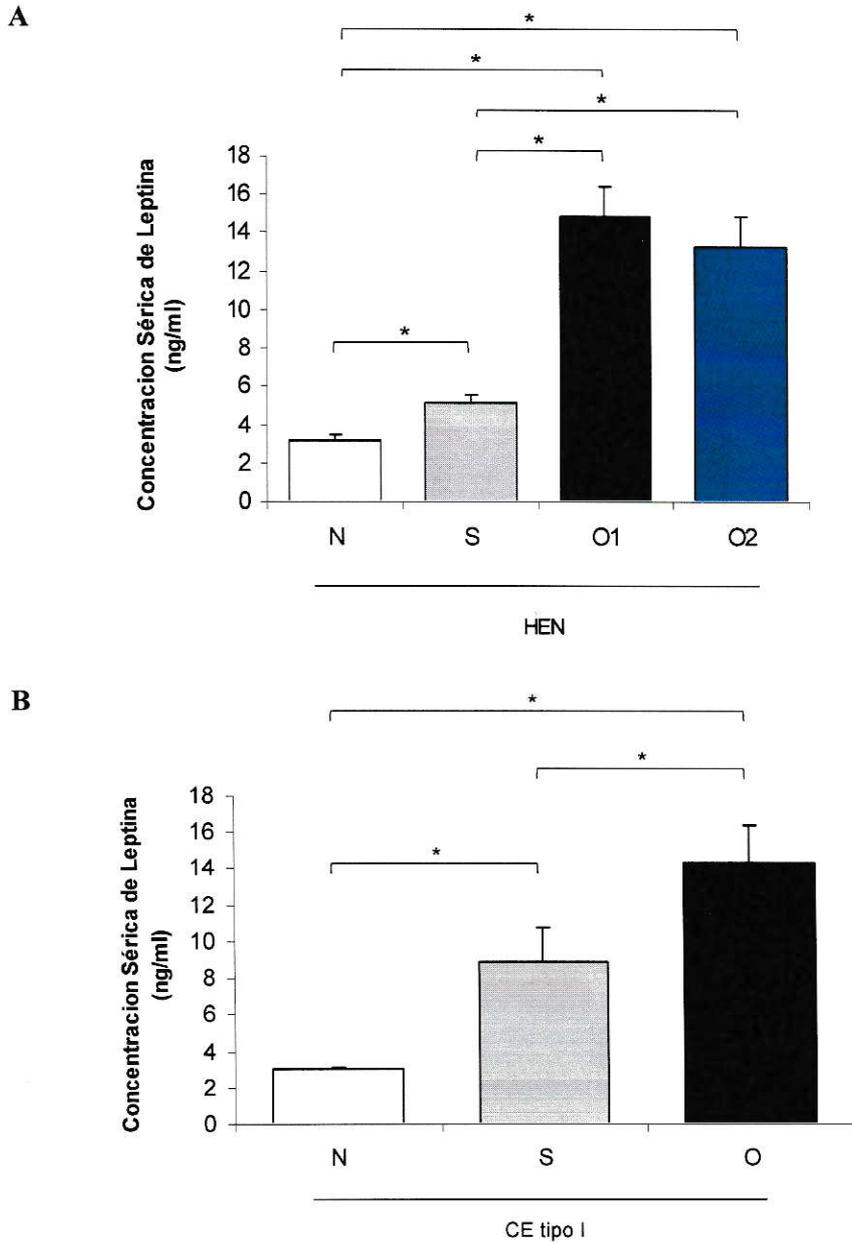
**Tabla 3.** Características clínicas y endocrinológicas de las mujeres con CE tipo I

	CE tipo I		
	Normopeso (N, n = 10)	Sobrepeso (S, n = 9)	Obesas (O, n = 12)
<b>Edad (años)</b>	67,4 ± 4,5	61,6 ± 5,3	66,0 ± 4,1
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23,9 ± 0,8	27,1 ± 0,6 <sup>a</sup>	37,8 ± 2,9 <sup>a,b</sup>
<b>A<sub>4</sub> (ng/ml)</b>	1,59 ± 0,11	1,64 ± 0,12	1,75 ± 0,1
<b>T (ng/ml)</b>	0,41 ± 0,03	0,44 ± 0,08	0,57 ± 0,1 <sup>a</sup>
<b>SHBG (nmol/l)</b>	70,8 ± 5,1	46,7 ± 9,6 <sup>a</sup>	32,1 ± 5,8 <sup>a</sup>
<b>IAL</b>	2,02 ± 0,15	4,27 ± 1,92 <sup>a</sup>	6,85 ± 1,3 <sup>a</sup>
<b>E<sub>2</sub> (pg/ml)</b>	14,5 ± 3,5	20,7 ± 6,1	26,4 ± 6,7 <sup>a</sup>
<b>E<sub>1</sub> (pg/ml)</b>	37,6 ± 7,2	47,2 ± 11	71,2 ± 8,2 <sup>a,b</sup>
<b>P<sub>4</sub> (ng/ml)</b>	1,5 ± 0,6	1,1 ± 0,3 <sup>b</sup>	0,035 ± 0,007 <sup>a,b</sup>

Los valores corresponden al promedio ± EEM. (a)  $p < 0,05$  comparado con el grupo normopeso. b)  $p < 0,05$  comparado con el grupo S.

### 5.2. Medición de la concentración sérica de leptina en mujeres con HEN y con CE tipo I

Mediante el ensayo IRMA, se determinó la concentración sérica de leptina en los grupos de mujeres con HEN y con CE tipo I. En ambos grupos la concentración de leptina circulante se incrementó con el IMC de las mujeres (Fig. 1). Es así como las mujeres con HEN del grupo S, O1 y O2 presentaron un incremento del 63%, 371% y 322%, respectivamente, respecto a las mujeres con IMC normal ( $p < 0,05$ ) (Fig. 1A). A su vez las mujeres del grupo O1 y O2 exhibieron concentraciones de leptina significativamente aumentadas (189% y 159% respectivamente) en comparación con las mujeres del grupo S ( $p < 0,05$ ) (Fig. 1A). En cuanto a las mujeres con CE tipo I, la concentración de leptina fue 188% y 363% mayor en las mujeres del grupo S y O, respectivamente, respecto al grupo N ( $p < 0,05$ ), y 60,8% superior en el grupo O al comparar con el grupo S ( $p < 0,05$ ) (Fig. 1B).

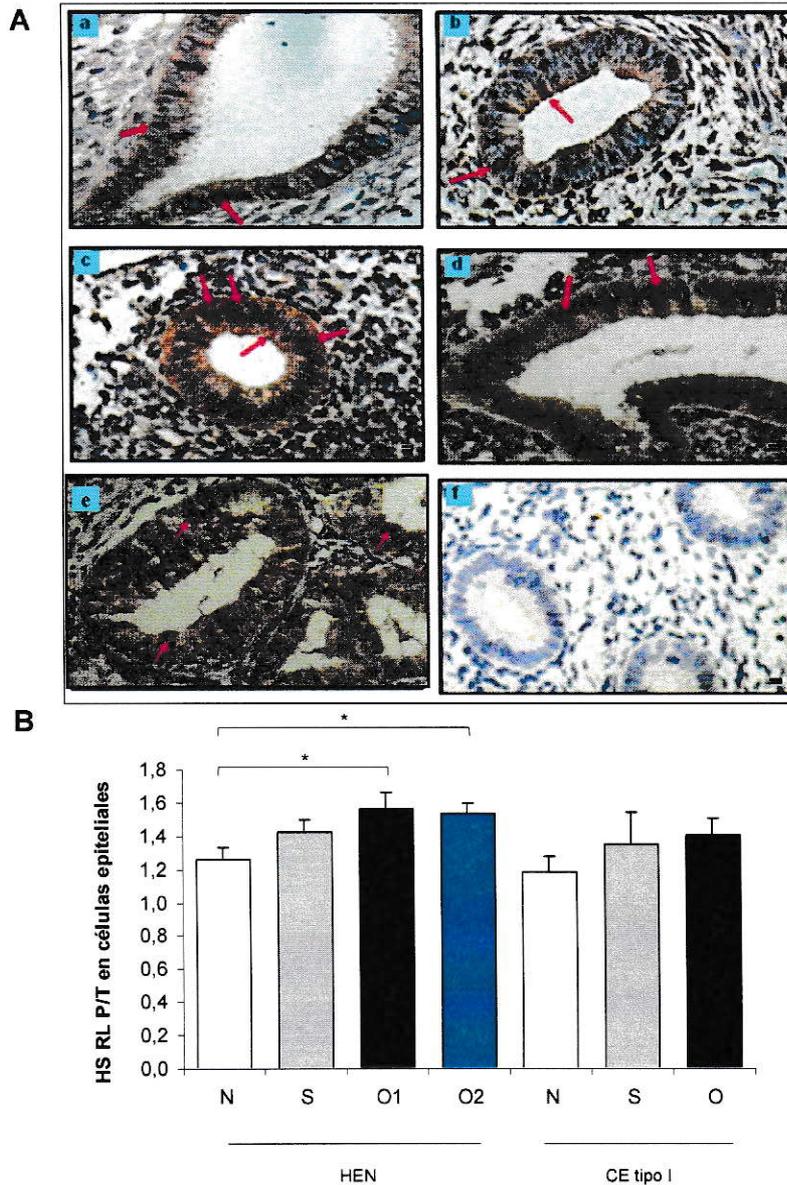


**Figura 1.** Concentración sérica de leptina en mujeres con histología endometrial normal (HEN) (**A**) y con carcinoma endometrial (CE) tipo I (**B**) con distintos índices de masa corporal. (**A**) Mediciones realizadas en muestras de mujeres normopeso (n=10), sobrepeso (n=9), obesas 1 (n=12) y obesas 2 (n=5) con HEN en fase proliferativa del ciclo menstrual. (**B**) Determinaciones efectuadas en muestras obtenidas de mujeres normopeso (n=10), sobrepeso (n=9), obesas (n=12) con CE tipo I. Las mediciones fueron realizadas en muestras de sangre (suero) obtenidas en ayunas, a través del ensayo inmunoradiométrico. Significancia: \*  $p < 0,05$

### *5.3. Expresión del receptor de leptina en tejido endometrial de mujeres con HEN y con CE tipo I*

En las muestras de tejido endometrial de mujeres con HEN y con CE se estudió la inmunolocalización del receptor de leptina (RL) total (T) y fosforilado (P). El receptor fue inmunodetectado en el citoplasma de las células epiteliales y estromales (Fig. 2A). En las células epiteliales del grupo de mujeres O1 y O2 se observó un incremento (24% y 22%, respectivamente) en la razón RL-P/RL-T al comparar con el grupo de N ( $p < 0,05$ ) (Fig. 2B). Cabe destacar que la expresión del RL-T no mostró cambios entre los grupos estudiados. En relación a las células estromales no se observaron diferencias significativas entre los grupos, y la expresión del RL-P en dichas células fue significativamente menor al comparar con las células epiteliales (datos no mostrados).

En el caso de las mujeres con CE tipo I la expresión del receptor (P/T) no mostró variación cuando se comparó con los grupos con HEN ( $p > 0,05$ ).



**Figura 2.** Inmunodetección del receptor de leptina fosforilado (RL-P) en secciones de endometrio incluidas en parafina de mujeres con histología endometrial normal (HEN) (en fase proliferativa del ciclo menstrual) (N, n=10; S, n=9; O1, n=12; O2, n=5) y de mujeres con carcinoma endometrial (CE) tipo I (N, n=10; S, n=9; O, n=12). (A) En las fotomicrografías está representada la inmunodetección del RL-P en las mujeres con HEN con distinto IMC: a, normopeso; b, sobrepeso; c, obesas 1; d, obesas 2. La inmunodetección en las mujeres obesas con CE se ilustra en la microfotografía e. El control negativo en ausencia del primer anticuerpo, corresponde a la fotomicrografía f. Las flechas indican las células epiteliales con tinción citoplasmática positiva para el RL-P. En todas las figuras el aumento es de 400X, y la escala de las barras representa 10  $\mu$ m. (B) La evaluación de la tinción, expresada en HScore ( $HS = \Sigma \% \text{ células teñidas (intensidad+1)/100}$ ) (promedio  $\pm$  EEM), de las células epiteliales positivas para el RL-P/RL-T en las mujeres sin y con CE tipo I, fue realizada por dos observadores en forma independiente, los cuales contaron un total de 1500 células por lámina. Significancias: \* $p < 0,05$ .

