

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



**“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL RECEPTOR
DEL GEN DE LA OBESIDAD (OB-R) EN CÁNCER DE ENDOMETRIO
MEDIANTE PUNTAJE HISTOPATOLÓGICO Y DIGITAL”**

**TESIS
QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

**PRESENTA:
LUIS FERNANDO MÉNDEZ LÓPEZ**

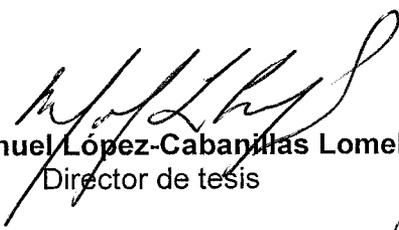
Monterrey, Nuevo León, Marzo de 2012.

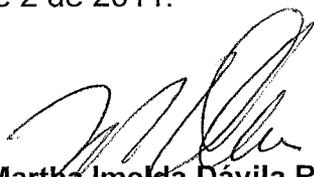
MSP. ALPHA BERENICE MEDELLÍN GUERRERO
Facultad de Salud Pública y Nutrición-UANL
Presente. –

Nos permitimos comunicar a usted que hemos concluido la Dirección y co-dirección respectiva de la tesis titulada: **“Estudio de la expresión inmunohistoquímica del receptor del Gen de la obesidad (OB-R) en cáncer de endometrio mediante puntaje patológico y digital”**, presentada por el QBP. Luis Fernando Méndez López, con la finalidad de obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Nutrición.

Sin otro asunto por el momento, estamos a sus órdenes.

Atentamente,
"Alere Flammam Veritatis"
Monterrey, Nuevo León, diciembre 2 de 2011.


MC. Manuel López-Cabanillas Lomeli
Director de tesis


Dra. en C. Martha Imelda Dávila Rodríguez
Co-director de Tesis


Dr. En C. Ernesto Torres López
Co-director de Tesis



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN

COMITÉ DE EVALUACIÓN DE TESIS

El Comité de Evaluación de Tesis **APROBÓ** la Tesis Titulada: “**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL RECEPTOR DEL GEN DE LA OBESIDAD (OB-R) EN CÁNCER DE ENDOMETRIO MEDIANTE PUNTAJE PATOLÓGICO Y DIGITAL**”, presentada por el QBP. Luis Fernando Méndez López, con la finalidad de obtener el grado de Maestro en Ciencias en Nutrición.

Monterrey, Nuevo León, enero 20 de 2012.



DR. EN C. PABLO ZAPATA BENAVIDES
PRESIDENTE



DR. EN C. ÁNGEL ZAVALA POMPA
SECRETARIO



MC. MANUEL LOPEZ-CABANILLAS LOMELÍ
VOCAL



Avenida Dr. Aguirre Pequeño y Yuriria
Colonia Mitras centro, C.P. 64460
Monterrey, Nuevo León; México
Tel:(81) 13 40 48 90 y 83 48 60 80 (en fax)
www.faspyn.uanl.mx ; faspyn@uanl.mx

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a las instituciones públicas y privadas que participaron en este proyecto, especialmente a la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) por brindarme la oportunidad y el apoyo económico para la realización de mis estudios. Asimismo al Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDCS)-UANL, al Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN) y a los Hospitales No.25 y No.23 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), así como también a la Clínica 0-19 de la Asociación Mexicana de Asistencia a Niños con Enfermedades Catastróficas (AMANEC) y a la clínica Medicina Diagnóstica, por facilitar instalaciones, equipo y material que permitieron la realización de este estudio. Quisiera agradecer en particular a mis directores de Tesis, empezando por la Dra. Martha Dávila quien sigue manteniendo su presencia y apoyo en mi vida, razón por la cual ha sido posible el éxito de este y anteriores proyectos, al Doc. Ernesto Torres al cual me siento afortunado de conocer y a quien agradezco su voluntad para leer y ofrecer comentarios valiosos sobre el proyecto, además de fomentar mi crecimiento profesional y personal y sin duda por motivarme a escribir, en lo cual encontré una pasión más. Al maestro Manuel López-Cabanillas por su continua paciencia, apoyo y por nutrir mis aspiraciones durante estos dos años que ha seguido de cerca el desarrollo del proyecto. A mi comité de evaluación de tesis conformado por el Dr. Pablo Zapata y el Dr. Ángel Zavala quienes fueron y siguen siendo grandes maestros para mí, en particular al Dr. Zavala cuya experiencia me ha hecho crecer en más de un aspecto y a quien agradezco la oportunidad de compartir con él, el tiempo, esfuerzo, entusiasmo y disciplina necesarios en la investigación en el mundo de la biología molecular del cáncer. Agradezco las facilidades otorgadas por el Dr. Eduardo Castelán y el Dr. Antonio Escobar para la conformación del grupo de estudio, sin el cual no hubiera sido posible el proyecto. Igualmente al grupo de trabajo conformado por el Dr. Javier Pacheco, la Dra. Elva Cortes y el Dr. Ricardo Cerda los cuales aportaron también de sobremanera al estudio. Agradezco también a los profesores del programa de la Maestría en Ciencias en Nutrición; Dra. Elizabeth Solís, Dra. Blanca González, Doc. Zacarías Jiménez, Doc. Eduardo Campos y Doc. Erik Ramírez quienes durante muchas horas compartieron con nosotros en el aula de clases. A mis compañeras, en especial a Nancy Campos y Alhelí Hernández, quienes siempre me brindaron oídos y ruedas. A mis compañeros de Lab; Brenda Ortiz, Caro Becerril, Leticia Guardado, Miguel Aguado, Mario Bermúdez y en especial a Laura Gonzales. A mis amigos y aprendices, Manuel Vera y Carlos Morales cuya compañía y ayuda hizo de las arduas jornadas de experimentos momentos épicos. Agradezco igualmente a mis compañeros de viaje, José Dávila, Emanuel Salazar, Efrén Robledo, Raúl Garza, Ángel Colunga, Alonso Gonzales, Hugo Aldape, Ledy Becerra y Ofelia Sánchez. A Barbará Marín, su familia y a todas las personas que contribuyeron a lograr esta meta, muchas gracias.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo al Sr. Fernando Méndez Borges y la Sra. María Bernardina López Palomo; mis padres, a Mariana y Roció; mis hermanas y a Marifer, Fabián, Kal-el y Natalia; mis sobrinos. Integrantes de mi familia a quienes amo, me debo y por quienes soy. Gracias.

"The most beautiful experience we can have is the mysterious. It is the fundamental emotion that stands at the cradle of true art and true science. Whoever does not know it and can no longer wonder, no longer marvel, is as good as dead, and his eyes are dimmed. It was the experience of mystery - even if mixed with fear - that engendered religion. A knowledge of the existence of something we cannot penetrate, our perceptions of the profoundest reason and the most radiant beauty, which only in their most primitive forms are accessible to our minds: it is this knowledge and this emotion that constitute true religiosity. In this sense, and only this sense, I am a deeply religious man... I am satisfied with the mystery of life's eternity and with a knowledge, a sense, of the marvelous structure of existence - as well as the humble attempt to understand even a tiny portion of the Reason that manifests itself in nature."

Albert Einstein. 1931. The World As I See It.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. MARCO TEÓRICO.....	3
a. Definición del problema.....	3
b. Antecedentes.....	5
b.1 Obesidad.....	5
b.1.1 Epidemiología de la obesidad.....	5
b.1.2 Definición de obesidad.....	6
b.1.3 Complicaciones médicas de la obesidad.....	7
b.1.3.1 Relación entre la obesidad y cáncer.....	7
b.1.3.1.1 Obesidad y cáncer de endometrio.....	8
b.2 Tejido de endometrio.....	8
b.2.3 Cáncer de endometrio.....	9
b.2.3.1 Factores pronóstico.....	9
b.2.3.2 Modelo de carcinogénesis en la obesidad.....	10

b.2.3.3 Tipo histológico en la obesidad.....	12
b.3 Adipocinas y su Impacto en la carcinogénesis.....	13
b.3.1 La adipocina leptina.....	14
b.3.2 Mecanismo de acción molecular de leptina.....	15
b.4 Leptina y Ob-R en cáncer de endometrio.....	16
b.5 Cáncer de ovario, obesidad y su asociación con leptina y Ob-R...	18
b.6 Determinación de expresión de proteínas mediante IHQ.....	19
b.6.1 Aspectos técnicos de la IHQ enzimática.....	23
b.6.2 Interpretación y evaluación de la técnica IHQ.....	23
b.6.2.1 Cuantificación de las IHQ.....	24
b.6.2.2 Análisis digital para la cuantificación de las IHQ.....	25
b.6.2.3 Análisis digital mediante la deconvolución de colores.....	26
c. JUSTIFICACIÓN.....	29
d. HIPÓTESIS.....	30
e. OBJETIVOS.....	31
2. MATERIAL Y METÓDO.....	32
a. Diseño de estudio.....	32
a.1 Definición del universo.....	32

a.2 Tamaño de la muestra.....	32
a.3 Definición de las unidades de observación.....	32
a.4 Definición del grupo control.....	33
a.5 Criterios de inclusión.....	33
a.6 Criterios de exclusión.....	33
a.7 Criterios de eliminación.....	34
a.8 Operacionalización de variables.....	34
a.9 Procedimientos.....	34
a.9.1 Diagnóstico histopatológico.....	35
a.9.2 Técnica IHQ.....	35
a.9.3. Interpretación de técnica IHQ.....	36
a.9.4 Prueba piloto.....	36
a.9.5 Análisis estadístico.....	37
3. RESULTADOS.....	38
a. Puntaje histopatológico.....	38
b. Puntaje digital.....	38
c. Comparación de la expresión de Ob-R.....	39
Figura 1. IHQ representativa de Ob-R.....	39
Tabla 1. Puntaje de los tejidos de endometrio estudiados.....	40

Tabla 2. Comparación de la expresión de Ob-R.....	41
Grafica 1. Expresión de Ob-R mediante puntaje digital.....	41
4. DISCUSION.....	42
5. CONCLUSIONES.....	46
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
7. ANEXOS.....	XV
7.1. Clasificación OMS para rangos de IMC.....	XV
7.2 Complicaciones médicas asociadas con la obesidad.....	XV
7.3 Tipos de cáncer relacionados a la obesidad con R.R según IMC....	XVI
7.4 Complejo de detección en la técnica IHQ de inmunoperoxidasa....	XVI
7.5 Mecanismo de carcinogénesis endometrial en la obesidad.....	XVII
7.6 Sistema de puntuación patológica para IHQ.....	XVII
7.7 Características clinicopatológicas y moleculares de tipos de CE.....	XVIII
7.8 Producción de adipocinas por componentes del tejido adiposo.....	XVIII
7.9 Mecanismo de acción molecular de leptina.....	XIX
7.10 Uso del software <i>ImageJ-v1.45p</i> para la puntuación digital.....	XX

NOMENCLATURA

°C	Grados centígrados
Ab	Anticuerpo
Ab ¹	Ab primario
Ab ²	Ab secundario
ABC	complejo avidina-biotina-peroxidasa
ADN	Acido desoxirribonucleico
AEC	3-amino-9-etil carbazol
Ag	Antígeno
AKT	Proteína homóloga al oncogén viral murino del timoma V-akt
AN3CA	Línea celular de cáncer endometrial no diferenciado
ANOVA	Análisis de variancia
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
Bad	Proteína promotora de muerte asociada a Bcl-2
cdc42	Proteína del control de la división celular 42
CE	Cáncer de endometrio
CEE	Cáncer de endometrio de tipo endometrioides
CEI	Carcinoma endometrial intraepitelial
CIBIN	Centro de Investigación Biomédica del Noreste
CIDCS	Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud
Cox-2	Ciclooxigenasa 2
DAB	Diaminobencidina tetrahidrocloreuro
DO	Densidad óptica
E-caderina	Proteína de adhesión intercelular caderina epitelial
ECC-1	Línea celular de cáncer endometrial-1
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>

ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
EN	Endometrio histológicamente normal
ENC	EN de pacientes diagnosticadas con cáncer de ovario
ERK1/2	Cinasa reguladora de señal extracelular
FASPYN	Facultad de Salud Pública y Nutrición
FC	Factor de Crecimiento
Fig	Figura
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de Gonadotropina
GOG	Grupo de Ginecología Oncología
GSK3	Enzima glicógeno sintasa-3
GTP	Guanosina trifosfato
H&E	Hematoxilina y eosina
HB-EGF	FC similar al FC de unión a heparina
HEC-1A	<i>Line human endometrial cancer-one A</i>
HEC-1B	<i>Line human endometrial cancer-one B</i>
HER2/neu	Oncogén c-erb-B2
HGF	FC hepático
HNPCC	Cáncer de colon hereditario sin poliposis
hr	Horas
HRP	<i>Horse Raddish Peroxidase</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IGF-1	FC similar a la insulina tipo 1
IGFBPs	Proteínas de unión a IGF-1
IHQ	Inmunohistoquímica
Il-6	Interleucina 6
IMC	Índice de masa corporal

IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
JAK2	Cinasa intracelular janus 2
kDa	Kilo-daltones
kg	Kilogramos
Ki-67	Ag ki-67ò proteína Ki-67 /MKI67 codificada por el gen <i>MKI67</i>
K-ras	Proteína oncogénica K-ras
LH	Hormona luteinizante
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MDO	Mediana de DO
NIE	Neoplasia intraepitelial endometrial
m ²	Metros cuadrados
min	Minuto
ml	Mililitro
MLH1	<i>MutL homolog 1 colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)</i>
MSH2	<i>Human homolog of the E. coli mismatch repair gene mutS,</i>
MSI	Inestabilidad de los microsatélites
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
ND	No determinado
NF- B	Factor nuclear kappa B
Ob	Gen de la obesidad (gen de Leptina)
Ob-R	Receptor del gen de la obesidad/ Receptor de Leptina
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>f</i>	Valor de significación estadística
p16	Proteína supresora de tumor p16
p53	Proteína supresora de tumor p53
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCR-TR	Reacción de la cadena de polimerasa en tiempo real
PGE2	Prostaglandina E2
PI3K	Fosfatidil inositol 3 cinasa
PTEN	Supresor de tumor PTEN (<i>phosphatase and tensin homolog,</i>

rac1	Proteína C3 sustrato de la toxina botulínica relacionada a ras 1
RBG	<i>Reo-Green-Blue</i>
rhoA	Proteína homóloga a la familia génica de ras miembro A
RL95-2	<i>Human uterine epithelial cell line</i>
R.R.	Riesgo Relativo
SA	Estreptavidina
SHBG	Globulinas de unión a hormonas sexuales
SOPQ	Síndrome de ovario poliquístico
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
STAT3	Proteína transductora de señal 3
TNF-	Factor de necrosis tumoral alfa
TMB	Tetrametilbenzidina
TRS	Técnica de recuperación por calor(<i>Target Retrieval Solution</i> ,
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UMAE	Unidad Médica de Alta Especialidad
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
WHO	<i>World Health Organization</i> ,
-catenina	Proteína beta-catenina
µl	Micrólitro
µm	Micrómetro

RESUMEN

Se estima que hasta el 20% de todas las muertes por cáncer pueden ser atribuibles al sobrepeso y obesidad. El primer cáncer en identificarse como relacionado a la obesidad fue el cáncer de endometrio (CE), en el cual hasta el 60% de los casos diagnosticados son atribuibles a la obesidad. En México el CE es la quinta causa de muerte por cáncer en la mujer y aunado a que la prevalencia de obesidad y sobrepeso de esta población es del 72%, se espera que esta sea una causa importante en el aumento de los casos de CE. Por lo tanto la exploración de la relación entre la obesidad y el desarrollo de CE es de considerable importancia. La leptina es el producto del gen de la obesidad (gen ob), es la hormona producida en mayor cantidad por el tejido adiposo blanco y su concentración en sangre se encuentra elevada en los pacientes con obesidad. Ha mostrado promover el crecimiento, migración e invasión de las células tumorales a través de la activación del receptor del producto del gen de la obesidad (Ob-R). Los niveles de leptina en sangre se han asociado con el desarrollo de CE, sin embargo los estudios de la expresión de Ob-R determinados por inmunohistoquímica (IHQ) no son concluyentes. Por lo anterior se planteo este trabajo de tesis, el cual está basado principalmente en la cuantificación de la expresión de Ob-R mediante IHQ e interpretada de manera patológica y digital con el objetivo de identificar los cambios en la expresión la proteína de Ob-R en dos grupos de tejido de endometrio histológicamente normal, uno de pacientes sin antecedentes personales de cáncer (EN) y otro de pacientes diagnosticadas con cáncer de ovario (ENC), comparados con tejido de CE de tipo endometriode (CEE). Encontramos mediante la interpretación digital de las IHQ que el tejido ENC expresa una cantidad significativamente mayor de proteína Ob-R, mientras que entre los tejidos EN y CEE no se detectaron diferencias. Asimismo que mediante la interpretación patológica no se logro establecer ninguna diferencia entre los grupos. Como conclusión la identificación de que el tejido ENC se expresa mayor cantidad de Ob-R reafirma previos hallazgos de la relación directa entre la obesidad y la carcinogénesis en el cáncer de ovario mediada por Ob-R.

