



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biodiversidad
y Biología Experimental

**“Factores Inmunomoduladores Asociados con la
Reabsorción Embrionaria Inducida por
Hiperandrogenización. Tratamiento con Metformina”**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área: CIENCIAS BIOLÓGICAS

Autora: Lic. Carolina Griselda Luchetti
Directora de tesis: Dra. Alicia Beatriz Motta
Consejero de estudios: Dr. Enrique Rodríguez
Lugar de trabajo: Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-
Universidad de Buenos Aires (UBA)- Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas (CONICET)

Ciudad de Buenos Aires, 2008

**“Factores inmunomoduladores asociados con la reabsorción
embrionaria inducida por hiperandrogenización. Tratamiento con
metformina”**

El Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) es una de las patologías endocrinas más frecuentes que afectan la fertilidad y la salud en general de mujeres en edad reproductiva. Se ha visto que la hormona secretada en mayores concentraciones por los ovarios de mujeres con SOP es la dehidroepiandrosterona (DHEA). En el presente trabajo de tesis estudiamos los efectos de la hiperandrogenización post-implantatoria con DHEA y el tratamiento simultáneo con metformina en un modelo murino durante la preñez temprana. Vimos que la metformina, administrada en forma oral, fue capaz de evitar los efectos sistémicos y locales de la hiperandrogenización por inyección de DHEA que se detallan a continuación. Sistémicos: 1) aumento en la tasa de reabsorción embrionaria, 2) disminución en los niveles séricos de progesterona y estradiol, 3) aparición de insulino-resistencia, 4) disminución de IL-6. Como efectos locales la metformina previno, en los sitios de implantación: 1) ausencia del *factor bloqueante inducido por progesterona* (PIBF), 2) aumento en la abundancia de ciclooxigenasa-2 y de óxido nítrico sintasas, 3) aumento en la relación prostaglandina F2 alfa/E y 4) aumento en el estrés oxidativo. En el ovario, la metformina previno la disminución en la abundancia de óxido nítrico sintasa. Estos resultados contribuyen al conocimiento de la etiología del SOP, que aún no se conoce completamente, y de los mecanismos de acción de la metformina, específicamente durante las etapas tempranas de gestación.

Palabras claves: preñez- dehidroepiandrosterona- metformina- factor bloqueante inducido por progesterona- óxido nítrico sintasa- ciclooxigenasa- estrés oxidativo

“Immunomodulatory factors associated to embryo resorption induced by hyperandrogenization. Treatment with metformin”

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is the most frequent endocrine pathology affecting fertility and health in general of women. The main hormone secreted by the ovaries of women with PCOS is the dehydroepiandrosterone (DHEA). In the present work by mean of a murine model we studied the effects of the hyperandrogenization with DHEA during the post-implantatory period and the role of metformin treatment. We found that metformin was able to prevent some of the systemic and local effects induced by DHEA. Among systemic effects we found that metformin prevented: 1) the embryo resorption rate 2) the decrease on serum progesterone and estradiol levels, 3) the insulin-resistance state, 4) the decrease on IL-6 levels. Among local effects on the implantation sites metformin prevented: 1) the lack of *progesterone induced blocking factor* (PIBF), 2) both the increase on cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthases abundances, 3) the alteration on prostaglandin E/F2 alpha ratio and 4) the increase on the oxidative stress. In addition, metformin prevented the decrease on nitric oxide synthase abundance in ovarian tissue. These results contribute to the knowledge of PCOS aetiology (not completely understood) and to the knowledge of the mechanism by which metformin is able to prevent miscarriages during early gestation.

Key words: pregnancy- dehydroepiandrosterone- metformin- progesterone induced blocking factor– nitric oxide synthase- cyclooxygenase- oxidative stress

Los contenidos de esta tesis han sido parcialmente publicados en el siguiente artículo:

C.G. Luchetti, E. Miko, J. Szekeres-Bartho, D.A. Paz, A.B. Motta

“Dehydroepiandrosterone and metformin modulate progesterone-induced blocking factor (PIBF), cyclooxygenase 2 (COX2) and cytokines in early pregnant mice”

The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2008 Jun 20. DOI 0.1016

¡¡¡Muchas Gracias!!!

A mis padres, por llevarme de la mano por este sendero maravilloso y apoyarme incondicionalmente en mis elecciones. Por ayudarme a superar las dificultades, por escucharme, aconsejarme y alentarme, y por su felicidad ante mis logros. Los quiero mucho.

A Alicia, mi directora, por su guía y su confianza, por su dedicación y amistad.

A Emi, Vale y Eve, mis compañeras de laboratorio, mis amigas, por compartir el camino, por los mates, por el apoyo, por las manos prestadas en la mesada y la mente prestada cuando me cuesta pensar.

A Élida, por ser una cara amiga en el trabajo, y por su luz.

A mis amigos, por bancarme las ausencias y el cansancio, por darme fuerzas y apoyarme.

A mis tíos y primos y a mis padrinos Jorge y Pelusa, por bancarme en mis horarios largos, por apoyarme y por sentirse orgullosos.

Al Dr. Claudio Barbeito, por su ayuda desinteresada en mi trabajo y su humildad.

Al Dr. Dante Paz, por su calidad humana, su confianza, simpatía y su ayuda con las inmunos.

A la Dra. Marta Dubín, por prestarme su espectrofotómetro, su confianza y calidez. A Igal por sus críticas.

Al bioquímico José Pelegrino por su instrucción en el procesamiento de imágenes y su amabilidad.

A las Dras. Telma Zorn y Estela Bevilacqua, por compartir sus profundos conocimientos sobre la decidua de los “camundongos”.

A la Dra. Szekeres-Bartho por la medición de PIBF.

Al personal del CEFYBO, investigadores, becarios y técnicos.

A las chicas del 17º, y antes del 5º piso.

A Daniel, por su ayuda con los ratones, especialmente con las hembras preñadas y por interesarse en nuestro trabajo.

A CONICET, Agencia y UBA por permitirme realizar este trabajo de tesis.

A mis padres

<u>Capítulo I: Introducción</u>	1-21
La preñez temprana en el ratón	1-6
Regulación endócrino-inmune en el sitio de implantación	7
Las prostaglandinas	8-10
El sistema óxido nítrico	10-13
Balance oxidante/ antioxidante	13-14
Síndrome del ovario poliquístico (SOP)	14-18
La metformina	18-21
 Hipótesis	 22
 Objetivos	 23
 <u>Capítulo II: Materiales y métodos</u>	 24-43
Animales	24-27
Modelo experimental	24
Grupos experimentales	26
Obtención de muestras	28-29
 Procedimientos experimentales	 30-42
Aspecto macroscópico y microscópico de los sitios de implantación	30
Concentración de progesterona y estradiol en suero	31
Concentración de glucosa en sangre, insulina en suero. Evaluación de la insulino resistencia a través del índice HOMA ("Homeostasis Model Assessment")	32
Determinación de citoquinas Th1 y Th2 en suero	33
Abundancia Factor Bloqueante Inducido por Progesterona (PIBF)	34-35
Abundancia de Ciclooxygenasa 2 (COX-2)	34-35
Abundancia de las isoformas de la Óxido nítrico sintasa (NOS)	34-35
Expresión de linfocitos T CD4+/ CD8+ en ganglios linfáticos	36-37
Inmunofluorescencia para linfocitos T CD4+ en los sitios de implantación	38

Prostaglandina E2 y F2 alfa liberadas por los sitios de implantación _____	39
Parámetros del estrés oxidativo en los sitios de implantación _____	40-42
Producción de nitritos _____	40
Actividad de la superóxido dismutasa _____	40-41
Actividad de la catalasa _____	41
Contenido de glutatión _____	41-42
Índice de peroxidación lipídica _____	42
<u>Capítulo III: Resultados</u> _____	44-59
<u>Capítulo IV: Discusión</u> _____	60-67
Conclusiones _____	68-69
Referencias _____	70-85

am:	Decidua antimesometrial
AMPK:	Adenosin-monofosfato kinasa
COX:	Ciclooxigenasa
d:	Decidua
DHEA:	Dehidroepiandrosterona
e:	Embrión
E2:	Estradiol
GSH:	Glutación
h:	Hora (s)
KDa:	KiloDaltons
m:	Decidua mesometrial
MDA:	Malondialdehido
mg:	Miligramo
min:	Minuto(s)
ml:	Millilitro
NO:	Oxido Nítrico
P4:	Progesterona
PG:	Prostaglandina
pg:	Picogramo
PIBF:	Factor Bloqueante Inducido por Progesterona
ROS:	Especies Reactivas del Oxígeno
SOD:	Superóxido Dismutasa
SOP:	Síndrome de Ovario Poliquístico
TBARS:	Especies Reactivas del Acido Tiobarbitúrico
Th:	T helper
tr:	Trofoblasto

Capítulo I

Introducción

1. La preñez temprana en el ratón

El útero murino tiene forma bicornes. Ambos cuernos uterinos desembocan en el extremo superior de la vagina y se comunican con los ovarios mediante sendos oviductos en los extremos (Figura 1 A). Durante la preñez, los blastocistos se implantan en el útero distribuidos entre los dos cuernos uterinos. La cepa Balb/c tiene un promedio de 12 sitios de implantación. Esto le da el aspecto de un “collar de perlas”, característico del útero preñado en roedores, donde cada perla es un sitio de implantación, o unidad feto-placentaria (Figuras 1 B y C).

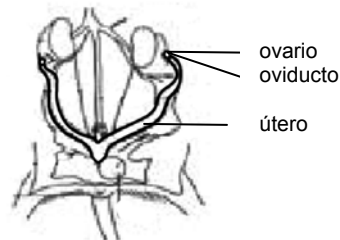


Figura 1 A: Sistema reproductor femenino del ratón.

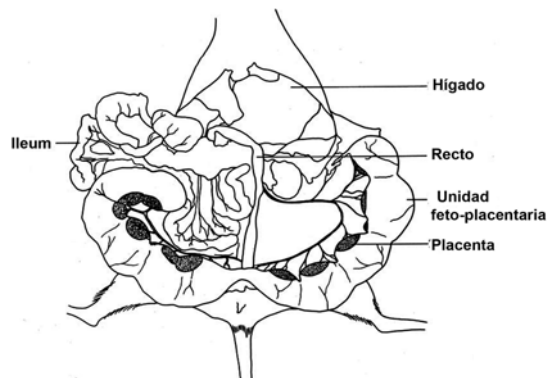


Figura 1 B: Sistema reproductor de una hembra de ratón preñada.



Figura 1 C: Útero preñado murino con aspecto de "collar de perlas", donde cada perla es una unidad feto-placentaria.

En el día 8 de preñez, un sitio de implantación se encuentra ocupado en su mayoría por tejido decidual, rodeando al embrión (Figura 2 A). En la Figura 2 B, panel de arriba, se observa un sitio de implantación despojado de la capa miometrial (muscular lisa que recubre al útero), lo que hace que se exponga la decidua; en el panel de abajo se encuentra un embrión aislado del útero y de todas las capas extraembrionarias.

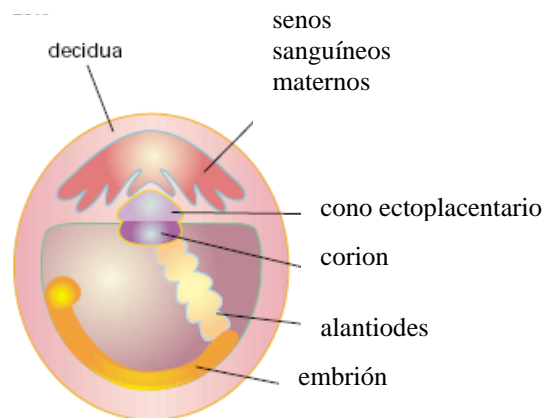


Figura 2 A: Esquema de un sitio de implantación de 8 días de preñez.

Fuente: Rinkenberger 2000.

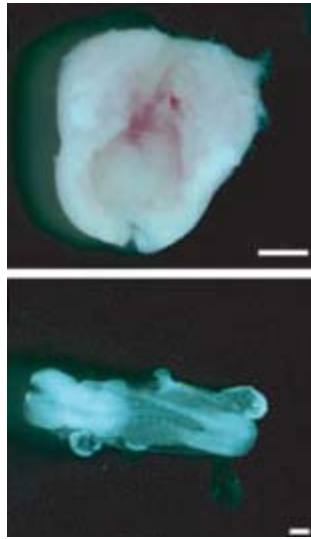


Figura 2 B: Sitio de implantación de ratón Balb/c de 8 días de preñez. Panel de arriba: sitio despojado del miometrio. Panel de abajo: embrión.

Fuente: Mizugishi 2007.

Invasión del endometrio por el trofoblasto

Durante la implantación, el blastocisto sufre la diferenciación y desarrollo del maciso celular interno (MCI) para producir un epiblasto y un endodermo parietal y visceral, mientras que el trofoblasto inicia interacciones con el útero (Enders y col 1978). La interacción trofoblasto-uterina abarca una compleja red de interacciones endócrinas, parácrinas e inmuno-reguladoras. Aquí se establece un diálogo entre la madre y el feto que involucra hormonas, citoquinas, factores de crecimiento y otras moléculas. El blastocisto primero se posiciona muy cerca y luego se adjunta firmemente a la superficie apical del epitelio uterino. Luego, el trofoblasto penetra en el epitelio uterino, componentes de la membrana basal y el estroma endometrial y finalmente se aproxima a los capilares maternos (Schlafke y Enders 1975, Blankenship y Given 1992). El microambiente uterino requiere una extensiva adaptación para la implantación embrionaria (Abrahamsohn 1983, Parr y col 1986). Sensibilizados por las hormonas ováricas estradiol y progesterona, los fibroblastos del endometrio tienen profundas modificaciones morfo-funcionales que abarcan proliferación, agrandamiento y diferenciación al fenotipo secretor, resultando en la formación de un nuevo tipo celular llamado célula decidual. En roedores la decidualización del endometrio promueve además una rápida y profunda remodelación de varios de los componentes de la matriz extracelular (Zorn y col 1986, Abrahamsohn y Zorn 1993) y las glándulas uterinas cambian su patrón de secreción (Given y Enders 1980, 1981). Las células deciduales junto con las glándulas uterinas son responsables de producir citoquinas y factores de crecimiento que colaboran en la nutrición del embrión en desarrollo (Purcell y col 1999). Estos cambios vienen acompañados por un reclutamiento de poblaciones de células inmunes específicas y alteraciones en el tamaño del lumen uterino (De Feo 1967, Finn y McLaren 1967).

El trofoblasto invade el endometrio decidualizado de la madre en dirección mesometrial-antimesometrial. Las células gigantes del trofoblasto van al frente, encargadas de fagocitar células deciduales y secretar enzimas que digieren la matriz extracelular. Las células de la decidua que se

encuentran cercanas al trofoblasto también presentan una alta actividad fagocítica, y generan una ola de decidualización que se va extendiendo hacia las áreas más lejanas del endometrio. Durante la preñez temprana, entre las células gigantes del trofoblasto se abren espacios que son llenados por sangre materna denominados lagunas. La sangre materna no puede entrar en contacto con las células deciduales, y en caso de que esto ocurriera llevaría a una reacción inflamatoria que desencadenaría la reabsorción del embrión. Es en la zona de unión entre el mesodermo extraembrionario, las células gigantes del trofoblasto y la decidua, que se va a originar el laberinto placentario.

Fisiología de la preñez temprana

El cuerpo lúteo: El cuerpo lúteo tiene un rol fundamental en el mantenimiento de la preñez. En la mayoría de los mamíferos, como el ratón, el cuerpo lúteo permanece funcional durante toda la preñez mientras que en los primates constituye el sostén de la preñez temprana y luego, en el segundo trimestre de gestación, es reemplazado por la placenta.

Las hormonas luteales: La progesterona y el estradiol juegan un papel fundamental en el establecimiento y mantenimiento de la preñez. Sintetizadas por el cuerpo lúteo, ejercen diversos efectos tanto a nivel ovárico como a nivel del tejido uterino que promueven la implantación y el desarrollo embrionario. Se ha demostrado que el blastocisto presenta receptores para ambas hormonas, indicando que existe un efecto directo de las mismas sobre el desarrollo embrionario (Hou y Gorski 1999). El mecanismo de acción de ambas hormonas reside en la interacción directa con su receptor intracelular, el cual una vez activado, se comporta como un factor de transcripción capaz de modular la expresión de diversos genes a través de la unión a elementos específicos de respuesta en el DNA (Moutsatsou y col 1997, Hou y Gorski 1999). En algunos casos la progesterona antagoniza los efectos del estradiol por ejemplo, disminuyendo el edema en la implantación) y en otros casos ambas se sinergizan; muchas veces el tejido responde a progesterona sólo si estuvo previamente expuesto a estrógenos. Algunos de los efectos de progesterona y estradiol durante la gestación se enumeran a continuación: preparan al endometrio para la implantación, regulan los tiempos en que el ovocito fecundado migra hacia el útero, intervienen en el desarrollo de las glándulas mamarias, la progesterona modula la respuesta inmune de la interfase feto-materna y mantiene la quiescencia uterina.

El rol que juega el cuerpo lúteo durante la gestación es diferente en humano y ratón. Sin embargo, tanto en humano como en ratón, su funcionalidad es fundamental para mantener la preñez temprana. La Figura 3 muestra una comparación esquemática entre ambos.

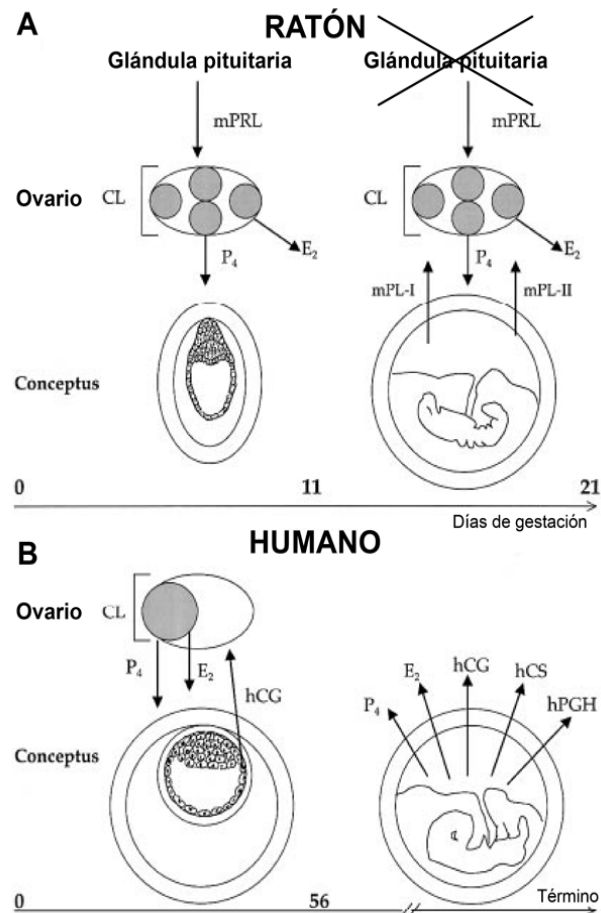


Figura 3: Funciones endócrinas comparadas de los cuerpos lúteos murino y humano. (A) En el ratón, la producción de progesterona (P₄) por el cuerpo lúteo (CL) es necesaria durante toda la gestación. Durante los primeros 8-9 días de gestación, la prolactina pituitaria del ratón (mPRL) regula las funciones del cuerpo lúteo. Los lactógenos placentarios producidos por las células gigantes del trofoblasto reemplazan la producción pituitaria. E₂ = estradiol. (B) En humanos, la glándula pituitaria no es necesaria para iniciar y mantener el embarazo. El mantenimiento del cuerpo lúteo (CL) depende de la hCG producida por el trofoblasto. Después de 8 semanas de gestación, la producción de la progesterona placentaria (P₄) por el sinciotrofoblasto es

suficiente para mantener el embarazo inclusive en casos de ovariectomía. Fuente: Malassine 2003.

2. Regulación endócrino-inmune en el sitio de implantación

Inmunidad en la interfase feto-materna

La progesterona modula la respuesta inmune de la madre a través de una red compleja de efectores, entre los cuales se encuentra una proteína llamada factor bloqueante inducido por progesterona (PIBF) (Szekeres- Bartho y col 2005). El paradigma Th1/Th2 propone que el establecimiento y mantenimiento de la preñez están asociados con un perfil de citoquinas periféricas dominante de tipo Th2 (Clark y Croitoru 2001; Lim y col. 1998). Es sabido que, sin embargo, existen momentos donde es necesario un perfil de tipo Th1, como son la ventana de implantación y el parto. De todas formas, en el período post-implantatorio es necesario un perfil Th2, mientras que el aborto está caracterizado por un perfil de tipo Th1. El PIBF, sintetizado por linfocitos T en los sitios de implantación de hembras preñadas sanas en presencia de progesterona, induce una producción de citoquinas inclinada hacia aquéllas de tipo Th2, según se ha observado en estudios realizados tanto in vitro (Szekeres- Bartho y Wegmann 1996) como in vivo (Szereday y col. 1997), controlando la actividad de las Natural Killers (Gutierrez y col. 2001; Szekeres- Bartho y col. 2005). Además el PIBF inhibe la liberación de ácido araquidónico (precursor de prostaglandinas). La neutralización del PIBF endógeno resulta en una producción alterada de citoquinas y en la terminación de la preñez en ratones (Szekeres-Bartho y col. 1997). En mujeres embarazadas, concentraciones bajas de PIBF en el útero sugieren un riesgo de terminación espontánea del embarazo (Polgar y col. 2004).

El grupo de Julia Szekeres-Barthó desarrolló un anticuerpo policlonal anti-PIBF humano, utilizado por primera vez en un modelo murino en el presente trabajo de tesis para detectar presencia de PIBF en sitios de implantación de ratón.

3. Las prostaglandinas

Se ha denominado eicosanoides a las familias de prostaglandinas, leucotrienos y compuestos similares que derivan de ácidos grasos esenciales de veinte carbonos. Las prostaglandinas juegan un papel importante en diversos procesos fisiológicos como la ovulación, la inflamación, la relajación y la contracción muscular, la modificación del ritmo cardíaco y la regresión luteal. Son sintetizadas por un complejo de enzimas microsomales a partir de ácidos grasos insaturados como el ácido araquidónico, que se encuentra inmerso en las bicapas lipoproteicas (Hardman y col 1996).

Síntesis de prostaglandinas

Disponibilidad de sustrato: Dado que es muy pequeña la cantidad de ácido araquidónico libre en la célula, la biosíntesis de prostaglandinas depende de la disponibilidad de precursores, de la actividad y la concentración de las ciclooxigenasas (COX) así como también de las fosfolipasas A (PLA) encargadas de liberar el ácido araquidónico de los depósitos celulares. Este último proceso ocurre mediante una deacilación dependiente de calcio, en la que participan fosfolipasas activadas por estímulos hormonales y antigénicos.

Además de la PLA₂, otras enzimas contribuyen con la movilización de ácido araquidónico desde los fosfolípidos de membrana. En algunos sistemas, la hidrólisis de fosfolípidos es iniciada por la activación de la PKC ó PKD (Ballsinde y col 1991).

Las Ciclooxigenasas: La primera enzima en la biosíntesis de prostaglandinas es la sintasa del endoperóxido ó ciclooxigenasa-peroxidasa (COX) cuya actividad constituye uno de los pasos limitantes en el camino metabólico de las prostaglandinas. La COX presenta dos actividades (Smith y col 1991): una actividad sintasa de endoperóxido, con la que oxigena al ácido araquidónico formando el intermediario endoperóxido PGG₂ y otra actividad

peroxidasa, encargada de reducir el PGG₂ a PGH₂. Estos endoperóxidos cíclicos son químicamente inestables por lo que se transforman rápidamente en derivados con actividad biológica como los tromboxanos, las prostaciclina y las prostaglandinas.

Existen dos isoformas de la COX: una forma constitutiva ó COX-I, ampliamente distribuida en los tejidos y una forma inducible o COX-II, que se encuentra en las células endoteliales, los fibroblastos y los macrófagos y cuya expresión aumenta luego del tratamiento con agentes pro-inflamatorios (Goppelt-Struebe 1995). Estas enzimas comparten un 60% de homología en su estructura.

En base a la modulación diferencial en la expresión de las COXs, se ha sugerido que la COX-I sería la responsable de la síntesis de prostanoides necesarios para ciertas funciones biológicas como la agregación plaquetaria y la vasodilatación. Por otro lado, la COX-II participaría de los procesos inflamatorios ya que su expresión se encuentra modulada por factores promotores de tumores y citoquinas pro-inflamatorias.

Las gonadotrofinas también han sido descritas como eficientes reguladores de la expresión de la COX-II, y por ende esta isoforma ha sido implicada también en la síntesis de prostaglandinas involucrada en la regulación de la función ovárica (Narko y col 1997).