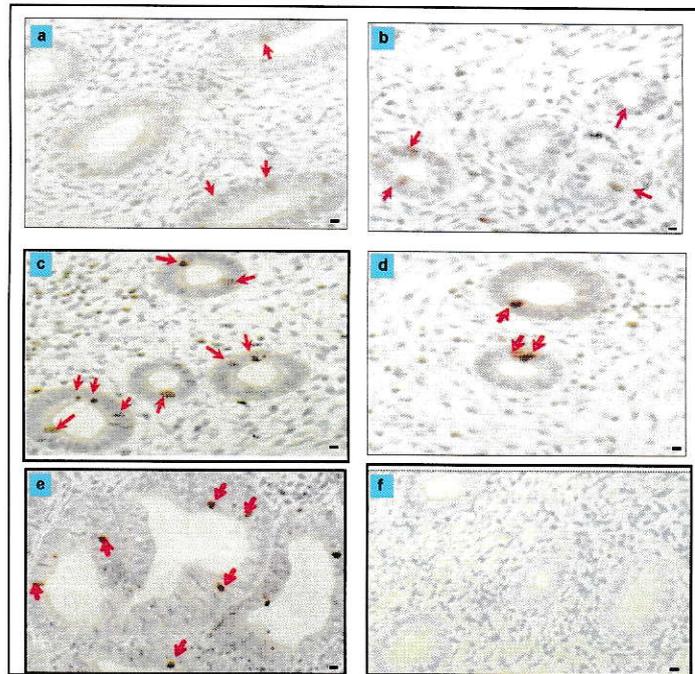
#### *5.4. Determinación del balance entre proliferación y apoptosis en el tejido endometrial*

##### *5.4.1. Expresión de la proteína histona H3 fosforilada (pH3) en mujeres con HEN y en mujeres con CE de tipo I*

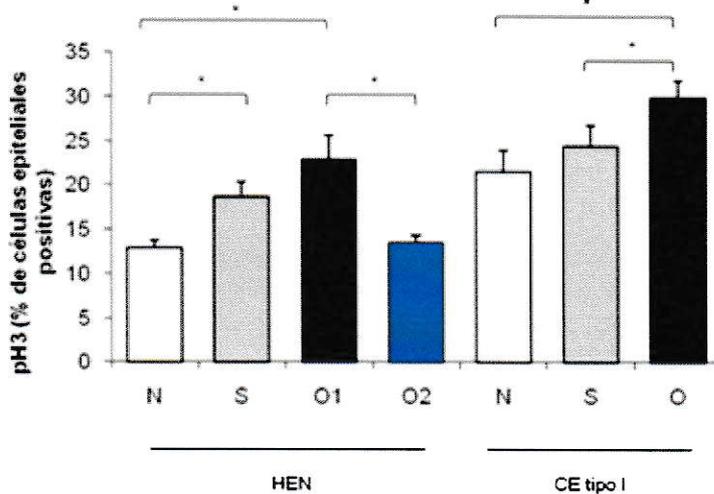
En las muestras de tejido endometrial se evaluó la proliferación celular por la detección de la Histona 3 fosforilada en residuos de Serina 10, mediante inmunohistoquímica. En la Figura 3A se observa que la tinción es nuclear y se encuentra principalmente localizada en las células epiteliales de los grupos de interés. Como se muestra en la Figura 3B el porcentaje de células epiteliales positivas para pH3 en las mujeres con HEN es mayor en las mujeres del grupo S (45%) y O1 (77,5 %) en comparación con mujeres del grupo N ( $p < 0,05$ ). A su vez, se observó un aumento de 69,9 % en la expresión de esta proteína en las mujeres del grupo O1 respecto a las del grupo O2 ( $p < 0,05$ ) (Fig. 3B). El comportamiento de las mujeres O2 en relación a este marcador de proliferación fue similar al observado en las mujeres normopeso (Fig. 3B). En el caso de la expresión de pH3 en las células endometriales estromales, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en estudio (resultados no mostrados).

En lo que respecta a las mujeres con CE tipo I, se observó un aumento significativo en las mujeres obesas (38,8%) en comparación con las mujeres normopeso ( $p < 0,05$ ) (Fig. 3B). Es importante destacar la mayor expresión de esta proteína en el grupo de las mujeres con CE tipo I al comparar con las mujeres con HEN ( $p < 0,05$ ) (Fig. 3B).

A



B

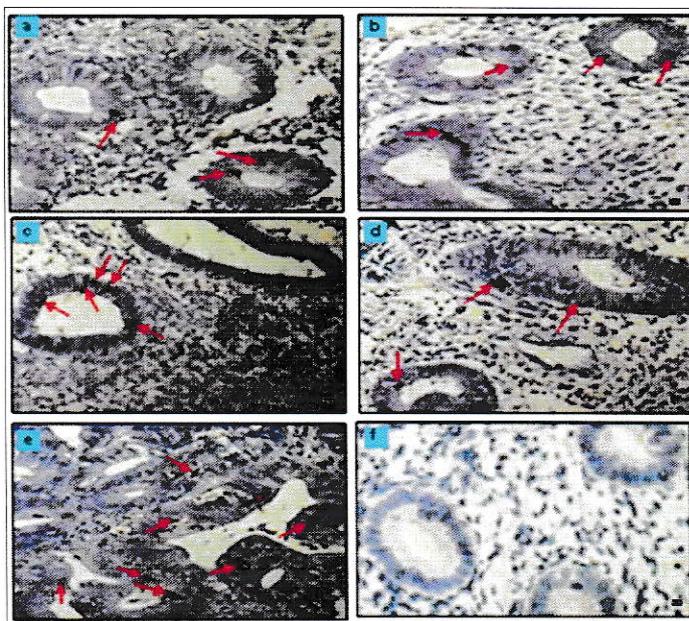


**Figura 3.** Inmunodetección de la proteína histona H3 fosforilada (pH3) en secciones de tejido endometrial (incluidas en parafina) de mujeres con histología endometrial normal (HEN) (en fase proliferativa del ciclo menstrual) y con CE tipo I. (A) Las flechas indican a las células epiteliales con tinción nuclear positiva para pH3 de mujeres con HEN (N, n=10; S, n=9; O1, n=12; O2, n=5) mostradas en las fotografías: a, normopeso; b, sobrepeso; c, obesas 1; d, obesas 2. Entre las mujeres con CE tipo I (N, n=10; S, n=9; O, n=12), las obesas se encuentran representadas en la microfotografía e. El control negativo en ausencia del primer anticuerpo, corresponde a la fotomicrografía f. En todas las figuras el aumento es de 400X, y la escala de las barras representa 10 µm. (B) La evaluación de la tinción, expresada como porcentaje (promedio ± EEM) de las células epiteliales positivas para pH3 en las mujeres sin y con CE tipo I, fue realizada por dos observadores en forma independiente los cuales contaron un total de 1500 células por lámina. Significancias: \*p<0,05.

#### 5.4.2. *Análisis de apoptosis por TUNEL en el tejido endometrial de mujeres con HEN*

#### *y con CE tipo I*

Se estudió el proceso de apoptosis evaluando la fragmentación del DNA a través del método de TUNEL en los tejidos endometriales obtenidos de las mujeres de interés. En las microfotografías de la Figura 4 se indican las células epiteliales positivas para la fragmentación del DNA en los distintos grupos en estudio. La evaluación de dicha tinción se realizó teniendo en cuenta el porcentaje de las células epiteliales con signos positivos de apoptosis en los endometrios de las mujeres estudiadas (Tabla 4), no observándose diferencias significativas en entre las mujeres con HEN. Lo mismo ocurrió en el caso de las mujeres con CE.



**Figura 4.** Fotomicrografías que ilustran la fragmentación del DNA por la técnica de TUNEL en secciones de endometrio incluidas en parafina de mujeres con HEN (en fase proliferativa del ciclo menstrual). Se muestran los grupos normopeso, sobrepeso, obesas 1 y obesas 2 en las figuras a, b, c y d, respectivamente (N, n=10; S, n=9; O1, n=12; O2, n= 5). En el caso de las mujeres con CE tipo I (N, n=10; S, n=9; O, n=12), las obesas se encuentran representadas en la figura e. El control negativo en ausencia del primer anticuerpo, corresponde a la fotomicrografía f. En las fotomicrografías las flechas indican a las células positivas (coloración café) producto de la fragmentación del DNA. En todas las figuras el aumento es de 400X, y la escala de las barras representa 10  $\mu$ m.

**Tabla 4.** Evaluación de la fragmentación del DNA en las mujeres en estudio.

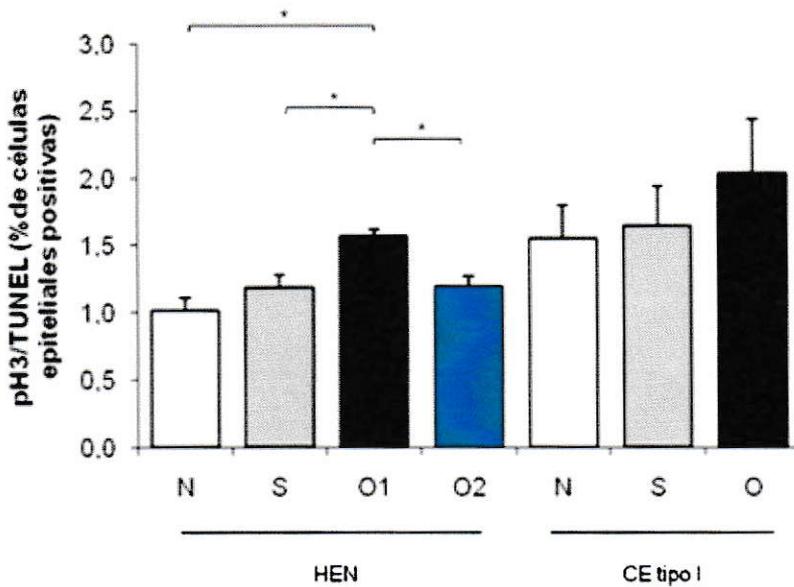
Grupos de mujeres	Histología endometrial	% de células epiteliales con signos positivos de apoptosis
N	HEN	1,25 ± 0,43
S	HEN	1,9 ± 0,28
O1	HEN	2,0 ± 0,5
O2	HEN	1,05 ± 0,4
N	CE tipo I	1,93 ± 0,48
S	CE tipo I	2,18 ± 0,33
O	CE tipo I	2,40 ± 0,82

Nota: Se muestra la evaluación de la tinción expresada en porcentaje (%) de las células epiteliales positivas (promedio ± EEM) para la fragmentación del DNA en las mujeres con HEN (N, n=10; S, n=9; O1, n=12; O2, n=5) y en las mujeres con CE tipo I (N, n=10; S, n=9; O, n=12). Esta evaluación fue realizada por dos observadores en forma independiente, los cuales contaron un total de 1500 células por lámina. Significancias:  $p > 0,05$  (entre todos los grupos en estudio).

#### 5.4.3. *Evaluación del desbalance entre proliferación y apoptosis en células epiteliales de mujeres con HEN y con CE tipo I*

Como una forma de aproximarse a conocer el desbalance entre proliferación y apoptosis en el tejido endometrial de mujeres con sobrepeso y de mujeres obesas, se realizó la evaluación de la razón entre el porcentaje de células epiteliales positivas para pH3 y el porcentaje de células con signos positivos de apoptosis. Se observó que las mujeres O1 con HEN exhiben un incremento de 56,4% y 33,8 % en la razón pH3/TUNEL al comparar con el grupo N y S, respectivamente ( $p < 0,05$ ). A su vez, las mujeres O1 presentaron un aumento de 32,7 % en dicha razón versus las

mujeres O2 ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, no se detectaron diferencias en la razón pH3/TUNEL entre las mujeres N y O2. Además, la razón pH3/TUNEL es semejante entre las mujeres obesas con HEN y los grupos de mujeres con CE tipo I ( $p > 0.05$ ).