ABSTRACT

It is estimated that up to 20% of all cancer deaths may be attributable to overweight and obesity. The first cancer identified as related to obesity was endometrial cancer (EC), in which up to 60% of diagnosed cases are attributable to obesity. In Mexico, the EC is the fifth leading cause of cancer death in women, and given the 72% of prevalence in obesity and overweight between these populations, we can expect an important increase in cases of EC driven by obesity. Therefore the exploration of the relationship between obesity and development of EC is of considerable importance. Leptin is the product of the obesity gene (ob gene); a hormone produced in greater quantities by white adipose tissue and its blood concentration is elevated in obese patients. It has been shown to promote growth, migration and invasion of tumor cells via activation of the obesity gene receptor (Ob-R). The blood leptin levels are associated with the development of EC; however studies of Ob-R expression determined by immunohistochemistry (IHC) are inconclusive. The aim of this study is the quantification of the Ob-R expression by IHC interpreted by pathology and digital score in order to identify changes in protein expression of Ob-R in two groups of histologically normal endometrial tissue, one type from patients with no personal history of cancer (EN) and the other from patients diagnosed with ovarian cancer (ENC) and compared with EC tissues diagnosed as endometrioid type (EEC). We found by digital score of IHC that ENC tissue expressed significantly more Ob-R protein, while among EN and EEC tissues there was no difference. In addition we fail to establish any difference between the groups by histopathologic score. In conclusion the identification of ENC as the tissue where expression of Ob-R is the highest confirm previous findings of the direct relationship between obesity and carcinogenesis in ovarian cancer mediated by Ob-R.

1. MARCO TEÓRICO

a. Definición del Problema.

México ha experimentado un incremento alarmante en la prevalencia de la obesidad y el sobrepeso en la población adulta e infantil. La obesidad se asocia a una amplia variedad de problemas de salud, incluyendo la diabetes *mellitus* tipo 2, enfermedades cardiovasculares, enfermedad de hígado graso, demencia, problemas de vías respiratorias y algunos tipos de cáncer.

El CE fue el primer cáncer en relacionarse a la obesidad ya que las mujeres obesas tienen hasta 3.5 veces más riesgo de desarrollarlo que las mujeres de peso normal, atribuyéndosele hasta el 60% de los casos de CE a la obesidad, además las mujeres obesas diagnosticadas con CE tienen 6 veces más riesgo de morir que las mujeres no obesas. En México el CE es la quinta causa de muerte por cáncer en las mujeres y su incidencia se está incrementando. Aunque no existen datos de la asociación entre la obesidad y la incidencia de CE en México, dada la prevalencia de obesidad y sobrepeso del 72% en la población femenina mayor de 20 años y lo relevante que es ésta para el riesgo del desarrollo de CE se espera que la obesidad y sobrepeso sean factores importantes del incremento de la incidencia de este tipo de cáncer en México.

Los efectos de la obesidad en el CE representan una intersección crítica entre estos dos problemas de salud. La leptina es el producto del gen de la obesidad, ha mostrado una asociación positiva con la incidencia del CE y se ha propuesto que su receptor; Ob-R podría tener un papel importante en su progresión tumoral.

Previos estudios realizados con IHQ reportaron no encontrar expresiones de Ob-R mayores a 1+ en los tejidos de CEE, mientras que en los controles de endometrio normal en fase proliferativa media a tardía del ciclo menstrual fue de 0. Lo anterior significa que la valoración con puntaje histopatológico solo alcanzo a detectar el puntaje más bajo, reflejando que podría ser insuficiente la sensibilidad de la interpretación para detectar los cambios en la expresión de la proteína en este tejido. Argumento que puede ser válido por el hecho de que mediante la técnica de PCR-TR si se detectan niveles de expresión de Ob-R en la misma etapa del ciclo menstrual que fue negativa mediante IHQ.

Por lo anterior se planteo este trabajo de tesis, el cual está basado principalmente en la interpretación patológica y digital de la técnica IHQ para la cuantificación de la expresión de Ob-R con el objetivo de identificar los cambios en su expresión en dos grupos de tejido de endometrio histológicamente normal, uno de pacientes sin antecedentes personales de cáncer (EN) y otro de pacientes diagnosticadas con cáncer de ovario (ENC), el cual también se asocia a la obesidad y compararlos con tejido de cáncer de endometrio de tipo endometriode (CEE), el cual es el más frecuente en las pacientes con obesidad. Buscando reafirmar el impacto de la obesidad en el desarrollo de este tipo de cáncer mediante cambios en la expresión de Ob-R.

b. Antecedentes.

b.1 Obesidad.

La obesidad puede ser vista como un trastorno de almacenamiento de energía, que genera ganancia de peso a causa del desbalance energético, en donde la mayor parte del exceso de calorías es almacenado como triglicéridos en el tejido adiposo. Es el resultado de una interacción compleja entre genes y factores ambientales como la dieta, componentes de la comida y estilo de vida (Smith et al., 2006).

b.1.1 Epidemiología de la Obesidad.

La prevalencia de la obesidad y el sobrepeso en la mayoría de los países desarrollados (y en las áreas urbanas de los países menos desarrollados) se ha ido incrementando importantemente en las pasadas dos décadas, los últimos cálculos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que hay en todo el mundo aproximadamente 1,600 millones de adultos con sobrepeso, de los cuales al menos 400 millones son clínicamente obesos. Además se calcula que en 2015 habrá aproximadamente 2,300 millones de adultos con sobrepeso y más de 700 millones con obesidad (WHO, 2005). Datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) revelan que México posee el segundo lugar en la lista de los países con mayor obesidad en el mundo con una prevalencia del 30% en la población adulta, mientras que en la población infantil ya es el primer lugar a nivel mundial (Olaiz et al., 2006).

b.1.2 Definición de Obesidad.

Las definiciones para la clasificación y reporte de peso saludable, sobrepeso y de obesidad en las poblaciones se han basado históricamente en mediciones antropométricas (Kuczmarski and Flegal, 2000). Uno de los índices antropométricos más simples para estimar la cantidad de tejido adiposo es el peso ajustado según la estatura. Desde los años 80, los índices del peso ajustados según la estatura han ganado aceptación porque proporcionan una sola estimación de la cantidad de tejido adiposo (sin importar altura) que puede ser comparado fácilmente entre diferentes estudios y poblaciones. En gran medida, la más ampliamente utilizada es el índice de masa corporal (IMC), también llamado el índice de Quetelet, que se define como peso (en kilogramos) dividido por la altura (en metros cuadrados). La validez del IMC como medida de tejido adiposo es apoyada más a fondo por su asociación con factores de riesgo relacionados a la obesidad, tales como triglicéridos de la sangre, colesterol total, presión arterial y niveles de glucosa en ayuno (Willett, 1998). Los estándares que definen el peso saludable, el sobrepeso y la obesidad se han desarrollado con el tiempo y reflejan el conocimiento existente de las suposiciones sobre la relación del peso a los resultados de la enfermedad. Los únicos criterios globalmente aceptados para el exceso de peso y la obesidad se basan en el IMC, según lo recomendado por la OMS. A pesar que los puntos de corte son algo arbitrarios, esta clasificación del IMC es derivada de grandes estudios epidemiológicos y observacionales del IMC y la mortalidad total (WHO, 1995) (Anexo 7.1).

b.1.3 Complicaciones Médicas de la Obesidad.

La prevalencia e incidencia de las enfermedades relacionadas con la obesidad también se han incrementado en los últimos años (Klein et al., 2002). La obesidad está asociada al desarrollo de una amplia variedad de problemas de salud, las cuales llevan a una calidad de vida deteriorada, considerable morbilidad y muerte prematura (Semenkovich, 2006) (Anexo 7.2).

b.1.3.1 Relación entre la Obesidad y Cáncer.

La relación entre la obesidad y diferentes tipos de cáncer ha recibido poca atención, contrario a su reconocido papel en el desarrollo de diabetes y enfermedad cardiovascular (Calle and Kaaks, 2004) (Anexo 7.3). Un estudio epidemiológico que involucró 750,000 americanos durante el período de 1959 a 1972 encontró una relación entre los individuos con sobrepeso y la mortalidad por cáncer, reportaron un incremento del 33% en los hombres y un 55% en las mujeres cuyo peso corporal era más del 40% por encima del promedio. Los hombres con sobrepeso tuvieron índices más altos de cáncer colorectal, mientras que las mujeres tenían índices más altos de cáncer de seno, cérvix, endometrio, vesícula y conductos biliares, ovarios y útero (Lew and Garfinkel, 1979).

Recientemente se estimó que del 15 al 20% de todas las muertes por cáncer en los Estados Unidos de América (EUA) pueden ser atribuibles al sobrepeso y obesidad (Calle et al., 2003).

b.1.3.1.1 Obesidad y Cáncer de Endometrio. El CE fue el primer cáncer en reconocerse como relacionado a la obesidad. Existe evidencia convincente y consistente de estudios de casos-control y de cohorte en donde el sobrepeso y la obesidad están asociados fuertemente con el CE (Kaaks et al., 2002; Vainio et al., 2002). El estilo de vida es un factor de riesgo importante para el desarrollo del CE, lo cual ha sido demostrado por el hecho de que la tasa de incidencia de CE es hasta 10 veces más alta en los países industrializados de Occidente que en los países de Asia o África rural (Parkin et al., 1997; Pisani et al., 1993) y por los cambios en la tasa de incidencia sobre el tiempo después del desarrollo industrial o con la migración de una zona de bajo riesgo hacia una zona de riesgo elevado (Armstrong and Doll, 1975; Coleman et al., 1993; Dunn, 1975; Haenszel and Kurihara, 1968; Hill and Austin, 1996)

La obesidad ha sido asociada con un incremento de 2 a 5 veces el riesgo de desarrollar CE en mujeres en etapa pre y post menopáusica, atribuyéndosele a esta relación hasta el 60% de la incidencia del CE en las sociedades avanzadas (Bergstrom et al., 2001; Calle and Kaaks, 2004). Algunos estudios indican que el riesgo relativo (R.R) alcanza una relación lineal con el IMC, incluso con un incremento de varias veces el R.R, lográndose en mujeres con un IMC de 30 (Vainio et al., 2002).

b.2 Tejido de Endometrio.

El tejido endometrial consiste de estroma, epitelio glandular y epitelio de superficie. Estos diferentes tipos de tejidos responden a los esteroides sexuales y otras hormonas de la circulación, los cuales secretan una variedad de factores de crecimiento, citocinas y otros péptidos que actúan de manera paracrina y autocrina regulando la proliferación, diferenciación y apoptosis (Kaaks et al., 2002).

b.2.3 Cáncer de Endometrio.

El CE es la neoplasia ginecológica más común, globalmente constituye el 4% de todos los tipos cáncer diagnosticados en la mujer especialmente después de la menopausia (Bray et al., 2005). Es una enfermedad curable en pacientes diagnosticadas en estadios tempranos, llegando a sobrevivir más de 5 años hasta el 95% de ellas, sin embargo, en las diagnosticadas en etapas avanzadas solo lo logran entre el 25 al 79% (Abeler and Kjorstad, 1992; Alektiar et al., 2002; Collins et al., 1980; Mariani et al., 2000; McDonald et al., 1977; Wilson et al., 1990). Aproximadamente el 5% de los casos de EC se consideran hereditarios (Gruber and Thompson, 1996), muchos de estos casos están asociados con cáncer de colon hereditario sin poliposis (HNPCC), un cáncer heredable autosómico dominante con anomalías de la línea germinal en uno de los genes de reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN). Las mujeres con HNPCC tienen un incremento de hasta 10 veces de padecer CE comparadas con la población en general. El riesgo de padecerlo durante la vida es de 30-61% para las portadoras de HNPCC (Dunlop et al., 1997). Este tipo de CE hereditario es más probable que ocurra a una edad más temprana y se caracteriza por un alto estadio y grado FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia), un patrón estructural cribiforme, diferenciación mucinosa y necrosis (Parc et al., 2000).

b.2.3.1 Factores Pronóstico.

En Ginecología oncológica, los factores pronósticos validados son necesarios para definir subgrupos biológicamente similares para el análisis de la eficiencia terapéutica. Son importantes para personalizar la terapia del

paciente, la cual consiste en radiación, quimioterapia y terapia hormonal (Uharcek, 2008). En 1988 FIGO cambio la estadificación clínica del CE a un sistema basado en la cirugía (Shepherd, 1989). Este cambio fue basado en el estudio de estadificaciones quirúrgicas prospectivas realizadas por el Grupo de Ginecología Oncología (GOG), que demostraron que el pronóstico está relacionado a la presencia o ausencia de factores de riesgo histopatológicos uterinos y extrauterinos (Boronow et al., 1984; Creasman et al., 1987; Morrow et al., 1991). Los factores uterinos incluyen el tipo histológico, el grado histológico, la profundidad de la invasión miometrial, la invasión linfovascular, el compromiso cervical, la ploidía del ADN, los oncogenes, los genes supresores de tumor y los receptores de hormonas, mientras que los factores extrauterinos incluyen la citología peritoneal positiva, compromiso anexial, las metástasis de nódulos linfáticos pélvicos y paraaórticos y las metástasis peritoneales (Shepherd, 1989).

b.2.3.2 Modelo de Carcinogénesis en la Obesidad.

Aunque el mecanismo no se entiende por completo, las hormonas endógenas parecen jugar un papel importante en el desarrollo del EC ya que hay un incremento en el riesgo asociado a una menarquía temprana, menopausia tardía, sugiriendo una relación entre el riesgo y el aumento en la exposición a los niveles de estrógenos durante la premenopausia (Grady et al., 1995). Otros factores asociados son la paridad y el uso de estrógenos exógenos orales para la anticoncepción o la terapia de remplazo hormonal postmenopáusica (Grady et al., 1995; Weiss and Hill, 1996). Además el riesgo ha sido relacionado a las altas concentraciones en los niveles plasmáticos de estrógenos, andrógenos, de factores de crecimiento similares a la insulina tipo 1 (IGF-1) e insulina y bajos niveles de progesterona, globulinas de unión a hormonas sexuales (SHBG), proteínas de unión a factores de crecimiento

similares a la insulina (IGFBPs). Se cree que el exceso de peso influencia el riesgo al EC a través de cambios en el metabolismo endógeno de las hormonas (Austin et al., 1991; Mollerstrom et al., 1993; Potischman et al., 1996; Troisi et al., 1997). El mecanismo principal por el cual se cree que las hormonas y los factores de crecimiento influyen el incremento en el riesgo de desarrollar EC son los efectos en la regulación del balance entre la proliferación celular, diferenciación y la apoptosis (Ames et al., 1993; Cohen and Ellwein, 1991; Cory et al., 1999; Preston-Martin et al., 1990; Russo et al., 1982; Scott and Maercklein, 1985; Wille et al., 1982). El incremento en la tasa de proliferación aumenta las probabilidades de que las mutaciones se acumulen en los proto-oncogenes y los genes supresores de tumor. La evasión de la apoptosis permitiría a las células que posean estas mutaciones sobrevivir y eventualmente expandirse clonalmente, acumulando mutaciones adicionales hasta que alcancen una malignidad completa. Finalmente el estímulo proliferativo podría incrementar el crecimiento de tumores establecidos (Scott and Maercklein, 1985; Wille et al., 1982). En mujeres en premenopausia, el riesgo de desarrollar cáncer de endometrio también se incrementa entre mujeres con Síndrome de ovario poliquístico (SOPQ) (Kaaks et al., 2002), que frecuentemente se desarrolla y es consecuencia de una hiperinsulinemia crónica, generalmente relacionada a una deficiencia en progesterona.

Todas estas relaciones se ajustan en un modelo fisiológico coherente con la teoría de los estrógenos sin la oposición de la progesterona para el desarrollo del cáncer endometrial. Teoría ampliamente aceptada, basada en una amplia evidencia, incluyendo la asociación entre el cáncer de endometrio con el uso de terapia de remplazo hormonal en la postmenopausia. La cual considera que el desarrollo del cáncer es incrementado por los efectos mitogénicos de los estrógenos cuando hay una insuficiencia en el contrabalance de la progesterona (Kaaks et al., 2002; Key and Pike, 1988) (Anexo 7.5).

b.2.3.3 Tipo Histológico en la Obesidad.