Función de las prostaglandinas

Prácticamente todas las células sintetizan eicosanoides, sin embargo las funciones de las prostaglandinas comprenden distintos efectos en los distintos tejidos (Hardman y col 1996). Sobre la reproducción y el parto, los efectos son los siguientes: en el líquido menstrual hay grandes cantidades de prostaglandinas que contraen el músculo liso del útero y las vías gastrointestinales, y sensibilizan las fibras aferentes del dolor. Durante el trabajo de parto, se incrementan las concentraciones en sangre y líquido amniótico que mantienen las contracciones uterinas iniciadas por la oxitocina. El goteo intravenoso de PGE₂ en mujeres embarazadas incrementa el tono uterino, y según la dosis, aumenta la frecuencia e intensidad de las

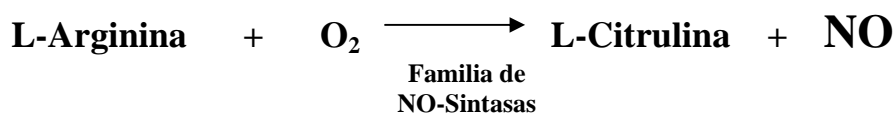
contracciones uterinas rítmicas. La PGE2 es luteotrófica, mientras que la PGF es luteolítica (Motta y col 1999). Esto se traduce en un efecto protector de la preñez de la PGE, y un efecto negativo de la PGF. Lo que influye sobre las funciones ovárica y uterina es el balance PGE/PGF. Además, las prostaglandinas tienen efectos sobre el aparato cardiovascular, las plaquetas y la musculatura lisa.

4. El sistema óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un gas radical de vida media muy corta, que regula el tono vascular, la contracción del músculo liso, la agregación plaquetaria, la adhesión leucocitaria, la transmisión sináptica, las acciones citotóxicas de macrófagos y la remodelación del tejido conectivo (Ignarro y col 1990, Moncada y col 1991, Forstermann y Kleinert 1995).

Síntesis del óxido nítrico: familia de NO-Sintasas

El NO se origina a partir de L-arginina en presencia de oxígeno y NADPH, en una reacción catalizada por una familia de enzimas conocidas como NO-Sintasas (NOS) (Moncada y col 1993).



Existen tres isoformas de la NOS, productos de genes distintos: la NOS neuronal (nNOS, tipo I), la NOS inducible, calcio-independiente (iNOS, tipo II) y la NOS endotelial (eNOS, tipo III) (Moncada y col 1993, Nathan y col 1994, Marletta 1994). Las tres isoformas son similares en estructura y función, utilizando como sustrato L-arginina y el oxígeno molecular y requiriendo como

cofactores NADPH, FAD, FMN, calmodulina y tetrahidrobiopterina (Griffith y col 1995). Las isoformas calcio-dependientes, también conocidas como constitutivas, se encuentran en numerosos tipos tisulares y producen pequeñas cantidades de NO por períodos cortos (Berdeaux 1993) mientras que la forma inducible o calcio-independiente se encuentra generalmente en macrófagos, células endoteliales y células de músculo liso y produce grandes cantidades de NO por un largo tiempo. Esta última además se expresa bajo la inducción de agentes pro-inflamatorios como el LPS y las citoquinas Th1 (Herrero y col 1996, Stuehr y col 1997).

Se ha descrito una cuarta isoforma de la NOS, la NOS mitocondrial que se encontraría activa constitutivamente y participaría en los procesos de respiración mitocondrial y metabolismo del oxígeno (Boveris y col 1999). Se desconoce hasta el momento si se encuentra presente en los órganos reproductivos de ratón y si exhibe alguna relevancia en la fisiología reproductiva.

Funciones del óxido nítrico

Diversas líneas de investigación han informado que el NO participa en la regulación de los eventos reproductivos. Friden y col (2000) han sugerido que el NO actúa como un factor luteolítico en humanos y Johnson y col (1999) han encontrado que el NO presenta un efecto antiesteroideogénico en células luteales humanas en cultivo. Mediante el uso de dadores de NO, varios grupos han confirmado que el NO modula negativamente la esteroideogénesis ovárica en células luteales de rata (Olson y col 1996, Vega y col 1998, Motta y col 1999). Por el contrario, Dong y col (1999) demostraron que el tratamiento con liberadores lentos de NO como el Deta/NO aumenta la biosíntesis de P en forma dosis dependiente mientras que un inhibidor competitivo de la NOS no altera la producción de esteroides.

En estudios previos de nuestro laboratorio hemos encontrado que el NO, producido en el ovario durante la fase luteal, presenta un efecto antiesteroideogénico, disminuyendo los niveles de progesterona (Motta y col

1999). Además, el NO aumenta la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en ratas pseudopreñadas (Motta y col 2001).

Función del óxido nítrico en la preñez temprana

La NOS juega un rol muy importante en el desarrollo peri-implantatorio del ratón. Las tres isoformas de la NOS están presentes en los sitios de implantación, siendo más prominentes la iNOS y la eNOS dentro del cono ectoplacentario, en el miometrio y en la zona decidual primaria; además se expresan en mayor medida en los sitios de implantación frente a las zonas interimplantatorias; por último, las NOS se encuentran elevadas durante el período peri-implantatorio (días 6-8) (Purcell y col 1999). El NO es importante en la supervivencia embrionaria temprana (Gouge y col 1998). Sin embargo, niveles excesivos demostraron ser perjudiciales para el embrión pre-implantatorio e implantatorio de ratón (Barroso y col 1998). El NO en el miometrio en humanos y en rata juega un rol clave en la relajación uterina durante la preñez (Natuzzi y col 1993), y tiene un rol importante en la decidualización, en la invasión por el trofoblasto y en la vasodilatación de vasos deciduales, placentarios y uterinos (Sladek y col 1997).

Relación Ciclooxygenasa – Oxido Nítrico

En trabajos previos de nuestro laboratorio (Motta y col 1997, 1998, 1999) se ha encontrado una estrecha relación entre el NO y la producción de prostanoïdes en el mecanismo de regulación del desarrollo luteal. Dado que el NO puede interactuar con el átomo de hierro situado en el sitio activo de varias enzimas (Tsai 1994), la COX, que presenta en su centro catalítico un grupo hemo coordinado por histidinas, es susceptible a la regulación por NO (Goppelt-Struebe 1995). En este aspecto, se ha demostrado que el NO puede activar a la COX-2 durante los procesos pro-inflamatorios conduciendo a la producción de prostaglandinas como la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Salvemini y col 1993).

Las citoquinas inducen la síntesis de NO vía la iNOS (Herrero y col 1996) y también activan la COX-2 (isoforma inducible) estimulando por lo tanto la síntesis de prostaglandinas (Salvemini y col 1997).

Óxido Nítrico y estrés oxidativo

Se ha encontrado que la NOS puede generar aniones superóxido, peróxido de hidrógeno al igual que NO. En células con niveles muy bajos de L-arginina, la producción del anión superóxido está aumentada, mientras que la presencia de L-arginina reduce su generación. El anión superóxido generado a bajas concentraciones de L-arginina reacciona con el NO generando peroxinitritos de gran toxicidad (Xia y col 1996).

5. Balance oxidante/ antioxidante

Especies reactivas del Oxígeno

Los radicales libres han sido descritos como entidades moleculares que poseen al menos un electrón desapareado, gran reactividad y vida media muy corta. Generalmente, los efectos directos e indirectos de los radicales libres se clasifican en tres categorías: daño al DNA, daño a las proteínas y peroxidación lipídica que principalmente afecta la función y la estructura de las membranas plasmáticas.

Las membranas biológicas son un posible blanco de ataque por estos agentes oxidantes ya que poseen fosfolípidos con alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, que son particularmente sensibles a las reacciones de oxidación.

Cuando los radicales libres del oxígeno (ROS) aumentan su concentración o cuando bajan la defensas antioxidantes del organismo, o ambas, se genera estrés oxidativo. El balance oxidante/antioxidante ha demostrado ser fundamental en las funciones reproductivas. En el tracto

reproductor femenino, interviene en la regulación del desarrollo luteal, la ovulación, la fecundación, la implantación y el mantenimiento de la preñez.

Las defensas antioxidantes del organismo se dividen en enzimáticas y no enzimáticas. Las enzimas antioxidantes más abundantes en las células son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión reductasa. Los antioxidantes no enzimáticos consisten en vitaminas y el metabolito glutatión. Este metabolito se mantiene en la célula en estado reducido, y cuando pasa a su forma oxidada, si no es reducido nuevamente, es expulsado por la célula (Griffith 1999).

La estimación del balance oxidante/antioxidante es un excelente indicador del estado general de un tejido, y el estrés oxidativo puede estar asociado a un proceso inflamatorio.

6. Síndrome del ovario poliquístico (SOP)

El síndrome del ovario poliquístico (SOP) es la endocrinopatía más frecuente en mujeres en edad reproductiva. El 50% de mujeres con pérdidas frecuentes de embarazos y el 87% de mujeres con ciclos menstruales irregulares presentan SOP (Abbott 2002). Esta condición lleva a desórdenes metabólicos que afectan a la salud de las mujeres afectadas. Dado que su etiología no ha sido completamente caracterizada es difícil la comparación epidemiológica.

Diagnóstico y clínica: En 1935, Stein y Leventhal publicaron un artículo sobre sus hallazgos en 7 mujeres con amenorrea, hirsutismo, obesidad y una apariencia poliquística de sus ovarios, una de las primeras descripciones del complejo fenotipo del SOP (Stein y Leventhal 1935). Los signos y síntomas que se presentan son heterogéneos y varían con el tiempo, de ahí la dificultad en su diagnóstico.

Se desprende de los tres últimos consensos (NIH 1990, Rotterdam 2003 y Androgen Excess Society 2006) referidos a la patología que será diagnosticado SOP cuando se descarten: hiperplasia adrenal congénita, falla ovárica prematura, tumores de ovario, síndrome de Cushing, prolactinoma y

desórdenes de las glándulas tiroideas y cuando estén presentes por lo menos dos componentes de la tríada:

- ◆ oligo- o anovulación (usualmente manifestado como oligo- o amenorrea)
- ◆ niveles elevados de andrógenos circulantes (hiperandrogenemia) o manifestaciones clínicas de exceso de andrógenos (hiperandrogenismo)
- ◆ ovarios poliquísticos (por acumulación de estrógenos en folículos preovulatorios) (Ehrmann 2005).

En el pasaje de la adolescencia a la adultez las anomalías fenotípicas y clínicas del SOP empeoran, y están comúnmente acompañadas por infertilidad, frecuentes abortos durante el primer trimestre y mayor tendencia a la diabetes gestacional (Glueck y col 2005, Lo y col 2006, Crave y col 1995, Velásquez y col 1994, 1997). Las mujeres con SOP pueden presentar síndrome de insulino-resistencia, obesidad, hiperlipidemia, riesgo cardiovascular incrementado, elevada relación LH/FSH (hormona luteinizante/hormona folículo-estimulante), hirsutismo, acné, un patrón masculino de pérdida del pelo y acantosis nigricans.

Etiología: La etiología del SOP no ha sido aún completamente dilucidada. Sin embargo, existen algunas hipótesis al respecto:

Obesidad: si bien la obesidad en sí misma no es la causa del SOP, una adiposidad excesiva puede exacerbar los desarreglos reproductivos y metabólicos asociados. Los síntomas del SOP usualmente comienzan alrededor de la menarca, pero también se puede expresar después de la pubertad como el resultado de modificaciones ambientales, tales como aumento de peso. Además, un ambiente intrauterino aberrante está implicado en la patogénesis, particularmente de sus componentes metabólicos (Sagle y col 1988, Balen y col 1993, Franks 1995, Abbot y col 1998, 2002, Glueck y col 2002, Vivas 2005, Ehrmann 2005).

Insulino-resistencia: la insulino-resistencia y la hiperinsulinemia compensatoria tienen un rol central en la patofisiología del SOP (Figura 3) (Glueck y col 2005, Moran y col 2003, Pasqualini y col 2000, Glueck y col 1999, 2001, Harborne y col 2003, Ibáñez y de Zegher 2005, Moghetti y col 2000, Sepilian y Nagamani 2005, Spranger y col 2004, Nestler y col 1991,

1998, 2003, Nestler y Jakubowicz 1997, Nestler 1997, Baillargeon y col 2003, 2004).

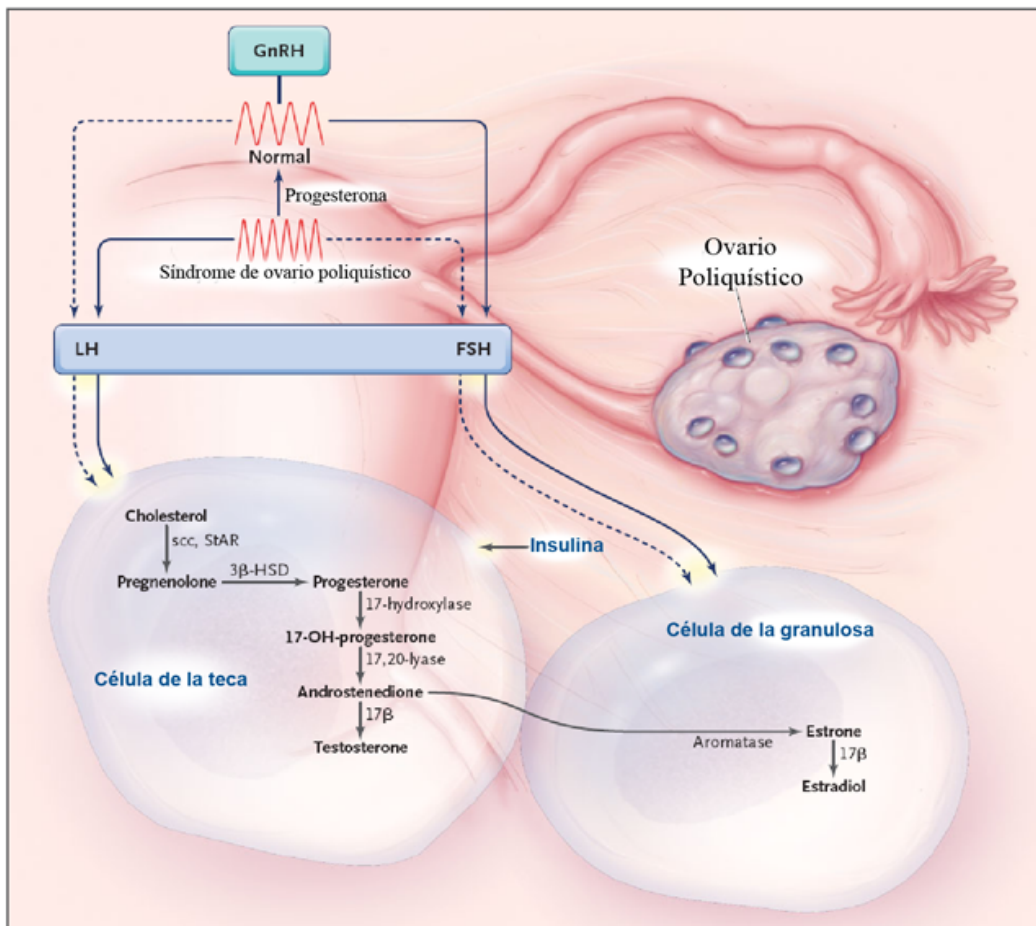


Figura 4: Rol de la insulina en la regulación de la esteroidogénesis ovárica durante el desarrollo del Síndrome del Ovario Poliquístico.

Modelos experimentales: debido a las limitaciones existentes para estudiar las fallas que envuelve esta patología en humanos, los modelos animales son de gran importancia para conocer los mecanismos involucrados y los posibles tratamientos. Numerosos modelos han sido desarrollados en diversas especies (rata, ratón, mono Rhesus, oveja, Guinea pig). En ellos se reproducen algunos de los aspectos de la patología humana. Basados en el conocimiento de que la dehidroepiandrosterona (DHEA) es uno de los principales andrógenos secretados por los ovarios de mujeres

con SOP y el de mayor duración en circulación, un modelo de SOP fue desarrollado en roedores mediante la administración de DHEA (Mahlesh y Greenblatt 1962; Roy y col 1962); dicho modelo exhibe muchas de las principales características del SOP en humanos (Lee y col 1991, 1998, Henmi y col 2001, Luchetti y col 2004, Anderson 1992, 1997).

En la Figura 5 se presenta un esquema de la cascada hormonal esteroideogénica femenina, donde se ubica la DHEA.

Embarazo con SOP

Los elevados niveles de andrógenos en las mujeres con SOP disminuyen la tasa de fertilidad de las mismas debido a las fallas en la ovulación y la baja receptividad uterina. Sin embargo pueden lograrse embarazos naturalmente o por técnicas de fertilización asistida. El problema radica en que las mujeres con SOP presentan elevadas tasas de abortos espontáneos durante el primer trimestre de embarazo.

Las mujeres sanas, en el primero y segundo trimestres de embarazo, muestran niveles elevados de DHEA respecto de mujeres no embarazadas (Tagawa y col 2004). La DHEA sostiene el mantenimiento de la gestación temprana como un precursor de esteroides sexuales (Miki y col 2002). Además, se ha visto que in vitro modula la respuesta inmune favoreciendo la producción de citoquinas de tipo Th2, favorables para el mantenimiento del embarazo (Du y col 2002). Sin embargo, niveles muy elevados de DHEA llevan a un desbalance en la función ovárica, el cual afecta la respuesta

endometrial, resultando en aborto (Okon y col 1998, Sir-Petermann y col 2002).

En el presente trabajo de tesis, y con el objetivo de desarrollar un modelo murino que reproduzca el ambiente endócrino e inmune de una mujer con SOP durante el primer trimestre de embarazo, ha sido aplicado el modelo de Malesh y Greenblatt a la preñez temprana. Este modelo consiste en la administración de DHEA a ratones hembra Balb/c preñadas.

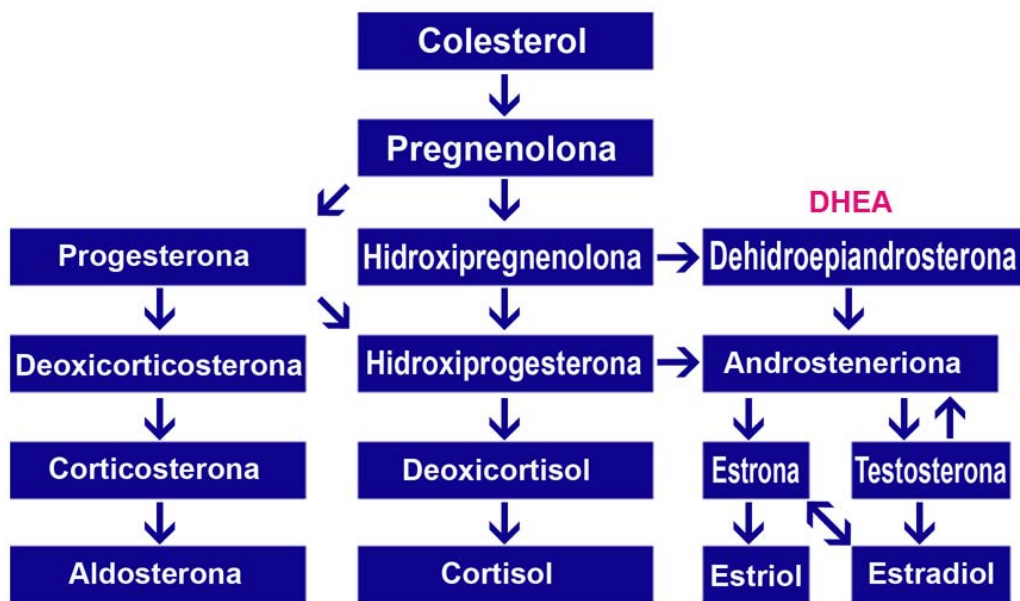


Figura 5: Esteroidogénesis femenina, lugar de la dehidroepiandrosterona (DHEA) en la cascada.

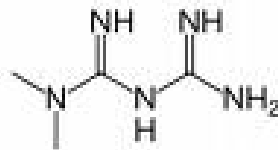
7. La metformina

La droga sensibilizante a la insulina metformina es ampliamente utilizada en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (Eriksson y col 2007) y del SOP (Harborne y col 2003).

Origen de la metformina: Originalmente se utilizaba el extracto de una planta, la Galega officinalis, que tenía efectos anti-hiperglucemiantes, en el tratamiento de la diabetes. Luego se descubrió que los componentes activos de dicho extracto son la guanidina y sus derivados diguanidinas y biguanidinas. La metformina fue inicialmente aprobada en Europa en los años 80 y en la actualidad existen numerosos laboratorios comerciales que la fabrican.

Estructura de la metformina:

La metformina (N, N`dimetil-biguanida) tiene la siguiente estructura química:



Metformina en el tratamiento del SOP

La N, N`-dimetilbiguanida (metformina) es un agente sensibilizante a la insulina. Su utilización en la terapia del SOP es cada vez más extendido y aceptado. Sin embargo, se desconoce la totalidad del mecanismo de acción. La metformina restaura la sensibilidad a la insulina en mujeres con SOP insulino-resistentes (Fedorcsak y col 2003, Harborne y col 2003a, Lord et al

2003). Además, esta droga trae beneficios metabólicos, reproductivos y clínicos (Harborne y col 2003b). Disminuye los niveles de andrógenos y mejora la frecuencia en la ovulación y los ciclos menstruales en pacientes con SOP (Diamanti-Kandarakis y col 1998, Ehrmann y col 1997, Glueck y col 2001, la Marca y col 2002, Negri y col 2000, Nestler y Jakubowicz 1996, Jakubowicz y col 2001, Velásquez y col 1997) y el tratamiento de mujeres con SOP en etapas tempranas del embarazo previene abortos (Jakubowicz y col 2001, Glueck y col 2004, Khattab y col 2006).

Metformina y embarazo con SOP

Cada vez más mujeres con SOP quedan embarazadas luego del tratamiento con metformina (Vandermolen y col 2001, Fedorcsak y col 2003, Harborne y col 2003b). La metformina es una droga de clase B por la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos (www.fda.gov) y se ha demostrado que no es teratogénica y no se encontraron indicios de metformina en lactantes de madres que han sido tratadas durante el embarazo (Feig y col 2007, Elizur y Tulandi 2008, Goldenberg y Glueck 2008). Su uso durante el embarazo también es cada vez más extendido y aceptado. El tratamiento con metformina de mujeres con SOP durante las etapas tempranas del embarazo previene abortos (Glueck y col 2002, Khattab y col 2006). Sin embargo es necesario ampliar el conocimiento sobre los mecanismos y efectos de esta droga en la gestación, dado que no se conocen completamente.

Metformina e insulina/glucosa: la metformina disminuye la hiperglucemia y tiene efectos beneficiosos sobre los lípidos circulantes, sin afectar la secreción de insulina (Stumvoll y col 1995). La metformina disminuye los niveles de glucosa aumentando su ingreso en los músculos y disminuyendo su producción por el hígado (Hundal y col 2000). Se ha descubierto que es necesaria la activación de la AMP kinas para la disminución de la producción de glucosa y el aumento en la oxidación de ácidos grasos por la metformina (Fryer y col 2002, Elia y col 2006). A diferencia de los agentes hipoglucemiantes utilizados tradicionalmente, como las sulfonilureas o

insulina, la metformina mejora las funciones cardiovasculares y reduce los riesgos cardiovasculares (Zhou y col 2001).

Metformina y ovarios/esteroidogénesis: La metformina modula la esteroidogénesis ovárica ejerciendo un efecto directo sobre las células ováricas (Mansfield y col 2003), regulando la síntesis de progesterona a través de AMPK, y de estradiol por regulación génica (Figura 6, Tosca y col 2006). Además, de manera indirecta, la metformina modula las concentraciones de insulina y ésta controla la esteroidogénesis ovárica (Willis y Franks 1995).

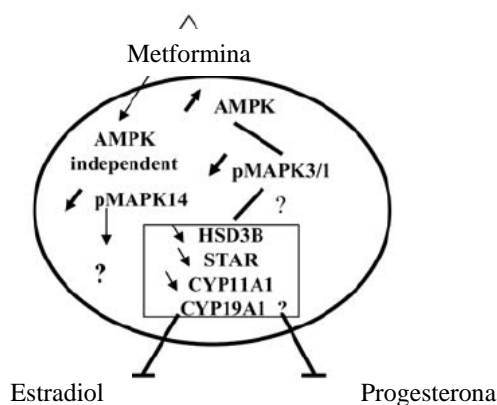


Figura 6: Modulación directa de la esteroidogénesis por metformina en las células de la granulosa.

Metformina y estrés oxidativo: tanto la diabetes como el SOP vienen acompañados por una capacidad antioxidante disminuida, lo cual contribuiría con el conocido riesgo cardiovascular incrementado (Fenkci y col 2003). La metformina tiene efectos antioxidantes actuando de dos maneras: directa, atrapando las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Faure y col 1999, Ceriello 2000, Srividhya y col 2002, Bonnefont-Rousselot y col 2003), e indirecta, modulando la producción intracelular de ROS (Bonnefont-Rousselot y col 2003).