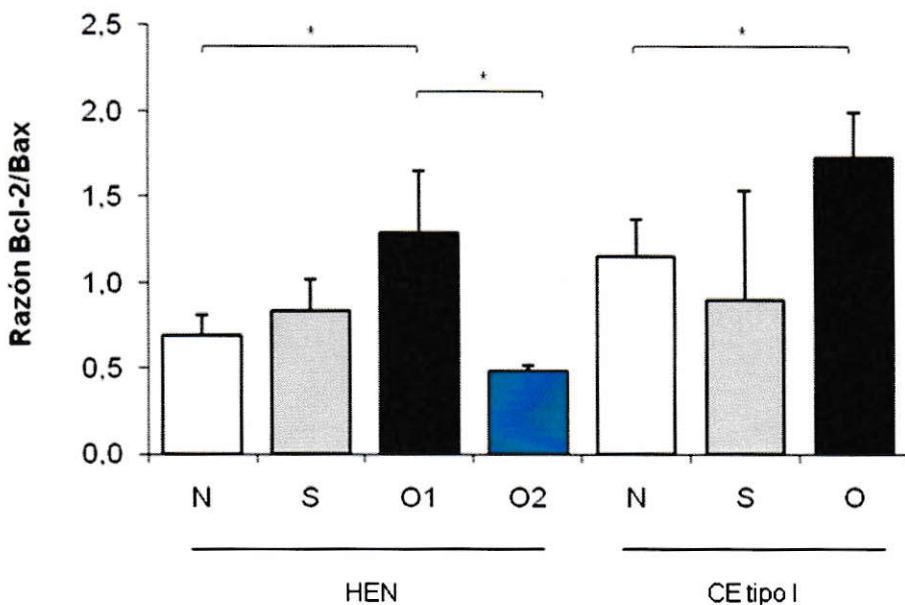
**Figura 5.** Evaluación del desbalance entre proliferación y apoptosis teniendo en cuenta la razón pH3/TUNEL en células epiteliales de mujeres con HEN (en fase proliferativa del ciclo menstrual) (N, n=10; S, n=9; O1, n=12; O2, n= 5) y en mujeres con CE tipo I (N, n=10; S, n=9; O, n=12). La evaluación de la tinción, expresada como porcentaje (%) de las células epiteliales positivas (promedio  $\pm$  EEM) para la razón pH3/ TUNEL, fue realizada por dos observadores en forma independiente los cuales contaron un total de 1500 células por placa. Significancia: \* $p < 0,05$ .

### 5.5. Expresión de las proteínas Bcl-2, Bax y Caspasa-3 activa en tejido endometrial obtenido de mujeres con HEN y con CE tipo I.

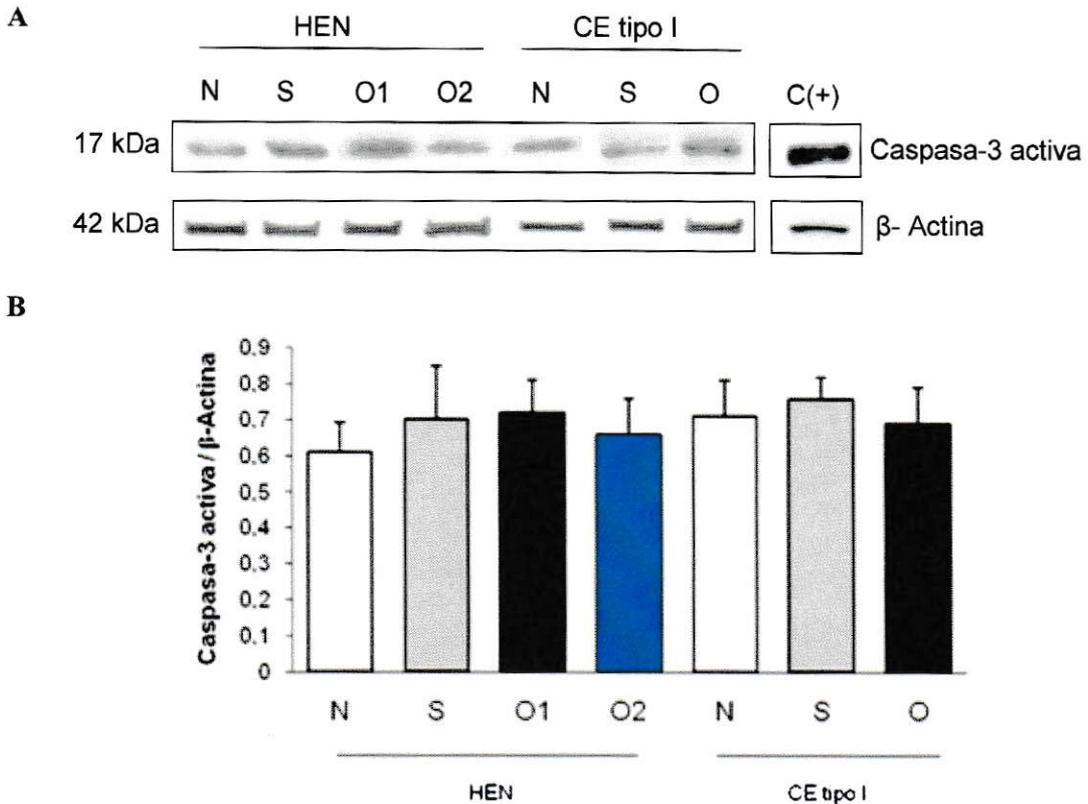
La expresión endometrial de Bcl-2 (anti-apoptótico), Bax (pro-apoptótico) y Caspasa-3 activa (proteína efectora de la apoptosis) en el tejido endometrial de las mujeres en estudio se realizó mediante el análisis de Western blot.

Observamos que en las mujeres obesas del grupo 1 (con HEN) existe un 86,9% ( $p < 0,05$ ) y 168,7% ( $p < 0,05$ ) de incremento en la razón Bcl-2/Bax versus las mujeres normopeso y obesas del grupo 2, respectivamente (Fig. 6). No se observaron diferencias significativas en dicha razón entre las mujeres del grupo O2 y N. En el caso de las mujeres obesas con CE se observó un incremento del 50,4% en la razón Bcl-2/Bax en comparación con las mujeres normopeso con CE (Fig. 6). Cabe destacar que en el caso de las mujeres con CE la razón Bcl-2/Bax fue similar a la encontrada en las mujeres obesas del grupo 1 (HEN) ( $p > 0,05$ ) (Fig. 6).

En caso de la proteína Caspasa-3 activa, su expresión endometrial no experimentó variaciones significativas entre los grupos de mujeres estudiados (Fig. 7).



**Figura 6.** Evaluación de la razón Bcl-2/Bax (promedio  $\pm$  EEM) en células epiteliales de mujeres con HEN (en fase proliferativa del ciclo menstrual) N, n=10; S, n=9; O1, n=12; O2, n=5) y de mujeres con CE tipo I (N, n=10; S, n=9; O, n=12). El estudio de la expresión de ambos marcadores se realizó mediante el análisis de Western blot, descrito en Materiales y Métodos. Significancia: \* $p < 0,05$



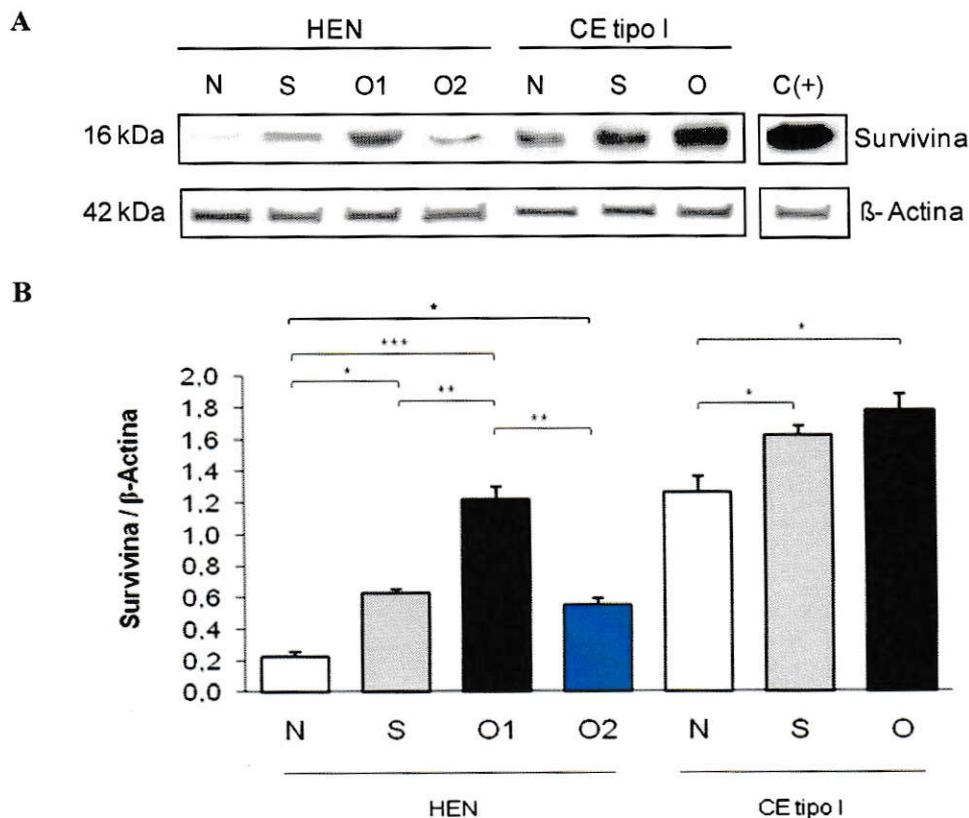
**Figura 7.** Expresión de la Caspasa-3 activa en tejido endometrial de mujeres con HEN (en fase proliferativa del ciclo menstrual) (N, n=10; S, n=9; O1, n=12; O2, n=5) y de mujeres con CE tipo I (N, n=10; S, n=9; O, n=12) mediante Western blot. En (A) se encuentran representados los niveles de expresión para la Caspasa-3 activa (17kDa) en el tejido endometrial. Las bandas fueron normalizadas con  $\beta$ - Actina. El control positivo (+) utilizado correspondió a células Jurkat tratadas con citocromo c. La intensidad de las bandas se cuantificó mediante densitometría. En (B) se muestran los porcentajes (promedio  $\pm$  EEM) de expresión de Caspasa-3 activa/  $\beta$ - Actina en el tejido endometrial de las mujeres sin y con CE tipo I.  $p > 0,05$  (no significativo).

### 5.6. Expresión de la proteína Survivina en tejido endometrial obtenido de mujeres con HEN y con CE tipo I.

En cuanto a la expresión de Survivina a través del análisis de Western blot se observó que las mujeres O1 con HEN exhiben un incremento de 454,5 %, 93,6 % y 121,8 % al comparar con el grupo N ( $p < 0,001$ ), S ( $p < 0,01$ ) y O2 ( $p < 0,01$ ), respectivamente (Fig. 8B). De esta misma forma

se observó un incremento en la expresión de Survivina en las mujeres con sobrepeso (186,3%) y obesas 2 (150%) versus las mujeres normopeso con HEN ( $p < 0,05$ ) (Fig. 8B).

Para las mujeres con CE tipo I se determinó que las mujeres con sobrepeso y obesidad presentaron un aumento significativo en la expresión de Survivina (28,5% y 41,2%, respectivamente) versus las mujeres normopeso ( $p < 0,05$ ) (Fig. 8B). La expresión de Survivina fue estadísticamente mayor en el grupo de las pacientes con CE al comparar con los grupos HEN.