Se ha descrito que el CE consiste de dos grupos (Bokhman, 1983; Deligdisch and Holinka, 1987). El primer grupo, el tipo I, lo conforman los carcinomas de endometrio endometrioides (CEE), son los más comunes (aproximadamente el 80% de los casos) y están caracterizados por tumores bien diferenciados al momento del diagnóstico y con enfermedad localizada. Estas pacientes usualmente tienen un pronóstico favorable, estadio I, con una sobrevivencia a los 5 años del 86%. El desarrollo de este tipo de tumores se relaciona principalmente con la exposición en exceso a los estrógenos. Los factores de riesgo incluyen la obesidad, la nuliparidad, la menopausia tardía, diabetes *mellitus*, terapia hormonal con estrógenos sin uso de progesterona, terapia con tamoxifeno y el uso de anticonceptivos orales de manera secuencial. El exceso de estrógeno de cualquiera de estas fuentes produce una estimulación continua del endometrio, generando una hiperplasia endometrial y potencialmente un EC. La obesidad tiene el riesgo más alto asociado con el exceso de exposición a estrógenos, aun en mujeres postmenopáusicas. Los ovarios en las mujeres postmenopáusicas junto con las glándulas adrenales continúan produciendo androstenediona. La enzima aromatasa encontrada en los adipocitos convierte este andrógeno en estrona 5 y con el tiempo, este estrógeno relativamente débil puede estimular la proliferación endometrial crónica y ocasionalmente un cambio maligno (Gates et al., 2006). En contraste, el segundo grupo, el Tipo II, los EC con histología no endometrioides conforman aproximadamente el 20% de los casos, son tumores más agresivos, con invasión temprana al miometrio y espacios vasculares, asociados a una enfermedad más avanzada en estadio, mas alto grado tumoral e histología no endometrioides y es acompañado de una tasa de mortalidad mayor. Estas pacientes son generalmente más delgadas que sus contrapartes tipo I y se cree que sus tumores están influenciados por factores no estrogénicos (Liu, 2007; Salvesen et al., 1998) (Anexo 7.7).

b.3 Adipocinas y su Impacto en la Carcinogénesis.

Estudios realizados a finales de los años 80s demostraron que los adipocitos pueden secretar factores solubles, actuando como un tejido endocrino (Cook et al., 1987; Flier et al., 1987). Sin embargo, el concepto del tejido adiposo como célula endocrina no ganó aceptación general si no hasta que se encontraron polipéptidos biológicamente activos que eran producidos exclusiva o substancialmente por el tejido adiposo blanco. A estas sustancias se les llamo adipocinas y actúan de manera endocrina, paracrina y autocrina (Scherer et al., 1995; Zhang et al., 1994). Los adipocitos forman aproximadamente la tercera parte de todo el tejido adiposo, mientras que el resto representa una combinación de vasos sanguíneos, matriz del tejido conectivo, tejido nervioso, estroma vascular y pre adipocitos (Faust et al., 1984) y en la obesidad es además infiltrado por macrófagos. (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). Las células del tejido adiposo que producen las adipocinas incluyen adipocitos y fibroblastos; los cuales se pueden diferenciar en adipocitos maduros y macrófagos (Vona-Davis and Rose, 2007) (Anexo 7.8).

Recientemente, ha surgido un interés considerable del papel potencial de las adipocinas en el desarrollo de los tipos de cáncer en los que la obesidad es un factor de riesgo establecido (Vona-Davis and Rose, 2007). La leptina es la adipocina producida mas abundantemente por el tejido adiposo blanco y de la cual sus concentraciones *in vivo* se encuentran elevadas en los pacientes obesos. Además ha mostrado estimular el crecimiento, migración e invasión de las células tumorales *in vitro*, mostrando su capacidad biológica para promover el comportamiento maligno del cáncer (Lang and Ratke, 2009), por lo tanto la exploración de la relación entre leptina y el cáncer es de considerable importancia (Ogunwobi and Beales, 2007).

b.3.1 La adipocina Leptina.

La leptina es el producto del gen de la obesidad (gen *ob*), es una adipocina peptídica de 16 kilodaltons (kDa) y 167 aminoácidos descubierta en 1994 (Zhang et al., 1994). Una mutación en este gen está asociada a una obesidad severa y diabetes tipo II en ratones (Auwerx and Staels, 1998). En los humanos el gen *ob* está localizado en el cromosoma 7q31.3 (Green et al., 1995). La leptina es sintetizada principalmente por el tejido adiposo, pero también es producida por varios tipos celulares como la placenta, células secretorias del epitelio mamario (Baratta, 2002), epitelio digestivo, mucosa gástrica y el hígado (Guilmeau et al., 2004). Una vez sintetizada, es continuamente secretada, no se almacena en grandes cantidades (Bornstein et al., 2000). El conocimiento de las acciones biológicas de esta hormona se ha incrementado considerablemente durante los últimos años y su papel en la regulación de la fisiología humana es ampliamente reconocido. Se ha demostrado que no limita sus acciones a la regulación de la ingesta de alimentos mediante la señal de saciedad, sino que también está involucrada en el metabolismo total, incluyendo el gasto de energía, la regulación de la temperatura, la función reproductiva, inmunidad y hematopoyesis (Huang and Li, 2000). La leptina actúa a nivel central (hipotalámico) y periférico como un regulador importante del peso corporal y del metabolismo al incrementar el consumo de energía, la pérdida de tejido adiposo y la función reproductiva (Hamann and Matthaei, 1996). Esta última función es vía la hormona liberadora de Gonadotropina (GnRH), afectando con esto a las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH)(Greisen et al., 2000). Por otro lado los linfocitos T y las células del endotelio vascular también expresan receptores para la leptina, haciendo que esta hormona participe en la función inflamatoria y la angiogénesis (Siegmond et al., 2004; Sierra-Honigmann et al., 1998). Los niveles de leptina sérica reflejan la cantidad de energía almacenada en el tejido adiposo y son proporcionales a la cantidad de grasa corporal, por ejemplo incrementan en los

pacientes obesos y disminuyen después de varios meses de una pérdida de peso pronunciada (Moschen et al., 2009).

b.3.2 Mecanismo de Acción Molecular de Leptina.

La leptina actúa vía el receptor del producto del gen de la obesidad (Ob-R), del cual hay al menos 6 isoformas (denominadas de la *a-f*) generadas por empalme alternativo de ácido ribonucleico mensajero (ARNm). Son receptores transmembrana pertenecientes a la familia de los receptores de citocina clase I, en los cuales se ha descrito que la señalización es principalmente a través de la isoforma Ob-Rb ya que es la única que posee el dominio intracelular completo (Auwerx and Staels, 1998).

La señal de leptina se trasmite principalmente por la cinasa intracelular janus 2 (JAK2), la transductora de señal 3 (STAT3) y la cinasa reguladora de señal extracelular (ERK1/2). La unión de leptina con Ob-R permite la fosforilación de JAK-2, que después puede reclutar STAT-3 y fosforilar su tirosina que finalmente le permite su translocación nuclear y la estimulación de la transcripción. Además Ob-R también activa intracelularmente la vía de señalización de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) después de su unión a la leptina (Sweeney, 2002). También se ha demostrado que fosforila y activa a ERK y a la proteína homóloga al oncogen viral murino del timoma V-akt (AKT), ambas asociadas con crecimiento celular y migración (Gao et al., 2009; Saxena et al., 2007; Sharma et al., 2006). Estudios recientes han mostrado que la vía de señalización ERK es un blanco atractivo de las terapias anti cáncer debido a su rol central en la regulación de la proliferación, invasión, y sobrevivencia de los tumores (Sebolt-Leopold, 2004). AKT provee una señal de prevención de la apoptosis, inducida debido al estrés, a través de varios

mecanismos, como la fosforilación de la proteína promotora de muerte asociada a Bcl-2 (Bad), de la enzima glicógeno sintasa-3 (GSK3) y caspasa 9 (Franke et al., 1997; Garofalo and Surmacz, 2006).

La vía de señalización de fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K)/AKT esta frecuentemente alterada en cáncer y su activación esta correlacionada a tumores de mama invasivos y metastásicos (Lin et al., 2005). AKT también esta aumentada en los condrosarcomas, células de hepatocarcinoma y de endometrio, se encontró que el tratamiento de estas células con leptina incrementa la invasión, migración y proliferación, efectos que se pueden prevenir con la inhibición específica de AKT, con lo cual se probó que muchas de las actividades de la leptina son dependientes de AKT.(Gao et al., 2009; Saxena et al., 2007; Sharma et al., 2006; Yan et al., 2009). Otros estudios explican el efecto en la migración e invasión de varias células de carcinoma a través de la expresión incrementada de varias metaloproteasas de matriz e integrinas vía la activación del factor nuclear kappa B (NF- B) (Yang et al., 2009; Yeh et al., 2009). En células de carcinoma de colon mostro activar las proteínas Rho de unión a guanosina trifosfato (GTP); la proteína C3 sustrato de la toxina botulínica relacionada a ras 1 (rac1), la proteína del control de la división celular 42 (cdc42) y la proteína homóloga a la familia génica de ras miembro A (rhoA), proteínas que regulan la migración celular afectando la reorganización del citoesqueleto de actina (Jaffe and Schwartz, 2008) (Anexo 7.9).

b.4 Leptina y Ob-R en Cáncer de Endometrio.

Ya ha sido descrita la expresión de leptina y Ob-R en el sistema reproductivo femenino (Moschos et al., 2002); leptina es detectada en la placenta y en los ovarios (Cioffi et al., 1997; Henson et al., 1998; Masuzaki et al., 1997; Senaris et

al., 1997), mientras que Ob-R es expresado en ovarios (Cioffi et al., 1997; Karlsson et al., 1997) y endometrio (Gonzalez et al., 2000; Kitawaki et al., 2000). En este último, la expresión de Ob-R mediante PCR-TR alcanza un máximo durante la etapa secretora temprana del ciclo menstrual de endometrio (Kitawaki et al., 2000) y es suprimido por la progesterona, sugiriendo que la disminución de su expresión es a causa de la progesterona secretada en el cuerpo lúteo (Koshiba et al., 2001).

Hay al menos tres estudios que sugieren que leptina desempeña un papel importante en la carcinogénesis del endometrio, lo cual reafirma que la obesidad es un factor de riesgo importante en el CE (Cymbaluk et al., 2008). El primero mostro que leptina tiene una fuerte asociación positiva con el CE en un estudio de casos-controles de CE incidente en Grecia (Petridou et al., 2002). El segundo encontró que las pacientes diagnosticadas con CE e hiperplasias de endometrio con IMC>30 tienen concentraciones séricas de leptina mayores que sus contrapartes con IMC<25 y ausencia de patologías endometriales (Cymbaluk et al., 2008). Por último, se encontró que las pacientes postmenopáusicas con CE tienen niveles de leptina en suero significativamente más elevados (8.2 ± 5.5 ng/ml) que el de sujetos control (4.5 ± 5.5 ng/ml) y que estos fueron asociados con el IMC (Ashizawa et al., 2010).

El mecanismo molecular propuesto para explicar esta asociación epidemiológica se obtuvo con ensayos en líneas celulares de adenocarcinoma endometrial humano, en donde se observo que leptina induce la proliferación celular mediante la activación funcional y expresión de la proteína de Cox-2 y su ARNm, así como la subsecuente producción de prostaglandina E2 (PGE2), usando las vías de señalización JAK2/STAT3, MAPK/ERK y PI3K/AKT (Gao et al., 2009; Saxena et al., 2007). Además que la activación de estas últimas es mediante via Ob-R, del cual se confirmo la expresión de Ob-Ra y Ob-Rb en todas las líneas celulares ensayadas, siendo la isoforma Ob-Ra la que se

expreso en mayor cantidad. Aunque la expresión de Ob-R fue más intensa en las líneas celulares de CE bien diferenciadas (Ishikawa, EEC-1) en comparación con las líneas celulares poco diferenciadas (RL95-2, HEC-1A, HEC-1B) y aún menor en la línea celular menos diferenciada (AN3CA) (Gao et al., 2009).

La primera vez que se sugirió que la proteína Ob-R podría estar involucrada en la patogénesis del CE, fue al observar una disminución de su expresión determinada mediante IHQ en zonas de tejido tumoral al compararse con zonas de tejido endometrial histológicamente normal proveniente del mismo paciente y que esto sucedía mayormente con los casos de CEE poco diferenciados (Yuan et al., 2004). Otros estudios en tejido de CEE mediante IHQ obtuvieron mayor expresión de Ob-R en los tumores bien diferenciados en comparación a los pocos diferenciados, indicando que su presencia se asocia con el grado histológico (Bogusiewicz et al., 2006; Wincewicz et al., 2008). Sin embargo no todos los estudios han encontrado dicha asociación (Koda et al., 2007).

Posteriormente un estudio mediante PCR-TR encontró resultados contradictorios, ya que reportaron que la expresión de Ob-R en el tejido neoplásico de CE fue aproximadamente 5 veces más alta, en comparación al tejido histológicamente normal del mismo paciente y que además el IMC>30 correlaciono con un incremento en la expresión de Ob-R (Mantzios et al., 2011), resultados, que si concuerdan con previos reportes de la función de Ob-R en la carcinogénesis de los tumores relacionados a la obesidad (Uddin et al., 2009a; Xia et al., 2009), como el caso de cáncer de ovario.

b.5 Cáncer de Ovario, Obesidad y su asociación con Leptina y Ob-R.

La obesidad es un factor de riesgo bien establecido para todos los tumores relacionados a las hormonas en la mujer; sin embargo, aún no se ha logrado una asociación consistente del cáncer de ovario con la obesidad (Fairfield et al., 2002; Pan et al., 2004; Rodriguez et al., 2002; Schouten et al., 2003; Wolk et al., 2001), a pesar de que al igual que en el cáncer de mama y endometrio se considera a las hormonas endógenas como responsables del cáncer de ovario (Risch, 1998).

Entre las mujeres que nunca han usado terapia de remplazo hormonal, las que sufren obesidad, sobre todo las categorías más altas de IMC tienen un R.R incrementado (1.5-2) de desarrollar cáncer de ovario comparadas con las mujeres de peso normal (Leitzmann et al., 2009). Sin embargo otros estudios no han encontrado ninguna asociación, por lo que no han podido realizarse conclusiones solidas. Aun no es claro cuales factores podrían explicar los resultados divergentes (Calle and Kaaks, 2004).

Recientemente fue publicada una relación directa entre la obesidad y la carcinogénesis en el cáncer de ovario mediada por la proteína Ob-R, se encontró que en el 60% de los casos de cáncer de ovario se expresa Ob-R determinada mediante IHQ y que los pacientes con tumores con niveles altos de esta proteína mostraron una menor sobrevivencia libre de enfermedad comparados con aquellos con niveles de expresión menor, la sobreexpresión de Ob-R resulto ser una variable independiente de pronóstico para predecir poca sobrevivencia y los experimentos realizados en líneas celulares de cáncer de ovario mostraron que la leptina tiene un efecto oncogénico, causando activación de la proliferación e inhibición de la apoptosis lo cual soporta un papel de leptina en cáncer de ovario (Uddin et al., 2009b).

b.6 Determinación de Expresión de Proteínas Mediante IHQ.

La IHQ es una técnica que consiste en la identificación, de antígenos (Ag) celulares o tisulares *in situ*, está basada en el reconocimiento Ag-anticuerpo (Ab). Se utiliza en la práctica diagnóstica y en investigación para la visualización de la distribución y localización de componentes celulares específicos dentro de una célula o tejido mediante análisis en microscopia de luz (Taylor, 1994).

La primera detección exitosa de Ag en tejidos fijados en formalina y montados en parafina ocurrió en 1974 (Taylor and Burns, 1974), desde entonces la IHQ ha evolucionado, convirtiéndose en una de las tinciones más utilizadas en patología, actualmente es una técnica fundamental para el diagnóstico y clasificación de los tumores (Shi et al., 2011). Además ha sido adaptada a la identificación y demostración de marcadores de pronóstico (los que de forma independiente puede predecir el resultado clínico) y como marcadores predictivos (aquellos que de forma independiente puede predecir la respuesta a una terapia en particular) (Gown, 2008).

La recuperación de la antigenicidad de las piezas de tejido sometidas a fijación con formol se realiza con la técnica de recuperación por calor (TRS), desarrollada en 1991, la cual involucra un paso de la pieza en temperaturas altas previo a la tinción IHQ lográndose el incremento de la antigenicidad y por lo tanto de la tinción (Shi et al., 1991).