Metformina y óxido nítrico: Se ha encontrado que la metformina es capaz de modular agentes vasodilatadores mediante el estímulo de la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) en el mesenterio de ratas diabéticas (Sartoretto y

col 2005). Además, el sistema del óxido nítrico fue propuesto como un intermediario de la acción de la metformina (Zou y col 2004).

Metformina y sistema inmune: La metformina modula la diferenciación de linfocitos (Stefanovic y col 1999) y regula la producción de prostaglandinas y los porcentajes de linfocitos T CD4+/CD8+ en ratones hembra prepúberes (Elia y col 2006, Luchetti y col 2004).

Hipótesis de trabajo: La respuesta Th2 favorece el éxito de la preñez mientras que el predominio de una respuesta del tipo Th1 induce aborto. Durante la preñez se establece un fino equilibrio entre las respuestas Th1/Th2.

Cuando la preñez es exitosa la progesterona regula las respuestas Th1/Th2 a través de la acción inmunomoduladora del *factor bloqueante inducido por progesterona* o PIBF.

El PIBF es capaz de: 1) inhibir las respuestas del tipo Th1, 2) favorecer las del tipo Th2, 3) inhibir la liberación de ácido araquidónico (sustrato de la ciclooxigenasa y precursor de la síntesis de las prostaglandinas).

La respuesta del tipo Th1 estimula la producción de óxido nítrico (NO), genera estrés oxidativo y regula la producción de prostaglandinas.

El Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) es una de las endocrinopatías más frecuentes que afectan a mujeres en edad reproductiva. Se caracteriza por elevados niveles de andrógenos, quistes ováricos y problemas ovulatorios. El SOP está asociado a hirsutismo, obesidad, insulina resistencia, diabetes tipo 2, riesgo cardiovascular incrementado y cáncer de endometrio.

Las mujeres con SOP presentan 75- 80 % de abortos espontáneos durante el primer trimestre de embarazo.

La metformina (N,N´dimetil biguanida) es una droga sensibilizante a la insulina que se utiliza en el tratamiento de diabetes tipo 2 y de SOP aún durante el embarazo, pero cuyo mecanismo de acción no se conoce completamente.

De acuerdo a estos antecedentes, la **hipótesis** del presente trabajo de tesis fue:

La condición de hiperandrogenismo que presentan las mujeres con SOP provoca abortos durante el primer trimestre de embarazo debido al desencadenamiento de una cascada de eventos sistémicos y locales cuyo eje podría ser el Factor Bloqueante Inducido por Progesterona.

La eficacia de la metformina como tratamiento radica en la modulación directa o indirecta de esta cascada.

Objetivos: Para comprobar esta hipótesis se planteó el siguiente objetivo general: **Estudiar las posibles alteraciones de la cascada Progesterona-PIBF- balance de la respuesta Th1/Th2 por efecto del hiperandrogenismo y evaluar el mecanismo de acción de la N,N´dimetil biguanida metformina como tratamiento.**

Objetivos específicos

Analizar en un modelo murino de hiperandrogenismo durante la preñez temprana de ratones BALB/c:

1. Reabsorción embrionaria producida por el hiperandrogenismo y acción de la metformina.
2. Regulación de la esteroidogénesis ovárica por el hiperandrogenismo y posible reversión por metformina.
3. Expresión del *factor bloqueante inducido por progesterona* en los sitios de implantación provenientes de animales preñados e hiperandrogenizados. Acción de la metformina.
4. Compromiso del sistema inmune durante el hiperandrogenismo en la preñez temprana y acción de la metformina, particularmente sobre: subtipos linfocitarios T, CD4+ y CD8+ y sobre la producción de citoquinas Th1 y Th2.
5. Producción de óxido nítrico y prostaglandinas en los sitios de implantación luego de la hiperandrogenización y el rol del tratamiento con metformina.
6. Expresión de las enzimas limitantes de la producción de óxido nítrico y prostaglandinas.
7. Estrés oxidativo en los sitios de implantación producido luego de la hiperandrogenización. Rol de la metformina.

Capítulo II

Materiales

y

métodos

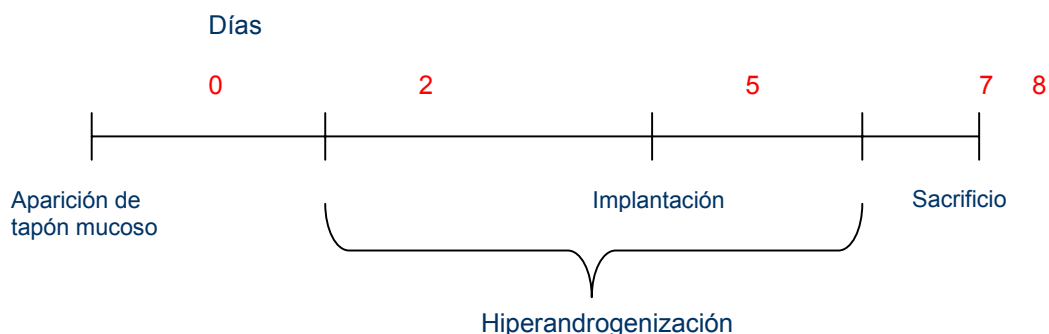
1. Animales:

En el presente trabajo se utilizaron hembras preñadas de ratón de la cepa Balb/c: hembras vírgenes de 8 a 12 semanas de edad fueron apareadas con machos de la misma edad. El día de aparición del tapón mucoso vaginal (post-coital) fue considerado como el día 0 de preñez. En las condiciones de nuestro laboratorio la implantación embrionaria ocurre en el día 5 de preñez. En el día 8 los animales fueron sacrificados para su posterior estudio. Los animales fueron mantenidos a temperatura controlada (22 ° C) e iluminación (14 h-luz, 10-h oscuridad; luces encendidas a las 05:00) y tuvieron acceso ad libitum a alimento Purina rat chow y agua. Todos los procedimientos que involucraron animales se llevaron a cabo de acuerdo con la *Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio* (CONICET, 1996) y los estudios fueron aprobados por el Comité Independiente de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

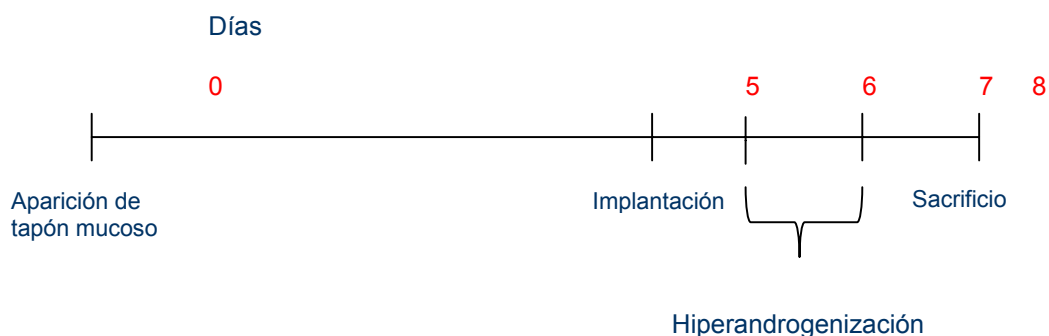
Modelo experimental:

Se utilizaron dos modelos de hiperandrogenización en preñez temprana:

1) **Peri-implantatorio:** los animales preñados fueron hiperandrogenizados durante 6 días, desde el día 2 hasta el día 7 de preñez, mediante la inyección subcutánea de dehidroepiandrosterona (DHEA), en una dosis de 60 mg / Kg masa corporal, disuelto en aceite de maíz. En el día 8 de preñez, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical.



2) **Post-implantatorio:** los animales preñados fueron hiperandrogenizados durante 2 días, en los días 6 y 7 de preñez, mediante la inyección subcutánea de DHEA, en una dosis de 60 mg / Kg masa corporal, disuelto en aceite de maíz. En el día 8 de preñez, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical.



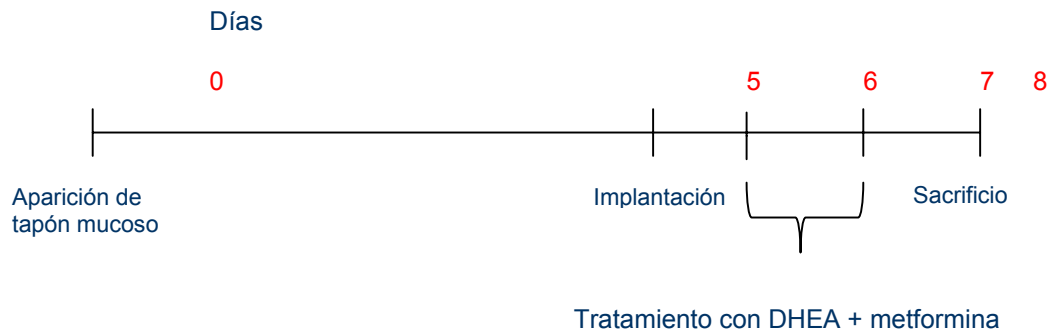
La dosis suministrada de DHEA es equivalente a los niveles circulantes de dicha hormona en una mujer con poliquistosis ovárica.

Se observó si existía reabsorción embrionaria. Se midieron los valores de progesterona (P) de cada animal y se estudió la histología de los sitios de implantación teñidos con hematoxilina-eosina.

Dado que en el modelo de hiperandrogenización peri-implantatoria la implantación fue imposibilitada en el 100 % de los casos, se continuó trabajando con el modelo **post-implantatorio**.

A continuación se estableció un modelo de hiperandrogenización y tratamiento simultáneo con metformina:

3) **Tratamiento con metformina:** los animales fueron hiperandrogenizados con DHEA (inyección subcutánea, 60 mg / Kg masa corporal, disuelto en aceite de maíz) y tratados simultáneamente con metformina, administrada vía oral por cánula en una dosis de 240 mg / Kg masa corporal, durante 2 días, en los días 6 y 7 de preñez. En el día 8 de preñez, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical.



Los *grupos experimentales* fueron:

- **Grupos controles:** * Vehículo: inyección subcutánea de 0,1 ml de aceite de maíz y administración vía oral por cánula de 0,1 ml de agua destilada, en los días 6 y 7 de preñez.

* Control preñez: no recibieron tratamiento.

Dado que no existieron diferencias significativas entre los resultados de ambos grupos control y para mayor claridad en la presentación de los resultados, se representó únicamente una barra, la correspondiente al Control preñez.

- **Grupo metformina:** administración vía oral por cánula de metformina en una dosis de 240 mg / Kg masa corporal, disuelta en 0,1 ml de agua destilada, en los días 6 y 7 de preñez.

- **Grupo DHEA:** inyección subcutánea de dehidroepiandrosterona en una dosis de 60 mg / Kg masa corporal, disuelta en 0,1 ml de aceite de maíz, en los días 6 y 7 de preñez.

- **Grupo DHEA + metformina:** inyección subcutánea de dehidroepiandrosterona en una dosis de 60 mg / Kg masa corporal disuelta en aceite de maíz y administración vía oral por cánula de metformina en una dosis de 240 mg / Kg masa corporal disuelta en agua destilada, en los días 6 y 7 de preñez.

Con el objetivo de estudiar si alguno de los tratamientos producía efectos adversos a largo plazo, se realizó un seguimiento de 3 grupos adicionales de 10 animales cada uno hasta el parto: Control, metformina y DHEA + metformina. Estos animales recibieron los tratamientos respectivos en los días y dosis que se detallaron anteriormente, y fue determinada su masa corporal periódicamente a lo largo de la gestación. Se registró la fecha del parto y luego se realizó un breve seguimiento de las crías: morfología y masa corporal al nacer, y ciclo estral más tarde. Encontramos que los animales mostraron estos parámetros normales, y no observamos diferencias entre los 3 grupos.

Se utilizaron 16 animales por grupo experimental.

2. Obtención de muestras:

Inmediatamente después del sacrificio se extrajeron los siguientes tejidos para su posterior estudio: sangre, ovarios, útero y ganglios retroperitoneales.

Sangre
Útero
Ovarios
Ganglios



- **Sangre:** fue obtenida de 16 animales por grupo por punción retroorbital previo al sacrificio e inmediatamente centrifugada durante 15 minutos a 3000 rpm para obtener el suero, que fue guardado a -70° C para su posterior utilización en la determinación de hormonas séricas por radioinmunoensayo y citoquinas por ELISA. Las técnicas se detallan más adelante.

- **Útero:** los tejidos uterinos de 8 animales por grupo fueron divididos en sus dos cuernos, uno fue inmediatamente fijado en paraformaldehído 4 % (peso/vol) y guardado a 4° C para posteriores estudios histológicos e inmunohistoquímicos (PIBF, COX-2, iNOS y eNOS) y el otro fue separado de sus embriones y luego guardado a -70° C para la posterior determinación de expresión de COX2 por western blotting, concentración de prostaglandinas liberadas por radioinmunoensayo y parámetros del estrés oxidativo (nitritos por el método de Griess, peroxidación lipídica por TBA-RS, superóxido dismutasa catalasa y glutatión por métodos colorimétricos). Las técnicas se detallan más adelante.

- **Ovarios:** fueron obtenidos de 8 animales por grupo y guardados a -70° C para la posterior determinación de expresión de COX2 e iNOS por western blotting, y concentración de prostaglandinas liberadas por radioinmunoensayo. Las técnicas se detallan más adelante.

- **Ganglios retroperitoneales:** los ganglios de 5 animales por grupo fueron disgregados inmediatamente luego de su obtención mediante malla metálica en medio de cultivo a 0° C para obtener una suspensión de linfocitos, que fueron inmunomarcados para los subtipos T CD4+ / CD8+, fijados en paraformaldehido 4 % y guardados a 4 ° C hasta su determinación en citómetro de flujo. Las técnicas se detallan más adelante.

3. Procedimientos experimentales:

a) *Aspecto de los sitios de implantación*

Macroscópico

Se aislaron los úteros de las hembras y se observó macroscópicamente si estaban preñadas o si habían sufrido reabsorción embrionaria. Esto fue determinado realizando una incisión longitudinal en el miometrio a la altura de cada sitio de implantación y observando si estaba presente la decidua rosada con el embrión (preñez) o si la decidua era morada y de contenido hemorrágico (reabsorción embrionaria). Luego se calculó el porcentaje de reabsorción embrionaria en los distintos grupos experimentales. Dado que los animales con reabsorción embrionaria presentaban todos los sitios de implantación reabsorbidos, se contabilizó el número de animales con reabsorción embrionaria y no el número de sitios reabsorbidos.

Microscópico

Los tejidos uterinos obtenidos fueron fijados en paraformaldehído 4 % (m/v), luego los sitios de implantación fueron incluidos en parafina, cortados con micrótopo en secciones de 6 μm y puestos en portaobjetos cubiertos con gelatina (gelatin-coated glass slides, Biobond; British Biocell International, Cardiff). Los cortes seriados en blanco fueron observados al microscopio óptico y fueron seleccionados sólo los cortes que pasaban por el centro del sitio de implantación. Luego, los cortes fueron secados al aire por 2 h previo a ser fijados en acetona a 4° C por 5 minutos, lavados en PBS (pH= 7.3) y coloreados con hematoxilina-eosina (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA). Las secciones coloreadas de los sitios de implantación fueron analizadas en cuanto a preñez o reabsorción, decidualización y células del trofoblasto, y por último fueron fotografiadas las más representativas.

b) Concentración de progesterona y estradiol en suero

Los sueros de las hembras fueron obtenidos por centrifugación de la sangre. Las hormonas progesterona (P) y estradiol (E) fueron determinadas por radioinmunoensayo.

Técnica de radioinmunoensayo (RIA) para la determinación de progesterona y 17 beta estradiol: (Motta y col., 2001b). Los anticuerpos, tanto de P como de E fueron provistos por el Dr. GD Niswender, Colorado State University, Ford Collind, CO). El antisuero para P posee una alta especificidad, con baja reactividad cruzada: < 2 % para la 20 alfa hidroxiprogestero y para deoxicorticosterona y < 1 % para los otros esteroides presentes en el suero. La sensibilidad es de 5-10 pg/tubo. El antisuero para E presenta una baja reactividad cruzada: < 1 % para P y testosterona, < 5 % para estriol y < 10 % para estrona. Los resultados fueron expresados como ng/ml suero.

c) *Niveles de glucosa en sangre, de insulina en suero y evaluación de la insulino resistencia a través del índice HOMA (“Homeostasis Model Assessment”)*

Determinación de glucosa en sangre: se utilizaron tiras reactivas Hemo–Glukotest (Roche, Alemania) para la determinación visual (por color) dentro del rango de 20–800 mg/100ml (1–44mm) en sangre obtenida de la cola. El principio del test utiliza la reacción glucosa oxidasa- peroxidasa. Los resultados fueron expresados en mg glucosa/100ml sangre.

Determinación de insulina en suero: se utilizó el Coat-A-Count insulin method (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, EUA). El método consiste en un radioinmunoensayo de fase sólida. El anticuerpo es inmovilizado en la pared de tubos de polipropileno y simplemente decantando el sobrenadante es suficiente para terminar la competencia y aislar la fracción de insulina radioactiva unida al anticuerpo. Las muestras fueron luego leídas en un contador gama. La sensibilidad fue de 1.2 μ IU insulina/ ml suero. Los resultados fueron expresados como pg insulina/ml suero.

Cálculo del HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment, Matthews y col, 1985): este índice es un buen indicador del aprovechamiento de la insulina por el organismo, y es utilizado en la clínica como una buena aproximación para evaluar insulino-resistencia. Fue calculado según la siguiente fórmula

$$\text{HOMA-IR} = \text{Concentración de insulina (mU/ml)} \times \text{Concentración de glucosa (mmol/l)} \times \text{BMI}^{-1}$$

Donde:

BMI es el índice de masa corporal y es igual a: $\text{Peso} / \text{altura}^2$

Se calculó el HOMA-IR para cada animal y luego se obtuvo un promedio para cada grupo experimental.

d) Determinación de citoquinas del tipo Th1 y Th2 en suero

El suero de los animales fue obtenido como se describió anteriormente y fue utilizado para la determinación de citoquinas con el kit de ELISA Ready-Set Go (eBioscience, USA) para Th2/Th1 de ratón. Las citoquinas medidas fueron: IL-6, IL-4, IL-2 e IFN gamma. El experimento fue llevado a cabo siguiendo las indicaciones del proveedor del kit. En breve, placas pre-fijadas con anticuerpo contra conejo desarrollado en cabra fueron incubadas toda la noche con 100 μ l de muestra o standard a 4° C. Luego, fueron agregados 100 μ l/well de diluyente e incubados a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de aspirar y lavar 5 veces con diluyente, fue agregado el anticuerpo biotinilado contra la citoquina correspondiente de ratón e incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar 2 veces, las placas fueron incubadas con 100 μ l/well de avidina-peroxidasa diluida 1:250 durante 30 min. La reacción fue detenida mediante el agregado de 100 μ l/well de stop reaction y se midió la densidad óptica a 450 nm. La sensibilidad del test es de 0,78 pg/ml para cada citoquina. Los resultados fueron expresados como pg citoquina/ml suero.

e) *Abundancia en los sitios de implantación y ovarios de:*

- ✓ *Factor Bloqueante Inducido por Progesterona (PIBF)*
- ✓ *Ciclooxigenasa 2 (COX-2)*
- ✓ *Óxido nítrico sintasa (NOS)*

Inmunohistoquímica: Los tejidos uterinos obtenidos de las hembras luego del sacrificio en el día 8 de preñez fueron fijados en paraformaldehído 4 % (m/v), luego los sitios de implantación incluidos en parafina, cortados con micrótopo en secciones de 6 µm y puestos en portaobjetos cubiertos con gelatina (gelatin-coated glass slides, Biobond; British Biocell International, Cardiff). Los cortes seriados en blanco fueron observados al microscopio óptico y fueron seleccionados sólo aquéllos que pasaban por el centro del sitio de implantación. Estos cortes fueron utilizados para la inmunolocalización de PIBF, COX-2, eNOS e iNOS mediante el kit de tinción por inmunoperoxidasa CSA/HRP (Dako). Brevemente, los cortes fueron desparafinados, rehidratados en PBS y bloqueados en TNB. La actividad peroxidasa endógena fue bloqueada con peróxido de hidrógeno 0.1 % (v/v) por 15 min, y luego las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente: para localizar el PIBF, anticuerpo policlonal anti-PIBF diluido 1:100 a temperatura ambiente 60 min; para COX-2, anticuerpo policlonal anti-COX2 diluido 1:50 (Cayman, USA); para eNOS, anticuerpo policlonal anti-eNOS diluido 1:200; para iNOS, anticuerpo policlonal anti-iNOS diluido 1:200, estos tres últimos incubados overnight a 4° C. El anticuerpo policlonal IgG anti-PIBF recombinante fue generado en el laboratorio de la Dra. Julia Szekeres-Bartho (Universidad de Pecs, Hungría) inmunizando conejos con el extremo N-terminal de 48-kDa de PIBF recombinante. Se realizaron secciones sin anticuerpo primario como controles negativos. Luego de ser lavados con PBS, los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de conejo biotinilado diluido 1:100, a temperatura ambiente por 30 min. Finalmente, fueron revelados con una solución que contiene el complejo estreptavidina-peroxidasa y diaminobenzidina (DAB), contrateñidos con hematoxilina y montados con gelatina-glicerol. Las secciones fueron

analizadas para determinar la localización de cada una de las proteínas analizadas y por último fueron fotografiadas las más representativas.

Western blotting: Los ovarios o los sitios de implantación sin embriones fueron homogeneizados a 4° C en buffer lisis (Tris-HCl 20 mM, pH = 7.4, NaCl 150 mM y Triton X-100 1% v/v) suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 0.5 mM, N-CBZ-L-fenilalanina clorometilcetona 0.025 mM y L-1-tosilamida-2-fenil-etilclorometilcetona 0.025 mM) con un homogeneizador de teflón. Los homogenatos fueron centrifugados a 1500 x g durante 10 min y se guardaron los sobrenadantes. La concentración de proteínas se midió por el método de Bradford (Bio-Rad). Después de hervir las muestras durante 5 min en agua, se sembraron 90 µg de proteínas de cada muestra en un gel 8% SDS-poliacrilamida. La electroforesis se desarrolló a 40 V durante la primer hora (hasta que el frente de corrida atravesara el gel concentrador) y luego a 100 V por 4 h. Las proteínas separadas de esta forma fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa en buffer de transferencia (metanol 20% v/v; glicina 0.19 M y Tris-base 0.025 M, pH = 8.8) durante 1.5 h a 4° C. Las membranas fueron luego bloqueadas 1.5 h en BSA 0.1 % en T-TBS 0.1 % v/v a temperatura ambiente. Se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo policlonal de conejo anti-COX2 diluido 1:1000 o anti- iNOS diluido 1:200 (Cayman, USA). Luego las membranas fueron lavadas e incubadas por 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti- IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1:5000 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Por último, las bandas fueron detectadas incubando las membranas durante 15 min con el sustrato para fosfatasa alcalina BCIP-NBT (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Se cuantificaron las intensidades y áreas de las bandas obtenidas mediante densitometría usando el programa Sigma Gel y fueron expresadas como Densidad (Intensidad/ Área). El control de carga de proteínas se realizó mediante tinción de las membranas con Ponceau-S.