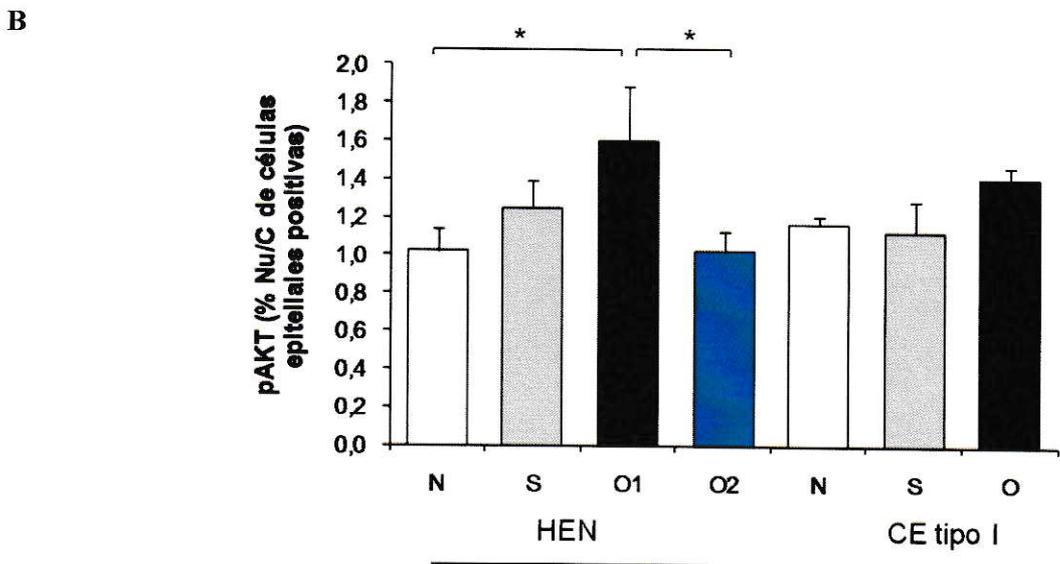
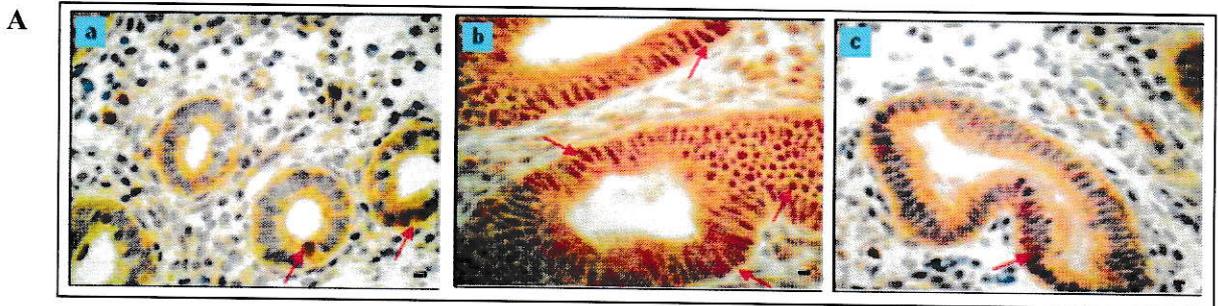


**Figura 8.** Estudio de la expresión de Survivina en tejido endometrial de mujeres con HEN (en FP) (N,  $n=10$ ; S,  $n=9$ ; O1,  $n=12$ ; O2,  $n=5$ ) y de mujeres con CE tipo I (N,  $n=10$ ; S,  $n=9$ ; O,  $n=12$ ). (A) En la figura están representados los niveles de expresión proteicos de Survivina (16kDa) en tejido endometrial en los grupos en estudio. El control positivo (+) utilizado correspondió a células Ishikawa. Las bandas fueron normalizadas con  $\beta$ -Actina y la intensidad de las mismas se cuantificó mediante densitometría. En

(B) se muestran los porcentajes (promedio  $\pm$  EEM) de expresión de Survivina en el tejido endometrial de las mujeres sin y con CE tipo I. Significancias:  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 5.7. *Expresión de la proteína AKT en tejido endometrial obtenido de las mujeres con HEN y de las mujeres con CE tipo I.*

A fin de conocer alguno de los mecanismos de señalización involucrados en la elevada proliferación encontrada en los endometrios de mujeres con sobrepeso y principalmente obesas 1 (con HEN), examinamos la expresión de la proteína kinasa AKT. En particular, se evaluó la expresión de la forma fosforilada de esta proteína (pAKT) en el residuo de Ser473, a través de inmunohistoquímica. De esta forma, pAKT fue inmunodetectada principalmente en las células epiteliales endometriales, tanto en el núcleo como en el citoplasma. Se observó una mayor expresión nuclear de pAKT en las células epiteliales de las mujeres del grupo O1 con HEN (Fig. 9A), sin diferencias en la expresión citoplasmática de pAKT entre los grupos de interés. Al evaluar la expresión de la proteína pAKT en las mujeres con HEN, teniendo en cuenta la razón Nu/C en las células epiteliales, se observó un incremento de 56,9% ( $p < 0,05$ ) en las mujeres O1 con respecto a las mujeres normopeso (Fig. 9B). Asimismo, en las mujeres con O1 se observó un incremento del 56,9% en comparación con las mujeres del grupo O2 ( $p < 0,05$ ) (Fig. 9B). Interesantemente, el nivel de expresión (Nu/C) de pAKT en las mujeres del grupo O2 fue similar al observado en las mujeres del grupo N ( $p > 0,05$ ) (Fig. 9 A -B). Por otro lado, entre las mujeres con CE con distinto IMC no se detectaron cambios significativos en la expresión de pAKT entre las mujeres en estudio. Cabe destacar que las mujeres obesas con HEN mostraron un nivel de fosforilación de AKT similar al de las mujeres obesas con CE (Fig. 9B).



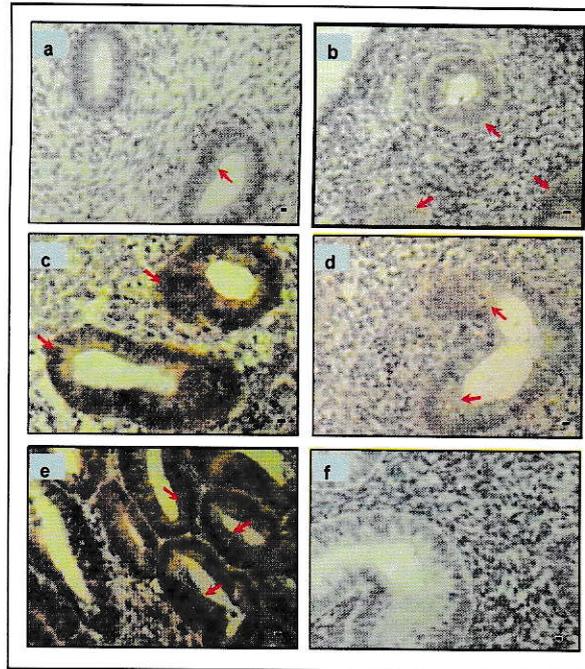
**Figura 9.** Inmunodetección de la proteína pAKT en secciones de endometrio incluidas en parafina de mujeres con HEN (en FP) (N, n=10; S, n=9; O1, n=12; O2, n= 5) y de mujeres con CE tipo I (N, n=10; S, n=9; O, n=12) (A) En las fotomicrografías las flechas indican la coloración café que corresponde a la detección de la forma fosforilada de la proteína AKT en las células epiteliales endometriales de las mujeres a) normopeso, b) obesas 1; c) obesas 2 con HEN. En todas las figuras el aumento es de 400X, y la escala de las barras representa 10  $\mu$ m. (B) Evaluación de la tinción expresada como porcentaje (%) núcleo/citoplasma (Nu/C) (promedio  $\pm$  EEM) de las células epiteliales positivas para pAKT en las mujeres sin y con CE tipo I, la cual fue realizada por dos observadores en forma independiente, los cuales contaron un total de 1500 células por lámina. Significancia \* $p < 0,05$ .

5.8. *Expresión de la enzima aromatasa (P450<sub>arom</sub>) en tejido endometrial de mujeres con HEN y con CE tipo I.*

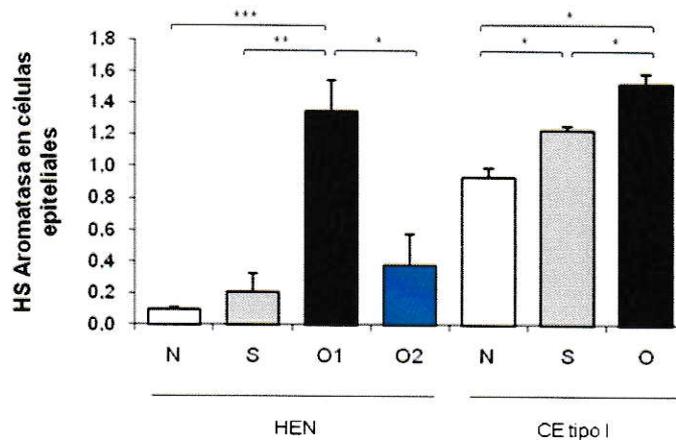
En las muestras de tejido endometrial se evaluó la expresión de la enzima P450<sub>arom</sub> mediante inmunohistoquímica. La aromatasa fue inmunodetectada en el citoplasma de las células epiteliales y estromales de los grupos en estudio (Fig 10A). La expresión de la enzima fue mayor en las células epiteliales que en el compartimiento estromal en los grupos con HEN. En lo que respecta a la expresión de aromatasa en las células epiteliales, su expresión fue 14 y 5,4 veces mayor en las mujeres obesas del grupo 1 respecto al grupo N ( $p < 0,001$ ) y S ( $p < 0,01$ ), respectivamente (Fig.10B). Además, la expresión de aromatasa en las mujeres obesas del grupo 2 fue semejante a la de las mujeres del grupo normopeso ( $p > 0,05$ ) y 2,5 veces menor ( $p < 0,05$ ) al comparar con el grupo O1 (Fig. 10B).

En el caso de las mujeres con CE de tipo I pertenecientes al grupo O, se observó un aumento significativo en la expresión de la aromatasa (63,4 % y 24%) respecto a las mujeres del grupo N y S, respectivamente ( $p < 0,05$ ) (Fig.10B). En el caso de las mujeres con sobrepeso la expresión fue 32% mayor en comparación con las mujeres del grupo N ( $p < 0,05$ ). Otro dato interesante es que el nivel de expresión de la enzima en las células epiteliales endometriales es similar entre las mujeres obesas del grupo 1 con histología endometrial normal y las mujeres obesas con CE ( $p > 0,05$ ) (Fig. 10B).

A



B



**Figura 10.** Inmunodetección de la enzima aromatasa ( $P450_{arom}$ ) en secciones de endometrio incluidas en parafina de mujeres con HEN (en fase proliferativa del ciclo menstrual) (N, n=10; S, n=9; O1, n=12; O2, n=5) y de mujeres con CE tipo I (N, n=10; S, n=9; O, n=12). (A) Las flechas indican a las células epiteliales con tinción citoplasmática positiva para  $P450_{arom}$ . En las microfotografías está representada la inmunodetección en las mujeres con HEN con distinto índice de masa corporal: a, normopeso; b, sobrepeso; c, obesas 1; d, obesas 2. El caso de las mujeres obesas con CE se ilustra en la fotomicrografía e. El control negativo en ausencia del primer anticuerpo, corresponde a la microfotografía f. En todas las figuras el aumento es de 400X, y la escala de las barras representa 10  $\mu$ m. (B) La evaluación de la tinción, expresada en HScore ( $HS = \Sigma \% \text{ células teñidas (intensidad+1)}/100$ ) (promedio  $\pm$  EEM) de las células epiteliales positivas para  $P450_{arom}$  en las mujeres sin y con CE tipo I, fue realizada por dos observadores en forma independiente, los cuales contaron un total de 1500 células por lámina. Significancias: \* $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

*5.9. Correlación entre la concentración sérica de leptina y la expresión de su receptor, con el índice de proliferación y apoptosis en las mujeres en estudio.*

A través del análisis de correlación multivariado observamos que el índice de proliferación y apoptosis, expresado como la razón pH3/TUNEL, se correlacionó con el IMC ( $R = 0,53$ ,  $p < 0,05$ ) y con los niveles séricos de leptina ( $R = 0,47$ ,  $p < 0,05$ ) pero no con la expresión endometrial del receptor de leptina ( $R = 0,42$ ,  $p = 0,051$ ) en los sujetos de los grupos N, S y O1.

## 6. DISCUSIÓN

La asociación obesidad-cáncer ha sido estudiada epidemiológicamente (95,96), sin embargo, aún no han sido completamente dilucidados los mecanismos a través de los cuales el sobrepeso u obesidad promueven la iniciación, promoción y progresión del cáncer. Dicho mecanismo parece involucrar la capacidad moduladora que ejercen algunas adipoquinas, hormonas y factores de crecimiento sobre la proliferación, diferenciación y apoptosis celular. De esta forma, el incremento en la tasa de proliferación celular aumenta las posibilidades de mutaciones en proto-oncogenes y genes supresores tumorales, los cuales están involucrados en la regulación del ciclo celular (97). Además, la disminución o alteración en la apoptosis, puede promover que tales mutaciones subsistan y eventualmente den lugar a la expansión clonal de células mutadas y con ello contribuir al desarrollo tumoral (98).