La detección del Ag se realiza mediante un método indirecto; el cual emplea como primer paso un Ab específico no marcado (Ab primario Ab¹) y en una segunda fase un Ab marcado (Ab secundario Ab²) que reacciona de forma específica con el Ab¹. La localización de este complejo Ag-Ab se realiza con una enzima, por lo cual el método se denomina IHQ enzimática y es el más ampliamente utilizado. Se usa la peroxidasa de rábano (HRP) como marcador,

la reacción de esta enzima con un sustrato cromógeno produce un precipitado de color localizado en donde se encuentra el complejo Ag-Ab. Entre las técnicas de inmunoperoxidasa, el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) es el que ha demostrado la máxima sensibilidad, se basa en la fuerte afinidad de la avidina por la biotina. La avidina es una glicoproteína de alto peso molecular formada por 4 subunidades, que configuran una estructura terciaria con cuatro lugares de unión. Actualmente se prefiere el uso de la estreptavidina (SA) conjugada con la molécula de HRP. La SA es una avidina tetramérica aislada de la bacteria *Streptomyces avidinii* la cual tiene mayor afinidad por la biotina y permite mayor especificidad en la detección y en la amplificación del evento de la unión Ag-Ab. Además a diferencia de la avidina la SA no contiene carbohidratos con lo cual se evitan las reacciones inespecíficas con lecitinas encontradas en los tejidos, tiene un punto isoeléctrico neutral con lo cual se evitan uniones electrostáticas que se presentaban con la avidina de punto isoeléctrico 10 y además su conjugación directa con la HRP la vuelve más estable por largos periodos. La biotina es una pequeña molécula vitamínica que se conjuga fácilmente con los Ab lográndose que hasta más de 150 moléculas de biotina puedan llegar a unirse a un único Ab. Así; el método ABC consiste en la aplicación de un Ab¹ no marcado seguido de un Ab² biotinilado y por último la aplicación de un complejo SA-HRP. Este complejo debe tener al menos uno de los cuatro lugares de unión de la avidina libre para que se pueda unir a las moléculas de biotina acomplejadas al anticuerpo secundario. Obteniéndose finalmente un complejo Ab¹-Ab²biotinilado-Complejo ABC en el lugar donde se encuentra el Ag en el tejido (Adams, 1992; Johnson, 1999).

El siguiente paso es el revelado mediante el cual se podrá visualizar y localizar el complejo. Para ello es necesario añadir un sustrato enzimático o cromógeno. Existen varios cromógenos como la 3,3`diaminobenzidina (DAB), el 3-amino-9-etil carbazol (AEC), el 4-cloro-naftol y la tetrametilbenzidina (TMB). El cromógeno más usado es el DAB. La enzima HRP se activa en presencia de

donadores de electrones, formando un complejo enzima sustrato y la posterior oxidación del donador de electrones. El donador de electrones al oxidarse genera un producto coloreado y por ello es llamado cromógeno. El DAB genera un producto final color marrón, el cual es altamente insoluble en alcohol y en otros solventes orgánicos, por consiguiente, adecuado para una gran cantidad de tinciones de contraste y medios de montaje. La oxidación del DAB genera su polimerización, haciendo que tenga la habilidad de reaccionar con metales y por lo tanto incrementando la intensidad de la reacción y su densidad electrónica. Estos metales incrementan la reacción a través de la reducción del DAB convirtiéndolo en un precipitado más oscuro e intenso. Los más utilizados son las sales de cobre, plata, níquel, oro y cobalto. Ya que los metales solo actúan sobre el cromógeno reducido que ha sido depositado en la reacción de la peroxidasa, esta reacción no contribuye al ruido de fondo. El lado negativo del DAB es que ha sido clasificado como un potente carcinógeno, por ello debe ser manejado con cuidado y dispuesto de manera adecuada (Hsu and Soban, 1982).

El paso final del proceso consiste en la tinción de contraste y el montaje de las laminillas. La hematoxilina es la contratinción más ampliamente utilizada en la práctica clínica en combinación con el DAB. La hematoxilina actúa como colorante básico, por lo cual se asocia y colorea estructuras aniónicas identificando las estructuras finas del núcleo en colores de tono azul en el caso de la hematoxilina de Mayer's modificada, la cual contiene aluminio, lo que mejora el contraste entre el azul y el precipitado marrón del DAB para las IHQ. El único inconveniente es cuando hay colocalización del antígeno en el núcleo, situación en la que debe evitarse una tinción intensa con la hematoxilina. Posteriormente la laminilla es sumergida en una serie sucesiva de concentraciones ascendentes de etanol y por ultimo aclarada en xileno para ser montada en resina sintética con un cubreobjetos convencional para su observación y preservación (Adams, 1981) (Anexo 7.4).

b.6.1 Aspectos Técnicos de la IHQ enzimática.

La peroxidasa es una enzima presente de forma endógena en las muestras de tejido, para evitar que el sustrato la reconozca creando falsos positivos, por una tinción de fondo excesiva, debe realizarse el bloqueo de la peroxidasa endógena tisular antes de la inmunotinción. Existen varios métodos que permiten bloquearla como la fenilhidracina y azida sódica, pero el más comúnmente utilizado es el peróxido de hidrogeno al 3% en metanol. El bloque de uniones inespecíficas evita la tinción generada por interacciones iónicas e uniones hidrofóbicas. Se logra saturar estos lugares de unión mediante el tratamiento de la muestra con sustancias como el Tritón X-100, suero preinmune de especie donadora del Ab², albumina sérica bovina o el suero fetal bovino. Por último, es importante incluir controles positivos y negativos para cada anticuerpo del estudio. Los controles positivos consisten en la inmunotinción de tejidos en los que se conoce que existe una gran cantidad del Ag a identificar. Los negativos son las mismas secciones del tejido de estudio en las que se omite el Ab¹ y el resto de las etapas son idénticas (Johnson, 1999).

b.6.2 Interpretación y Evaluación de la Técnica IHQ.

En la IHQ se utiliza una tinción diferencial con HRP y DAB generando un color marrón en la ubicación del antígeno de interés. La cantidad de colorante depositado determinara entonces la densidad óptica a longitudes de onda específicas de acuerdo a la ley de Lambert-Beer, donde la densidad óptica es proporcional a la concentración del colorante (Ruifrok and Johnston, 2001). La evaluación precisa de los resultados y tal vez, su cuantificación es crítica. Hay

varios factores importantes que pueden afectar drásticamente el estado de expresión determinado por IHQ, incluyendo la fijación del tejido, la elección de los Ab y la determinación de los umbrales para la notificación de los resultados positivos. Lo adecuado es incluir un control interno positivo para la identificación de un caso negativo (Gown, 2008). El sistema de evaluación de la expresión determinada por IHQ mas utilizado es el sistema de puntaje histopatológico aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) de 0, 1+, 2+ y 3+ (Anexo 7.6) que fue desarrollado para el *HercepTest kit*, y a pesar de que es solo aplicable para la determinación de elegibilidad para la terapia con el Ab monoclonal humanizado trastuzumab en las pacientes con cáncer de mama, se ha adaptado para la evaluación de la mayoría de los anticuerpos usados en la IHQ (Gown, 2008), sin embargo también es común el uso de modificaciones de este sistema de puntuación para la evaluación de otras proteínas (Deyrup et al., 2004).

b.6.2.1 Cuantificación de las IHQ.

La anatomía patológica es por sí misma observacional, dependiente del reconocimiento de patrones, proceso en el cual hay elementos cuantitativos. Aún la simple interpretación de las tinciones de rutina en hematoxilina y eosina (H&E) incluye elementos de evaluación cuantitativa, aunque la mayoría a un nivel subconsciente, hechas subjetivamente, con la experiencia como punto de referencia (Taylor and Levenson, 2006). Una reacción IHQ tiene el potencial para proporcionar información cuantitativa, pues es un “inmunoensayo” realizado *in situ* en la sección de tejido. La tinción de IHQ es estrictamente análoga a una ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), prueba realizada en el laboratorio clínico y ampliamente reconocida como una técnica cuantitativa. Claro que es evidente que para realmente lograr un resultado cuantificable este tiene que ser un proceso totalmente estandarizado (Diaz and

Sneige, 2005; Grube, 2004; Seidal et al., 2001; Umemura et al., 2004). A la fecha, a falta de un proceso de estandarización total de la técnica IHQ, la cuantificación de Ag que de ella se genera es, a lo más, una semicuantificación. Al carecer de estándares de referencia internos para la calibración, todas las tinciones IHQ son en el mejor de los casos, solo semicuantitativas, comparando la intensidad de la tinción, o el número de las células positivas, o ambas, con el control, o con otros casos, con los resultados siendo relativos, nunca absolutos. (Taylor and Levenson, 2006). La falta de confiabilidad de los métodos IHQ para la medición de la expresión es atribuible a la naturaleza semicuantitativa del proceso de puntuación patológica y las deficiencias intrínsecas del método manual basado en la subjetividad de observador. La creencia subyacente es que, a pesar de que los criterios están claramente establecidos, la aplicación de tales criterios y los informes de los resultados pueden variar de patólogo a patólogo, o incluso por el mismo patólogo de un día a otro día. En este escenario el análisis de imagen asistido por computadora, denominado puntaje digital se promociona como una solución a la medición de las tinciones de IHQ, donde la cuantificación de los resultados es necesaria (Taylor and Levenson, 2006). De hecho se ha mostrado que bajo circunstancias controladas, el análisis de imágenes es superior a los métodos manuales realizados por la mayoría de los observadores y además podría ser la solución al problema de la interpretación, en especial los aspectos cuantitativos de evaluación ó de interpretación (Cross, 2001; Diaz and Sneige, 2005; Lehr et al., 2001; Umemura et al., 2004).

b.6.2.2 Análisis Digital para la Cuantificación de las IHQ.

La clave del proceso de análisis de imagen para el puntaje digital está en la separación de la señal total de un solo pixel, en las especies que lo componen.

Los algoritmos de separación (Farkas et al., 1998; Ruifrok and Johnston, 2001; Zhou et al., 1996) subyacen en que las señales están sumadas linealmente. Este es el caso con los colorantes fluorescentes (que emiten luz), pero esto no es así con los cromógenos de luz visible ya que absorben la luz. Afortunadamente la ley de Lambert-Beer sobre las concentraciones de absorbancia indica que cuando la transmisión de datos se convierte a unidades de densidad óptica (DO) (absorbancia) la linealidad es restaurada y se puede lograr con éxito la cuantificación y separación (Ruifrok and Johnston, 2001). Hay muchos beneficios concomitantes en la conversión a DO, que normalmente se realizan tomando el negativo (base 10) de la imagen transmitida, dividido por la iluminación (por lo general un área clara en el portaobjetos de microscopio). En primer lugar, los valores de absorbancia son una propiedad intrínseca de la muestra y no dependen de la iluminación ó de la cámara. Esto significa que la medición de la absorbancia de una muestra dada puede ser en teoría comparable. Segundo, en el proceso de crear la absorbancia de una imagen, el fondo es automáticamente anulado, removiendo los efectos de una iluminación no deseada o fallas en el tren óptico. Esta conversión a DO puede ser realizada en imágenes monocromáticas, RGB (*Red-Green-Blue*) ó multiespectrales (Taylor and Levenson, 2006).

b.6.2.3 Análisis Digital Mediante la Deconvolución de Colores

Para el análisis simultaneo de las características morfométricas y fotométricas de una o más estructuras, es necesaria la separación de la contribución relativa de cada uno de los colorantes en el espectro de absorción resultante. En el marco de las tinciones histológicas y citológicas, es difícilmente logrado que las áreas sean teñidas solamente con un color, por ello es indispensable un método de deconvolución de colores, capaz de usar la información de ancho banda de las cámaras digitales o análogas RGB de tres

canales. Este método separa prácticamente cualquier combinación de dos o tres colores, asumiendo que los colores son lo suficientemente diferentes en las características de absorción del rojo, verde o azul. Ya que la sensibilidad de las cámaras RGB iguala a la sensibilidad del sistema visual humano RGB significa que virtualmente cada grupo de 3 colores que puedan ser vistos como diferentes por el ojo también pueden ser separados por el método de deconvolución de colores, el cual está basado en una transformación ortonormal de la imagen RGB original, dependiendo de la información tomada de los tres colores definida por el usuario. El método proporciona la posibilidad de determinar la DO de la tinción, aun en áreas donde múltiples tinciones colocalizan, haciendo posible no solo determinar el área de superficie y la absorción total de las áreas para un color en específico, sino también la determinación de la DO y radios de las tinciones en cada área. Después de la deconvolución de colores las imágenes pueden ser reconstruidas para cada tinción, por separado y ser usadas para el análisis de DO. El análisis de imagen para la cuantificación de la tinción IHQ tiene ventajas con respecto a otros ensayos bioquímicos y la citometría de flujo en que la información concerniente a la relación entre la morfología u los organelos de la célula o la proteína en estudio se mantiene. Además el análisis automático es más rápido, más objetivo y menos laborioso que la examinación visual (Ruifrok and Johnston, 2001). Por si fueran poco la IHQ sigue siendo la técnica preferida por los patólogos para quienes es imprescindible la integración de las características fenotípicas de la tinción IHQ con las características morfológicas tradicionales, las cuales siguen siendo el patrón de oro para el diagnóstico (Taylor and Levenson, 2006).

El puntaje digital de las IHQ es posible gracias al *software NIH Image* al cual se le adaptó un algoritmo denominado *Color deconvolution* el cual permite una separación y una cuantificación de la IHQ, mediante el análisis de las imágenes tomadas con cámaras de absorción RGB. Este algoritmo ha sido utilizado con

diferentes combinaciones de DAB y H&E a diferentes niveles de tinción, probando ser un método robusto y flexible (Ruifrok and Johnston, 2001) (Anexo 7.10).

Además, dado que la intensidad de la IHQ en una sección es proporcional a la cantidad de Ag en la sección, el contenido de Ag en dicha sección se puede medir por este método (Dobado-Berrios et al., 1992; Nibbering and van Furth, 1987; Watanabe et al., 1991) lo cual fue probado al encontrarse una relación lineal positiva significativa ($r = 0.97-0.99$) entre la intensidad de la inmunotinción y la concentración del Ag, detectándose cambios en el contenido de Ag de hasta el 10%. Sugiriéndose que el método es confiable y sensible para detectar cambios en el contenido de Ag en los tejidos y por tanto adecuado para el análisis cuantitativo de las IHQ con reacción enzimática de color, especialmente aquellas con DAB (Huang et al., 1996).

c. JUSTIFICACIÓN

México posee una prevalencia de obesidad y sobrepeso combinada del 72% en las mujeres adultas. Condición que incrementa el riesgo de desarrollar CE ya que a la obesidad se le atribuyen hasta el 60% de los casos diagnosticados. El CE representa la quinta causa de muerte por cáncer en las mujeres mexicanas y con el incremento esperado en el número y porcentaje de personas con obesidad y sobrepeso también se espera el consecuente aumento de los casos de CE.

El CE fue el primer cáncer en ser relacionado a la obesidad y los niveles de leptina en sangre se asocian con su desarrollo. Sin embargo los estudios realizados hasta al momento por IHQ de tejidos de CEE no han sido concluyentes al fundamentar esta asociación a través de la expresión de Ob-R, situación que si se ha conseguido con otras neoplasias en donde el R.R. es mayor en las pacientes con obesidad, como en el cáncer de ovario; en donde se encontró una relación directa entre la obesidad y la carcinogénesis mediada por la proteína Ob-R.

Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue cuantificar la expresión del receptor del gen de la obesidad, detectado mediante IHQ e interpretado con puntaje digital para analizar con mayor sensibilidad los cambios en su contenido, con la finalidad de establecer una relación más sólida entre la obesidad y el desarrollo de CE, esto mediante el uso de IHQ; la cual es la técnica más utilizada en la práctica diagnóstica del cáncer.

d. HIPÓTESIS

La expresión del receptor del producto del gen de la obesidad (Ob-R) determinada con inmunohistoquímica disminuye en el tejido de cáncer de endometrio en comparación al tejido de endometrio histológicamente normal.

e. OBJETIVO GENERAL

Determinar la disminución en la expresión del receptor del producto del gen de la obesidad (Ob-R) mediante inmunohistoquímica en tejido de cáncer de endometrio en comparación al tejido de endometrio histológicamente normal.

f. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la expresión inmunohistoquímica del receptor del producto del gen de la obesidad (Ob-R) en dos grupos de tejido de endometrio histológicamente normal (uno de pacientes sin antecedentes personales de cáncer y otro de pacientes diagnosticadas con cáncer de ovario) y en un grupo de tejido de cáncer de endometrio de tipo endometriode.
2. Interpretar la expresión inmunohistoquímica del receptor del producto del gen de la obesidad (Ob-R) en los tres grupos de tejido de endometrio mediante el puntaje histopatológico y mediante el puntaje digital.
3. Analizar si existen diferencias significativas en la expresión del receptor del producto del gen de la obesidad (Ob-R) en los tres grupos de tejido de endometrio estudiados mediante ambos métodos de puntaje utilizados.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

a. Diseño de Estudio

Este trabajo de investigación es un estudio retrospectivo de corte transversal en el área de conocimiento de Investigación Biomédica.

a.1 Definición del universo

Las muestras para el presente estudio se obtuvieron a partir de la colección de bloques con tejido de endometrio embebido en parafina, de los Departamentos de Anatomía Patológica de la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) - Hospital de Especialidades No. 25 y de la UMAE-Hospital de Ginecología y Obstetricia No.23, ambos hospitales del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en Monterrey, Nuevo León, México. Las muestras de tejido embebido en parafina de endometrio histológicamente normal [uno de pacientes sin antecedentes personales de cáncer (EN) y otro de pacientes diagnosticadas con cáncer de ovario (ENC)] y de tejido de cáncer de endometrio de tipo endometriode (CEE) fueron provenientes de la cirugía de las pacientes quienes pasaron por el procedimiento de biopsia o histerectomía por prescripción médica.

a.2 Tamaño de la Muestra

El muestreo fue por conveniencia de los casos archivados durante el periodo 2004-2009 que cumplieron con los criterios de inclusión, resultando un total de 40 pacientes en los tres grupos estudiados.

a.3 Definición de las unidades de observación

Tejido endometrial de una sección extraída al momento de biopsia o cirugía fijado en formalina al 4% y embebido en parafina. En él se evaluó la expresión de Ob-R por IHQ mediante el puntaje histopatológico y digital.

a.4 Definición del grupo control

Se selecciono tejido de endometrio histológicamente normal (EN y ENC) embebido en parafina. Como control interno en la IHQ se proceso tejido de un caso diagnosticado con cáncer de mama y como control negativo interno el mismo tejido pero en ausencia de Ab¹ en cada una de las determinaciones realizadas.

a.5 Criterios de inclusión

Se incluyo tejido de endometrio embebido en parafina de pacientes femeninas atendidas durante el periodo 2004-2009 en las UMAE-IMSS. Se incluyeron dos tipos de pacientes para los dos grupos control de endometrio con histología normal, para el primero se selecciono un grupo de pacientes sin patología en endometrio y sin ningún diagnostico de cáncer. Para el segundo grupo control se selecciono un grupo de pacientes sin patología en endometrio pero con diagnostico de cáncer de ovario, de este grupo la pieza de estudio fue el endometrio histológicamente normal. Las pacientes cuyo diagnostico de cáncer de endometrio correspondió al tipo CEE fueron incluidas en el grupo de cáncer de endometrio y el diagnóstico fue confirmado por dos patólogos expertos. Las muestras de tejido endometrial embebidas en parafina son provenientes de la cirugía de las pacientes quienes pasaron por el procedimiento de biopsia o histerectomía. Todos los casos incluidos cumplieron con tener una pieza de tejido embebida en parafina en buenas condiciones y contaban con una lamina de H&E para su revisión.

a.6 Criterios de exclusión

Se excluyeron pacientes con tratamiento médico previo a la cirugía (radio/quimioterapia), los casos en los que el diagnóstico histopatológico reportado en el expediente no estuvo acorde con la revisión de tejido, los especímenes que presentaban reacción estromal marcada (desmoplasia) y/o necrosis tumoral. De los pacientes diagnosticados con cáncer endometrial se

excluyeron los casos diagnosticados con carcinomas tipo seroso, de células claras, mucinosos, escamosos, tipos mixtos e indiferenciados.

a.7 Criterios de eliminación

Se eliminaron especímenes con pérdida del tejido durante el procedimiento, muestras cuyos controles presenten reacción inespecífica o fondo que dificulte la resolución de la tinción o la digitalización de la IHQ.

a.8 Operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de Variable	Escala de Medida
Expresión de Ob-R por IHQ	La IHQ es un método de localización de antígenos específicos en los tejidos, se basa en el reconocimiento del anticuerpo y su posterior identificación por microscopía de luz.	Puntaje histopatológico: 0 :Inmunotinción negativa 1+: Menos del 25% de las células expresan 2+: Del 25 al 50% de las células expresan 3+: Mas del 50% de las células expresan	Categórica	Ordinal
		Puntaje Digital: Mediana de la DO de la tinción, un valor entre 0 (negro) a 255 (blanco).	Cuantitativa	Razón

a.9 Procedimientos

Para obtener las muestras (tejido embebido en parafina), se consulto la base de datos de los Departamentos de Anatomía Patológica de las UMAE No.25 y No.23 ambas del IMSS en Monterrey, Nuevo León, México. Se realizó una solicitud de autorización para obtener diagnósticos de cada una de las muestras y posteriormente fueron captados los bloques correspondientes a los grupos de estudio incluidos, mencionados anteriormente.

a.9.1 Diagnóstico histopatológico

Todas las laminillas originales teñidas con H&E fueron revisadas por dos patólogos para confirmar que el tejido de endometrio estuviera carente de patología para los casos de los controles y en el caso del grupo de cáncer de endometrio para confirmar el diagnóstico del tipo histológico endometriode. Asimismo se selecciono un bloque con una sección de tejido representativa del diagnóstico para el estudio por IHQ de Ob-R.

a.9.2 Técnica IHQ

Para cada experimento el orden de las muestras fue elegido al azar de cada uno de los grupos. Se cortaron secciones de 4 μ m de muestras de tejido de endometrio fijadas en formalina amortiguada al 4% embebidas en parafina y se colocaron en laminillas silanizadas (S3002, Dako). Posteriormente se sumergieron en Xilol por 10 min dos veces, fueron hidratadas en una serie descendente de etanol y después se lavaron con agua destilada. La recuperación de antígeno fue mediante calor, sometiéndolas a 20 min a 96°C en la solución recuperadora (TRS S1699, Dako). Posteriormente las laminillas reposaron a temperatura ambiente por 20 min. Tras lo cual fueron lavadas en buffer de lavado (TBS S1968, Dako) por 5 min. Seguidos del bloqueo de la peroxidasa endógena con el reactivo correspondiente (Peroxidase blocking reagent S2001, Dako) por 15min, seguidos de la solución (X0909, Dako) como bloqueador de proteína. Las secciones de tejido fueron incubadas 20hrs a 4°C en una cámara húmeda con el Ab¹ anti Ob-R (sc-80255 Santa Cruz Biotechnology) en diluyente (1:150) de Ab (S3022, Dako). Como control negativo el Ab¹ se remplazo con 1% de albúmina de suero fetal bovino en PBS para descartar el efecto de la peróxidasa endógena. El Ab² utilizado fue el universal biotinilado (K0690, Dako) y se incubo por 15 min, después de un nuevo lavado de 5 min las laminillas se incuban con el complejo estreptavidina-HRP (K0690, Dako) por 30 min a temperatura ambiente. La reactividad específica fue revelada con una incubación con DAB (K3468, Dako) por 10min.

Posteriormente se incremento la intensidad del DAB con CuSo_4 al 0.5% con una incubación de 2 min. Las laminillas fueron contrastadas con hematoxilina (S3309, Dako) por 1min seguido de un paso deshidratación en serie de etanol y aclaradas en xilol para finalmente montarse con resina (Entellan HX787224, Merck).

a.9.3. Interpretación de Técnica IHQ

El puntaje histopatológico de los resultados de Ob-R fue llevada a cabo por análisis a doble ciego, ya que a los patólogos no se les proporcionó datos del paciente ni características del tejido. El criterio de puntaje de la inmunoreactividad fue: 0 para una inmunotinción negativa, 1+ cuando menos del 25% de las células expresan, 2+ cuando del 25 al 50% las células expresan y 3+, cuando más del 50% de las células expresan.

Para la obtención del puntaje digital todas las laminillas fueron visualizadas con un aumento de 320x en un microscopio Olympus Bx41 y las imágenes fueron capturadas una cámara Nikon modelo D40 adaptada al microscopio mediante un fototubo de 10x Carl Zeiss. El formato de imagen digitalizada obtenida fue jpg color RGB con una profundidad de 24 bits y una resolución de 3008x2000. Con el uso del software *ImageJ-v1.45p (Image Processing and Analysis in Java)* fue ajustada la iluminación del fondo mediante el algoritmo *Rolling Ball* posteriormente se extrajeron las regiones de interés (ROI) de estas imágenes, en general del componente glandular de cada una de las laminillas. Finalmente se utilizo el algoritmo de deconvolucion de colores para separar la contribución de los colorantes DAB y hematoxilina, de la cual, la imagen obtenida del DAB fue la analizada para obtener la mediana de la DO (MDO) el cual es un valor en el rango de 0 a 255.

a.9.4 Prueba Piloto

La prueba piloto fue realizada previamente a la elaboración de los casos, con la finalidad de estandarizar el Ab¹ anti Ob-R (sc-80255 Santa Cruz

Biotechnology) lo cual involucra la obtención de las condiciones ideales de dilución, temperatura, tiempo de incubación, recuperación del Ag, selección del pH de la solución TRS, tiempo de contratinción, así como el tipo y tiempo de las sales para incrementar la intensidad del DAB. También incluyo la selección de un tejido de carcinoma de mama como control positivo y negativo para su uso como testigo en cada una de las corridas IHQ. Para obtener reproducibilidad y confiabilidad en los resultados.

a.9.5 Análisis Estadístico

Los resultados de la expresión IHQ fueron procesados de dos maneras; al puntaje histopatológico se le realizo una prueba exacta de Fisher, mientras que al resultado del puntaje digital se le aplico una prueba de Levene, un análisis de varianza y una prueba de Student-Newman-Keuls. El análisis estadístico fue realizado usando el SPSS V.13 y se considero significativo un valor de $P < 0.05$.

3. RESULTADOS

a. Puntaje Histopatológico

La expresión del receptor del producto del gen de la obesidad (Ob-R) en el tejido endometrial (n=40) fue localizada en la membrana celular del epitelio glandular del endometrio en forma de gránulos finos en el citoplasma de las glándulas normales y cancerosas, presentando reactividad nuclear ocasional.

En el grupo de tejidos EN (n=16) el 56% tuvieron una inmunotinción negativa (Fig 1D) mientras que el 44% restante tuvieron un puntaje de 1+ (Fig 1A), en estas últimas la reacción fue principalmente en el citoplasma de las glándulas y epitelio superficial. En el grupo de tejidos de ENC (n=13) el 23% tuvieron una inmunotinción negativa, el 69% mostraron un puntaje de 1+ y el 8% de 2+ (Fig 1B) su reacción también ocurrió principalmente en el citoplasma del epitelio glandular y superficial, aunque presentó reactividad nuclear y en el estroma. El grupo de tejidos de CEE (n=11) el 36% mostro una inmunotinción negativa, en el 55% de los casos se detecto un puntaje de 1+ (Fig 1C) y en el 9% uno de 2+, esta reactividad también fue principalmente en el citoplasma del componente glandular, con un patrón apical, además mostro algunos núcleos con reacción. La puntuación patológica de cada uno de los tejidos estudiados se muestra en la tabla 1.

b. Puntaje Digital

Para la obtención de los datos de la MDO las laminillas se digitalizaron con un aumento de 320x en formato jpg color RGB con una profundidad de 24 bits. Posteriormente con el uso del software *ImageJ-v1.45p* y los algoritmos *Rolling Ball* y *Color deconvolution* se obtuvo el valor de la mediana de cada una de las regiones de interés (ROI) las cuales fueron el componente glandular de los

endometrios analizados. La MDO de cada una de las muestras analizadas por grupo se muestra en la tabla 1. El grupo que mostro la menor MDO fue el ENC (n=13) con una media de 189.31 seguido del CEE (n=11) con 212.82 y por último el EN (n=16) con 212.69. (Tabla 1).

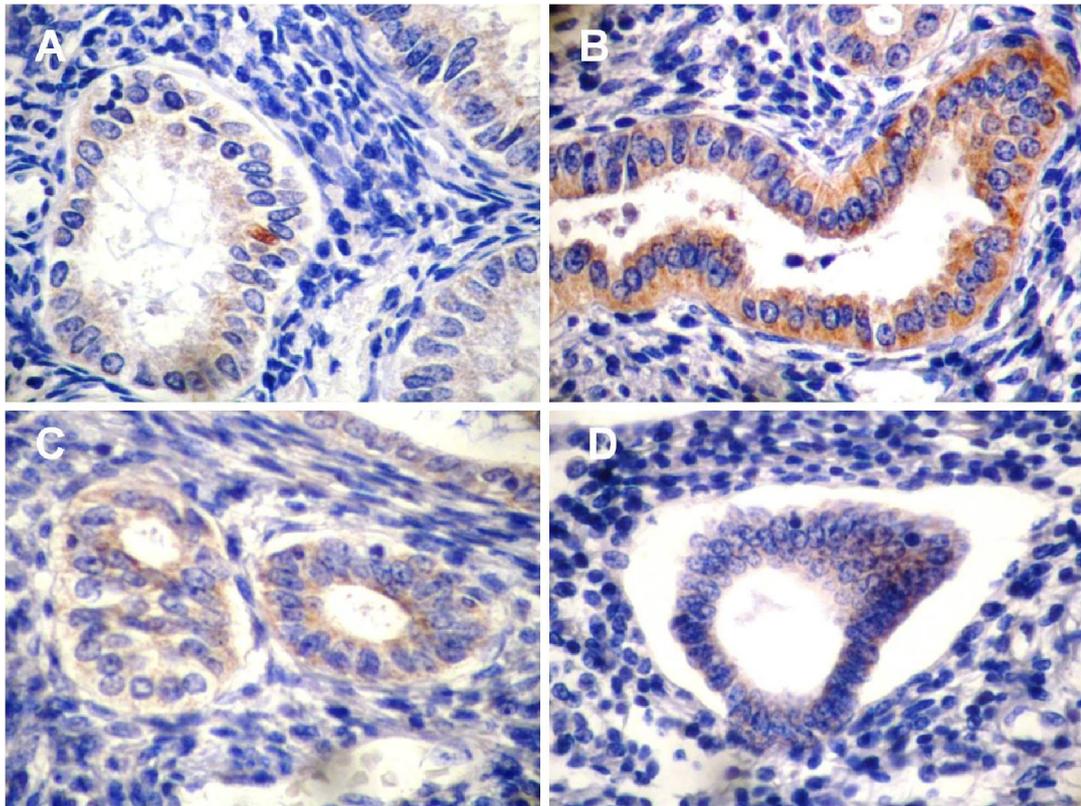


Figura 1. Inmunotinción positiva representativa de la proteína Ob-R mediante IHQ en A) Tejido EN; B) Tejido ENC; C) Tejido CEE. Inmunotinción negativa representativa D) Tejido EN. Aumento original x320.

c. Comparación de la expresión de Ob-R

El análisis estadístico de la expresión de Ob-R en los 3 grupos de endometrio estudiados revelo que mediante el puntaje histopatológico no se

encontraron diferencias significativas en la expresión de la proteína entre los grupos (prueba exacta de Fisher $P=4.447$). Sin embargo el análisis de los datos obtenidos mediante el puntaje digital, determino que el grupo ENC si tuvo una expresión significativamente mayor de la proteína en comparación con los otros dos grupos de estudio (ANOVA y prueba de Student-Newman-Keuls $P=0.000$). (Tabla 2 y Grafica 1).