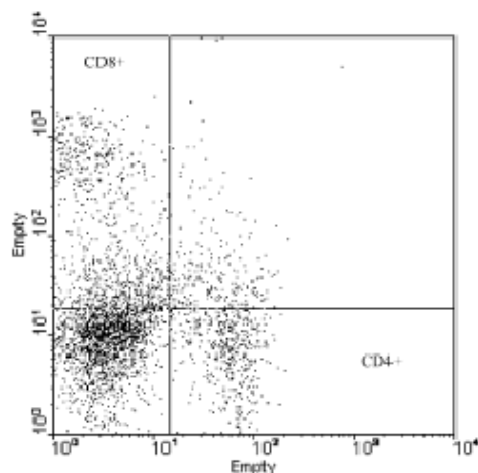
f) *Expresión de linfocitos T CD4+/ CD8+*

Aislamiento y purificación de linfocitos de ganglios linfáticos para cuantificación por citometría de flujo:

Los ganglios retroperitoneales (drenantes de órganos reproductivos) fueron separados de las hembras y los linfocitos fueron disgregados de los mismos enzimáticamente en medio de cultivo (medio 199, NaHCO₃ 25mM, Hepes 26mM y penicilina 50 IU/ml) con colagenasa libre de tripsina (740 IU/100 mg tejido) y DNAsa (14 IU/100 mg tejido). Después de 90 min, los linfocitos fueron lavados dos veces en medio de cultivo, dos veces en solución buffer salina Dulbecco fosfato libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ (PBS), y dos veces con medio de cultivo con EDTA (1 mM). Las células se contaron en un hemocitómetro, se controló la viabilidad que fue >80% por el método de trypan blue y luego fueron procesadas por inmunofluorescencia directa. Luego, 100 μ l de cada suspensión celular, con una concentración de 10⁶ células /ml, fue incubada durante 30 min a 4 °C con: (i) 30 μ l de control de isotipo IgG₂ de rata ficoeritrina (PE) más 30 μ l de control de isotipo IgG₂ fitocianina de rata (FITC) (eBioscience, USA) correspondientes a controles de isotipo; (ii) 4 μ l (=8 μ g) de anticuerpo monoclonal PE anti- T CD4 de ratón más 4 μ l (=8 μ g) de anticuerpo monoclonal FITC anti- T CD8 de ratón (eBioscience, USA). Los anticuerpos fueron utilizados a concentraciones de saturación establecidas luego de titulación por citometría de flujo. Luego, las muestras fueron lavadas con PBS y PBS-EDTA, fijadas con paraformaldehído 4% y guardadas a 4 °C en oscuridad hasta su análisis dentro de los 6 días. El análisis de fluorescencia fue evaluado con el citómetro de flujo FACScan® (Hospital de Clínicas) y el programa de computadora Winmdi 2.8. Los linfocitos fueron analizados utilizando diferentes características físicas (como tamaño y granularidad) seleccionando los parámetros “forward” (FSC: cell size) y “side scatter” (SSC: cell complexity). El análisis de citometría de flujo fue realizado utilizando la fluorescencia standard 1 (FL1: FITC anti- T CD8+ de ratón) y fluorescencia standard 2 (FL2: PE anti-T CD4+ de ratón). El análisis se basó en la medición de 50,000 células nucleadas / ensayo. De acuerdo con el tamaño y la complejidad, se caracterizó la región específica de los linfocitos T.

El porcentaje de células con marca positiva fue calculado restando las células inespecíficamente marcadas. En la Figura a continuación se observan las nubes de puntos obtenidas por citometría de flujo. El cuadrante superior izquierdo corresponde a células de mayor tamaño que linfocitos; el cuadrante inferior derecho, a células con mayor granularidad; el cuadrante superior derecho corresponde a células de mayor tamaño y granularidad que linfocitos; por último, el cuadrante inferior izquierdo corresponde a la población de células de menor tamaño y baja granularidad, los linfocitos. Luego, una vez seleccionada esa población de células, se analizó el tipo de fluorescencia. En este nuevo gráfico (Figura) se observa el cuadrante superior izquierdo, correspondiente a las células con marca positiva para PE (linfocitos T CD4+); el cuadrante inferior derecho, correspondiente a células con marca positiva para FITC (linfocitos CD8+); el cuadrante inferior izquierdo, correspondiente a células doble negativas, y el cuadrante superior derecho correspondiente a células doble positivas (posiblemente linfocitos inmaduros).

Finalmente se calculó la relación entre linfocitos T CD4+ / linfocitos T totales y linfocitos T CD8+ / linfocitos T totales. Los resultados fueron expresados como porcentajes.



g) Inmunofluorescencia para linfocitos T CD4+ en los sitios de implantación:

Los tejidos uterinos obtenidos de las hembras luego del sacrificio en el día 8 de preñez fueron fijados en paraformaldehído 4 % (m/v), luego los sitios de implantación incluidos en parafina, cortados con micrótopo en secciones de 6 μm y puestos en portaobjetos cubiertos con gelatina (gelatin-coated glass slides, Biobond; British Biocell International, Cardiff). Estos cortes fueron utilizados para la inmunolocalización por fluorescencia de linfocitos CD4+. Los cortes fueron desparafinados, rehidratados en PBS y bloqueados en TNB. Luego las secciones fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal PE anti- T CD4 de ratón. Luego de ser lavados con PBS, los cortes fueron observados en microscopio de fluorescencia bajo luz UV y por último fueron fotografiados los más representativos.

h) Prostaglandina E y F2 alfa producidas y liberadas por los sitios de implantación

La prostaglandina E (PGE) y la PGF₂ alfa liberada por los sitios al medio de incubación fue determinada por radioinmunoensayo (Motta y col, 1995). Los sitios de implantación de las hembras fueron obtenidos e incubados en medio Krebs- Ringer- Bicarbonato (KRB) con glucosa (11.0 mmol/l) como sustrato externo (pH =7.0) durante 1 hora en un agitador Dubnoff, bajo una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ en 95% de O₂ a 37°C. Al finalizar el período de incubación el tejido debe ser retirado y la solución acidificada a pH 3 con HCl 0.1 N y extraída para la determinación de las prostaglandinas 3 veces con volumen de 1 ml de acetato de etilo (Sintorgan, Buenos Aires). La fase orgánica (donde están disueltas las PGs) se seca en una atmosfera de N₂ y las muestras se guardan a -20° C hasta el momento de realizar el RIA. Las PGs fueron cuantificadas usando un anticuerpo específico desarrollado en conejo provisto por Sigma Chemical Co, USA. La PGE es la suma de PGE₁ + PGE₂. La reactividad cruzada con otras PGs es < 0.1 %. La sensibilidad es de 10 pg/tubo. Los resultados fueron expresados como pg/mg proteína. Las proteínas fueron determinadas en los sitios por el método de Bradford.

i) Parámetros del estrés oxidativo

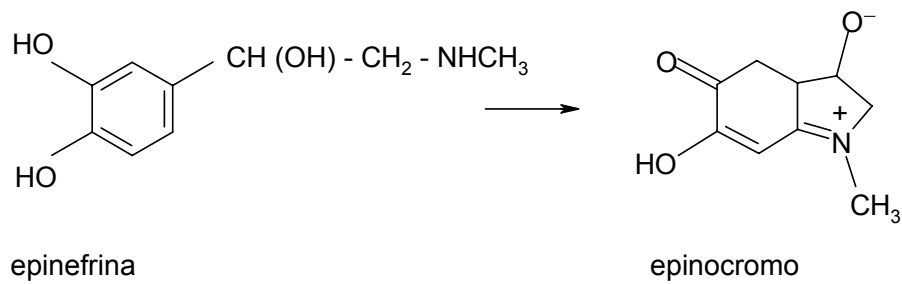
Tratamiento del tejido: Los sitios de implantación separados de sus embriones fueron homogeneizados en buffer para estrés oxidativo (Tris-Base 20 mM, pH=7, 6) con un homogeneizador de teflón en hielo, centrifugados a 9000 x g por 10 min a 4°C en centrífuga Sorvall y luego los sobrenadantes fueron fraccionados y guardados a -20° C hasta su utilización (una única determinación cada fracción para no descongelar-congelar). La concentración de proteínas fue determinada en los homogenatos de los sitios de implantación por el método de Bradford.

Concentración de Óxido nítrico en los sitios de implantación

La concentración de óxido nítrico fue estimada por el contenido de nitritos en las muestras. El método utilizado, la reacción de Griess (Ding y col 1988), es un ensayo colorimétrico basado en la reacción del NaNO₂ con ácido sulfonílico, cuyo producto absorbe a 540 nm. Los homogenatos obtenidos como se describe a continuación y los valores fueron referidos a una curva standard de NaNO₂. La concentración de nitritos (NO₂) fue expresada como nmol NO₂/mg proteína.

Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa total (SOD)

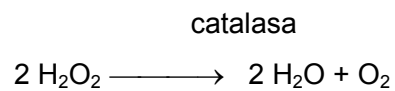
Las SODs son un grupo de metaloenzimas que detoxifican de ROS mediante la conversión de anión superóxido (O₂•-) a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y oxígeno (O₂). La actividad total fue medida por un método espectrofotométrico (Misra y Fridovich, 1972). Este método se basa en la habilidad de la SOD de inhibir la autooxidación de la epinefrina a pH alcalino (10.2) y a una temperatura de 30°C. El anión superóxido es un intermediario de dicha reacción. La oxidación de la epinefrina es seguida por la formación del epinocromo que tiene un máximo de absorbancia a 480 nm.



Se agregó epinefrina 30 mM en ácido acético 0.05% v/v a buffer glicina 50 mM (pH = 10,2) con los homogenatos uterinos. Se midió la actividad a 480 nm durante 4 min. Se tomó la cantidad de enzima que inhibe la oxidación de la epinefrina en un 50%, la cual es equivalente a 1 unidad (U). Se expresaron los resultados como USOD/mg proteína.

Determinación de la actividad de la catalasa

Este método (Chance, 1954) se basa en el rol de la enzima catalasa para catalizar la conversión de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua y oxígeno (H₂O + O₂), y dado que el H₂O₂ absorbe a 240 nm, el consumo de H₂O₂ fue medido por espectrofotómetro en un medio de reacción que consiste en buffer fosfato 50 mM (pH 7.2) y H₂O₂ 3 mM durante 1 min, en intervalos de 10 segundos. Los resultados fueron expresados como pmol cat/mg of proteína.



Contenido de glutathion (GSH)

La forma reducida del GSH comprende la mayoría de los grupos sulfidrilos de las proteínas celulares. Entonces, la medición de tioles solubles en ácido se utiliza para la estimación del contenido de GSH en extractos de tejido. El método utilizado (Tietze, 1969) se basa en la reacción de reducción del ácido 5,5,-ditiobis-2 nitro benzoico (DTNB), llevada a cabo por el Glutathion reducido (GSH), en medio reductor. Al reducirse, el DTNB forma compuestos coloreados, que es posible cuantificar a 412 nm. Para medir el Glutathion total, se agrega glutathion reductasa al medio, enzima que cataliza el pasaje de glutathion oxidado (GGSG) a su forma reducida. 300 µl de homogenatos fueron incubados con buffer Tris 1.75 M (pH= 7.4) con NADPH y GSH reductasa. La reacción involucra la reducción de la forma oxidada (GSSG) a GSH. Cuando el reactante de Ellman (un reactante sulfidriilo 5,5-ditiobis-2 ácido nitrobenzoico de Sigma Co, USA) se agrega al medio de incubación, el producto cromofórico resultante de esta reacción absorbe a 412 nm, que es lineal durante los primeros 6 min; después de esto, la reacción permanece constante. Los resultados fueron expresados como mmol GSH/mg proteína.

Peroxidación lipídica

Las cantidades de malondialdehído (MDA) formado por la ruptura de ácidos grasos poliinsaturados pueden ser tomados como un indicador de peroxidación (Buege y Aust 1978). El método MDA reacciona con el ácido tricloroacético (TCA) 15% (w/v)- ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.375% (w/v)- HCl 0.25 M, produciendo un compuesto de color rojo que absorbe a 535 nm. Los homogenatos fueron calentados a 100° C por 15 min con TCA-TBA-HCl. Después de enfriar, fueron centrifugados a 1000 g por 10 min para eliminar el floculente precipitado. La absorbancia fue medida a 535 nm. El contenido de especies reactivas del TBA (TBA-RS) fue expresado como nmol MDA/mg proteína.

Análisis estadísticos de la 1er Parte:

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa InStat (GraphPAD software, San Diego, CA, USA). Se aplicó el test t de Student para comparar datos desapareados considerando significativo un valor de $P < 0.05$. Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar.

Análisis estadísticos de la 2da Parte:

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa InStat (GraphPAD software, San Diego, CA, USA). Se aplicó el test de ANOVA de un factor considerando significativo un valor de $P < 0.05$. Luego, en los casos donde el ANOVA fue significativo, se aplicó el test de Tukey de comparaciones múltiples para comparar todos los pares de columnas entre sí. Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar.

Capítulo III

Resultados

1^{era} Parte: Reabsorción embrionaria por efecto del
hiperandrogenismo

1. **Establecimiento de un modelo de reabsorción embrionaria**
inducida por hiperandrogenización

En el presente trabajo de tesis doctoral se utilizaron originalmente dos modelos de hiperandrogenización que fueron descritos en Materiales y métodos: peri-implantatoria (inyección de dehidroepiandrosterona en los días 2 a 7 de preñez) y post-implantatoria (inyección de dehidroepiandrosterona en los días 6 y 7 de preñez). En el caso de la hiperandrogenización peri-implantatoria la implantación se vio impedida en el 100 % de los casos y es por eso que, con el objetivo de estudiar la reabsorción embrionaria, se utilizó únicamente el modelo de hiperandrogenización post-implantatoria, es decir que se inyectó dehidroepiandrosterona en los días 6 y 7 de preñez.

Los porcentajes de hembras con reabsorción embrionaria fueron determinados por observación macroscópica de los úteros. Se observó que las hembras hiperandrogenizadas con DHEA que habían sufrido reabsorción embrionaria mostraban el 100 % de los sitios reabsorbidos, por lo tanto fueron cuantificados los animales con reabsorción embrionaria y no los sitios reabsorbidos. El 82 % de las hembras preñadas hiperandrogenizadas con DHEA sufrieron reabsorción embrionaria, cifra significativamente mayor que la observada en el control ($p < 0.0001$, Figura 1).

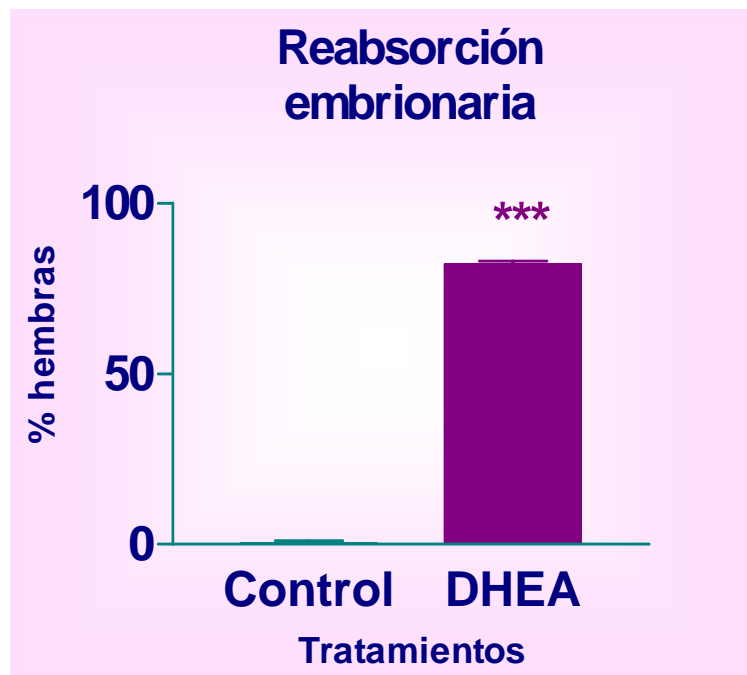


Figura 1: Porcentaje de animales con reabsorción embrionaria. Se determinó por observación macroscópica de los úteros si habían sufrido o no reabsorción embrionaria. La hiperandrogenización provocó un aumento significativo en la reabsorción embrionaria frente al control (t de Student: $p < 0.0001$).

2. Morfología de los sitios de implantación

Se caracterizó el aspecto de los úteros de las hembras de 8 días de preñez bajo los diferentes tratamientos de la siguiente manera:

- **Útero de aspecto preñado normal:** aspecto de un “collar de perlas”, donde cada perla corresponde a un sitio de implantación (una unidad feto-placentaria). Sitios de implantación de forma redondeada y gran irrigación, lo cual les confiere una coloración rojiza; presencia, además, de una pequeña zona de mayor contenido sanguíneo, de color morado, en los sitios de implantación, correspondiente al embrión.
- **Útero con unidades reabsorbidas:** tamaño del útero reducido, forma menos simétrica y “perlas del collar” menos notorias respecto del normal. Sitios de implantación reabsorbidos de forma ovalada, menor tamaño que uno normal, con un aspecto hemorrágico que les confiere color morado en toda su extensión.

Histología de los sitios de implantación

Se estudió la histología de los de los sitios de implantación mediante tinciones con hematoxilina-eosina de cortes de tejidos uterinos obtenidos de hembras de 8 días de preñez. Los tejidos fueron fijados en formol, incluidos en parafina y cortados para ser observados al microscopio óptico; sólo aquellos cortes que pasaran por el centro del sitio de implantación fueron teñidos. A continuación se muestran fotos representativas de un sitio de implantación normal en el día 8 de preñez (Control, Figura 2 A y B) y de uno en el día 8 que ha sufrido reabsorción embrionaria (hiperandrogenizado con DHEA, Figura 2 C y D).

- **Sitio de implantación preñado normal:** embrión implantado en estadio de huevo cilíndrico (e), células gigantes (cg), entre las cuales hay lagunas que se llenan con sangre materna (lag), y decidua con dos regiones, mesometrial (dm) y antimesometrial (dam) (Figura 2 A). La Figura 2 B es una ampliación del trofoblasto, donde se observan las células gigantes y las lagunas.

- **Sitio de implantación reabsorbido:** embrión reabsorbido, con restos de tejidos correspondientes al embrión y el trofoblasto y matriz decidual desestructurada (dm y dam) (Figura 2 C). La Figura 2 D es una ampliación de la zona donde habría estado el trofoblasto en el sitio reabsorbido.

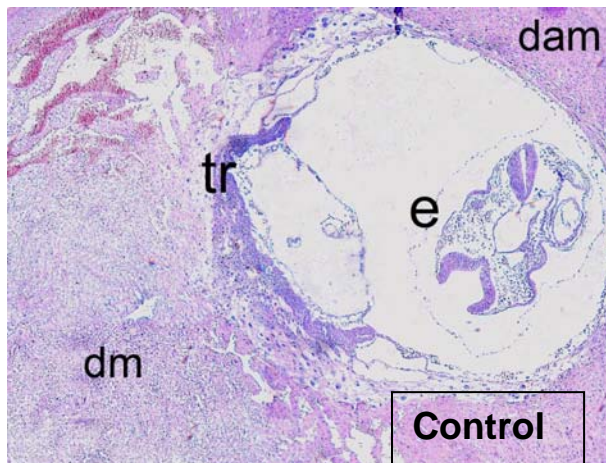


Figura 2 A: Sitio de implantación de un animal del grupo Control (8 días de preñez). Foto de un corte histológico coloreado con hematoxilina-eosina (40 X). Se observan: embrión implantado en estadio de huevo cilíndrico (e), trofoblasto (tr), decidua mesometrial (dm) y decidua antimesometrial (dam).

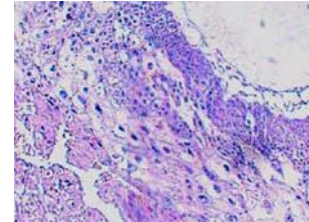


Figura 2 B: Ampliación de la zona del trofoblasto de A. Se observan las células gigantes y lagunas.

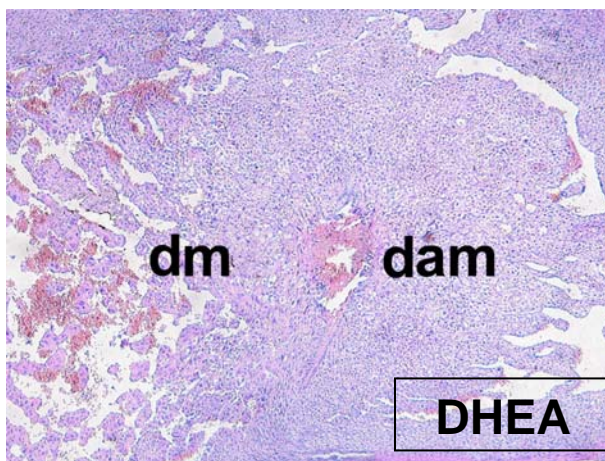


Figura 2 C: Sitio de implantación reabsorbido (8 días de preñez). Foto de un corte histológico coloreado con hematoxilina-eosina (40 X). Se observan: el sitio donde habría estado el trofoblasto, indicado por la flecha; decidua mesometrial y antimesometrial desestructurada (dm y dam).

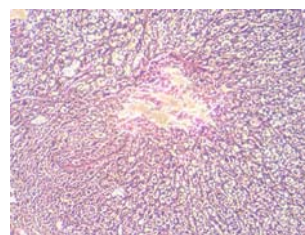


Figura 2 D: Ampliación de la zona donde habría estado el trofoblasto en C. Se observan restos de tejido trofoblástico.

3. Efectos sistémicos inducidos por hiperandrogenización

3. I. *Disminución de progesterona y estradiol*

Los niveles de progesterona fueron significativamente menores en el grupo hiperandrogenizado frente al Control ($p < 0.005$, Figura 3). Los niveles de estradiol fueron significativamente menores en el grupo hiperandrogenizado frente al Control ($p < 0.01$, Figura 4).

Ambas figuras muestran que la hiperandrogenización indujo una disminución significativa en las hormonas ováricas progesterona y estradiol durante la preñez temprana.

3. II. *Aumento de la insulino-resistencia: Glucosa, insulina y*

“Homeostasis Model Assessment “

La concentración de glucosa mostró un incremento significativo en los animales hiperandrogenizados con DHEA frente al grupo Control ($p < 0.01$, Figura 5 A). La concentración de insulina no mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figura 5 B). Los resultados de glucosa e insulina fueron traducidos en un índice de insulino-resistencia, el HOMA (Homeostasis Model Assessment). Dicho índice resultó mayor en el grupo hiperandrogenizado frente al Control (Tabla 1), indicando que la hiperandrogenización indujo un aumento de la insulino-resistencia en las hembras hiperandrogenizadas durante la preñez temprana.

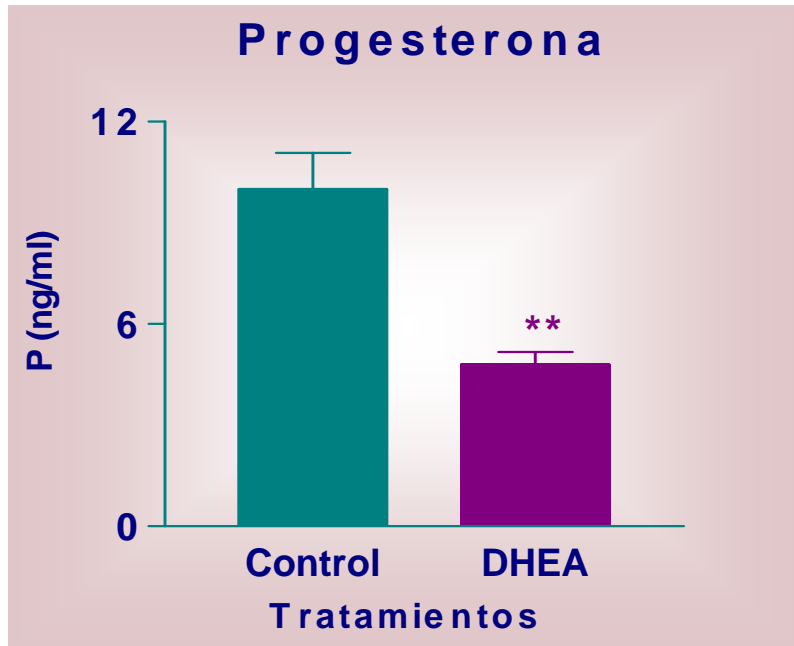


Figura 3: Niveles séricos de progesterona detectados por radioinmunoensayo. La hiperandrogenización provocó una disminución significativa en la progesterona sérica frente al control (t de Student: $p < 0.005$).

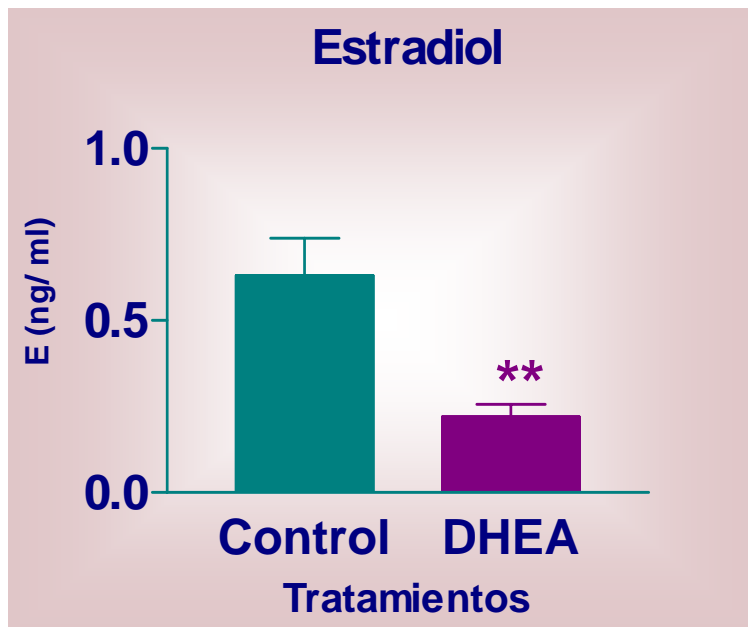


Figura 4: Niveles séricos de estradiol detectados por radioinmunoensayo. La hiperandrogenización provocó una disminución significativa en el estradiol sérico frente al control (t de Student: $p < 0.01$).