Aunque se ha reportado la asociación entre obesidad y diferentes tipos de cánceres (99), se ha observado que el CE sobresale debido a su fuerte asociación con el sobrepeso y la obesidad (95,99). Cabe destacar que debido a que el CE es de origen epitelial (100), los estudios en esta tesis fueron realizados teniendo en cuenta principalmente lo que sucede en las células epiteliales endometriales.

Adipoquinas como leptina juegan un importante rol, no solo en la regulación del metabolismo y del peso corporal (101, 102, 103) y en fenómenos reproductivos como la menstruación, desarrollo folicular en el ovario, implantación y desarrollo del embrión (104, 105, 106), sino también en la carcinogénesis endometrial (107, 108, 109), entre otros tipos de cáncer (110, 111, 112, 113). Es así como en un estudio realizado en líneas celulares de CE se observó que leptina

produjo un incremento en la proliferación e invasión a través de las vías de señalización STAT, MAPK y PI3K (114). Leptina se produce principalmente en el tejido adiposo y sus niveles séricos se incrementan a medida que aumenta el IMC (115, 116). Esto coincide con lo determinado en esta tesis al comparar los niveles séricos de leptina en las mujeres con HEN con sobrepeso y obesas versus las mujeres normopeso. En el caso de las mujeres con CE de tipo I, utilizadas como control en nuestro estudio, también observamos que los niveles circulantes de dicha adipoquina se incrementaron en forma proporcional al IMC de las mujeres.

Dicha leptina circulante, es capaz de alcanzar el tejido endometrial donde ejerce su función a través de un receptor específico, del que se conocen cuatro isoformas: la isoforma larga (ObR-b) y las isoformas cortas huB219.1, huB219.2, huB219.3 (117, 118). Estas isoformas presentan fluctuaciones en su expresión durante el ciclo menstrual (119), siendo predominante la isoforma larga en ambas fases del ciclo endometrial (119). Al respecto, y utilizando un anticuerpo específico para la fosforilación del receptor de leptina en el residuo Tyr 141, evaluamos la localización y grado de expresión del receptor en tejido endometrial, observándose una mayor expresión del mismo en el citoplasma de las células epiteliales de las mujeres con HEN a medida que se incrementa el IMC. La importancia de este residuo específico al (fosforilarse) radica en su papel de activador de la vía STAT/JAK, la cual una vez activada, produce la reclusión del factor de transcripción STAT3 que regula la expresión de genes involucrados en la proliferación celular (120, 121). Además, esta vía modula la activación de la vía de las MAPK, involucrada también en el proceso de proliferación celular. Incluso, modula la vía de las PI3K, de manera que puede ser activada por fosforilación la proteína AKT involucrada en la supervivencia celular (122, 123). Por lo tanto, los elevados niveles de leptina circulantes presentes en las mujeres con sobrepeso u obesidad, podrían alcanzar su receptor a nivel endometrial y,

posiblemente, a través de las vías de señalización celular anteriormente mencionadas, incrementar la proliferación de las células epiteliales endometriales, predisponiendo a estas mujeres al desarrollo del CE tipo I.

Varios métodos se han utilizado para evaluar la proliferación en tejido endometrial: detección del antígeno Ki67 (124) y de la proteína pH3 (63), entre otros. Al respecto, resultados previos del laboratorio mostraron que Ki67 incrementa su expresión a medida que aumenta el IMC, tanto en las mujeres con HEN como con CE (125). Sin embargo, en esta tesis fue necesario realizar la detección de la proteína pH3 debido a que, a diferencia de Ki67 que puede ser detectado durante todo el ciclo celular, la proteína pH3 puede ser detectada durante la mitosis y por lo tanto ser un indicador de que se ha completado el ciclo celular. Fue así como a través de la detección de la Histona H3 fosforilada en mujeres con HEN se pudo observar un incremento de la proliferación en las mujeres con sobrepeso en comparación con mujeres normopeso. Interesantemente, a través de este marcador de proliferación pudimos corroborar la existencia de dos grupos de mujeres obesas (1 y 2) con alto grado de proliferación (grupo O1) y con un nivel de proliferación similar al del grupo normopeso (grupo O2); lo ya fue observado a través de Ki67. En este sentido, investigadores italianos han reportado la existencia de un grupo de mujeres con obesidad que a pesar de tener exceso de grasa corporal, muestran un favorable perfil metabólico caracterizado por altos niveles de sensibilidad a la insulina (determinado por método de QUICKI), contrario a la resistencia a la insulina que significa que las células se han vuelto menos sensibles a los efectos de la insulina (126), un perfil lipídico favorable, y ningún signo de hipertensión (127). A este grupo de mujeres se les conoce como "metabólicamente sanos pero obesos" (MHO) (128, 129, 130) y podrían guardar cierto grado de relación con el grupo O2 encontrado en esta tesis.

Por otro lado, determinamos el grado de apoptosis endometrial mediante la evaluación de la fragmentación del DNA por TUNEL, sin encontrar diferencias entre las mujeres estudiadas a medida que se incrementa el IMC. A fin de confirmar lo anterior, determinamos la expresión endometrial de la proteína ejecutora de la apoptosis, Caspasa-3 activa, observando que no existen diferencias entre los grupos estudiados, lo que permite afirmar que la apoptosis no presenta variaciones a medida que aumenta el IMC.

Como una forma de determinar el balance entre proliferación y apoptosis se evaluó la razón pH3/TUNEL, observando que las mujeres del grupo O1 exhiben un incremento en dicha razón al compararlas con las mujeres normopeso e incluso al comparar con las mujeres con sobrepeso. Lo anterior adquiere especial relevancia cuando observamos que en las mujeres con CE tipo I la razón pH3/TUNEL es similar a la encontrada en las mujeres obesas 1 con HEN. Por lo tanto, podemos decir que en el grupo O1 existe un desbalance en la homeostasis endometrial a favor de la proliferación.

Previamente, al evaluar esta misma razón utilizando el marcador de proliferación Ki67, se obtuvieron resultados similares a los observados con el marcador pH3. Esto confirma que en las mujeres O1 con HEN la proliferación endometrial prima sobre la apoptosis, al igual que en las mujeres con CE, lo que sugiere que estas mujeres obesas con HEN serían más susceptibles al desarrollo del CE, si el estímulo otorgado por la condición de obesidad prevalece en el tiempo. En el caso de las mujeres O2 esta razón fue equivalente a la de las mujeres con normopeso, a pesar de tener el mismo IMC que las mujeres del grupo 1.

Tanto los resultados de proliferación como los de apoptosis son interesantes si consideramos los niveles de leptina circulantes en las mujeres normopeso, sobrepeso y obesas 1, y los reportes previos que indican que la adición de leptina a células en cultivo promueve la proliferación e

inhibe la apoptosis (131, 132, 133). En el caso de las mujeres obesas 2, el nivel de proliferación endometrial similar al grupo normopeso parece guardar relación con los niveles circulantes de estradiol (equivalentes a los del grupo normopeso), lo que explicaría de alguna forma por qué en este grupo de mujeres obesas no detectamos un desbalance en la homeostasis endometrial.

Esta desregulación en el grupo O1 también fue evidenciada al estudiar la razón entre las proteínas anti/proapoptóticas, Bcl-2/Bax, para la cual se observó un incremento en las mujeres O1 (con HEN) en comparación con las normopeso. A su vez, dicha razón fue similar entre los grupos N y O2. Interesantemente, no se observaron diferencias en la razón Bcl-2/Bax entre las mujeres con O1 (HEN) y las O (con CE), lo que sugiere que una condición antipoptótica se encuentra favorecida en los endometrios de las mujeres O1 con HEN y que además, en este último grupo existiría una mayor susceptibilidad al desarrollo del CE. Referente a esto hay reportes que indican que la relación entre ambas proteínas determina el destino del tipo celular estudiado, y es así como dicha razón se encuentra aumentada en mujeres con hiperplasia endometrial (precursora del CE) (134)

Por otro lado la existencia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), tales como Survivina, juegan un papel importante en la carcinogénesis endometrial (135). Es así como existen estudios que muestran una sobreexpresión de Survivina en células endometriales de mujeres con hiperplasia y CE al comparar con endometrio normal (136, 137). Más aún, en tejido endometrial de mujeres premenopáusicas la expresión de Survivina se asoció significativamente con el índice de proliferación celular, el grado histológico, el estado clínico y la tasa de supervivencia (138). Al respecto, los resultados de nuestro estudio indicaron que la expresión de Survivina se incrementa significativamente a medida que aumenta el IMC en mujeres con HEN y con CE, lo

que sugiere su participación en el control de la apoptosis, posiblemente por una disminución en la expresión de caspasas 3, 7, 9 las cuales son inhibidas por la acción de Survivina (139).

Aunque no estaba contemplado en la propuesta original de esta tesis, quisimos indagar en alguno de los mecanismos de señalización involucrados en la elevada proliferación encontrada en los endometrios de mujeres con sobrepeso y principalmente de mujeres O1 (con HEN). Para ello, examinamos la expresión de la proteína AKT, la cual se activa por fosforilación y se transloca al núcleo, lo que resulta en la transcripción de genes implicados en la progresión del ciclo celular y supervivencia celular, entre otros efectos (54, 140, 141, 142). Otros reportes apuntan a que la proteína AKT puede modular la apoptosis a través de su interacción con Bad y Caspasa-9 (143). Al respecto, observamos por inmunohistoquímica que la expresión de pAKT en las células epiteliales presenta una ubicación mayormente nuclear y se encuentra incrementada en las mujeres con S y O1 con HEN en comparación con las normopeso. Estos resultados son concordantes con los resultados del Western Blot previamente reportados por nuestro laboratorio (122). Interesantemente las mujeres obesas 1 con HEN mostraron un nivel de fosforilación de AKT similar de las mujeres obesas con CE, lo que sugiere que la activación de esta proteína puede ser una de las vías que favorecen la proliferación incrementada en las mujeres obesas sin CE. Además, es importante mencionar que ciertas adipoquinas y los estrógenos son capaces de activar a la proteína AKT. En este contexto, se han publicado estudios que relacionan a leptina con el incremento de la proliferación celular en líneas celulares de CE, a través de la activación de la vía de señalización que involucra a AKT (144, 145). Por su parte los estrógenos a través de vías no genómicas permiten la activación de la proteína AKT (44), de manera que un aumento en los niveles de estrógenos circulantes, tal como ocurre en las mujeres de los grupos S y O1, favorecería la supervivencia celular.

Considerando que además del aporte circulante de estrógenos también es importante el aporte local de estrógenos, evaluamos la expresión endometrial de la enzima P450<sub>arom</sub>. Se sabe que leptina aumenta la expresión de la enzima P450<sub>arom</sub> en células estromales ováricas (35), en células estromales adiposas (36), en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (37) y, posiblemente ocurra de igual forma en el tejido endometrial, lo que sería de suma importancia en este estudio dado los niveles circulantes de leptina.

Sin embargo, no hay reportes referentes al efecto de leptina sobre aromatasa en el endometrio ni tampoco en la condición de obesidad. Los resultados muestran que la enzima aromatasa se expresa en el citoplasma principalmente de las células epiteliales al comparar con las células estromales de las mujeres en estudio. Por otra parte, las mujeres O1 (con HEN) presentaron mayor expresión de aromatasa en comparación con las mujeres normopeso y sobrepeso, lo que indica que la mayor expresión de esta enzima podría redundar en un incremento de la síntesis endometrial de estrógenos. Sin embargo, se necesitan estudios de actividad enzimática a nivel endometrial para corroborar lo propuesto.

Además encontramos que esta enzima se encuentra sobre-expresada en las células epiteliales de las mujeres con CE, lo que coincide con lo reportado en tejido endometrial neoplásico (146, 147). Lo otro interesante es que las mujeres obesas 1 con HEN presentaron un nivel de expresión de la P450<sub>arom</sub> similar al de las mujeres obesas con CE, lo que sugiere que el incremento en la expresión endometrial de esta enzima en las mujeres obesas 1 (sin CE) podría conducir a un aporte extra de estrógenos (además del circulante), y contribuir así a la promoción del CE en estas mujeres.