Tabla 1. Puntaje de los tejidos de endometrio estudiados (n=40)

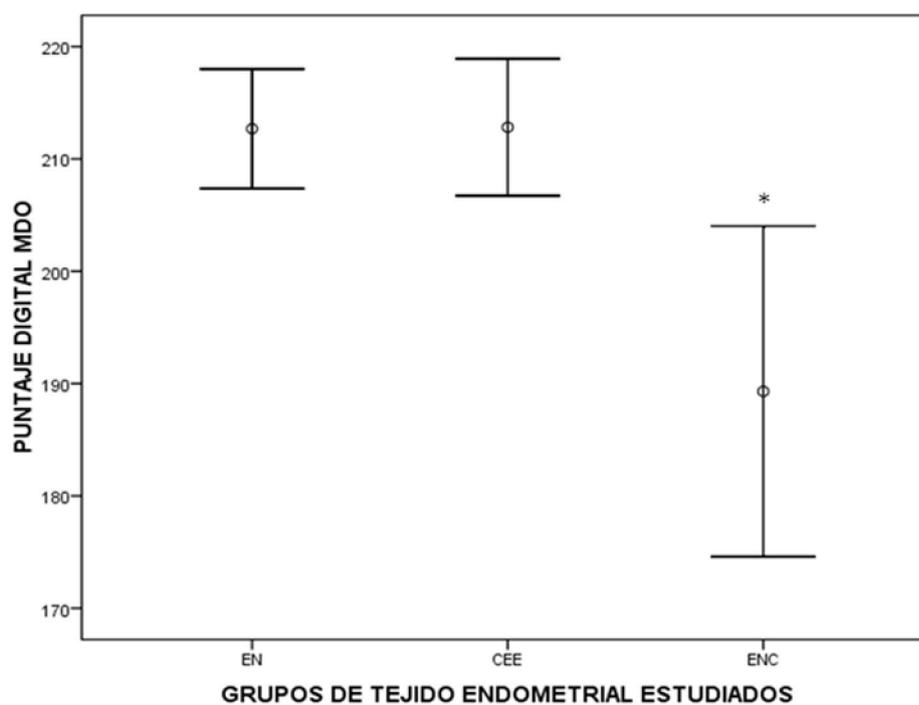
EN (n=16)		ENC (n=13)		CEE (n=11)	
PP	MDO	PP	MDO	PP	MDO
+	204	-	215	-	227
-	202	+	161	++	208
-	210	+	213	+	203
+	210	+	206	+	213
-	225	+	171	+	211
-	230	+	189	-	221
-	211	+	204	+	197
+	208	-	203	+	213
+	202	+	182	+	206
-	222	-	215	-	220
+	211	+	195	-	222
+	219	+	173		
-	200	++	134		
-	229				
-	218				
+	202				

PP; Puntaje Histopatológico, MDO; Mediana de la densidad óptica.

Tabla 2. Comparación de la expresión de Ob-R en los 3 grupos estudiados (n=40)

Tejido	Puntaje Histopatológico				χ^2	Puntaje Digital XMDO \pm DE (0-250)	P
	0	1+	2+	3+			
EN (n=16)	9 (56%)	7 (44%)	0 (0)	0 (0)	4.447 ^a	212.69 \pm 9.978	0.000 ^b
ENC (n=13)	3 (23%)	9 (69%)	1 (8%)	0 (0)		189.31 \pm 24.343*	
CEE (n=11)	4 (36%)	6 (55%)	1 (9%)	0 (0)		212.82 \pm 9.075	

MDO, Mediana de densidad óptica, EN, Endometrio sin patología endometrial, ENC, Endometrio sin patología con diagnóstico de cáncer de ovario, CEE, endometrio diagnosticado con Carcinoma Endometrial Endometrioides; ^a valor de P de prueba exacta de Fisher, ^b valor de P de ANOVA, P Se considero significativo un valor de $P < 0.05$; *Estadísticamente significativa mediante ANOVA, X, media.

**Grafica 1.** Comparación de la expresión de Ob-R obtenida mediante puntaje digital en los 3 grupos de endometrio estudiados (n=40). Se muestran las medias, los valores máximos y mínimos. * P , 0.000.

4. DISCUSION

Este trabajo se enfocó a la búsqueda de la expresión del receptor del gen de la obesidad (Ob-R) en tejido de endometrio (n=40). Nosotros encontramos que la expresión Ob-R detectada mediante IHQ se localiza principalmente en la membrana celular del epitelio glandular del endometrio en forma de gránulos finos en el citoplasma, lo cual concuerda con los cuatro estudios realizados con anterioridad (Bogusiewicz et al., 2006; Koda et al., 2007; Wincewicz et al., 2008; Yuan et al., 2004), sin embargo también detectamos reactividad nuclear ocasional, de lo que solo hay un reporte previo en tejidos de endometrio (Koda et al., 2007). Un nuevo hallazgo de este estudio fue la inmunoreactividad en el estroma de los tejidos del grupo ENC, lo cual no había sido reportado antes. De las muestras de tejido sin patología endometrial analizadas el 40% de los tejidos fueron negativos y el 60% positivos, contrastando estos resultados con un trabajo previo en el cual el 100% (n=25) de las muestras de tejido histológicamente normal de endometrio fueron negativas (Koda et al., 2007), lo que podría ser en parte explicado a que se utilizaron tejidos en etapa proliferativa del ciclo menstrual media a tardía, ya que fue reportado que la expresión de Ob-R (mediante PCR-TR) no está en sus niveles máximos en esta etapa del ciclo menstrual, sino que los alcanza hasta la etapa secretora temprana (Kitawaki et al., 2000) después de la cual disminuyen de nuevo por la acción de la progesterona (Koshiba et al., 2001).

En lo que respecta a los tejidos del grupo de CEE el 64% (n=11) mostro una reactividad positiva, lo que es un poco más alto que previas investigaciones en donde fue reportado positivo en el 31%(n=48) (Wincewicz et al., 2008) y 47% (n=45) (Bogusiewicz et al., 2006) de los tumores endometrioides analizados. La comparación de la expresión entre los grupos tomando en cuenta los datos obtenidos por el puntaje histopatológico no mostro diferencias significativas en

la expresión, sin embargo con el uso de los datos obtenidos mediante el puntaje digital se encontró que el grupo ENC tuvo una expresión significativamente mayor ($P=0.000$) de la proteína Ob-R en comparación con los otros dos grupos de estudio.

Lo anterior concuerda con las ventajas reportadas previamente de la digitalización de las imágenes de las IHQ para su cuantificación sobre el puntaje histopatológico. Tal como la eliminación de la naturaleza semicuantitativa del proceso de evaluación o medición del puntaje histopatológico, basado en la subjetividad del observador (Taylor and Levenson, 2006). Asimismo en estudios de comparación se mostro que el análisis de imágenes es superior al puntaje histopatológico y es una solución al problema de la interpretación, en especial de los aspectos cuantitativos de evaluación o interpretación (Cross, 2001; Diaz and Sneige, 2005; Lehr et al., 2001; Umemura et al., 2004).

En este trabajo utilizamos el *software NIH Image*, para obtener el puntaje digital se le adapto un algoritmo denominado *Color deconvolution*, que se ha demostrado como un método robusto y flexible para la cuantificación de las IHQ (Ruifrok and Johnston, 2001). Incluso es posible detectar cambios de solo el 10% en el contenido de Ag, lo que hace del puntaje digital un análisis confiable y sensible para detectar cambios en el contenido de Ag en los tejidos y por lo tanto más adecuado para el análisis cuantitativo de las IHQ especialmente aquellas con DAB (Huang et al., 1996).

La leptina se asocia con el desarrollo y progresión de diversos tipos de cáncer en muchos epitelios, incluido el de ovario (Ogunwobi and Beales, 2007; Saxena et al., 2007). El hecho de que haya sido el grupo ENC quien mostrase mayor expresión de la proteína Ob-R podría ser explicado por datos reportados recientemente en los cuales se establece una relación directa mediada por la proteína Ob-R entre la obesidad y la carcinogénesis en el cáncer de ovario ya

que mediante IHQ detectaron que el 60% de los casos de cáncer de ovario expresaron Ob-R, registrando una supervivencia libre de enfermedad más baja en aquellos pacientes cuyos tumores tenían mayor expresión de esta proteína. Además de que la sobreexpresión de Ob-R fue una variable independiente de mal pronóstico y los experimentos realizados en líneas celulares de cáncer de ovario demostraron que la leptina tiene un efecto oncogénico, causando activación de la proliferación e inhibición de la apoptosis (Uddin et al., 2009b). Con nuestro hallazgo se reafirma el impacto de la obesidad en el desarrollo del cáncer de ovario mediante cambios en la expresión de Ob-R.

Cabe mencionar que en nuestro estudio no se logró obtener diferencia significativa entre el tejido histológicamente normal de endometrio y el grupo de carcinoma endometrial endometriode así como en estudios anteriores, lo cual podría ser por la falta en selección de un buen control. Ya que la expresión de Ob-R es altamente regulada durante el ciclo menstrual y se sabe que el punto más alto de expresión determinado por PCR-TR se presenta en la fase secretora temprana y comienzan a descender conforme el endometrio se acerca a la fase de endometrio menstrual (Kitawaki et al., 2000). Por lo tanto para posteriores análisis es necesario contar con un control de endometrio que incluya muestras de cada una de las etapas del ciclo menstrual. De los tejidos con histología endometrial normal utilizados en el presente estudio como controles (EN y ENC=29), 22 estuvieron diagnosticados como endometrios atróficos, 4 estaban en etapa proliferativa y 3 en etapa secretora, mientras que en un estudio previo fueron utilizados como control tejidos (n=25) con histología endometrial normal en fase proliferativa media a tardía y en todos se encontró una inmunotinción negativa (Koda et al., 2007).

Los estudios previos con IHQ que reportan el criterio de puntaje histopatológico no alcanzaron expresiones de Ob-R mayores a 1+ en el 30% (18) de los tejidos de carcinoma endometrial estudiados (n=60) (Koda et al., 2007), lo cual hace más difícil el análisis estadístico, además en ninguna de los

anteriores estudios se utilizó el puntaje digital, el cual, como fue mencionado antes, es más adecuado para el análisis cuantitativo de las IHQ (Huang et al., 1996). Por otro lado, en este mismo estudio no se analizó solamente carcinomas de tipo endometriode, lo cual es de remarcar ya que solamente es este tipo histológico de CE el que está relacionado con la obesidad (Bokhman, 1983; Deligdisch and Holinka, 1987). Las pacientes que sufren carcinomas de endometrio tipo II son generalmente más delgadas que sus contrapartes tipo I y se cree que sus tumores están influenciados por factores no estrogénicos (Salvesen et al., 1998). Es posible que la ausencia de cambios en la expresión reportada sea a causa de falta de criterio en la selección del subtipo histológico, ya que en la obesidad solo incrementa el R.R. de carcinomas con un subtipo histológico definido (Calle and Kaaks, 2004).

5. CONCLUSIONES

La expresión del receptor del gen de la obesidad (Ob-R) en el tejido endometrial se localiza principalmente en el epitelio glandular del endometrio en forma de gránulos finos en citoplasma, con reactividad nuclear ocasional.

En el caso de los tejidos del grupo ENC la expresión de Ob-R también se observó en el estroma.

Al ser el puntaje digital un método más sensible, logro identificar que el tejido ENC expresaba una cantidad significativamente mayor de proteína Ob-R, mientras que con el puntaje histopatológico no fue posible establecer dicha diferencia.

En este estudio no encontramos diferencias en la expresión de Ob-R en tejido de EN en comparación a tejido CEE, sin embargo se logro identificar que la expresión de Ob-R en tejido ENC es mayor que en los otros dos tejidos de endometrio estudiados, reafirmando el posible rol de esta proteína en la carcinogénesis del cáncer de ovario en las pacientes con obesidad.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeler VM, Kjorstad KE. 1992. Endometrial adenocarcinoma with squamous cell differentiation. *Cancer* 69:488-495.
- Adams JC. 1981. Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction product. *J Histochem Cytochem* 29:775.
- Adams JC. 1992. Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem* 40:1457-1463.
- Alektiar KM, McKee A, Lin O, Venkatraman E, Zelefsky MJ, Mychalczak BR, McKee B, Hoskins WJ, Barakat RR. 2002. The significance of the amount of myometrial invasion in patients with Stage IB endometrial carcinoma. *Cancer* 95:316-321.
- Ames BN, Shigenaga MK, Gold LS. 1993. DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 101 Suppl 5:35-44.
- Armstrong B, Doll R. 1975. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer* 15:617-631.
- Ashizawa N, Yahata T, Quan J, Adachi S, Yoshihara K, Tanaka K. 2010. Serum leptin-adiponectin ratio and endometrial cancer risk in postmenopausal female subjects. *Gynecol Oncol* 119:65-69.
- Austin H, Austin JM, Jr., Partridge EE, Hatch KD, Shingleton HM. 1991. Endometrial cancer, obesity, and body fat distribution. *Cancer Res* 51:568-572.
- Auwerx J, Staels B. 1998. Leptin. *Lancet* 351:737-742.
- Baratta M. 2002. Leptin--from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues. *Med Sci Monit* 8:RA282-292.
- Bergstrom A, Pisani P, Tenet V, Wolk A, Adami HO. 2001. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *Int J Cancer* 91:421-430.
- Bogusiewicz M, Semczuk A, Gogacz M, Skomra D, Jakowicki JA, Rechberger T. 2006. Lack of correlation between leptin receptor expression and PI3-K/Akt signaling pathway proteins immunostaining in endometrioid-type endometrial carcinomas. *Cancer Lett* 238:61-68.

- Bokhman JV. 1983. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 15:10-17.
- Bornstein SR, Abu-Asab M, Glasow A, Path G, Hauner H, Tsokos M, Chrousos GP, Scherbaum WA. 2000. Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes* 49:532-538.
- Boronow RC, Morrow CP, Creasman WT, Disaia PJ, Silverberg SG, Miller A, Blessing JA. 1984. Surgical staging in endometrial cancer: clinical-pathologic findings of a prospective study. *Obstet Gynecol* 63:825-832.
- Bray F, Dos Santos Silva I, Moller H, Weiderpass E. 2005. Endometrial cancer incidence trends in Europe: underlying determinants and prospects for prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:1132-1142.
- Calle EE, Kaaks R. 2004. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 4:579-591.
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. 2003. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 348:1625-1638.
- Cioffi JA, Van Blerkom J, Antczak M, Shafer A, Wittmer S, Snodgrass HR. 1997. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod* 3:467-472.
- Cohen SM, Ellwein LB. 1991. Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. *Cancer Res* 51:6493-6505.
- Coleman MP, Esteve J, Damiacki P, Arslan A, Renard H. 1993. Trends in cancer incidence and mortality. *IARC Sci Publ*:1-806.
- Collins J, Donner A, Allen LH, Adams O. 1980. Oestrogen use and survival in endometrial cancer. *Lancet* 2:961-964.
- Cook KS, Min HY, Johnson D, Chaplinsky RJ, Flier JS, Hunt CR, Spiegelman BM. 1987. Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science* 237:402-405.
- Cory S, Vaux DL, Strasser A, Harris AW, Adams JM. 1999. Insights from Bcl-2 and Myc: malignancy involves abrogation of apoptosis as well as sustained proliferation. *Cancer Res* 59:1685s-1692s.
- Creasman WT, Morrow CP, Bundy BN, Homesley HD, Graham JE, Heller PB. 1987.

- Surgical pathologic spread patterns of endometrial cancer. A Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer* 60:2035-2041.
- Cross SS. 2001. Observer accuracy in estimating proportions in images: implications for the semiquantitative assessment of staining reactions and a proposal for a new system. *J Clin Pathol* 54:385-390.
- Cymbaluk A, Chudecka-Glaz A, Rzepka-Gorska I. 2008. Leptin levels in serum depending on Body Mass Index in patients with endometrial hyperplasia and cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 136:74-77.
- Deligdisch L, Holinka CF. 1987. Endometrial carcinoma: two diseases? *Cancer Detect Prev* 10:237-246.
- Deyrup AT, Tretiakova M, Khramtsov A, Montag AG. 2004. Estrogen receptor beta expression in vascular neoplasia: an analysis of 53 benign and malignant cases. *Mod Pathol* 17:1372-1377.
- Diaz LK, Sneige N. 2005. Estrogen receptor analysis for breast cancer: current issues and keys to increasing testing accuracy. *Adv Anat Pathol* 12:10-19.
- Dobado-Berrios PM, Ruiz-Navarro A, Torronteras R, Gracia-Navarro F. 1992. Application of an optimized immunostaining technique to evaluate the heterogeneous secretory response from porcine somatotropes by cell blotting. *J Histochem Cytochem* 40:1715-1724.
- Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, Wyllie AH, Sharp L, Burn J, Liu B, Kinzler KW, Vogelstein B. 1997. Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol Genet* 6:105-110.
- Dunn JE. 1975. Cancer epidemiology in populations of the United States--with emphasis on Hawaii and California--and Japan. *Cancer Res* 35:3240-3245.
- Fairfield KM, Willett WC, Rosner BA, Manson JE, Speizer FE, Hankinson SE. 2002. Obesity, weight gain, and ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 100:288-296.
- Farkas DL, Du C, Fisher GW, Lau C, Niu W, Wachman ES, Levenson RM. 1998. Non-invasive image acquisition and advanced processing in optical bioimaging. *Comput Med Imaging Graph* 22:89-102.
- Faust IM, Miller WH, Jr., Sclafani A, Aravich PF, Triscari J, Sullivan AC. 1984. Diet-dependent hyperplastic growth of adipose tissue in hypothalamic obese rats. *Am J Physiol* 247:R1038-1046.