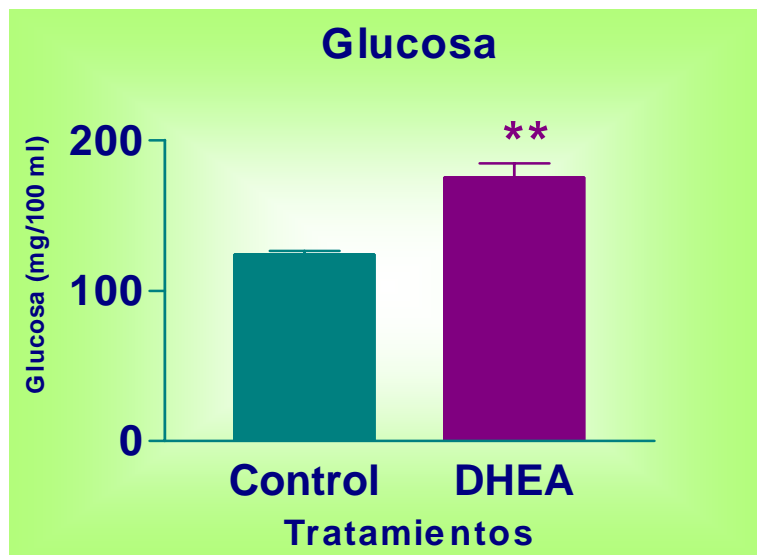


Figura 5 A: Concentración de glucosa en sangre determinada mediante tiras reactivas. La hiperandrogenización provocó un aumento significativo en la glucosa frente al control (t de Student: $p < 0.01$).

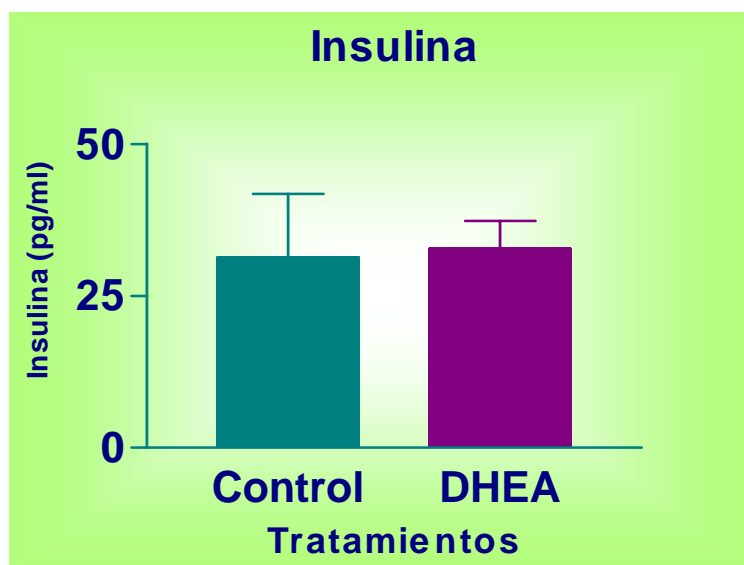


Figura 5 B: Concentración sérica de insulina determinada mediante radioinmunoensayo. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

Tratamientos	CONTROL	DHEA
HOMA	0,79	1,17

Tabla 1: Índice de insulino-resistencia HOMA para los dos grupos experimentales.

3. III. *Disminución de las citoquinas anti-inflamatorias y aumento de las pro-inflamatorias*

Se caracterizó el perfil de citoquinas en los dos grupos experimentales . Para esto se cuantificaron los niveles séricos de dos citoquinas de tipo Th2 (IL-6 e IL-4) y dos de tipo Th1 (IFN-gama e IL-2). La IL-6 mostró una disminución significativa en las hembras hiperandrogenizadas respecto del control ($p < 0.005$, Figura 6 A). Los niveles de IL-4 no variaron significativamente entre los grupos (Figura 6 B). La IL-2 se vio aumentada significativamente por la hiperandrogenización ($p < 0.01$, Figura 6 C). Los niveles de IFN-gama fueron indetectables en todos los grupos experimentales (datos no mostrados).

Estas tres figuras indican que la hiperandrogenización indujo una disminución significativa en la IL-6 (Th2) y un aumento significativo en la IL-2 (Th1) durante la preñez temprana.

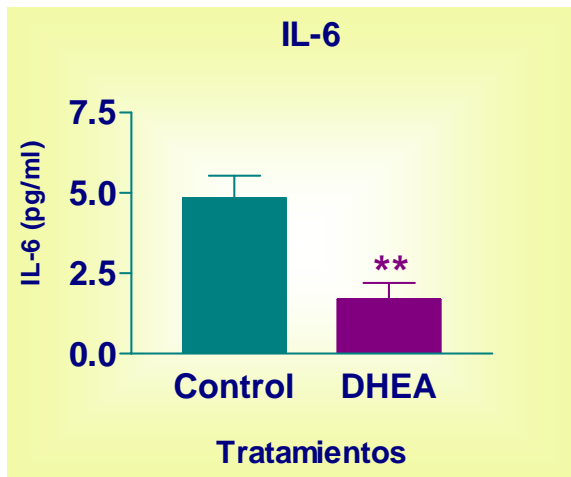


Figura 6 A: Concentración sérica de IL-6 detectada por ELISA. La hiperandrogenización provocó una disminución significativa frente al control (*t* de Student: $p < 0.005$).

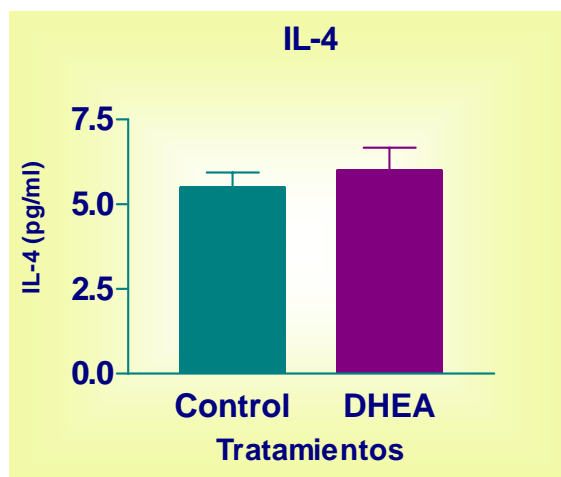


Figura 6 B: Concentración sérica de IL-4 detectada por ELISA. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

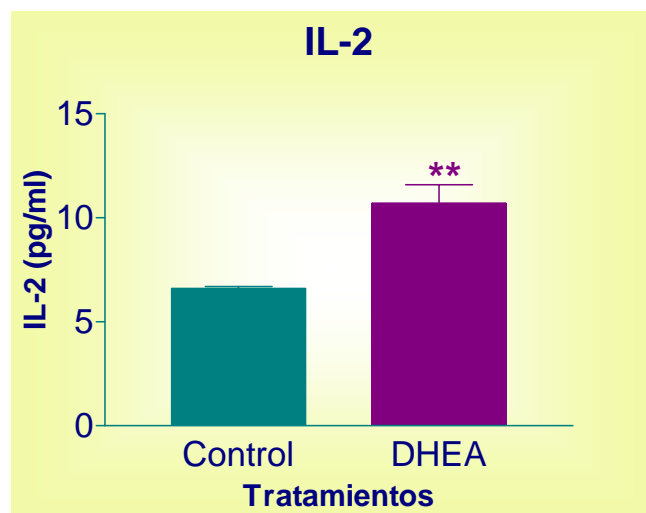


Figura 6 C: Concentración sérica de IL-2 detectada por ELISA. La hiperandrogenización provocó un aumento significativo frente al control (*t* de Student: $p < 0.005$).

4. Efectos locales inducidos por hiperandrogenización

4. I. *Disminución del Factor Bloqueante Inducido por Progesterona (PIBF) en los sitios de implantación*

Se localizó por inmunohistoquímica el factor bloqueante inducido por progesterona (PIBF) en el laboratorio de la Dra. Julia Szekeres-Bartho (Pecs, Hungría). A continuación se muestran fotos representativas de un sitio de implantación del grupo Control (Figuras 7 A y B) y de uno del grupo hiperandrogenizado con DHEA (Figuras 7 C y D).

- En el sitio control se observó (Figura 7 A): marca positiva para PIBF (de color rojo) presente en los citoplasmas de la gran mayoría de las células deciduales y trofoblásticas (d, tr). En la Figura 7 B se muestra un sector de la decidua del sitio control a mayor aumento para que se pueda distinguir la tinción positiva (roja) en los citoplasmas, mientras que los núcleos de las células mostraron la coloración violeta de contraste (hematoxilina).
- En el sitio hiperandrogenizado con DHEA se observó (Figura 7 C): ausencia de marca específica. Sólo fue visible un background (de color rosado pálido). En la Figura 7 D se muestra un sector de la decidua del sitio reabsorbido a mayor aumento para que se pueda distinguir que no se ven los citoplasmas rojos, sino de un rosado muy claro y sólo se destacan los núcleos de color violeta.

La Figura 7 E es una foto del control negativo, sin anticuerpo primario.

Estas figuras indican que la hiperandrogenización indujo la ausencia de PIBF en los sitios de implantación durante la preñez temprana.

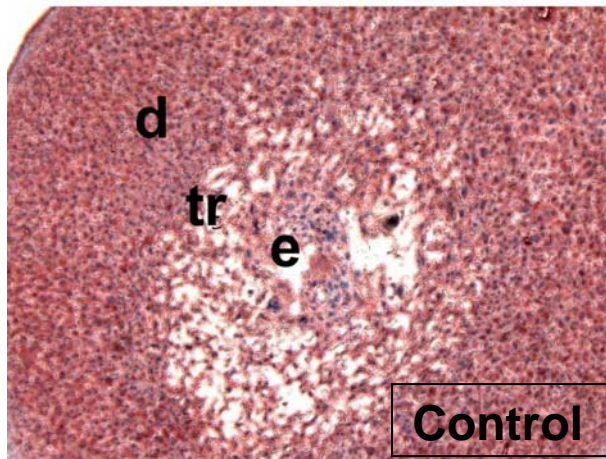


Figura 7 A: Inmunolocalización de PIBF en un sitio de implantación de un animal del grupo Control (8 días de preñez). En rojo: marca positiva. Se observa expresión de PIBF en los citoplasmas de células deciduales (**d**) y trofoblásticas (**tr**). Aumento: 40 X.

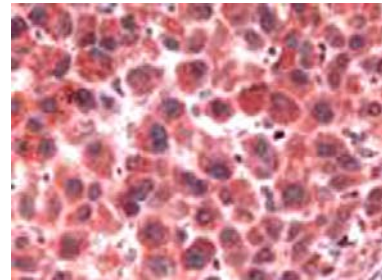


Figura 7 B: Ampliación (100 X) de parte de la decidua Control de la Figura 7 A, donde se distingue la tinción positiva (roja) para PIBF en los citoplasmas de las células, a diferencia de sus núcleos, que tienen la coloración de contraste (hematoxilina).

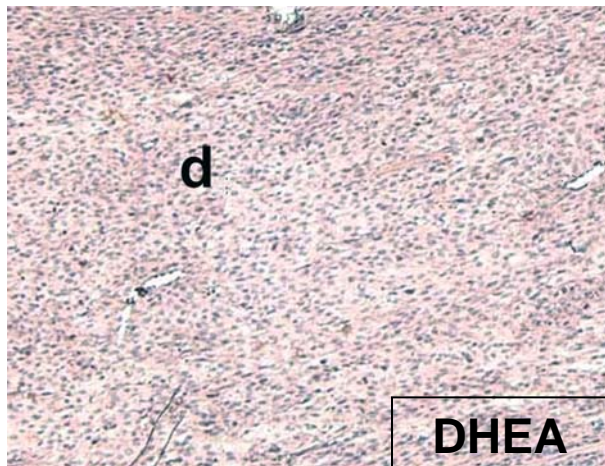


Figura 7 C: Inmunolocalización de PIBF en un sitio de implantación reabsorbido (8 días de preñez). Se observa la ausencia de marca positiva en la decidua (d), destacándose los núcleos de las células en color azul (hematoxilina) y marca de fondo en un tono rosa pálido. Aumento: 40 X.

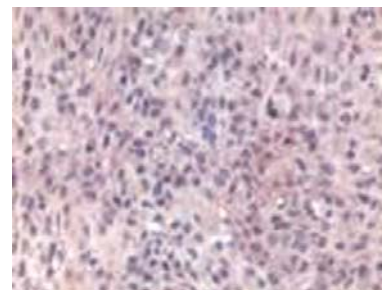


Figura 7 D: Ampliación (100 X) de parte de la decidua de la Figura 7 C, donde se observa la ausencia de marca específica (roja) para PIBF. Sólo se destacan los núcleos, que tienen la coloración de contraste (hematoxilina).

Figura 7 E: Foto representativa del control negativo sin anticuerpo primario (10 X).



4. II. *La expresión de linfocitos T CD4+/ CD8+ en ganglios retroperitoneales y sitios de implantación no se modifica*

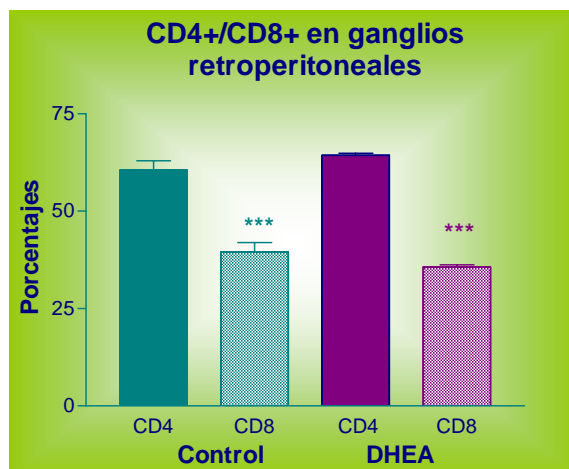
La expresión de los subtipos linfocitarios T CD4+/CD8+ fue estudiada en los ganglios linfáticos retroperitoneales, correspondientes a los órganos reproductivos. Se aislaron linfocitos de dichos tejidos por filtrado en malla metálica, y luego se midió el porcentaje de subtipos T CD4+ y CD8+ por citometría de flujo utilizando simultáneamente anticuerpos fluorescentes específicos anti-CD4+ (fluorescencia verde) o CD8+ (fluorescencia roja). Los porcentajes obtenidos no mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales, mientras que se observó una proporción significativamente mayor de linfocitos T CD4+ que de T CD8+ ($p < 0.0001$, Figura 8 A).

Luego, para estudiar la infiltración linfocitaria en los sitios de implantación, se realizó una inmunolocalización de células T CD4+ utilizando el mismo anticuerpo de fluorescencia que para la citometría de flujo.

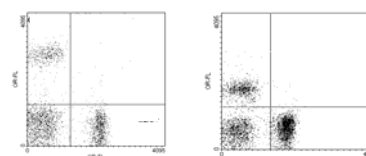
En la Figura 8 B se observa una foto representativa de un sitio de implantación del grupo Control y en la Figura 8 C la de uno del grupo hiperandrogenizado con DHEA.

- En el sitio control se observó: infiltración linfocitaria T CD4+ (verde fluorescente) presente en grupos en toda la decidua (Figura 8 B).
- En el sitio hiperandrogenizado con DHEA se observó: un patrón de infiltración similar al control, pero de marca más tenue (Figura 8 C).

Estas figuras indican que la hiperandrogenización no indujo variaciones en la expresión de los subtipos linfocitarios en los ganglios drenantes de órganos reproductivos, pero provocó una disminución de los linfocitos T CD4+ infiltrados en los sitios de implantación durante la preñez temprana.



Eje x: CD4+, Eje y: CD8+



Control

DHEA

Figura 8 A: La expresión de subtipos linfocitarios T CD4+/CD8+ en ganglios drenantes de ovario medida por citometría de flujo no se vio modificada por ninguno de los tratamientos.

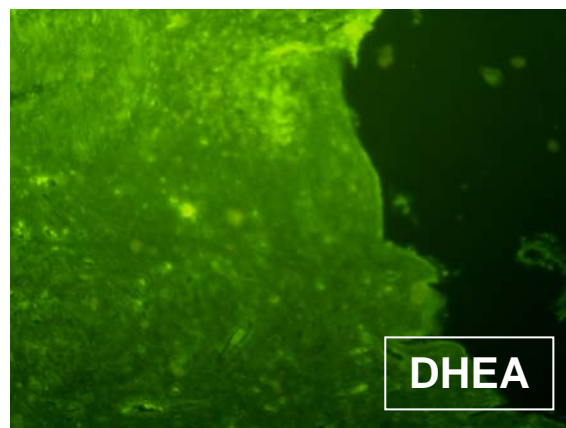
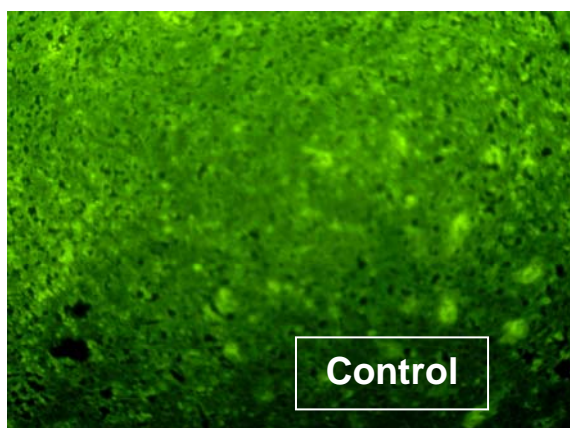


Figura 8 B: Inmunohistoquímica de fluorescencia para linfocitos T CD4 + en un sitio de implantación de un animal del grupo Control (8 días de preñez). En verde brillante: marca positiva. Aumento: 40 X.

Figura 8 C: Inmunohistoquímica de fluorescencia para linfocitos T CD4 + en un sitio de implantación reabsorbido (8 días de preñez). En verde brillante: marca positiva. Aumento: 40 X.

4. III. *Aumento de la abundancia de Ciclooxigenasa 2 (COX-2) en los sitios de implantación*

La abundancia de COX-2 determinada en los sitios de implantación por western blotting se vio aumentada significativamente en el grupo hiperandrogenizado con DHEA respecto del Control ($p < 0.0005$, Figura 9 A).

Luego se estudió la localización de la COX-2 en los sitios de implantación por inmunohistoquímica.

- En el sitio control se observó: marca positiva para COX-2 (coloración marrón) localizada en el trofoblasto (tr) (Figura 9 B). En la Figura 9 C se muestra un sector del trofoblasto control a mayor aumento para que se pueda distinguir la tinción positiva (marrón) en las células gigantes del trofoblasto.
- En el sitio hiperandrogenizado con DHEA se observó: marca positiva para COX-2 (coloración marrón) extendida a toda la decidua en forma más pareja (Figura 9 D). En la Figura 9 E se muestra un sector de la decidua del sitio reabsorbido a mayor aumento para permitir la observación del color marrón indicando marca positiva en todas las células en forma pareja.

4. IV. *Disminución de la PGE y aumento de la PGF2 alfa liberadas por los sitios de implantación*

La prostaglandina E liberada por los sitios de implantación medida por radioinmunoensayo (ver Materiales y Métodos) fue significativamente menor en el grupo hiperandrogenizado con DHEA respecto del control ($p < 0.0001$, Figura 10 A). Sin embargo, la PGF2 alfa liberada por los sitios de implantación fue mayor en el grupo hiperandrogenizado con respecto a los controles ($p < 0.05$, Figura 10 B).

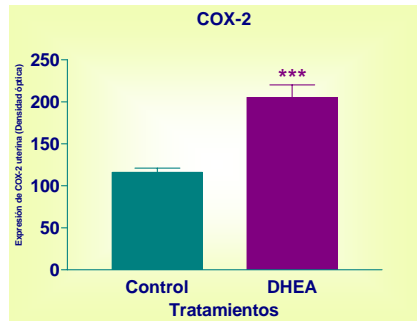
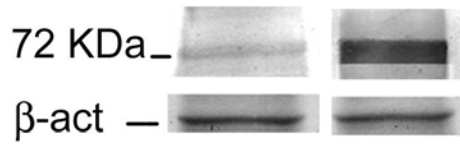


Figura 9 A: determinación de COX-2 por western blotting en los sitios de implantación. La hiperandrogenización provocó un aumento de la misma (t de Student: $p < 0.0005$).

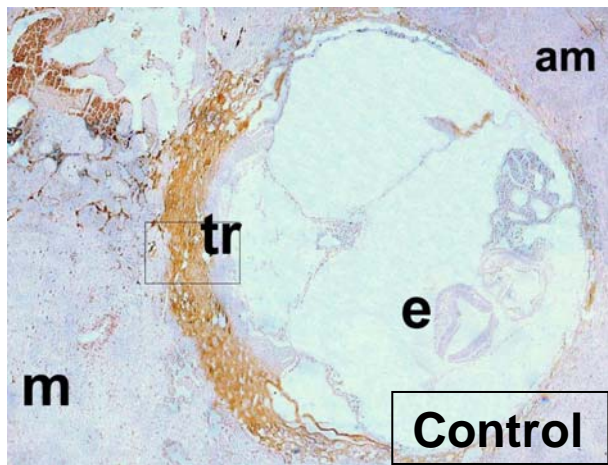


Figura 9 B: Inmunohistoquímica para COX-2 en un sitio de implantación del grupo Control (8 días de preñez). Se observa marca positiva en el trofoblasto (tr). e: embrión, d: decidua. Aumento: 40 X.

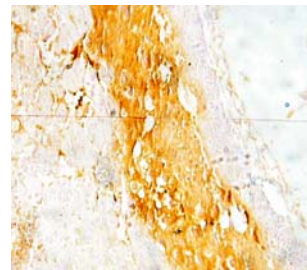


Figura 9 C: Ampliación (100 X) de parte del trofoblasto de la Figura 9 B, donde se observa la marca para COX-2 (marrón) en las células gigantes del trofoblasto.

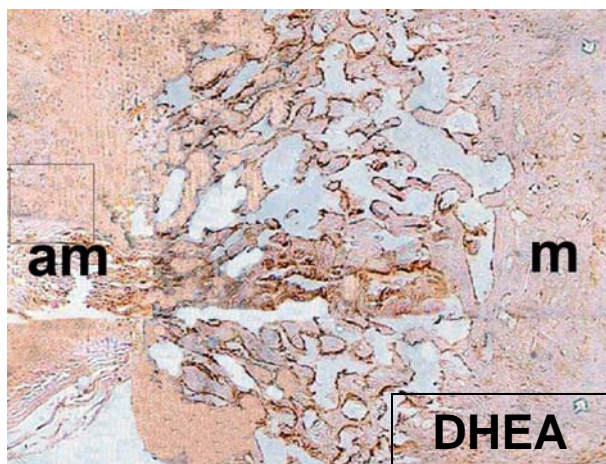


Figura 9 D: Inmunohistoquímica para COX-2 en un sitio de implantación reabsorbido (8 días de preñez). Se observa marca positiva en toda la decidua. am: decidua antimesometrial, m: decidua mesometrial. Aumento: 40 X.



Figura 9 E: Ampliación (100 X) de parte de la decidua de la Figura 9 D, donde se observa la marca extendida para COX-2 (marrón).

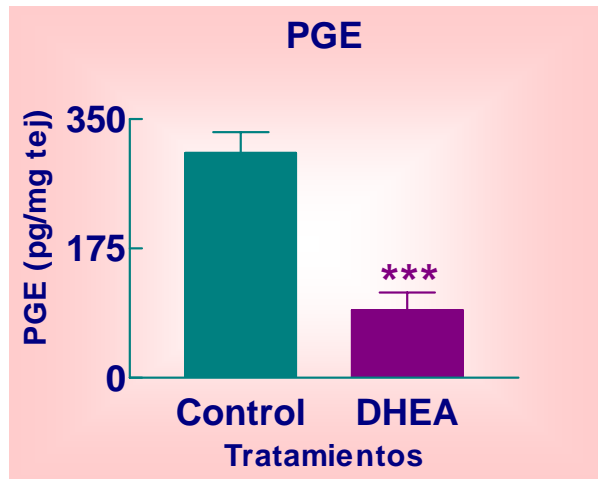


Figura 10: la PGE liberada por el tejido uterino, medida por radioinmunoensayo, disminuyó significativamente con DHEA (t de Student: $p < 0.0001$).