## 7. CONCLUSIONES

Considerando los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos concluir lo siguiente:

1. La concentración sérica de leptina aumentó en forma proporcional al IMC de las mujeres con HEN y con CE tipo I. La expresión del receptor de leptina fue mayor en las mujeres obesas con HEN al comparar con las mujeres con estado nutricional normal. Lo anterior permite sugerir que leptina (conocida por modular la proliferación endometrial) podría actuar directamente sobre las células endometriales.
2. La proliferación celular endometrial se incrementa a medida que aumenta el IMC de las mujeres. Además, fue posible distinguir dos subgrupos de mujeres obesas con HEN (O1 y O2) donde la proliferación endometrial fue mayor en las mujeres obesas del grupo 1 respecto a las mujeres normopeso. En cambio, las mujeres O2 exhibieron un nivel de proliferación similar al del grupo con IMC normal.
3. La apoptosis no se modificó entre los endometrios de los distintos grupos en estudio.
4. El desbalance entre proliferación y apoptosis observado principalmente en el grupo O1, el cual no fue diferente al detectado en las mujeres obesas con CE, apoya la hipótesis planteada en esta tesis. Además, el hallazgo de un subgrupo de mujeres obesas (O2) donde dicho balance es semejante al observado en las mujeres normopeso está de acuerdo con que no todas las mujeres obesas están más expuestas al potencial desarrollo del CE tipo I.
5. Tal desbalance entre proliferación y apoptosis se correlacionó con el IMC y con los niveles séricos de leptina de las mujeres en estudio (grupos N, S y O1)

6. El elevado nivel de fosforilación de AKT en las mujeres con HEN con sobrepeso y principalmente en las mujeres obesas del grupo 1 (similar al de las mujeres obesas con CE), se asocia con el incremento en la proliferación endometrial observado en estos grupos, y por lo tanto, podría ser uno de los mecanismos que explique el desbalance entre proliferación y apoptosis detectado en los endometrios de dichas mujeres.

7. El incremento en la expresión endometrial de la enzima P450<sub>arom</sub> en las mujeres obesas del grupo 1, podría conducir a un aporte extra de estrógenos (además del circulante), que se traduciría en una mayor biodisponibilidad de estrógenos, los cuales podrían ejercer acciones regulatorias en el ciclo celular, controlar la proliferación de las células epiteliales endometriales y contribuir a la promoción del CE tipo I en estas mujeres.

En resumen, y sobre la base de los resultados de esta tesis, es claro que las células epiteliales endometriales principalmente de las mujeres obesas del grupo 1, son más propensas a incrementar su proliferación debido a que están expuestas a niveles circulantes elevados de leptina y a un ambiente estrogénico alterado tanto a nivel sistémico como local. De mantenerse en el tiempo tales condiciones, dicha proliferación celular incrementada puede aumentar la incidencia de mutaciones y de esta forma las células pueden escapar del control normal de la proliferación y volverse neoplásicas.

Dado que la terapia para el CE involucra cirugía lo cual deteriora la capacidad reproductiva y reduce la calidad de vida de las mujeres, es absolutamente necesario desarrollar protocolos y pruebas para identificar a mujeres obesas con mayor susceptibilidad para el potencial desarrollo de CE. Los resultados obtenidos en esta tesis nos permitieron identificar a tales mujeres, comprender algunos de los mecanismos involucrados en la mayor proliferación endometrial y



proporcionar las bases para el diseño de estrategias de diagnóstico temprano. Por lo tanto, esperamos que en un futuro no muy lejano, estas mujeres obesas puedan ser segregadas para recibir mayor vigilancia. Lo anterior, es especialmente relevante si consideramos que menos del 20% de las mujeres con CE avanzado sobreviven.

## 8. REFERENCIAS

1. Velázquez G. 2009. Fisiología de la reproducción humana. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción*. 1: 115-130.
2. Parrott J, Nilsson E, Mosher R, Magrane G, Albertson D, Pinkel D y Gray J, Skinner M. 2001. Stromal-epithelial interactions in the progression of ovarian cancer: influence and source of tumor stromal cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 175: 29–39.
3. Stewart F, Power A, Lennard N., Allen W, Amet L y Edwards R. 1994. Identification of the horse epidermal growth factor (EGF) coding sequence and its use in monitoring EGF gene expression in the endometrium of the pregnant mare. *Journal Molecular Endocrinology*. 12: 341-350
4. Braunwald E, Fauci A y Kasper D. 2001. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15<sup>th</sup> ed. pp 138-167. New York: McGraw-Hill
5. Drevon C. 2005. Fatty acids and expression of adipokines. *International Journal of Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology*. 1740: 287-292.
6. Tataranni P, Monroe M, Dueck C, Traub S, Nicolson M, Manore M, Matt K y Ravussin E. 1997. Adiposity, plasma leptin concentration and reproductive function in active and sedentary females. *International Journal of Obesity*. 21: 818-821.
7. Must A, Spadano J, Coakley E, Field, A, Colditz, G, y Dietz W. 1999. The disease burden associated with overweight and obesity. *The Journal of the American Medical Association*. 282: 1523-1529.
8. World Health Organization (WHO) 1998. Programme of Nutrition, Family and Reproductive Health. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. (Geneva, 3-5 June, 1997). Ginebra, WHO, NUT, NCD/98.1.
9. Flegal K, Carroll M, Ogden C y Johnson A. 2004. Prevalence of Overweight and Obesity Among US Children, Adolescents, and Adults, 1999-2000. *The Journal of the American Medical Association*. 291: 2847–2850.
10. Ministerio de Salud –Instituto Nacional de Estadística. Encuesta Nacional de Salud 2003.
11. Calle E y Thun M. 2004. Obesity and cancer. *Oncogene*. 23: 6365–6378.

12. Calle E y Kaaks R. 2004. Overweight, obesity and Cancer: Epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature Review Cancer* .4: 579-591.
13. Fu-Shing L. 2007. Molecular Carcinogenesis of Endometrial Cancer. *Taiwanese Journal of Obstetric Gynecology*. 46: 26-32.
14. Petridou E, Belechri M, Dessypris N, Koukoulomatis P, Diakomanolis E, Spanos E y Trichopoulos D. 2002. Leptin and body mass index in relation to endometrial cancer risk. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 46: 147-151.
15. Somasundar P, McFadden D, Hileman S y Vona-Davis L. 2004. Leptin is a growth factor in cancer. *Journal of Surgical Research*. 116: 337-349.
16. Kitawaki J, Koshiba H, Ishihara H, Kusuki I, Tsukamoto K y Honjo H. 2000. Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 85: 1946-1950.
17. Alfer J, Muller F, Classen I, Rango U, Happel L, Beier K, Rath W y Beier M. 2000. The endometrium as a novel target for leptin: differences in fertility and subfertility. *Molecular Human Reproduction*. 6: 595-601.
18. Koda M, Sulkowska M, Wincewicz A, Kanczuga-Koda L, Musiatowicz B, Szymanska y M, Sulkowski S. 2007. Expression of leptin, leptin receptor, and hypoxia-inducible factor 1 alpha in human endometrial cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1095: 90-98.
19. Sharma D, Saxena N, Vertino P y Anania F. 2006. Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal transduction pathways. *Endocrine Related Cancer*. 13: 629-640.
20. Sweeney G. 2002. Leptin signalling. *Cell Signal*. 14: 655-663.
21. Zabeau L, Lavens D, Peelman F, Eyckerman S, Vandekerckhove J y Tavernier J. 2003. The ins and outs of leptin receptor activation. *FEBS Letters*. 546: 45-50.
22. Dieudonne N, Machinal-Quelin F, Serazin-Leroy V, Leneuve M, Pecquery R y Giudicelli Y. 2002. Leptin mediates a proliferative response in human MCF7 breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 293: 622-628.
23. Onuma M, Bub J, Rummel T y Iwamoto Y. 2003. Prostate cancer cell-adipocyte interaction: leptin mediates androgen-independent prostate cancer cell proliferation through c-Jun NH2-terminal kinase. *Journal of biological Chemistry*. 278: 42660-42667.

24. Shiou S, Yuan F, Bow K, Chung T, Chan T, Yeh Y, Tsai L y Su J. 2004. Aberrant expression and possible involvement of the leptin receptor in endometrial cancer .*Gynecologic Oncology*. 92: 769-775.
25. Sharma D, Saxena N, Vertino P y Anania F. 2006. Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal transduction pathways. *Endocrine Related Cancer*. 13: 629-640.
26. Atasoy P, Bozdogan O, Erekul S, Bozdogan N y Bayram M. 2003. Fas-mediated pathway and apoptosis in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium, *Gynecological Oncology*. 91: 309-317.
27. Key T y Pike M. 1988. The dose-effect relationship between 'unopposed' oestrogens and endometrial mitotic rate: its central role in explaining and predicting endometrial cancer risk. *British Journal of Cancer*. 57: 205-212.
28. Bulun S, Mahendroo M y Simpson E. 1993. Polimerase chain reaction amplification fails to detect aromatase cytochrome P450 transcripts in normal human endometrium or deciduas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 76: 1458-1463.
29. Sasano H y Harada N. 1998. Intratumoral aromatase in human breast, endometrial and ovarian malignancies. *Endocrine Reviews*.19: 593-607.
30. Bulun S, Economos K, Miller D y Simpson E. 1994. CYP19 (aromatase cytochrome P450) gene expression in human malignant endometrial tumors. *Journal of Clinical Endocrinology y Metabolism*. 79: 1831-1834.
31. Watanabe K, Sasano H y Harada N. 1995. Aromatase in human endometrial carcinoma and hyperplasia. Immunohistochemical, in situ hybridization, and biochemical studies. *American Journal of Pathology*. 146:491-500.
32. Tseng L, Mazella J, Mann W y Stone M. 1982. Estrogen synthesis in normal and malignant human endometrium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 55:1029-1031.
33. Tseng L, Mazella J, Funt M, Mann W y Stone M. 1984. Preliminary studies of aromatase in human neoplastic endometrium. *Obstetrics and Gynecology*. 63: 150-154.
34. Yamaki J, Yamamoto T y Okada H. 1985. Aromatization of androstenedione by normal and neoplastic endometrium of the uterus. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 22: 63-66.

35. Kitawaki J, Kusuki I, Koshiba H, Tsukamoto K y Honjo H. 1999 Leptin directly stimulates aromatase activity in human luteinized granulosa cells. *Molecular Human Reproduction*. 5: 708-713.
36. Magoffin D, Weitsman S, Agarwal S, Jakimiuk A. 1999. Leptin regulation of aromatase activity in adipose stromal cells from regularly cycling women. *Ginekologia polskal* 70: 1-7.
37. Catalano S, Marsico S, Giordano C, Mauro L, Rizza P, Panno L y Andó S. Leptin enhances, via ap-1, expression of aromatase in the MCF-7 cell line .*The Journal of Biological Chemistry*. 278: 28668-28676
38. Yamamoto T, Kitawaki J, Urabe M. 1993. Estrogen productivity of endometrium and endometrial cancer tissue; influence of aromatase on proliferation of endometrial cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 44: 463-468.
39. Tseng L, Mazella J, Mann W y Chumas J. 1982. Estrogen synthesis in normal and malignant human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, 55: 1029-1031
40. Gelfand M y Ferenczy A. 1989 A prospective 1-years study of estrogen and progestin in potsmenopausal women: effect on the endometrium. *Obstet Gynecol*. 74: 398-402.
41. Whitehead M. 1978. The effect of estroigens and progestogens on the potsmenopausal endometrium. *Maturitas*. 1: 87-98.
42. Kelly R, King A y Critchley H. 2001. Cytokine control in human endometrium. *Reproduction*. 121: 3-19.
43. Key T y Pike M. 1988. The dose-effect relationship between "unopposed" estrogens and endometrial mitotic rate: its central role in explaining and predicting endometrial cancer risk. *British. Journal of Cancer*. 57: 205-212.
44. Guzeloglu O, Kayisli U, Luleci G y Arici A. 2004. In vivo and in vitro regulation of Akt activation in human endometrial cells is estrogen dependent. *Biology of Reproduction*. 71: 714-721.
45. Clarke R, van den Berg H y Murphy R. 1990. Reduction of the membrane fluidity of human breast cancer cells by tamoxifen and 17  $\beta$ -estradiol. *Journal of the National Cancer Institute*. 82:1702-1705.
46. Reddy A, Shivaji S y Gupta P. 1989. Effect of estradiol on the membrane fluidity of the rat vaginal epithelial cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 33:1229-1233.