- Flier JS, Cook KS, Usher P, Spiegelman BM. 1987. Severely impaired adiponin expression in genetic and acquired obesity. *Science* 237:405-408.
- Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. 1997. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88:435-437.
- Gao J, Tian J, Lv Y, Shi F, Kong F, Shi H, Zhao L. 2009. Leptin induces functional activation of cyclooxygenase-2 through JAK2/STAT3, MAPK/ERK, and PI3K/AKT pathways in human endometrial cancer cells. *Cancer Sci* 100:389-395.
- Garofalo C, Surmacz E. 2006. Leptin and cancer. *J Cell Physiol* 207:12-22.
- Gates EJ, Hirschfield L, Matthews RP, Yap OW. 2006. Body mass index as a prognostic factor in endometrioid adenocarcinoma of the endometrium. *J Natl Med Assoc* 98:1814-1822.
- Gonzalez RR, Caballero-Campo P, Jasper M, Mercader A, Devoto L, Pellicer A, Simon C. 2000. Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4883-4888.
- Gown AM. 2008. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol* 21 Suppl 2:S8-S15.
- Grady D, Gebretsadik T, Kerlikowske K, Ernster V, Petitti D. 1995. Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 85:304-313.
- Green ED, Maffei M, Braden VV, Proenca R, DeSilva U, Zhang Y, Chua SC, Jr., Leibel RL, Weissenbach J, Friedman JM. 1995. The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. *Genome Res* 5:5-12.
- Greisen S, Ledet T, Moller N, Jorgensen JO, Christiansen JS, Petersen K, Ovesen P. 2000. Effects of leptin on basal and FSH stimulated steroidogenesis in human granulosa luteal cells. *Acta Obstet Gynecol Scand* 79:931-935.
- Grube D. 2004. Constants and variables in immunohistochemistry. *Arch Histol Cytol* 67:115-134.
- Gruber SB, Thompson WD. 1996. A population-based study of endometrial cancer and familial risk in younger women. Cancer and Steroid Hormone Study Group. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5:411-417.

- Guilmeau S, Buyse M, Bado A. 2004. Gastric leptin: a new manager of gastrointestinal function. *Curr Opin Pharmacol* 4:561-566.
- Haenszel W, Kurihara M. 1968. Studies of Japanese migrants. I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *J Natl Cancer Inst* 40:43-68.
- Hamann A, Matthaei S. 1996. Regulation of energy balance by leptin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104:293-300.
- Henson MC, Swan KF, O'Neil JS. 1998. Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstet Gynecol* 92:1020-1028.
- Hill HA, Austin H. 1996. Nutrition and endometrial cancer. *Cancer Causes Control* 7:19-32.
- Hsu SM, Soban E. 1982. Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 30:1079-1082.
- Huang L, Li C. 2000. Leptin: a multifunctional hormone. *Cell Res* 10:81-92.
- Huang X, Chen S, Tietz EI. 1996. Immunocytochemical detection of regional protein changes in rat brain sections using computer-assisted image analysis. *J Histochem Cytochem* 44:981-987.
- Jaffe T, Schwartz B. 2008. Leptin promotes motility and invasiveness in human colon cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. *Int J Cancer* 123:2543-2556.
- Johnson CW. 1999. Issues in immunohistochemistry. *Toxicol Pathol* 27:246-248.
- Kaaks R, Lukanova A, Kurzer MS. 2002. Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: a synthetic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:1531-1543.
- Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LM, Carlsson B. 1997. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4144-4148.
- Key TJ, Pike MC. 1988. The dose-effect relationship between 'unopposed' oestrogens and endometrial mitotic rate: its central role in explaining and predicting endometrial cancer risk. *Br J Cancer* 57:205-212.

- Kitawaki J, Koshiba H, Ishihara H, Kusuki I, Tsukamoto K, Honjo H. 2000. Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1946-1950.
- Klein S, Wadden T, Sugerman HJ. 2002. AGA technical review on obesity. *Gastroenterology* 123:882-932.
- Koda M, Sulkowska M, Wincewicz A, Kanczuga-Koda L, Musiatowicz B, Szymanska M, Sulkowski S. 2007. Expression of leptin, leptin receptor, and hypoxia-inducible factor 1 alpha in human endometrial cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1095:90-98.
- Koshiba H, Kitawaki J, Ishihara H, Kado N, Kusuki I, Tsukamoto K, Honjo H. 2001. Progesterone inhibition of functional leptin receptor mRNA expression in human endometrium. *Mol Hum Reprod* 7:567-572.
- Kuczmarski RJ, Flegal KM. 2000. Criteria for definition of overweight in transition: background and recommendations for the United States. *Am J Clin Nutr* 72:1074-1081.
- Lang K, Ratke J. 2009. Leptin and Adiponectin: new players in the field of tumor cell and leukocyte migration. *Cell Commun Signal* 7:27.
- Lehr HA, Jacobs TW, Yaziji H, Schnitt SJ, Gown AM. 2001. Quantitative evaluation of HER-2/neu status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization and by immunohistochemistry with image analysis. *Am J Clin Pathol* 115:814-822.
- Leitzmann MF, Koebnick C, Danforth KN, Brinton LA, Moore SC, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Lacey JV, Jr. 2009. Body mass index and risk of ovarian cancer. *Cancer* 115:812-822.
- Lew EA, Garfinkel L. 1979. Variations in mortality by weight among 750,000 men and women. *J Chronic Dis* 32:563-576.
- Lin HJ, Hsieh FC, Song H, Lin J. 2005. Elevated phosphorylation and activation of PDK-1/AKT pathway in human breast cancer. *Br J Cancer* 93:1372-1381.
- Liu FS. 2007. Molecular carcinogenesis of endometrial cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol* 46:26-32.
- Mantzou F, Vanakara P, Samara S, Wozniak G, Kollia P, Messinis I, Hatzitheofilou C. 2011. Leptin receptor expression in neoplastic and normal ovarian and endometrial tissue. *Eur J Gynaecol Oncol* 32:84-86.
- Mariani A, Sebo TJ, Katzmann JA, Keeney GL, Roche PC, Lesnick TG, Podratz KC. 2000. Pretreatment assessment of prognostic indicators in endometrial cancer.

- Am J Obstet Gynecol 182:1535-1544.
- Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. 1997. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 3:1029-1033.
- McDonald TW, Annegers JF, O'Fallon WM, Dockerty MB, Malkasian GD, Jr., Kurland LT. 1977. Exogenous estrogen and endometrial carcinoma: case-control and incidence study. *Am J Obstet Gynecol* 127:572-580.
- Mollerstrom G, Carlstrom K, Lagrelius A, Einhorn N. 1993. Is there an altered steroid profile in patients with endometrial carcinoma? *Cancer* 72:173-181.
- Morrow CP, Bundy BN, Kurman RJ, Creasman WT, Heller P, Homesley HD, Graham JE. 1991. Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 40:55-65.
- Moschen AR, Molnar C, Wolf AM, Weiss H, Graziadei I, Kaser S, Ebenbichler CF, Stadlmann S, Moser PL, Tilg H. 2009. Effects of weight loss induced by bariatric surgery on hepatic adipocytokine expression. *J Hepatol* 51:765-777.
- Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. 2002. Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril* 77:433-444.
- Nibbering PH, van Furth R. 1987. Microphotometric quantitation of the reaction product of several indirect immunoperoxidase methods demonstrating monoclonal antibody binding to antigens immobilized on nitrocellulose. *J Histochem Cytochem* 35:1425-1431.
- Ogunwobi OO, Beales IL. 2007. The anti-apoptotic and growth stimulatory actions of leptin in human colon cancer cells involves activation of JNK mitogen activated protein kinase, JAK2 and PI3 kinase/Akt. *Int J Colorectal Dis* 22:401-409.
- Olaiz G, Rivera J, Shamah T, Riojas R, Villalpando S, Hernández-Avila M. 2006. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Publica
- Pan SY, Johnson KC, Ugnat AM, Wen SW, Mao Y. 2004. Association of obesity and cancer risk in Canada. *Am J Epidemiol* 159:259-268.
- Parc YR, Halling KC, Burgart LJ, McDonnell SK, Schaid DJ, Thibodeau SN, Halling AC.

2000. Microsatellite instability and hMLH1/hMSH2 expression in young endometrial carcinoma patients: associations with family history and histopathology. *Int J Cancer* 86:60-66.
- Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J. 1997. Cancer incidence in five continents. Volume VII. IARC Sci Publ:i-xxxiv, 1-1240.
- Petridou E, Belechri M, Dessypris N, Koukoulomatis P, Diakomanolis E, Spanos E, Trichopoulos D. 2002. Leptin and body mass index in relation to endometrial cancer risk. *Ann Nutr Metab* 46:147-151.
- Pisani P, Parkin DM, Ferlay J. 1993. Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden. *Int J Cancer* 55:891-903.
- Potischman N, Hoover RN, Brinton LA, Siiteri P, Dorgan JF, Swanson CA, Berman ML, Mortel R, Twiggs LB, Barrett RJ, Wilbanks GD, Persky V, Lurain JR. 1996. Case-control study of endogenous steroid hormones and endometrial cancer. *J Natl Cancer Inst* 88:1127-1135.
- Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK, Jones PA, Henderson BE. 1990. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res* 50:7415-7421.
- Risch HA. 1998. Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. *J Natl Cancer Inst* 90:1774-1786.
- Rodriguez C, Calle EE, Fakhrabadi-Shokoohi D, Jacobs EJ, Thun MJ. 2002. Body mass index, height, and the risk of ovarian cancer mortality in a prospective cohort of postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:822-828.
- Ruifrok AC, Johnston DA. 2001. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 23:291-299.
- Russo J, Tay LK, Russo IH. 1982. Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 2:5-73.
- Salvesen HB, Iversen OE, Akslén LA. 1998. Identification of high-risk patients by assessment of nuclear Ki-67 expression in a prospective study of endometrial carcinomas. *Clin Cancer Res* 4:2779-2785.
- Saxena NK, Sharma D, Ding X, Lin S, Marra F, Merlin D, Anania FA. 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 Res* 67:2497-2507.
- Scott RE, Maercklein PB. 1985. An initiator of carcinogenesis selectively and stably inhibits stem cell differentiation: a concept that initiation of carcinogenesis involves multiple phases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:2995-2999.
- Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. 1995. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270:26746-26749.
- Schouten LJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA. 2003. Height, weight, weight change, and ovarian cancer risk in the Netherlands cohort study on diet and cancer. *Am J Epidemiol* 157:424-433.
- Sebolt-Leopold JS. 2004. MEK inhibitors: a therapeutic approach to targeting the Ras-MAP kinase pathway in tumors. *Curr Pharm Des* 10:1907-1914.
- Seidal T, Balaton AJ, Battifora H. 2001. Interpretation and quantification of immunostains. *Am J Surg Pathol* 25:1204-1207.
- Semenkovich CF. 2006. Insulin resistance and atherosclerosis. *J Clin Invest* 116:1813-1822.
- Senaris R, Garcia-Caballero T, Casabiell X, Gallego R, Castro R, Considine RV, Dieguez C, Casanueva FF. 1997. Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology* 138:4501-4504.
- Sharma D, Saxena NK, Vertino PM, Anania FA. 2006. Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. *Endocr Relat Cancer* 13:629-640.
- Shepherd JH. 1989. Revised FIGO staging for gynaecological cancer. *Br J Obstet Gynaecol* 96:889-892.
- Shi SR, Key ME, Kalra KL. 1991. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39:741-748.
- Shi SR, Shi Y, Taylor CR. 2011. Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. *J Histochem Cytochem* 59:13-32.
- Siegmund B, Sennello JA, Jones-Carson J, Gamboni-Robertson F, Lehr HA, Batra A,

- Fedke I, Zeitz M, Fantuzzi G. 2004. Leptin receptor expression on T lymphocytes modulates chronic intestinal inflammation in mice. *Gut* 53:965-972.
- Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR. 1998. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281:1683-1686.
- Smith J, Al-Amri M, Dorairaj P, Sniderman A. 2006. The adipocyte life cycle hypothesis. *Clin Sci (Lond)* 110:1-9.
- Sweeney G. 2002. Leptin signalling. *Cell Signal* 14:655-663.
- Taylor CR. 1994. An exaltation of experts: concerted efforts in the standardization of immunohistochemistry. *Hum Pathol* 25:2-11.
- Taylor CR, Burns J. 1974. The demonstration of plasma cells and other immunoglobulin-containing cells in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using peroxidase-labelled antibody. *J Clin Pathol* 27:14-20.
- Taylor CR, Levenson RM. 2006. Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology* 49:411-424.
- Troisi R, Potischman N, Hoover RN, Siiteri P, Brinton LA. 1997. Insulin and endometrial cancer. *Am J Epidemiol* 146:476-482.
- Uddin S, Bavi PP, Hussain AR, Alsbeih G, Al-Sanea N, Abduljabbar A, Ashari LH, Alhomoud S, Al-Dayel F, Ahmed M, Al-Kuraya KS. 2009a. Leptin receptor expression in Middle Eastern colorectal cancer and its potential clinical implication. *Carcinogenesis* 30:1832-1840.
- Uddin S, Bu R, Ahmed M, Abubaker J, Al-Dayel F, Bavi P, Al-Kuraya KS. 2009b. Overexpression of leptin receptor predicts an unfavorable outcome in Middle Eastern ovarian cancer. *Mol Cancer* 8:74.
- Uharcek P. 2008. Prognostic factors in endometrial carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res* 34:776-783.
- Umemura S, Itoh J, Itoh H, Serizawa A, Saito Y, Suzuki Y, Tokuda Y, Tajima T, Osamura RY. 2004. Immunohistochemical evaluation of hormone receptors in breast cancer: which scoring system is suitable for highly sensitive procedures? *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 12:8-13.
- Vainio H, Kaaks R, Bianchini F. 2002. Weight control and physical activity in cancer

- prevention: international evaluation of the evidence. *Eur J Cancer Prev* 11 Suppl 2:S94-100.
- Vona-Davis L, Rose DP. 2007. Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocr Relat Cancer* 14:189-206.
- Watanabe J, Kanai K, Kanamura S. 1991. Measurement of NADPH-ferrihemoprotein reductase content in sections of liver. *J Histochem Cytochem* 39:1635-1643.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-1808.
- Weiss NS, Hill DA. 1996. Postmenopausal estrogens and progestogens and the incidence of gynecologic cancer. *Maturitas* 23:235-239.
- WHO. 1995. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Ser* 854:1-452.
- WHO. 2005. Obesity Fact Sheets. In: World Health Organization.
- Wilson TO, Podratz KC, Gaffey TA, Malkasian GD, Jr., O'Brien PC, Naessens JM. 1990. Evaluation of unfavorable histologic subtypes in endometrial adenocarcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 162:418-423; discussion 423-416.
- Wille JJ, Jr., Maercklein PB, Scott RE. 1982. Neoplastic transformation and defective control of cell proliferation and differentiation. *Cancer Res* 42:5139-5146.
- Willett W. 1998. In *Nutritional Epidemiology* New York: Oxford University Press.
- Wincewicz A, Koda M, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Sulkowski S. 2008. Comparison of STAT3 with HIF-1 α , Ob and ObR expressions in human endometrioid adenocarcinomas. *Tissue Cell* 40:405-410.
- Wolk A, Gridley G, Svensson M, Nyren O, McLaughlin JK, Fraumeni JF, Adam HO. 2001. A prospective study of obesity and cancer risk (Sweden). *Cancer Causes Control* 12:13-21.
- Xia XH, Gu JC, Bai QY, Yu W. 2009. Overexpression of leptin and leptin receptors in breast cancer positively correlates with clinicopathological features. *Chin Med J (Engl)* 122:3078-3081.
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112:1821-

1830.

- Yan W, Fu Y, Tian D, Liao J, Liu M, Wang B, Xia L, Zhu Q, Luo M. 2009. PI3 kinase/Akt signaling mediates epithelial-mesenchymal transition in hypoxic hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 382:631-636.
- Yang SN, Chen HT, Tsou HK, Huang CY, Yang WH, Su CM, Fong YC, Tseng WP, Tang CH. 2009. Leptin enhances cell migration in human chondrosarcoma cells through OBRI leptin receptor. *Carcinogenesis* 30:566-574.
- Yeh WL, Lu DY, Lee MJ, Fu WM. 2009. Leptin induces migration and invasion of glioma cells through MMP-13 production. *Glia* 57:454-464.
- Yuan SS, Tsai KB, Chung YF, Chan TF, Yeh YT, Tsai LY, Su JH. 2004. Aberrant expression and possible involvement of the leptin receptor in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 92:769-775.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432.
- Zhou R, Hammond EH, Parker DL. 1996. A multiple wavelength algorithm in color image analysis and its applications in stain decomposition in microscopy images. *Med Phys* 23:1977-1986.