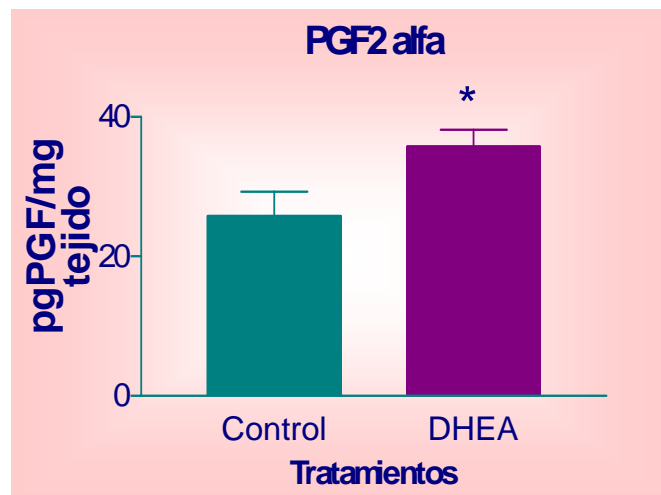


Figura 10 B: la PGF2 alfa liberada por el tejido uterino, medida por radioinmunoensayo, aumentó significativamente con DHEA (t de Student: $p < 0.05$).

4. V. *Aumento de la Óxido nítrico sintasa (NOS) en los sitios de implantación*

Dos isoformas de la NOS (iNOS y eNOS) fueron localizadas por inmunohistoquímica.

Vimos que la localización de ambas coincide. A continuación se muestran fotos representativas de dichas localizaciones en los sitios de implantación del grupo Control (Figuras 11 A y B para iNOS, 12 A y B para eNOS) y del grupo hiperandrogenizado con DHEA (Figuras 11 C y D para iNOS, 12 C y D para eNOS).

- En el sitio Control se observó: marca positiva para iNOS y eNOS (coloración marrón) localizada en el trofoblasto (tr) (Figuras 11 A y 12 A). En las Figuras 11 B y 12 B se muestra un sector del trofoblasto control a mayor aumento para que se pueda distinguir la tinción positiva (marrón) en las células gigantes.
- En el sitio hiperandrogenizado con DHEA se observó: la marca positiva para iNOS y eNOS (coloración marrón) extendida a toda la decidua en forma más pareja (Figuras 11 C y 12 C). En las Figuras 11 D y 12 D se muestra un sector de la decidua del sitio reabsorbido a mayor aumento para permitir la observación de la marca positiva en todas las células en forma pareja.

Luego de ser localizadas, se realizó una semi-cuantificación de la densidad de ambas isoformas de la NOS por el programa Image Pro Plus. El área marcada por inmunohistoquímica se relativizó al área total de tejido presente en el corte (en porcentaje) y los resultados obtenidos se representaron en gráficos de barras. El porcentaje de área marcada tanto para la iNOS como para la eNOS resultó significativamente mayor en el grupo hiperandrogenizado con DHEA ($p < 0.0001$, Figuras 11 E y 12 E).

En conjunto, estas figuras indican que la hiperandrogenización indujo un aumento significativo en la densidad de iNOS y eNOS y un cambio en su localización en los sitios de implantación durante la preñez temprana.

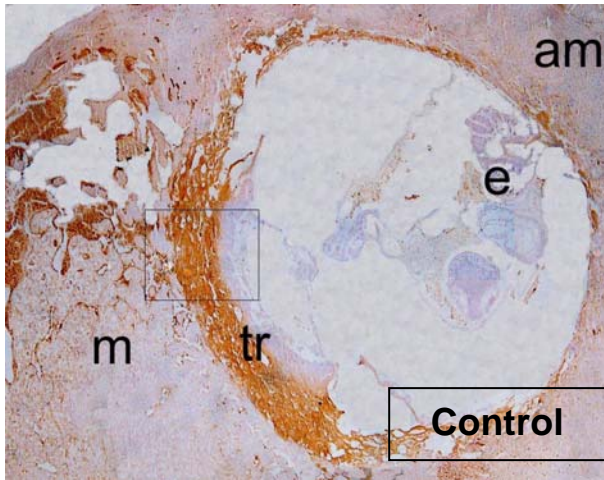


Figura 11 A: Inmunohistoquímica para iNOS en un sitio de implantación del grupo Control (8 días de preñez). Color marrón: marca positiva en el trofoblasto. **e:** embrión, **m:** decidua mesometrial. **am:** decidua antimesometrial

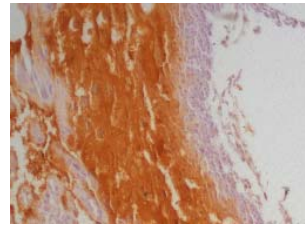


Figura 11 B: Ampliación (400 X) de la zona del trofoblasto donde se distingue la tinción positiva (marrón) para iNOS en las células gigantes del trofoblasto.

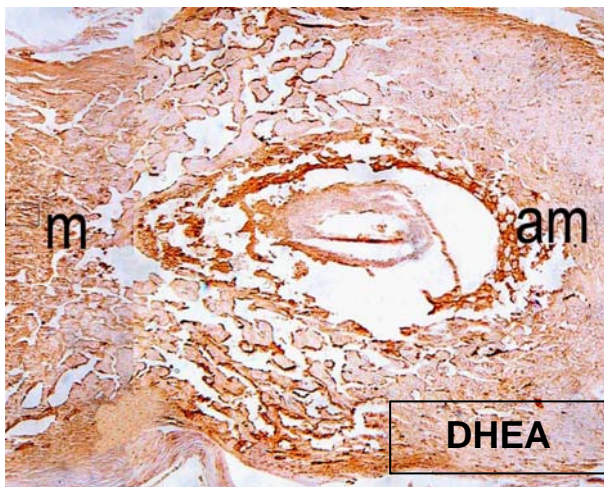


Figura 11 C: Inmunohistoquímica para iNOS en un sitio de implantación reabsorbido (8 días de preñez). Se observa marca positiva en toda la decidua (**m** y **am**).

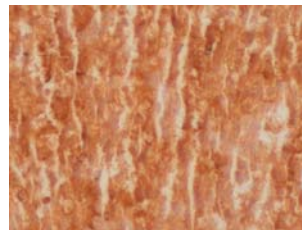


Figura 11 D: Ampliación (400 X) de una zona decidual donde se distingue la tinción positiva (marrón) para iNOS.

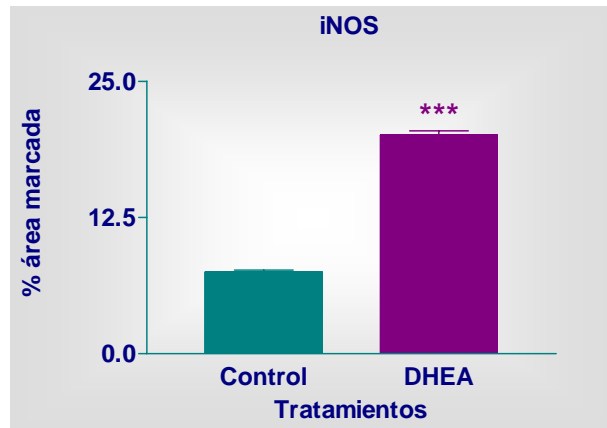


Figura 11 E: cuantificación del área marcada en la inmunohistoquímica de iNOS en los sitios de implantación por el programa Image Pro Plus (*t* de Student: $p < 0.01$).

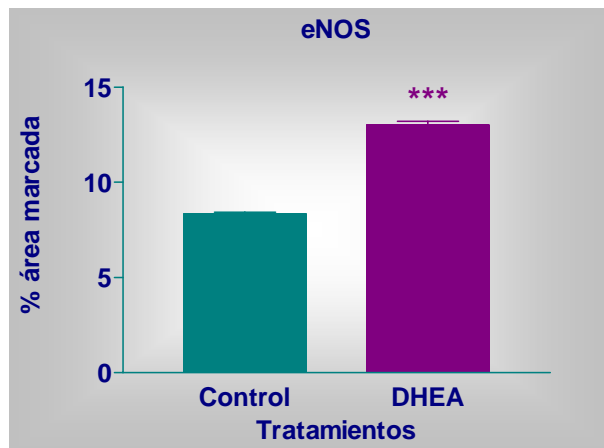


Figura 12 E: cuantificación del área marcada en la inmunohistoquímica de eNOS en los sitios de implantación por el programa Image Pro Plus (*t* de Student: $p < 0.01$).

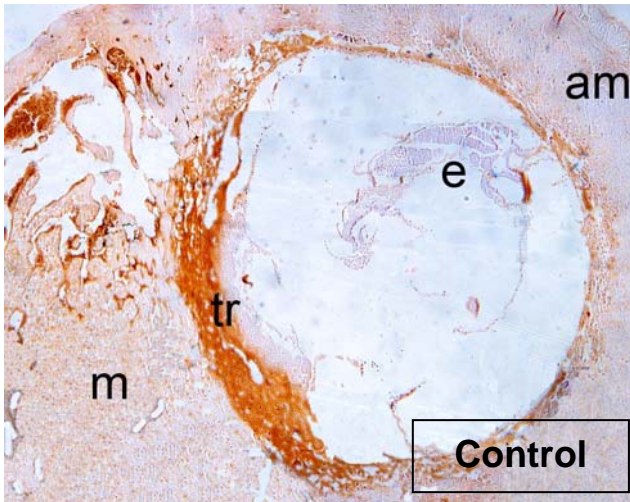


Figura 12 A: Inmunohistoquímica para eNOS en un sitio de implantación del grupo Control (8 días de preñez). Color marrón: marca positiva en el trofoblasto. **e:** embrión, **m:** decidua mesometrial. **am:** decidua antimesometrial

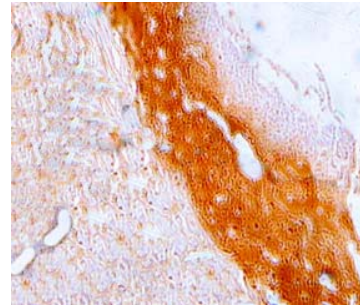


Figura 12 B: Ampliación (400 X) de la zona del trofoblasto donde se distingue la tinción positiva (marrón) para eNOS en las células gigantes del trofoblasto.

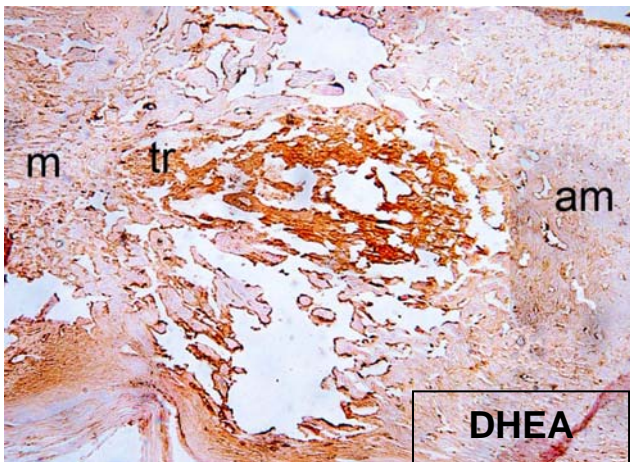


Figura 12 C: Inmunohistoquímica para eNOS en un sitio de implantación reabsorbido (8 días de preñez).

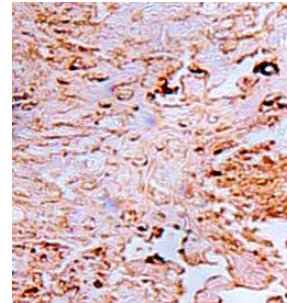


Figura 12 D: Ampliación (400 X) de una zona decidual donde se distingue la tinción positiva (marrón) para eNOS.

4. VI. *Aumento del Óxido nítrico producido en los sitios de implantación*

El óxido nítrico (NO) producido en los sitios de implantación fue estimado por la concentración de nitritos (reacción de Griess, ver Materiales y Métodos). Los nitritos fueron significativamente mayores en el grupo hiperandrogenizado con DHEA respecto del control ($p < 0.01$, Figura 13).

4. VII. *Aumento del estrés oxidativo en los sitios de implantación*

Finalmente, el balance oxidante/ antioxidante se determinó en homogenatos de los sitios de implantación para poder establecer si existe o no un desbalance del mismo con el tratamiento. Para esto se determinaron diversos parámetros del estrés oxidativo: actividad de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), enzimas antioxidantes, contenido de glutatión (GSH), metabolito antioxidante de rápida disponibilidad, y la peroxidación lipídica (LPO), producto del daño a las membranas.

No se observaron diferencias significativas en las actividades de SOD y CAT entre los grupos (Figuras 14 A y 14 B). El contenido de GSH se vio aumentado en el grupo hiperandrogenizado con DHEA respecto del control ($p < 0.005$, Figura 14 C). La peroxidación lipídica se vio aumentada en el grupo hiperandrogenizado con DHEA respecto del control ($p < 0.01$, Figura 14 D).

En conjunto, estas figuras indican que la hiperandrogenización indujo un aumento en el estrés oxidativo en los sitios de implantación durante la preñez temprana. Esto se resume en el esquema de la Figura 15.

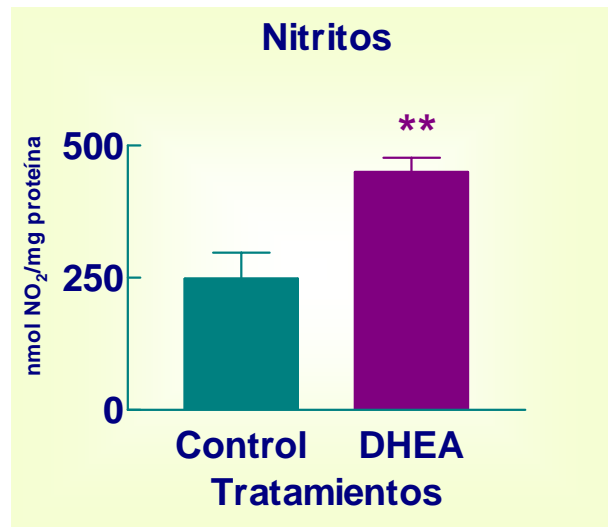


Figura 13: nitritos en los sitios de implantación de animales Control y DHEA por el método de Griess.

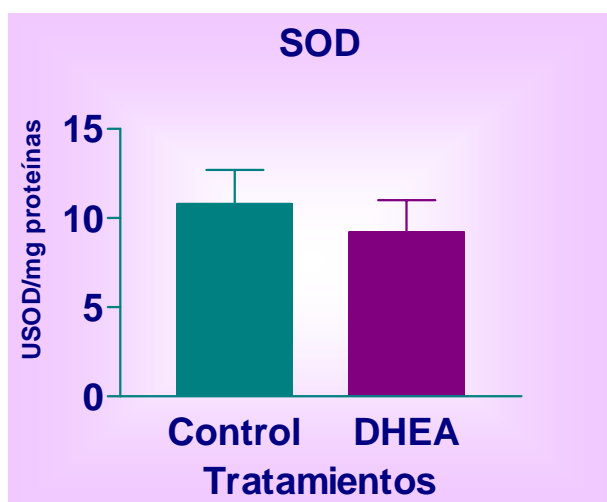


Figura 14 A: enzima superóxido dismutasa en los sitios de implantación determinada por método colorimétrico. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

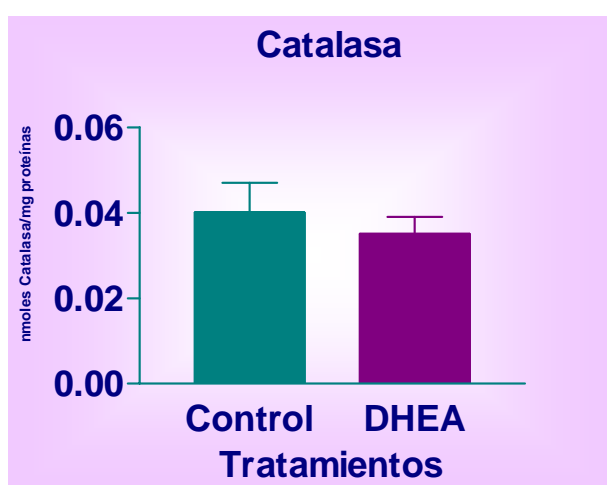


Figura 14 B: enzima catalasa en los sitios de implantación determinada por método colorimétrico. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

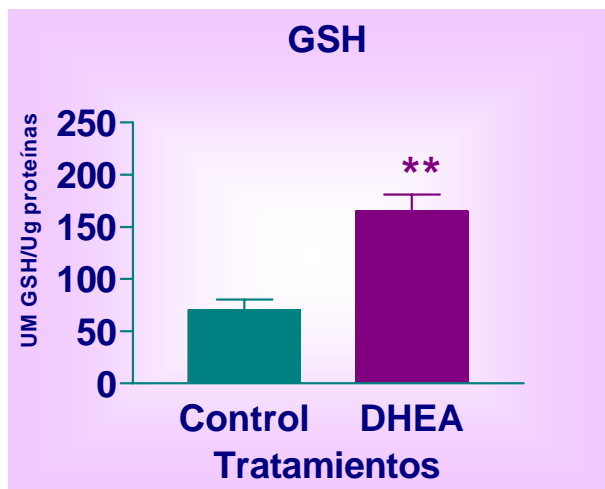


Figura 14 C: concentración de glutatión total en los sitios de implantación. El grupo DHEA presentó valores significativamente mayores que el Control (*t* de Student: $p < 0.01$).

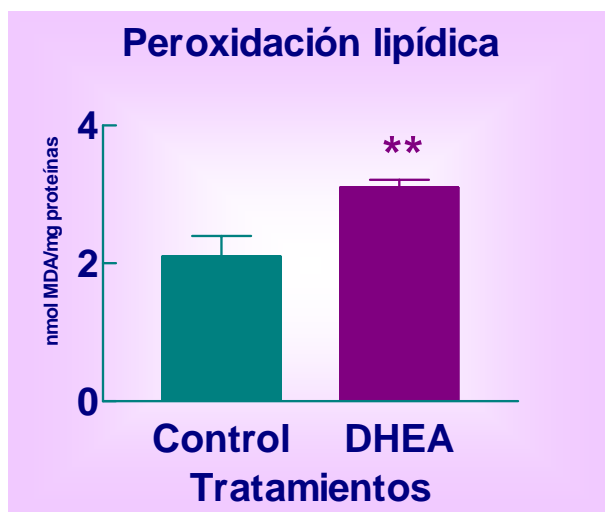
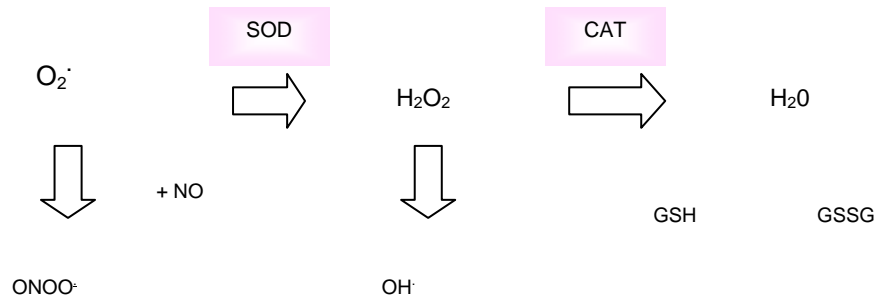


Figura 14 D: producto de la peroxidación lipídica en los sitios de implantación. El grupo DHEA presentó valores significativamente mayores que el Control (*t* de Student: $p < 0.01$).

A. Control



B. DHEA

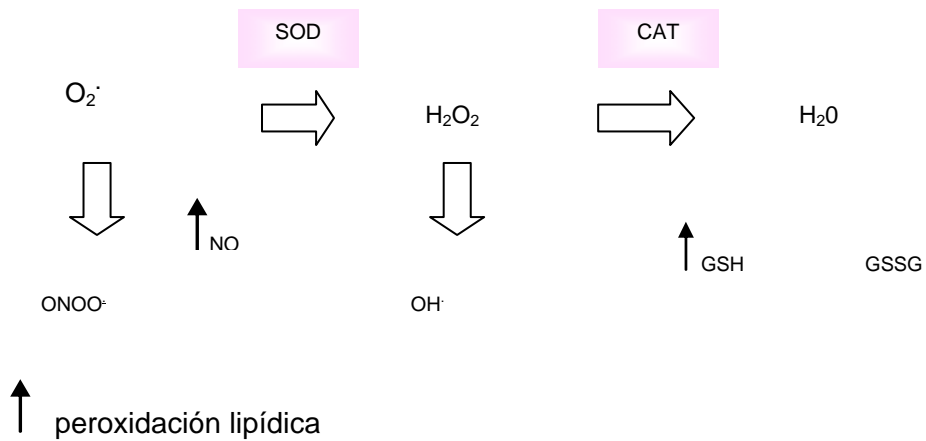


Figura 15: Esquema que resume el balance oxidante/ antioxidante mediante los parámetros medidos en los sitios de implantación de animales Control y DHEA. Se puede observar que las enzimas antioxidantes no mostraron diferencias entre los grupos, mientras que los nitritos, la peroxidación lipídica y el glutatión se vieron aumentados en el grupo hiperandrogenizado frente al Control.

4. VIII. *Aumento de la abundancia de Ciclooxygenasa 2 (COX-2) en los ovarios*

La enzima ciclooxygenasa 2 (COX-2) fue cuantificada por western blotting en los tejidos ováricos obtenidos de ambos grupos experimentales (ver Materiales y Métodos). La misma en ovarios se vio aumentada significativamente en el grupo hiperandrogenizado con DHEA respecto del Control ($p < 0.01$, Figura 16).

4. IX. *Disminución de la abundancia de Óxido nítrico sintasas (NOS) en los ovarios*

La abundancia de la isoforma inducible de la enzima NOS (iNOS) fue cuantificada por western blotting en homogenatos de ovarios obtenidos de ambos grupos experimentales (ver Materiales y Métodos). La iNOS se vio disminuida significativamente en el grupo hiperandrogenizado con DHEA respecto del Control ($p < 0.005$, Figura 17).

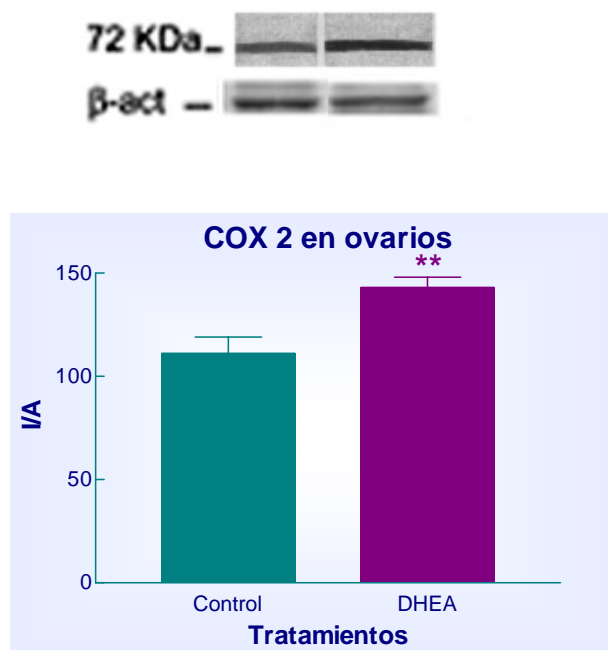


Figura 16: Abundancia de la ciclooxygenasa 2 en ovarios medida por western blotting. Se vio un incremento de dicha enzima en el grupo DHEA.

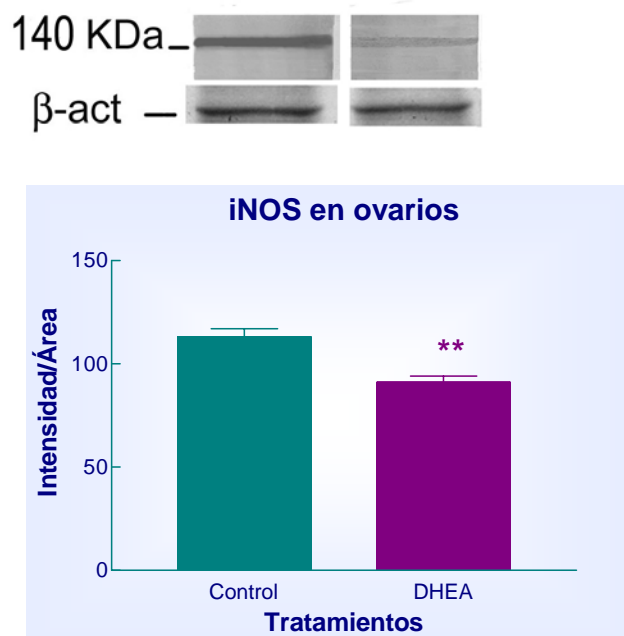


Figura 17: Expresión de la óxido nítrico sintasa inducible medida por western blotting en ovarios de hembras Control y DHEA. Se vio una disminución de dicha enzima en el grupo DHEA.

2^{da} Parte: Tratamiento con metformina

1. Acción de la metformina sobre los porcentajes de reabsorción embrionaria

La administración de metformina por vía oral a ratones hembra Balb/c preñadas durante el período post-implantatorio simultánea a la hiperandrogenización previno la reabsorción de los embriones provocada por la hiperandrogenización (Figura 18).

2. Acción de la metformina en los sitios de implantación

Los úteros preñados tratados con metformina presentaron el aspecto de un útero preñado normal. La histología de los sitios de implantación fue la de un sitio preñado normal, similar al control (Figuras 19 A- D).