47. Shivaji S y Jagannadham M. 1992. Steroid-induced perturbations of membranes and its relevance to sperm acrosome reaction. *International Journal of Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology*. 1108: 99–109.
48. Foster J, Henley D, Ahamed S y Wimalasena J. 2001. Estradiols and cell cycle regulation in breast cancer. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 12: 320–327.
49. Chang, X, Tabcharani J, Hou Y, Jensen X, Kartner T, Alon N, Hanrahan J y Riordan J. 1993. Protein kinase A (PKA) still activates CFTR chloride channel after mutagenesis of all ten PKA consensus phosphorylation sites. *The Journal of Biological Chemistry*. 268: 11304-11311
50. Zabeu L, Lavens D, Pellman F, Eycherman S, Vandekerckhove J y Tavernier J. 2003. The ins and outs of leptin receptor activation. *FEBS Letters*. 546: 45-60.
51. Del Peso L, González M, Page C, Herrera R, y Nuñez G. 1997. Interleukin-3-induced phosphorylation of bad through the protein kinase Akt. *Science*. 278: 687- 689.
52. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. 1997. *Cell*. 91:231–241.
53. Melinda M. Mortenson, Joseph G. Galante, Oren Gilad, Michael G. Schlieman, Subbulakshmi Virudachalam, Hsing-Jien Kung, Richard J. Bold 2007 BCL-2 functions as an activator of the AKT signaling pathway in pancreatic cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*: 102: 1171-1179.
54. Julian Downward. 2004. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 15: 177–182.
55. Yoshino O, Osuga Y, Hirota Y, Koga K, Yano T, Tsutsumi O y Taketani Y 2003. Akt as a possible intracellular mediator for decidualization in human endometrial stromal cells. *Molecular Human Reproduction*. 9: 265–269.
56. Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli U, Luleci G y Arici A. 2004. In vivo and in vitro regulation of Akt activation in human endometrial cells is estrogen dependent. *Biology of Reproduction*. 71:714–721.
57. Ivanova T, Mendez P, Garcia-Segura LM y Beyer C. 2002. Rapid stimulation of the PI3-kinase/Akt signalling pathway in developing midbrain neurones by oestrogen. *Journal of Neuroendocrinology*. 14: 73–79.

58. Falkenstein E, Tillmann H, Christ M, Feuring M, y Wehling M. 2000. Multiple actions of steroid hormones a focus on rapid, nongenomic Effects. *Pharmacology Review*. 52:513–555
59. Bogusiewicz M, Semeczuk A, Gogacz M, Skomra D, Jakowicki J y Rechberger. 2006. Lack of correlation between leptin receptor expression and PI3K/AKT signaling pathway proteins immunostaining in endometrioid-type endometrial carcinomas. *Cancer Letters*. 238: 61-68.
60. Frühbeck G. 2006. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochemical Journal*. 393: 7–20.
61. Chakravarty D, Gupta N, Shastri- Goda J, Srinivasan R , Pate F y Dhaliwal L. 2009. Steroid receptors, HER2/neu and Ki-67, in endometrioid type of endometrial carcinoma: Correlation with conventional histomorphological features of prognosis. *Acta Histochemical*. In press
62. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker, H, Schwab U y Stein H. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Journal of Immunology*. 133: 1710–1715.
63. Brenner R, Slayden O, Rodgers W, Critchley H, Carroll R, Nie X y Mah K. 2003. Immunocytochemical assessment of mitotic activity with an antibody to phosphorylated histone H3 in the macaque and human endometrium. *Journal of Molecular Human Reproduction*. 18: 1185-1193.
64. Singh N y Anand S. 1994. Cell death by apoptosis. *Indian Journal Experimental biology* . 32:843-847.
65. Kokawa K, Toshihiko S y Nakano R. 1996. Apoptosis in human uterine endometrium during the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 81:4144-4147.
66. Nagata S. 1999. Fas ligand-induced apoptosis. *Annual Review of Genetics*. 33: 29–55.
67. Tao X, Tilly K, Maravei D, Shifren J, Krajewski S, Reed J, Tilly J y Isaacson K. 1997. Differential Expression of Members of the bcl-2 Gene Family in Proliferative and Secretory Human Endometrium: Glandular Epithelial Cell Apoptosis Is Associated with Increased Expression of *bax*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 82: 2738-2746.
68. Cuello E. 2006. Boletín Escuela De Medicina U.C. Pontificia Universidad Católica De Chile Vol. 31 N°1.

69. Gompel, A., Sabourin, J. C., Martin, A., Yaneva, H., Audouin, J., Detribute- croix, Y., y Poitout, P. 1994. bcl-2 expression in normal endometrium during the menstrual cycle. *The American Journal Pathology*. 44: 1195–1202
70. Gee J, Robertson J, Ellis I, Willsher P, McClelland R, Hoyle H, Kyme S, Finlay P, Blamey R y Nicholson R. 1994. Immunocytochemical localization of bcl-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. *International Journal of Cancer*. 59: 619-628.
71. Lauwers, G, Scott G y Karpeh, M. 1995 .Immunohistochemical evaluation of bcl-2 protein expression in gastric adenocarcinomas. *Cancer*. 75: 2209–2213.
72. McDonnell T, Troncoso P, Shawn M. Brisbay S, Logothetis C. Chung L, Jer-Tsong Hsieh, Shi-Ming Tu y Campbell M. 1992. Expression of the Protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Research*. 52: 6940-6944.
73. Niemann T, Trgovac T, McGaughy V y, Vaccarello L. 1996. bcl-2 expression in endometrial hyperplasia and carcinoma. *Gynecologic oncology*. 63: 318-22
74. Crescenzi E, Criniti V, Pianese M, Tecce M y Pulombo G. 2000. Differential expression of antiapoptotic genes in human endometrial carcinoma: bcl-2-XL succeeds bcl-2 function in neoplastic cells. *Gynecol Oncol*. 77: 419–28.
75. Kokawa K, Shikone T, Otani T, Nishiyama R, Ishii Y, Yagi S y Yamoto M. 2001. Apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 in hyperplasia and adenocarcinoma of the uterine endometrium. *Human Reproduction*. 16: 2211-2218.
76. Oltvai, Z, Milliman C y Korsmeyer S. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* .74: 609-619.
77. Sakuragi N, Salah-eldin A, Watari H, Itoh T, Inoue S, Moriuchi T y Fujimoto S. 2002. Bax, Bcl-2, and p53 expression in endometrial cancer. *Gynecological Oncology* .86: 288–296.
78. Porter A y Jänicke R. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. 6: 99-104.
79. Yoshinori O 2001. Apoptosis in human endometrium: apoptotic detection methods and signaling. *Medical Electron Microscopy*. 34: 166–173.
80. Peiro G, Diebold J, Baretton G, Kimming R y Lohrs U. 2001. Cellular apoptosis susceptibility gene expression in endometrial carcinoma: correlation with bcl-2, bax and

caspase-3 expression and outcome. *International Journal Gynecological Pathology*. 20: 359–367.

81. Montgomery B, Daum S y Dunton J. 2004. Endometrial Hiperplasia. *Obstetrical and Gynecological survey*. 59: 368-376.

82. Li F, Ackermann E, Bennett C, Rothermel A, Plescia J, Tognin S, Villa A, Marchisio P y Altieri D. 1999. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nature Cell Biology*. 1: 461– 466.

83. Sui L, Dong Y, Ohno M, Watanabe Y, Sugimoto K y Tokuda M. 2002. Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors. *International Journal Oncology*. 21: 315-320.

84. Olie R, Simoes A, Baumann B, Leech S, Fabbro D, Stahel R y Zangemeister W 2000. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Research*. 60: 2805-2809.

85. Lehner R, Enomoto T, James A , Mcgregor J, Shroyer L, Bryan R, Haugen , Pugazhenti U, Kenneth R y Shroyer L. 2002. Correlation of survivin mRNA detection with histologic diagnosis in normal endometrium and endometrial carcinoma. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*. 81: 162 – 167

86. Konno R, Yamakawa H, Utsunomiya H, Ito K, Sato S y Yajima A 2000. Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium. *Molecular Human Reproduction*. 6: 529–534

87. Zhihong A, Lianhua Y, Xianrong Z, Ying Z, Dongmei Z, Yinhua Y y Youji F. 2006. Inhibition of survivin reduces cell proliferation and induces apoptosis in human endometrial cancer. *Cancer* .107: 746-756.

88. Edwin Sevallos Barrera. *Fundamentos de oncologia*.2006 Primera edicion. 15-36.

89. Noyes R, Hertig D y Rock J. 1950. Dating the endometrial biopsy. *Fertility and Sterility* 1: 3- 25.

90. Scully R, Bonfiglio T, Kurman R, Silverberg S y Wilkinson 1994. *International histological classification and histologic typing of female genital tract tumors*. Berlin, Springer-Verlag. World Health Organization 39–50.

91. Matsubara M, Chiba H, Maruoka S y Katayose S. 2000. Elevated serum leptin concentrations in women with components of multiple risk factor clustering syndrome. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. *Gynecological Oncology*. 7: 231-237.

92. Brenner R, Slayden O, Rodgers W, Critchley H, Carroll R, Nie X y Mah K. 2003. Immunocytochemical assessment of mitotic activity with an antibody to phosphorylated histone H3 in the macaque and human endometrium. *Molecular Human Reproduction*. 18: 1185-1193.
93. Von Rango U, Classen-Linke I, Kruche C y Beier H. 1998. The receptive endometrium is characterized by apoptosis in the glands. *Human Reproduction*. 13: 3177-3189.
94. Villavicencio A, Bacallao K, Gabler F, Fuentes A, Albornoz J, Casals A y Vega M. 2007. Deregulation of tissue homeostasis in endometria from patients with polycystic ovarian syndrome with and without endometrial hyperplasia. *Gynecological Oncology*. 104: 290-295.
95. Reeves GK, Pirie K y , Beral V. 2007. Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *British Medical Journal*. 335: 1134-1145.
96. Wee C, Phillips R y McCarthy E. 2005. BMI and cervical cancer screening among white, african american, and hispanic women in the United States. *Obesity Research*. 13: 1275-1280
97. Gómez L, González M. 1998. Genes supresores de tumores. *Oncología Clínica: fundamentos y patología general*. Editado por González Barón M, Ordoñez A, Feliu J, Zamora P, Espinosa E y De Castro J. 2ª edición. McGraw-Hill Interamericana de España. Capítulo 6: 71-79.
98. Cohen S y Elwein L. 1991. Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. *Cancer Research*. 51: 6493-6505.
99. Calle E y Kaaks R. 2004. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature Review Cancer*. 4: 579-591.
100. Lilia P, Guzmán P., Villasec M., Araya J y, Roa J. 2008. Adenocarcinoma endometrial concomitante con tumor estromal benigno del endometrio. *Revista chilena de obstetrician y ginecologia*. 73: 397-401.
101. Friedman J y Halaas J. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 395: 763-770.
102. Hadji P, Hars O, Bock K, Sturm G, Bauer T, Emons G y Schulz K. 2000. The influence of menopause and body mass index on serum leptin concentrations. *Europe Journal Endocrinology*. 143: 55-60.

103. Al-Harithy R. 2004. Relationship of leptin concentration to gender, body mass index and age in Saudi adults. *Saudi Medical Journal*. 25:1086–1090.
104. González RR, Caballero-Campo P, Jasper M, Mercader A, Devoto L, Pellicer A y Simon C. 2000. Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *Journal Clinical Endocrinology and Metabolism*. 85: 4883-4888.
105. González RR, Simón C, Caballero-Campo P, Norman R, Chardonnens D, Devoto L y Bischof P: Leptin and reproduction. *Human Reproduction Update*. 6: 290-300.
106. Cervero A, Horcajadas J. A. Dominguez F, Pellicer A, Simon C. 2005. Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function. *Reproduction Biomedical Online*. 10: 217-223.
107. Somasundar P, McFadden D, Hileman S y Vona-Davis L. 2004. Leptin is a growth factor in cancer. *Journal of Surgical Research* 116: 337–349.
108. Petridou E, Belechri M, Dessypris N, Koukoulomatis P, Diakomanolis E, Spanos E y Trichopoulos D. 2002. Leptin and body mass index in relation to endometrial cancer risk. *Annals and Nutrition and Metabolism*. 46: 147-151.
109. Petridou E, Mantzoros C, Dessypris N, Koukoulomatis P, Addy C, Voulgaris Z, Chrousos y Trichopoulos D. 2003. Plasma adiponectin concentrations in relation to endometrial cancer: a case-control study in Greece. *Journal Clinical Endocrinology and Metabolism*. 88: 993-997.
110. Lagiou P, Signorello L, Trichopoulos D, Tzonou A, Trichopoulou A y Mantzoros C. 1998. Leptin in relation to prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *International Journal of Cancer*. 76: 25-28.
111. Laud K, Gourdou I, Pessemesse L, Peyrat J y Djiane J. 2002. Identification of leptin receptors in human breast cancer: functional activity in the T47-D breast cancer cell line. *Molecular Cell Endocrinology*. 188: 219-226.
112. Lebrecht A, Hefler L, Schneeberger C y Koelbl H. 2001. Serum leptin in patients with vulvar cancer. *Gynecological Oncology*. 83: 164-165.
113. Lebrecht A, Ludwig E, Huber A, Klein M, Schneeberger C, Tempfer C, Koelbl H y Hefler L. 2002. Serum vascular endothelial growth factor and serum leptin in patients with cervical cancer. *Gynecological Oncology* 85:32-35.