7. ANEXOS

7.1. Clasificación OMS para rangos de IMC.

IMC (kg/m ²)	Clasificación OMS	Descripción Popular
<18.5	Bajo peso	Delgado
18.5-24.9	Rango Normal	Aceptable, Normal, Saludable
25.0-29.9	Grado 1 de sobrepeso	Pasado de peso
30.0-39.9	Grado 2 de sobrepeso	Obesidad
40.0	Grado 3 de sobrepeso	Obesidad Mórbida

Modificada de (WHO, 1995).

7.2 Complicaciones médicas asociadas con la obesidad.

Gastrointestinal	Litiasis renal, pancreatitis, hernia abdominal, esteatosis hepática y cirrosis
Endocrino/metabólico	Resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, diabetes <i>mellitus</i> tipo 2, dislipidemia, síndrome de ovario poliquístico
Cardiovascular	Hipertensión, enfermedad coronaria, falla congestiva de corazón, disritmias, hipertensión pulmonar, daño isquémico, estasis venosa, trombosis y embolia pulmonar
Respiratorio	Función pulmonar anormal, apnea, hipo ventilación
Musculo esquelético	Osteoartritis, gota, dolor en espalda baja
Ginecológico	Anormalidades menstruales, infertilidad
Genitourinario	Incontinencia urinaria
Oftalmológico	Cataratas
Neurológico	Hipertensión idiopática intracraneal
Cáncer	Colon, mama, endometrio, esófago, páncreas, hígado, vesícula biliar, estomago, próstata, ovario y cérvix.
Postquirúrgicos	Atelectasis, neumonía, trombosis, émbolos pulmonares

Modificada de (Klein et al., 2002).

7.3 Tipos de cáncer relacionados a la obesidad con R.R estimado según IMC.

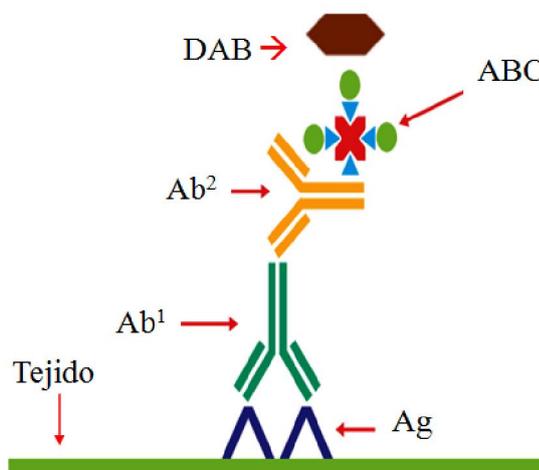
Tipo de Cáncer	R.R con IMC de 25-30	R.R con IMC de 30
Colorectal (hombre)	1.5	2.0
Colorectal (mujer)	1.2	1.5
Mama*	1.3	1.5
Endometrio	2.0	3.5
Renal (células-renales)	1.5	2.5
Esofágico (adenocarcinoma)	2.0	3.0
Pancreático	1.3	1.7
Hígado	ND	1.5-4.0
Vesícula Biliar	1.5	2.0
Ovario	1.5	2.0
Cardias Gástrico (adenocarcinoma)	1.5	2.0

R.R, Riesgo Relativo, IMC, Índice de masa corporal, ND, no determinado , * en mujeres post menopáusicas

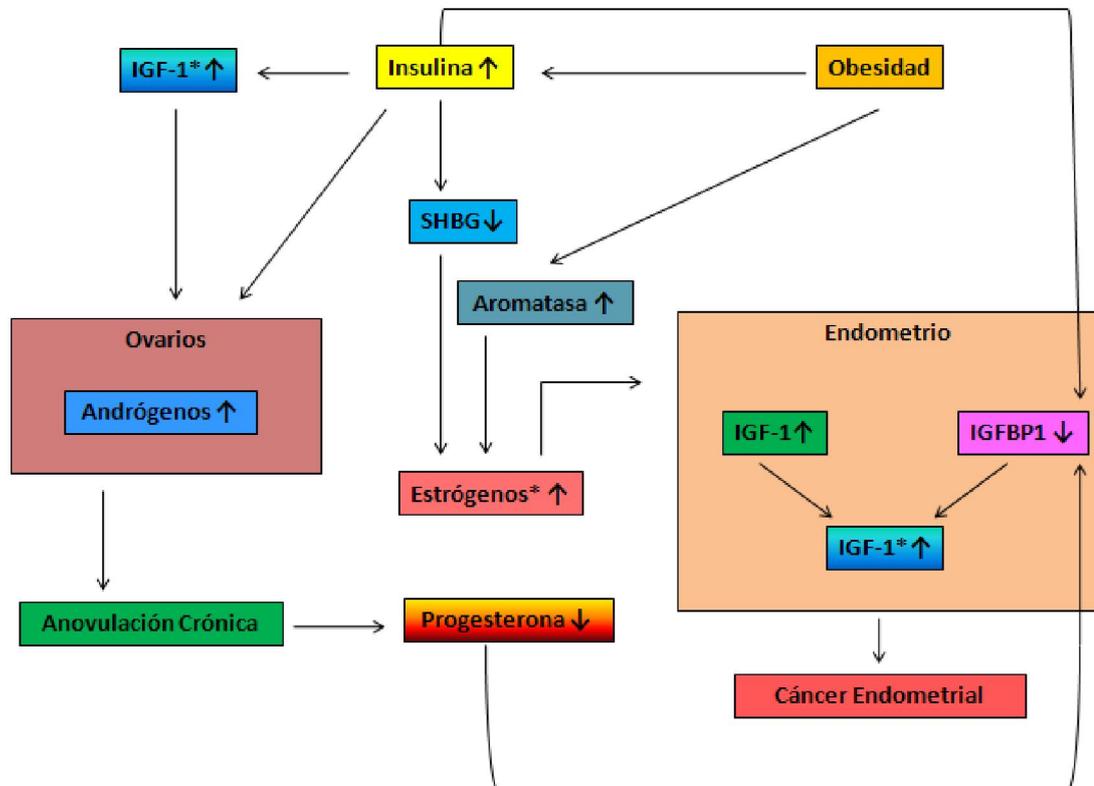
Modificada de (Calle and Kaaks, 2004).

7.4 Complejo de detección en la Técnica IHQ de Inmunoperoxidasa.

Técnica IHQ de Inmunoperoxidasa



7.5. Mecanismo de carcinogénesis endometrial en la Obesidad.



(Calle and Kaaks, 2004).

7.6. Sistema de Puntuación histopatológica para IHQ

Puntuación	Definición para HER2	Definición Modificada
0	No inmunotinción	Inmunotinción negativa
1+	Inmunotinción débil, menos del 30% de las células tumorales	Menos del 25% de las células expresan
2+	Tinción membranosa completa, ya sea uniforme o débil en al menos 10% de las células	Del 25 al 50% de las células expresan
3+	Uniforme tinción intensa membranosa en al menos un 30% de las células	Mas del 50% de las células expresan

(Gown, 2008; Deyrup et al., 2004)

7.7 Características clinicopatológicas y moleculares de los dos tipos de CE.

	Tipo I	Tipo II
Incidencia	80%	20%
Edad	Pre y peri menopáusicas	>60 años
Histología	Endometrioide	Seroso, de células claras
Diferenciación celular	Bajo grado	Alto grado
Lesión Precursora	NIE	CEI
Estimulación estrogénica	Relacionado	No relacionado
Comportamiento clínico	Indolente	Agresivo
Inactivación de PTEN	50-80%	10%
Inestabilidad de Microsatélites	20-45%	0-5%
Mutaciones en K-ras	10-30%	0-5%
Mutaciones en β -catenina	20%	0-5%
Mutaciones en p53	10-20%	90%
Sobreexpresión de Her-2/neu	10-30%	45-80%
Inactivación de p16	10%	40%
Alteraciones en E-caderina	10-20%	80-90%

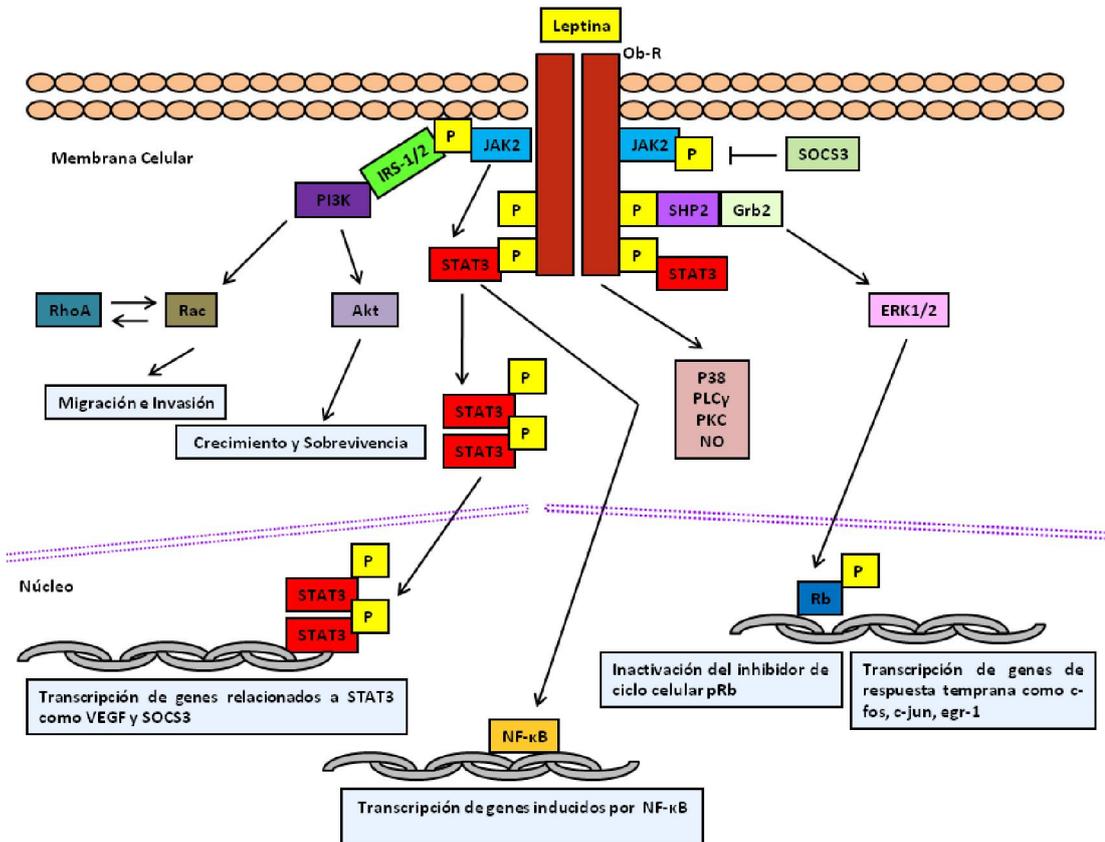
Modificada de (Liu, 2007).

7.8 Producción de adipocinas por componentes del tejido adiposo.

Adipocina	Célula principal de síntesis	Otras fuentes celulares
Leptina	Preadipocitos y adipocitos	Fibroblastos y Queratinocitos
Adiponectina	Adipocitos maduros	Ninguna
TNF-	Macrófagos	Preadipocitos y adipocitos
Il-6	Macrófagos	Células del estroma y adipocitos
HGF	Células del estroma	Adipocitos
VEGF	Células del estroma	Adipocitos
HB-EGF	Adipocitos	Células de musculo liso vascular

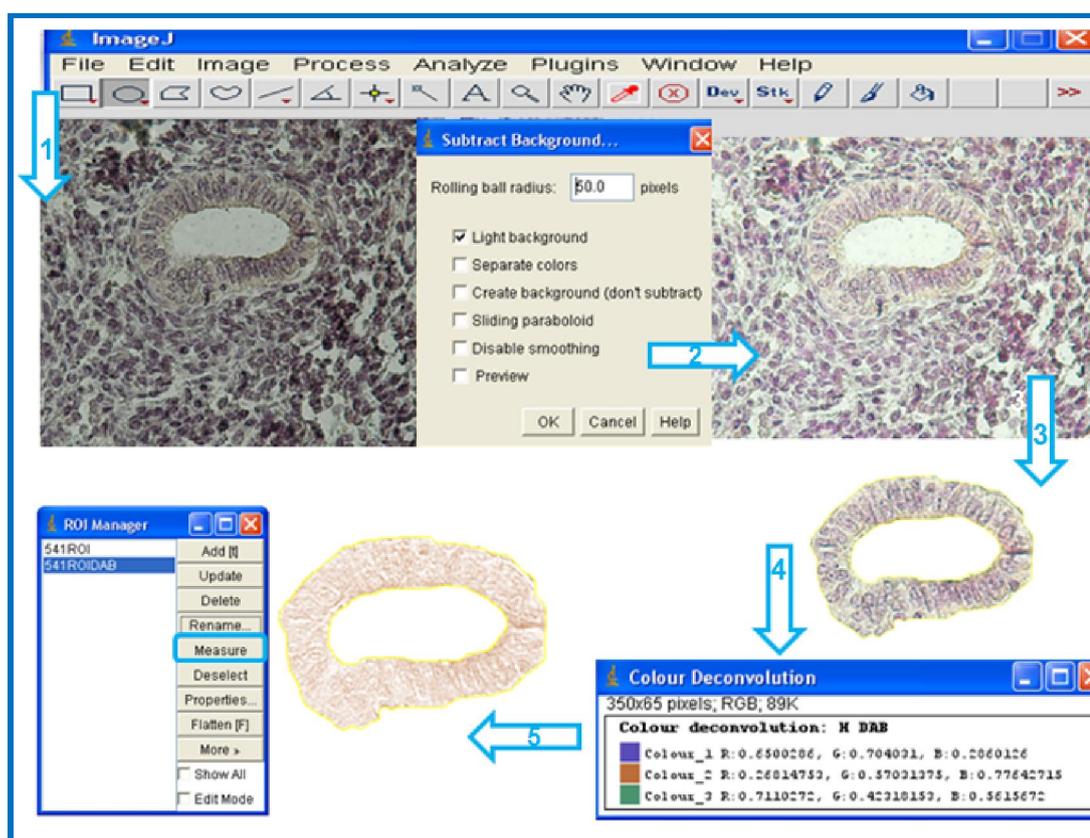
Modificado de (Vona-Davis and Rose, 2007).

7.9 Mecanismo de acción molecular de leptina.



Modificado de (Garofalo and Surmacz, 2006).

7.10 Uso del software *ImageJ-v1.45p* para la obtención de la puntuación digital. (1) Se ajusta la iluminación del fondo con el algoritmo *Rolling Ball* (2) Se seleccionan las regiones de interés (ROI) (3) En este caso los ROI son el epitelio glandular de los endometrios analizados. Finalmente el algoritmo de deconvolución de colores (4) genera una imagen que solo contiene los datos del DAB, los cuales se analizan para determinar su DO (5) Así se obtiene la mediana del caso.



RESUMEN CURRICULAR

Luis Fernando Méndez López

Candidato para el Grado de Maestro en Ciencias en Nutrición

Tesis: "ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL RECEPTOR DEL GEN DE LA OBESIDAD (OB-R) EN CÁNCER DE ENDOMETRIO MEDIANTE PUNTAJE HISTOPATOLÓGICO Y DIGITAL"

Campo de estudio: Ciencias Biomédicas

Datos personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, México, el 16 de Julio de 1982, hijo del Sr. Luis Fernando Méndez Borges y la Sra. María Bernardina López Palomo.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, obteniendo el grado de Maestro en Ciencias con acentuación en Inmunobiología con un reconocimiento del jurado por el trabajo de investigación y defensa de tesis, el cual también fue publicado en una revista indexada en 2010. Así como también obtuvo la licenciatura de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en el 2007 en la misma universidad por medio de tesis, la cual obtuvo el tercer lugar en el Concurso Estatal de Investigación en Salud 2008, entregado por el poder ejecutivo de Nuevo León a través de la Secretaria de Salud obtenido en el área de Neoplasias.

Experiencia Profesional: Fungí como Becario de CONACYT haciendo una estancia en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL a cargo del Dr. Pablo Zapata Benavides de Agosto 2007 a Julio de 2009 trabajando en la determinación de biomarcadores en cáncer de mama. También he sido Becario del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS, en el departamento de Citogenética Molecular a cargo de la Dra. Martha Dávila Rodríguez de Enero de 2003 a la fecha trabajando en el área de biología molecular de cáncer.