3. Acción de la metformina en los niveles séricos de progesterona y estradiol

La metformina fue capaz de restituir los niveles séricos de progesterona y estradiol a los valores del grupo Control (Figuras 20 A y B).

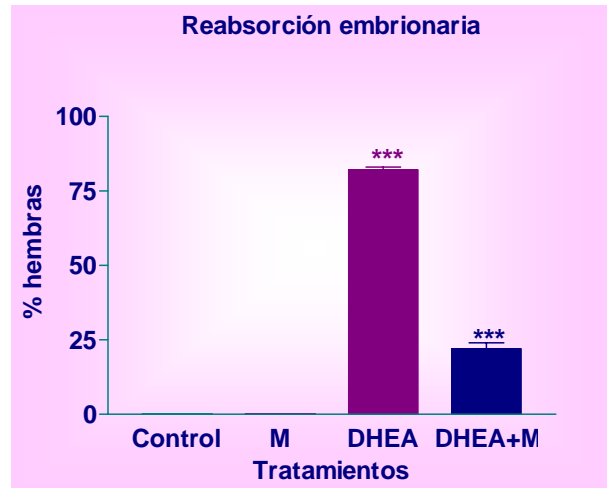


Figura 18: Porcentaje de animales con reabsorción embrionaria. Se determinó por observación macroscópica de los úteros si habían sufrido o no reabsorción embrionaria. La metformina evitó el aumento en la reabsorción embrionaria provocado por la hiperandrogenización.

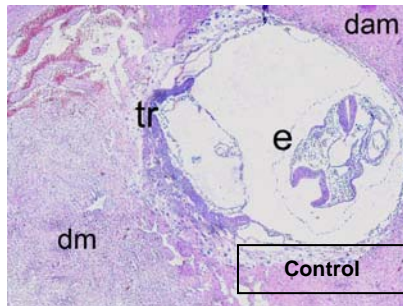


Figura 19 A: Sitio de implantación de un animal del grupo Control (8 días de preñez). Foto de un corte histológico coloreado con hematoxilina-eosina (40 X).

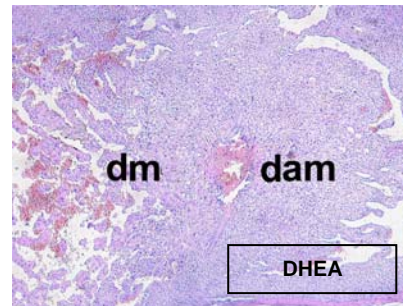


Figura 19 C: Sitio de implantación de un animal del grupo DHEA (8 días de preñez). Foto de un corte histológico coloreado con hematoxilina-eosina (40 X).

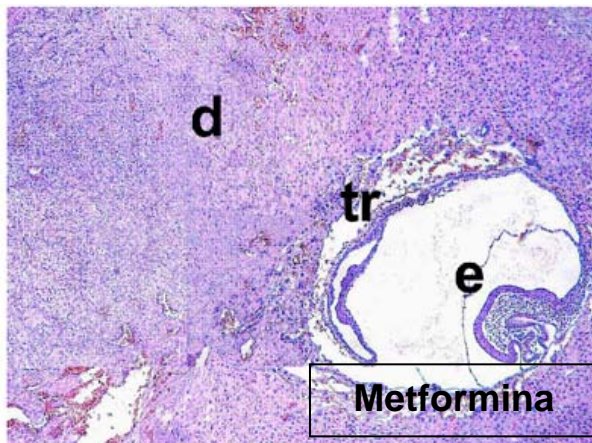


Figura 19 B: Sitio de implantación de un animal del grupo Metformina (8 días de preñez). Foto de un corte histológico coloreado con hematoxilina-eosina (40 X). Muestra un aspecto similar al control: embrión implantado (**e**), trofoblasto (**tr**) y decidua normal (**d**).



Figura 19 D: Sitio de implantación de un animal del grupo DHEA+Metformina (8 días de preñez). Foto de un corte histológico coloreado con hematoxilina-eosina (40 X). Muestra un aspecto similar al control: embrión implantado (**e**), trofoblasto (**tr**) y decidua normal (**d**).

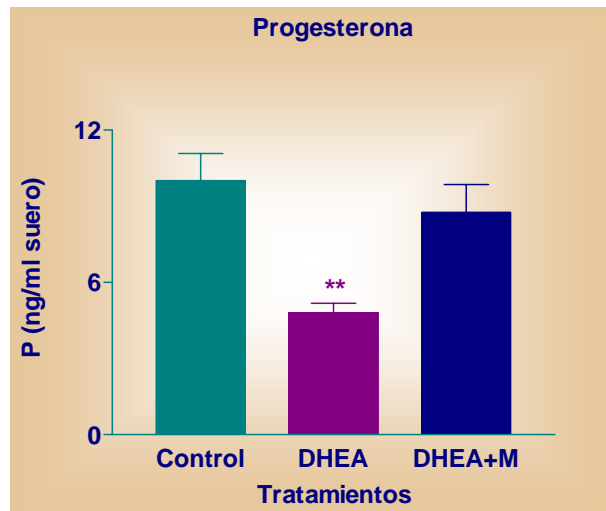


Figura 20 A: Niveles séricos de progesterona detectados por radioinmunoensayo. La metformina evitó la disminución provocada por la hiperandrogenización.

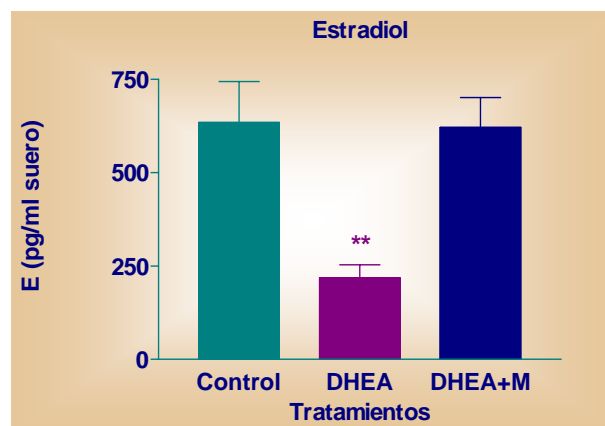


Figura 20 B: Niveles séricos de estradiol detectados por radioinmunoensayo. La metformina evitó la disminución provocada por la hiperandrogenización.

4. *Acción de la metformina en la insulino-resistencia: Glucosa, insulina y “Homeostasis Model Assessment”*

La concentración de glucosa fue restituida a los niveles del control por el tratamiento con metformina (Figura 21 A). La concentración de insulina no mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figura 21 B). El HOMA resultó similar en el grupo tratado con metformina y el grupo Control (Figura 21 C).

5. *Acción de la metformina sobre los niveles de citoquinas séricas*

La IL-6 se vio restituida a los niveles de control con metformina (Figura 22 A). Un dato llamativo fueron los valores detectados para esta citoquina en el control que sólo recibió metformina, que fueron significativamente mayores que el control ($p < 0.001$).

Los niveles de IL-4 no variaron significativamente entre los grupos (Figura 22 B).

La IL-2 se vio incrementada respecto del Control por el tratamiento con metformina ($p < 0.05$, Figura 22 C).

Los niveles de IFN gama fueron indetectables en todos los grupos experimentales (datos no mostrados).

6. *Rol de la metformina sobre la expresión del Factor Bloqueante Inducido por Progesterona (PIBF) en los sitios de implantación*

El tratamiento con metformina restituyó la presencia PIBF en los sitios de implantación, que presentaron marca específica (de color rojo) con un patrón similar al observado en los controles (Figuras 23 A- D).

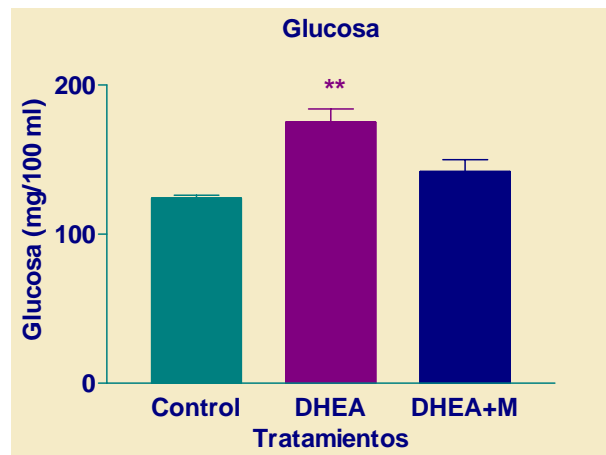


Figura 21 A: Concentración de glucosa en sangre determinada mediante tiras reactivas. La metformina evitó el aumento provocado por la hiperandrogenización.

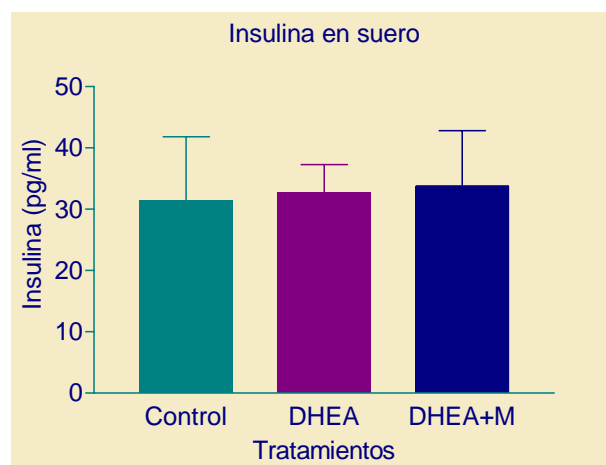


Figura 21 B: Concentración sérica de insulina determinada mediante radioinmunoensayo. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

Tratamientos	CONTROL	DHEA	DHEA+Metformina
HOMA	0,79	1,17	0,86

Tabla 2: Índice de insulino-resistencia HOMA para los dos grupos experimentales.

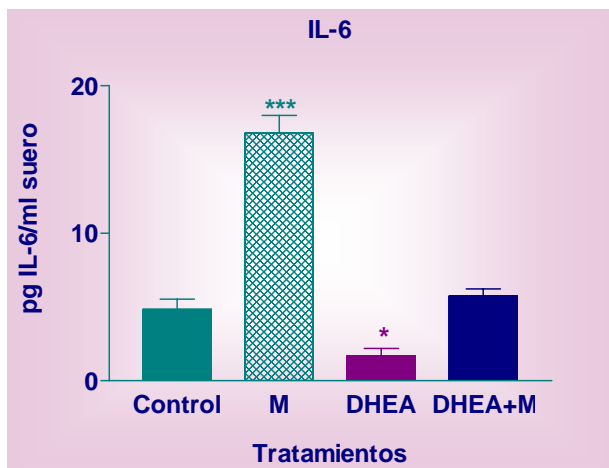


Figura 22 A: Concentración sérica de IL-6 detectada por ELISA. La metformina evitó la disminución provocada por la hiperandrogenización.

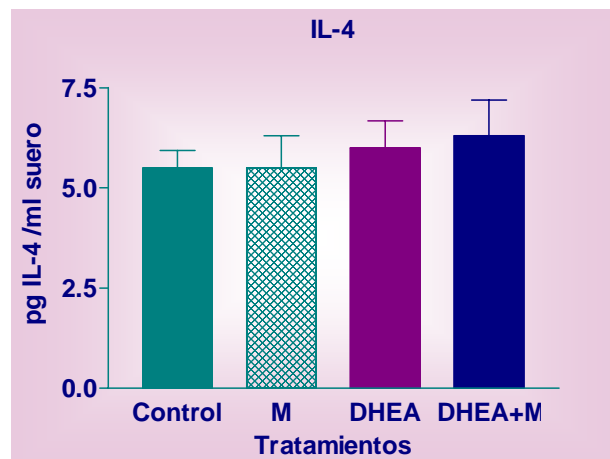


Figura 22 B: Concentración sérica de IL-4 detectada por ELISA. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

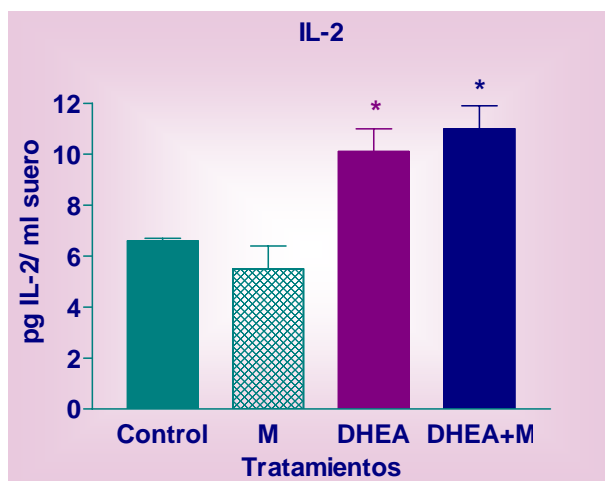


Figura 22 C: Concentración sérica de IL-2 detectada por ELISA. La metformina provocó un aumento significativo respecto del control.

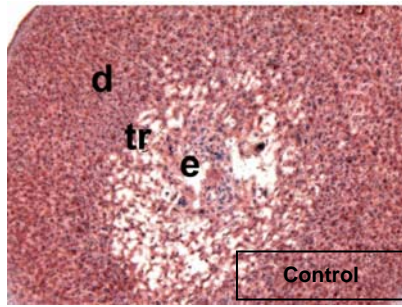


Figura 23 A: Inmunolocalización de PIBF en un sitio de implantación de un animal del grupo Control (8 días de preñez). En rojo: marca positiva. Aumento: 40 X.

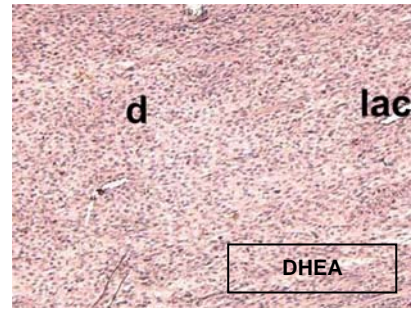


Figura 23 C: Inmunolocalización de PIBF en un sitio de implantación de un animal del grupo DHEA (8 días de preñez). Aumento: 40 X.

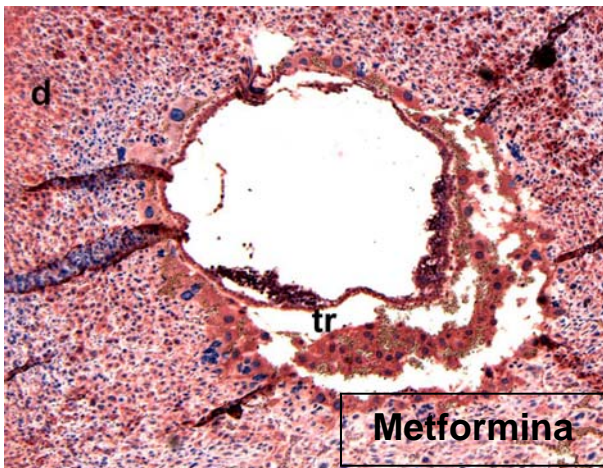


Figura 23 B: Inmunolocalización de PIBF en un sitio de implantación de un animal del grupo Metformina (8 días de preñez). En rojo: marca positiva. Presenta un patrón de marca similar al control: en las células de la decidua (d) y el trofoblasto (tr).

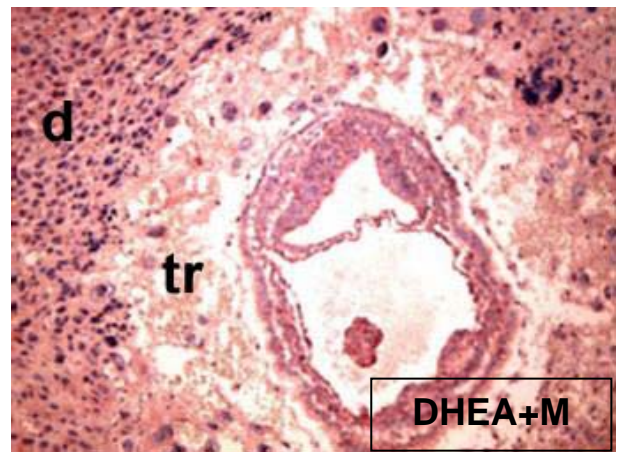


Figura 23 D: Inmunolocalización de PIBF en un sitio de implantación de un animal del grupo DHEA+Metformina (8 días de preñez). En rojo: marca positiva. Aumento: 40 X.

7. Acción de la metformina en la expresión de linfocitos T CD4+/CD8+ en ganglios retroperitoneales y sitios de implantación

La expresión de los subtipos linfocitarios T CD4+/CD8+ estudiada en ganglios linfáticos retroperitoneales no mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales, siendo significativamente mayor la proporción de T CD4+ que de T CD8+ en todos los grupos ($p < 0.0001$, Figura 24 A).

Luego, la inmunolocalización de células CD4+ en los sitios de implantación (verde fluorescente) fue similar en el tratamiento con metformina y en el control (Figuras 24 B- E).

8. Rol de la metformina en la abundancia y localización de Ciclooxygenasa 2 (COX-2) en los sitios de implantación

La abundancia de la enzima ciclooxygenasa 2 (COX-2) determinada por western blotting en los tejidos uterinos fue significativamente mayor en el grupo tratado con metformina respecto del Control ($p < 0.05$, Figura 25 A).

La localización por inmunohistoquímica de la enzima COX-2 fue similar en los sitios tratados con metformina y en los controles (Figuras 25 B- D). En conjunto, estas figuras indican que el tratamiento con metformina evitó el aumento en la abundancia de COX-2 y el cambio en su localización en los sitios de implantación inducidos por la hiperandrogenización durante la preñez temprana.

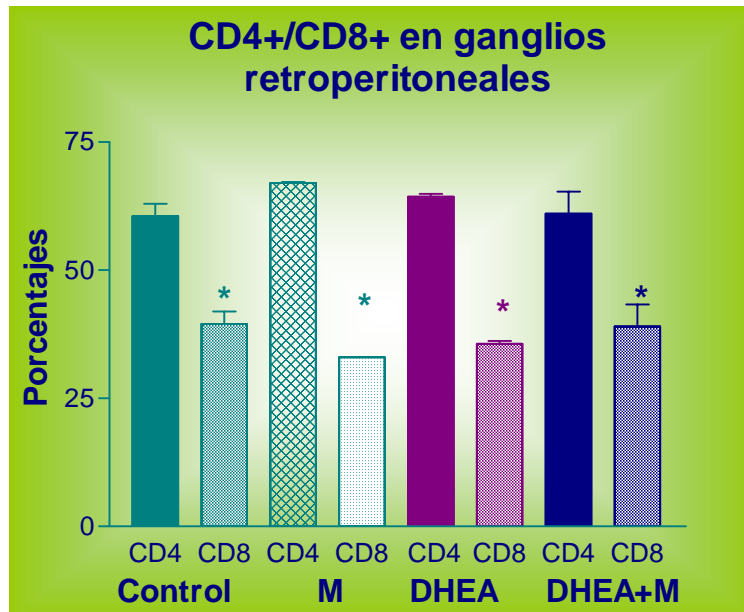


Figura 24 A: La expresión de subtipos linfocitarios T CD4+/CD8+ en ganglios drenantes de ovario medida por citometría de flujo no se vio modificada por ninguno de los tratamientos.



Figura 24 B: Inmunohistoquímica de fluorescencia para linfocitos T CD4 + en un sitio de implantación de un animal del grupo Control (8 días de preñez). En verde brillante: marca positiva. Aumento: 40 X.



Figura 24 D: Inmunohistoquímica de fluorescencia para linfocitos T CD4 + en un sitio de implantación de un animal del grupo DHEA (8 días de preñez). En verde brillante: marca positiva. Aumento: 40 X.

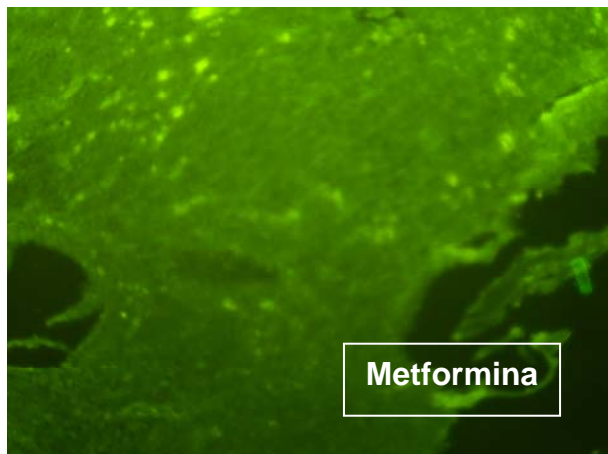


Figura 24 C: Inmunohistoquímica de fluorescencia para linfocitos T CD4 + en un sitio de implantación de un animal del grupo Metformina (8 días de preñez). En verde brillante: marca positiva. Aumento: 40 X.

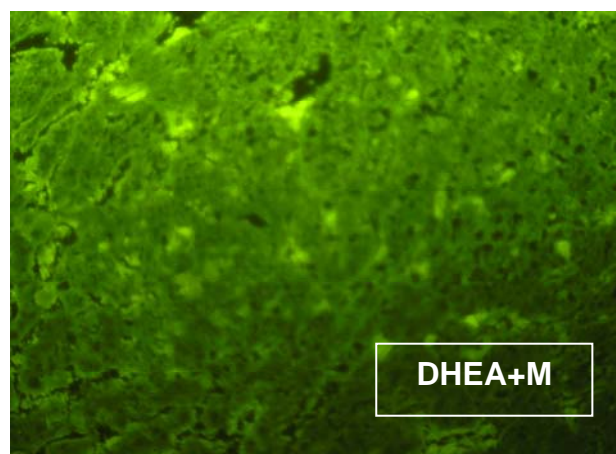


Figura 24 E: Inmunohistoquímica de fluorescencia para linfocitos T CD4 + en un sitio de implantación de un animal del grupo DHEA+Metformina (8 días de preñez). En verde brillante: marca positiva. Aumento: 40 X.

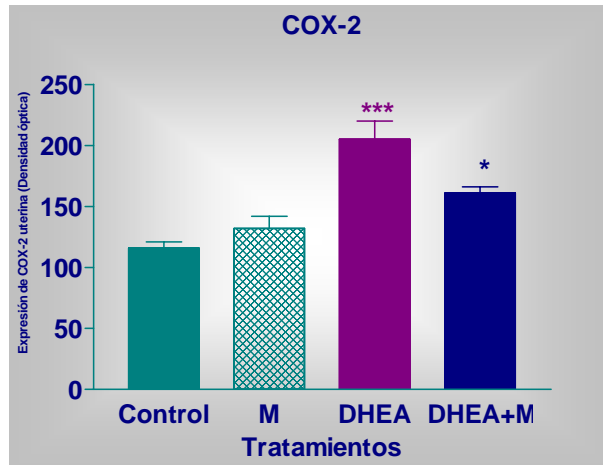
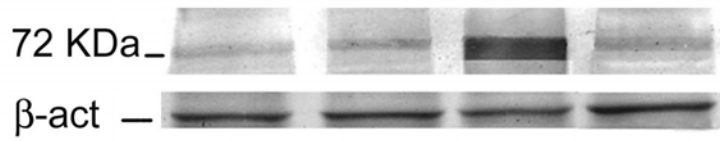


Figura 25 A: determinación de COX-2 por western blotting en los sitios de implantación. La metformina junto con DHEA provocó un aumento significativo respecto del Control (ANOVA: $p < 0,05$).

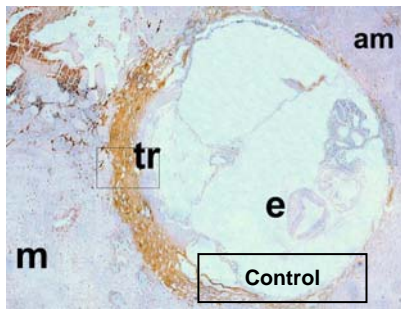


Figura 25 B: Inmunohistoquímica para COX-2 en un sitio de implantación del grupo Control (8 días de preñez). Aumento: 40 X.

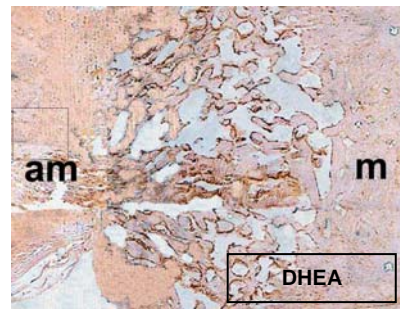


Figura 25 C: Inmunohistoquímica para COX-2 en un sitio de implantación reabsorbido (8 días de preñez). Aumento: 40 X.