114. Sharma D, Saxena N, Vertino P y Anania F. 2006. Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal transduction pathways. *Endocrine Related Cancer* 13:629–640.
115. Considine R, Sinha M, Heiman M, Kriauciunas A, Stephens T, Nyce M, Ohannesian J, Marco C, McKee L, Bauer T y Caro J. 1996. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *The New England Journal of Medicine*. 334:292–295.
116. Boden G, Chen X, Mozzoli M y Ryan I. 1996. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *Journal Clinical Endocrinology and Metabolism*. 81:3419–3423.
117. Lima I, Cervero A y Bonilla F. 2004. Endometrial leptin and leptin receptor expression in women with severe/moderate endometriosis. *Molecular Human Reproduction*. 10: 777-782.
118. Frederich R, Lollmann B, Hamann A, Napolitano-Rosen A, Kahn B, Lowell B y Flier J. 1995. Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. *J Clin Invest*. 96: 1658-1663.
119. Kitawaki J, Koshiba H, Ishihara H, Kusuki I, Tsukamoto K y Honjo H. 2000. Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle. *Journal Clinical Endocrinology and Metabolism*. 85: 1946-1950.
120. Sweeney G. 2002. Leptin signalling. *Cell Signal*. 14:655–663.
121. Frühbeck G. 2006. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Journal Biochemistry*. 393: 7-20.
122. Downward J. 2004. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Seminars in Cell and Developmental Biology* .15: 177–182.
123. Villavicencio A, Aguilar G, Argüello G, Dünner C, Gabler F, Soto E, Gaete F, Peñaloza P, Celis M y Rojas C. 2010. The effect of overweight and obesity on proliferation and activation of AKT and ERK in human endometria. *Gynecological Oncology*. 1: 96-102.
124. Gerdes J, Lemke H., Baisch H., Wacker H, Schwab U. y Stein H. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Journal of Immunology*. 133: 1710-1715.
125. Lilia P, Guzmán P, Villaseca M, Araya J y Roa J. 2008. Adenocarcinoma endometrial concomitante con tumor estromal benigno del endometrio. *Revista chilena de obstetrician y ginecología*. 73: 397-401.

126. Katz A, Nambi S, Mather K, Baron A, Follmann D, Sullivan G, Quon M. 2000 Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *Journal Clinical Endocrinology and Metabolism*.85: 2402–2410.
127. Karelis A, Faraj M, Bastard J, St-Pierre D, Brochu M, Prud'homme D y Rabasa-Lhoret R. 2005. The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90: 4145–4150
128. Karelis A, St-Pierre D, Conus F, Rabasa-Lhoret R y Poehlman E. 2004. Metabolic and body composition factors in subgroups of obesity: what do we know? *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 89: 2569-2575.
129. Sims E. 2001. Are there persons who are obese, but metabolically healthy. *Metabolism* 50: 1499–1504.
130. Dvorak R, DeNino W, Ades P, Poehlman E. 1999. Phenotypic characteristics associated with insulin resistance in metabolically obese but normalweight young women. *Diabetes*. 48: 2210–2214.
131. Artwohl M, Roden M, Holzenbein T, Freudenthaler A, Waldhausl W, Baumgartner-Parzer S. 2002. Modulation by leptin of proliferation and apoptosis in vascular endothelial cells. *International Journal of Obesity* .26 :577–580.
132. Fujita Y, Murakami M, Ogawa Y, Masuzaki H, Tanaka M, Ozaki S, Nakao K y Mimori T. 2002. Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. *Clinical and Experimental Immunology*. 128:21–26.
133. Konopleva M, Mikhail A, Estrov Z, Zhao S, Harris D, Sanchez-Williams G, Kornblau S, Dong J, Kliche K, Jiang S, Snodgrass H, Estey E y Andreeff M. 1999. Expression and function of leptin receptor isoforms in myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: proliferative and anti-apoptotic activities. *Blood* 93:1668–1676.
134. Kokawa K, Shikone T, Otani T, Nishiyama R, Ishii Y, Yagi S y Yamoto M. 2001. Apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 in hyperplasia and adenocarcinoma of the uterine endometrium. *Human Reproduction*. 16: 2211-2218.
135. Tarkowski R, Wojcierowski J, Polak G, Kotarski J. 2000. Expression of the survivin gene in normal and hyperplastic endometrium. *Ginekologia Polska*. 71:1226–1229.
136. Fukuda S y Pelus LM. 2006. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Molecular cancer therapeutics*. 5: 1087-1098.

137. Pallares J, Martínez-Guitarte J, Dolcet X, Llobet D, Rue M, Palacios J, Prat J, y Matias-Guiu X. 2005. Survivin expression in endometrial carcinoma: a tissue microarray study with correlation with PTEN and STAT-3. *International Journal Gynecological Pathology*. 24: 247–253.
138. Takai N, Miyazaki T, Nishida M, Nasu K y Miyakawa I. 2002. Survivin expression correlates with clinical stage, histological grade, invasive behavior and survival rate in endometrial carcinoma. *Cancer Letters*. 184: 105-116.
139. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T y Reed J. 1998. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Research*. 58: 5315 - 5320.
140. Hutchinson J, Jin J, Cardiff R, Woodgett J, y Muller W. 2001. Activation of Akt (Protein Kinase B) in Mammary Epithelium Provides a Critical Cell Survival Signal Required for Tumor Progression. *Molecular and Cellular Biology*. 21: 2203-2212.
141. Brunet A, Bonni A., Zigmund M, Lin M, Juo P, Hu L, Anderson M, Arden K, Blenis J y Greenberg M. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 96: 857–868.
142. Andjelkovic M, Alessi D, Meier R, Fernandez A, Lamb N , Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocqi J, y Brian A. 1997. Translocation in the activation and function of protein kinase B. *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 31515–31524.
143. Datta S, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y y Greenberg M. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 91: 231–241.
144. Nicholson K y Anderson N. 2002. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*. 14: 381–395.
145. Saxena N, Sharma D, Ding X, Lin S, Marra F, Merlin D y Anania F. 2007. Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Research*. 67: 2497–2507
146. Tseng L, Mazella J, Funt M, Mann W y Stone M. 1984. Preliminary studies of aromatase in human neoplastic endometrium. *Obstetrics and Gynecology*. 63: 150-154.

137. Pallares J, Martínez-Guitarte J, Dolcet X, Llobet D, Rue M, Palacios J, Prat J, y Matias-Guiu X. 2005. Survivin expression in endometrial carcinoma: a tissue microarray study with correlation with PTEN and STAT-3. *International Journal Gynecological Pathology*. 24: 247–253.
138. Takai N, Miyazaki T, Nishida M, Nasu K y Miyakawa I. 2002. Survivin expression correlates with clinical stage, histological grade, invasive behavior and survival rate in endometrial carcinoma. *Cancer Letters*. 184: 105-116.
139. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T y Reed J. 1998. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Research*. 58: 5315 - 5320.
140. Hutchinson J, Jin J, Cardiff R, Woodgett J, y Muller W. 2001. Activation of Akt (Protein Kinase B) in Mammary Epithelium Provides a Critical Cell Survival Signal Required for Tumor Progression. *Molecular and Cellular Biology*. 21: 2203-2212.
141. Brunet A, Bonni A., Zigmond M, Lin M, Juo P, Hu L, Anderson M, Arden K, Blenis J y Greenberg M. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 96: 857–868.
142. Andjelkovic M, Alessi D, Meier R, Fernandez A, Lamb N , Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocqi J, y Brian A. 1997. Translocation in the activation and function of protein kinase B. *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 31515–31524.
143. Datta S, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y y Greenberg M. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 91: 231–241.
144. Nicholson K y Anderson N. 2002. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*. 14: 381–395.
145. Saxena N, Sharma D, Ding X, Lin S, Marra F, Merlin D y Anania F. 2007. Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Research*. 67: 2497–2507
146. Tseng L, Mazella J, Funt M, Mann W y Stone M. 1984. Preliminary studies of aromatase in human neoplastic endometrium. *Obstetrics and Gynecology*. 63: 150-154.

147. Tseng L, Mazella J, Mann W y Chumas J. 1982. Estrogen Synthesis in normal and malignant human endometrium. Journal Clinical Endocrinology and Metabolism. 55: 1029-1031.

## Anexo I

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA OBTENCION DE MUESTRAS DE SANGRE Y DE TEJIDO ENDOMETRIAL

Título del Proyecto: **“EFECTOS ENDOCRINOS Y METABOLICOS DE LA OBESIDAD EN EL DESARROLLO DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL”**

Nombre del investigador principal: Dra. Alejandra M.Villavicencio Galdeano

Institución: Laboratorio de Biología Celular y Molecular, INTA, Universidad de Chile

Teléfono: 9781510

Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación *“Efectos endocrinos y metabólicos de la obesidad en el desarrollo del carcinoma endometrial”*.

Esta investigación tiene por objetivo estudiar la regulación del metabolismo de las hormonas femeninas y del estado del endometrio en mujeres delgadas y obesas sin o con carcinoma endometrial, debido a que la obesidad es un factor de riesgo importante en el desarrollo de este tipo de cáncer.

Este estudio incluirá a un número total de 60 mujeres de los siguientes hospitales: Hospital Clínico San Borja Arriarán, Campus Centro, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, y Hospital Dr. Tisné.

Si Ud. acepta participar en este proyecto, se le pedirá una muestra de tejido endometrial obtenida de la biopsia, esterilización tubaria y/o histerectomía que le fue indicada por su médico, parte de la cual será utilizada en este estudio. Además, se le solicitará una muestra de sangre venosa (10 ml) la cuál será tomada el mismo día de la intervención para la obtención de la muestra endometrial. Dichos procedimientos no tendrán más riesgo para Ud. que el procedimiento mismo, y usted será informada por el anatómo-patólogo del Hospital que corresponda, del resultado del estudio anatómo patológico de su muestra endometrial, para eventuales prevenciones o controles.

Es substancial destacar, que su contribución será importante para estudiar los mecanismos que pudieran contribuir a un crecimiento endometrial inadecuado en mujeres obesas.

Ud. es libre de participar o no en este estudio, de manera que si Ud. decide no participar, no habrá consecuencias negativas para Ud. y recibirá la misma atención previamente acordada con su médico tratante.

Toda la información será conservada con estricta confidencialidad, la que compromete a los investigadores o miembros de agencias supervisoras de la investigación y al Comité de Ética. Además, la publicación de los resultados no incluirá su nombre e identidad.

Cabe mencionar que los análisis en el marco del estudio arriba señalado se realizarán en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA).

Si Ud. necesita cualquier otra información sobre este proyecto o acerca de su participación, puede dirigirse a la Dra. Alejandra Villavicencio (Fono: 9781510). Si usted considera amagados los derechos que le asisten como sujeto de investigación, puede contactar al Dr. Andrés Stuardo, Presidente del Comité de Ética Científico del S.S.M. Oriente al teléfono 3404601

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto "*Efectos endocrinos y metabólicos de la obesidad en el desarrollo del carcinoma endometrial*".

.....  
Nombre de la paciente

.....  
Firma

.....  
Fecha

.....

Nombre del médico

.....

Firma

.....

Fecha

.....

Nombre del investigador

.....

Firma

.....

Fecha