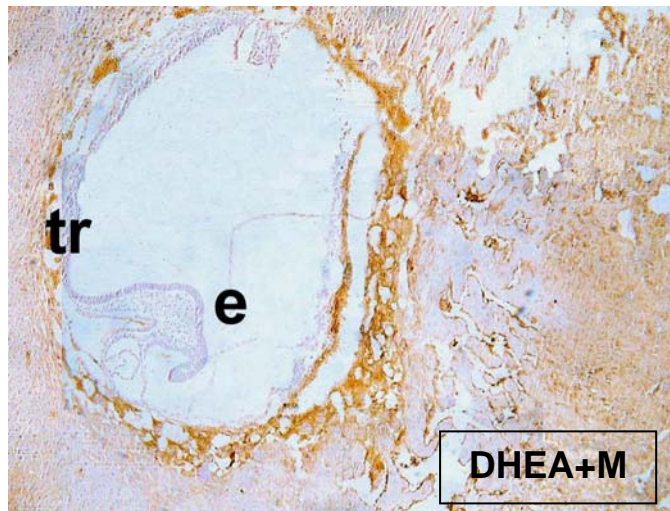


Figura 25 D: Inmunohistoquímica para COX-2 en un sitio de implantación del grupo DHEA+Metformina (8 días de preñez). Aumento: 40 X. Presenta un patrón de marca similar al Control. **tr:** trofoblasto. **e:** embrión.

9. Acción de la metformina sobre los niveles de prostaglandina E y F2 alfa liberadas por los sitios de implantación

Los niveles de PGE y PGF2 alfa liberadas por los sitios de implantación fueron iguales en el grupo DHEA + metformina y en el grupo control. (Figura 26 A y 26 B).

10. Rol de la metformina sobre la Óxido nítrico sintasa (NOS) en los sitios de implantación

La localización de iNOS y eNOS por inmunohistoquímica fue similar en el tratamiento con metformina y en el control (Figuras 27 y 28 A- C).

La semi-cuantificación de la densidad de ambas isoformas fue restituida por el tratamiento con metformina, aunque en este grupo también se observaron diferencias respecto del Control ($p < 0.001$, Figuras 27 D para iNOS y 28 D para eNOS).

En conjunto, estas figuras indican que el tratamiento con metformina evitó el aumento en la densidad de iNOS y eNOS y el cambio en su localización en los sitios de implantación inducidos por la hiperandrogenización durante la preñez temprana.

11. Acción de la metformina en la producción de Óxido nítrico por los sitios de implantación

Los nitritos fueron restituidos a los valores de control por el tratamiento con metformina (Figura 29).

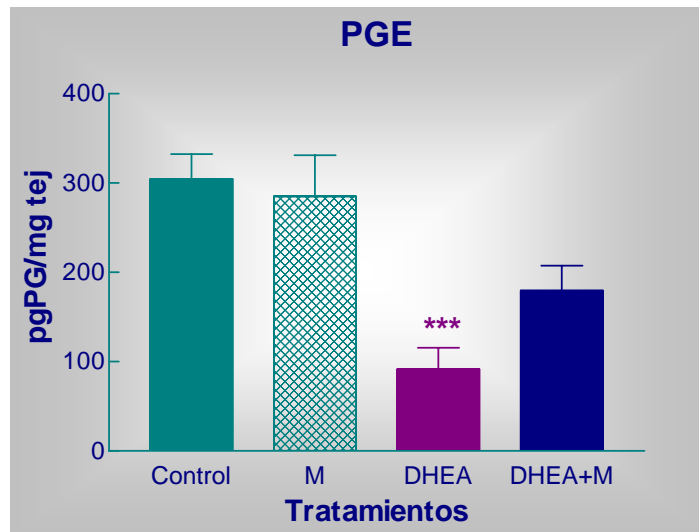


Figura 26: La metformina evitó la disminución en la PGE liberada provocada por la hiperandrogenización.

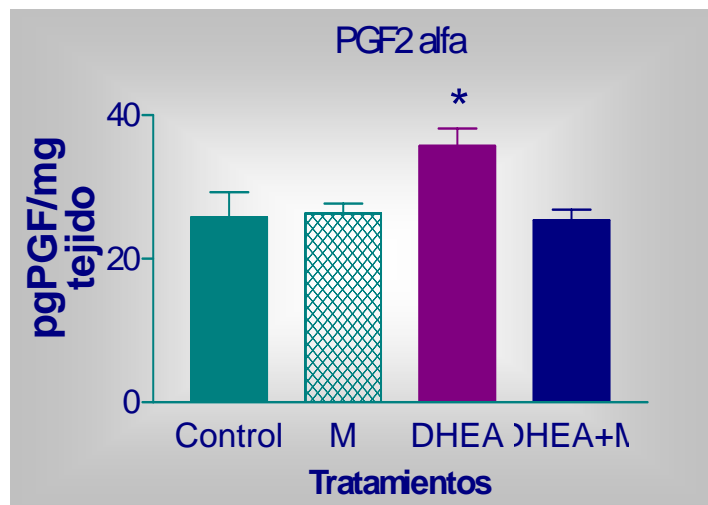


Figura 26 B: La metformina evitó el aumento en la PGF2 alfa liberada provocada por la hiperandrogenización.

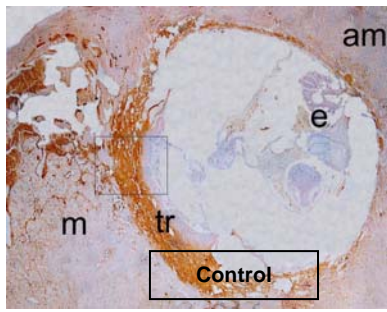


Figura 27 A: Inmunohistoquímica para iNOS en un sitio de implantación del grupo Control (8 días de preñez). Color marrón: marca positiva. Aumento: 40 X.

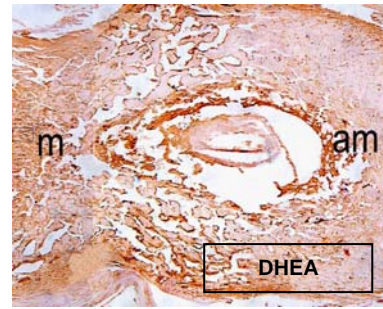


Figura 27 B: Inmunohistoquímica para iNOS en un sitio de implantación reabsorbido (8 días de preñez). Color marrón: marca positiva. Aumento: 40 X.

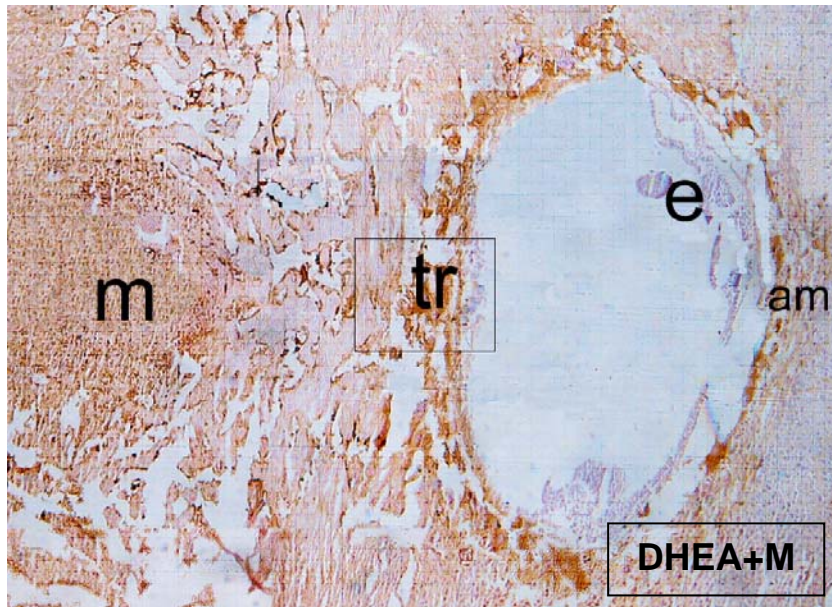


Figura 27 C: Inmunohistoquímica para iNOS en un sitio de implantación del grupo DHEA+Metformina (8 días de preñez). Aumento: 40 X. Presenta un patrón de marca similar al Control. **tr:** trofoblasto. **e:** embrión.

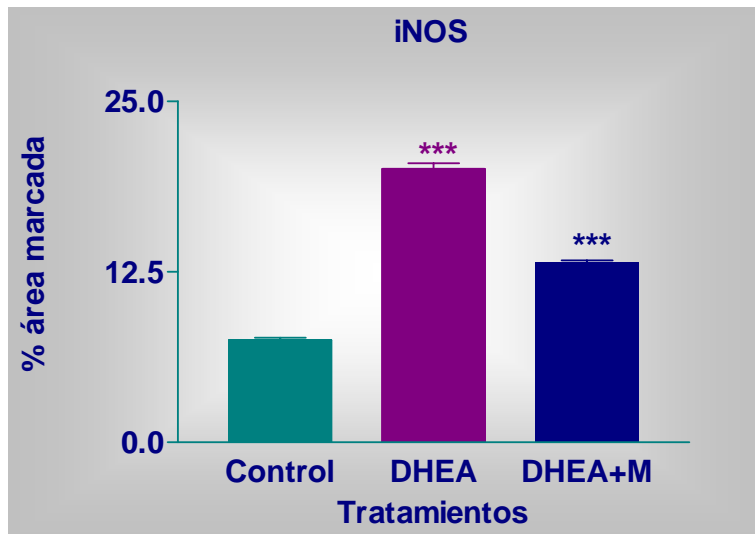


Figura 27 D: cuantificación del área marcada en la inmunohistoquímica de iNOS en los sitios de implantación por el programa Image Pro Plus. El tratamiento simultáneo con DHEA+Metformina provocó un aumento significativo (ANOVA: $p < 0,005$).

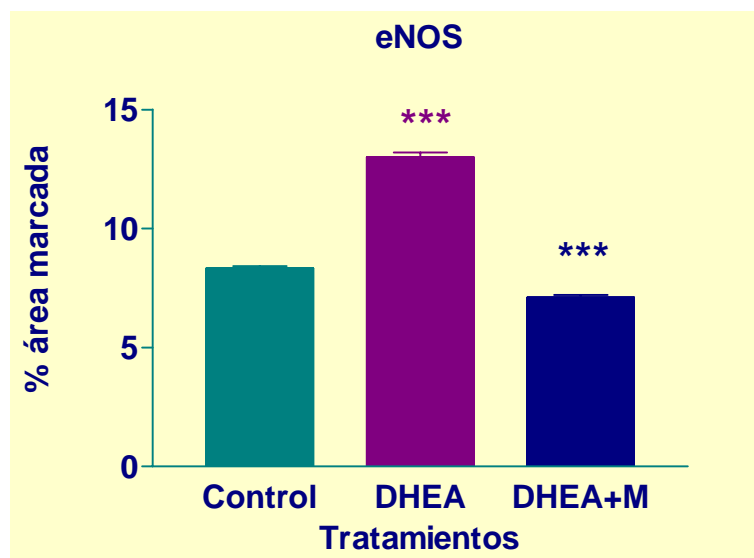


Figura 28 D: cuantificación del área marcada en la inmunohistoquímica de eNOS en los sitios de implantación por el programa Image Pro Plus. El tratamiento simultáneo con DHEA+Metformina provocó un aumento significativo (ANOVA: $p < 0,005$).

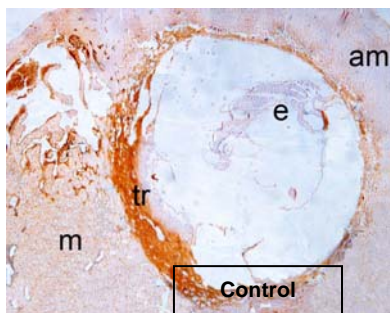


Figura 28 A: Inmunohistoquímica para eNOS en un sitio de implantación del grupo Control (8 días de preñez). Color marrón: marca positiva. Aumento: 40 X.

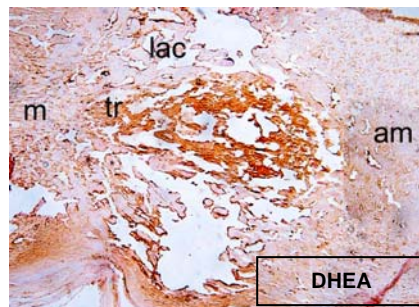


Figura 28 B: Inmunohistoquímica para eNOS en un sitio de implantación reabsorbido (8 días de preñez). Color marrón: marca positiva. Aumento: 40 X.

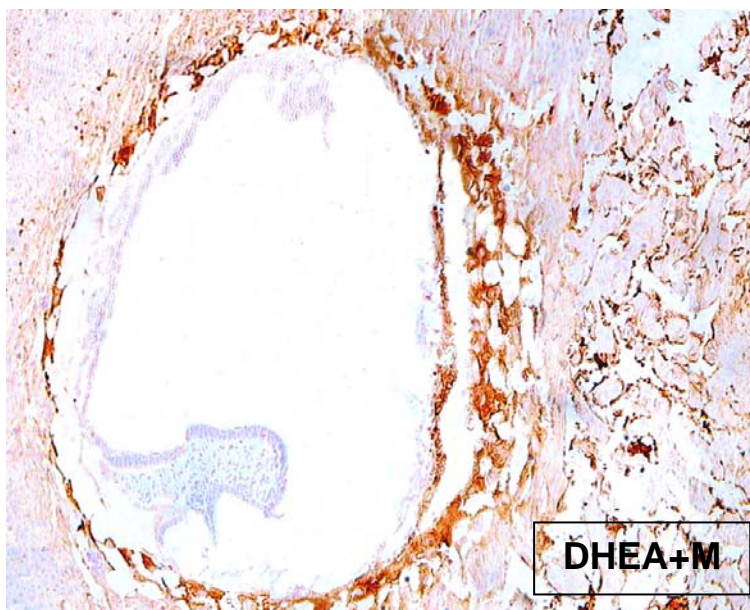


Figura 28 C: Inmunohistoquímica para eNOS en un sitio de implantación del grupo DHEA+Metformina (8 días de preñez). Aumento: 40 X. Presenta un patrón de marca similar al Control.

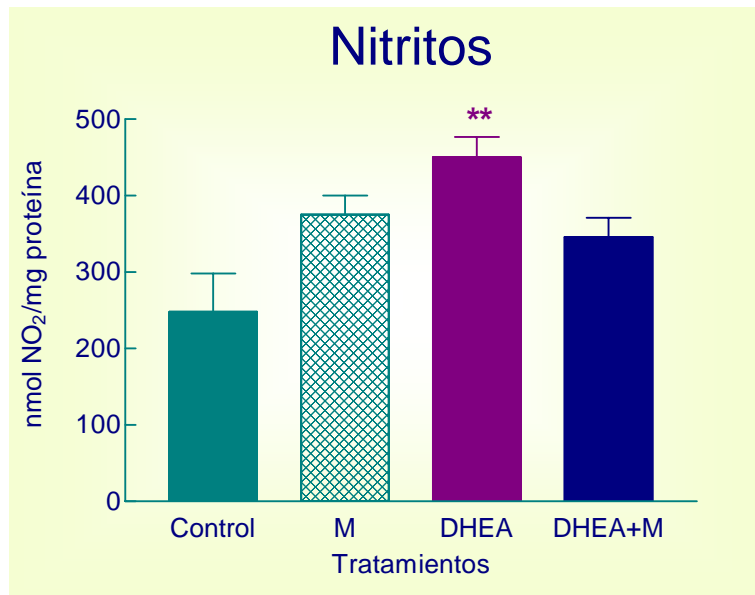


Figura 29: Nitritos en los sitios de implantación medidos por el método de Griess. El tratamiento con metformina evitó el aumento provocado por la hiperandrogenización.

12. *Acción de la metformina sobre el estrés oxidativo en los sitios de implantación*

No se observaron diferencias significativas en las enzimas antioxidantes SOD y CAT entre los grupos (Figuras 30 A y B). El contenido de GSH se vio aumentado por el tratamiento con metformina ($p < 0.01$, Figura 30 C). La peroxidación lipídica fue restituida a los niveles de control por el tratamiento con metformina (Figura 30 D).

En conjunto, estas figuras indican que el tratamiento con metformina evitó el aumento en el estrés oxidativo en los sitios de implantación inducido por la hiperandrogenización durante la preñez temprana. Esto se resume en el esquema de la Figura 31.

13. *Rol de la metformina en la abundancia de Ciclooxygenasa 2 (COX-2) en los ovarios*

El tratamiento con metformina provocó un aumento significativo en la abundancia de COX-2 respecto del Control ($p < 0.05$). El control que sólo recibió metformina también se mostró mayor que el control ($p < 0.05$, Figura 32).

14. *Acción de la metformina en la abundancia de Óxido nítrico sintasa (NOS) en los ovarios*

La abundancia de la iNOS cuantificada por western blotting en homogenatos de ovarios se vio restituida a los valores de control por el tratamiento con metformina (Figura 33).

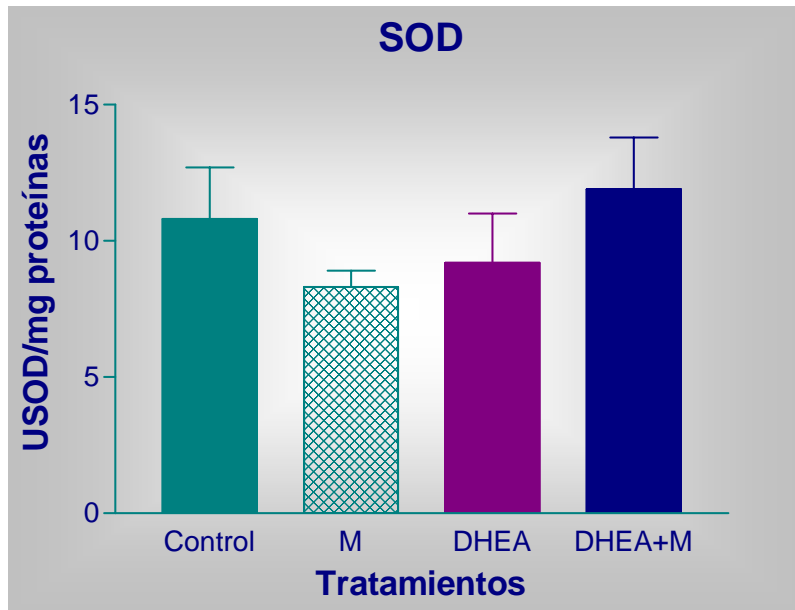


Figura 30 A: enzima superóxido dismutasa en los sitios de implantación determinada por método colorimétrico. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

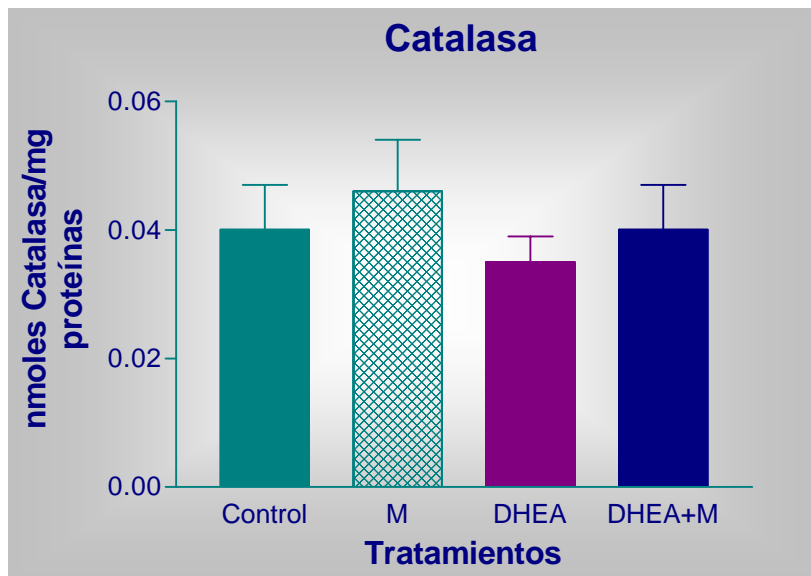


Figura 30 B: enzima catalasa en los sitios de implantación determinada por método colorimétrico. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

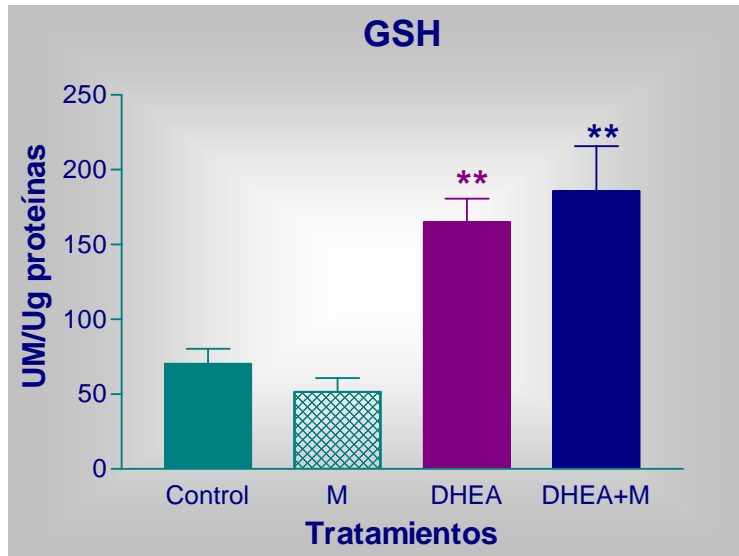


Figura 30 C: concentración de glutatión total en los sitios de implantación. El grupo DHEA+Metformina presentó valores significativamente mayores que el Control (ANOVA: $p < 0.01$).

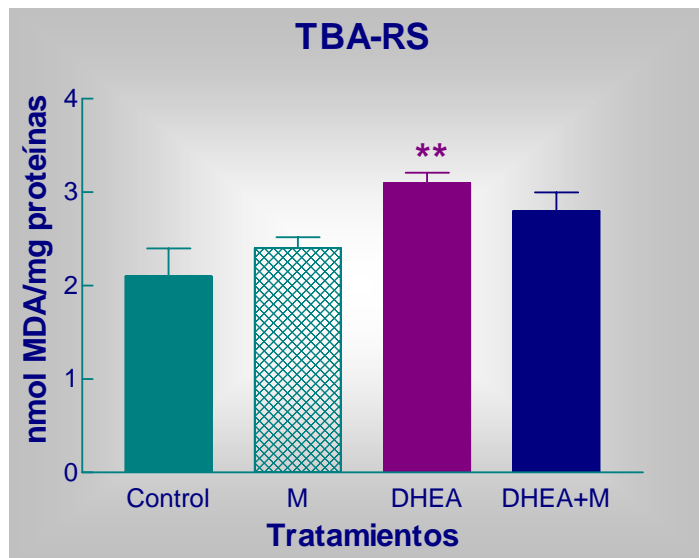
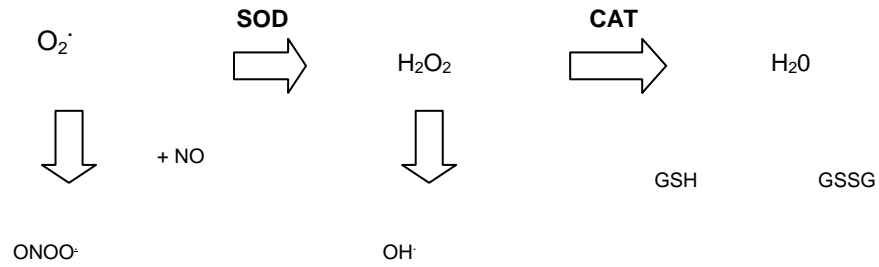
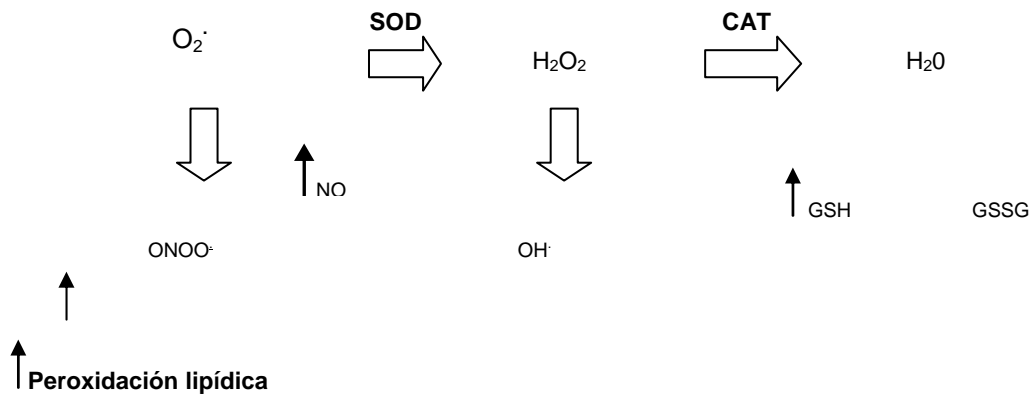


Figura 30 D: producto de la peroxidación lipídica en los sitios de implantación. La metformina evitó el aumento provocado por la hiperandrogenización.

A. Control



B. DHEA



C. DHEA+ M

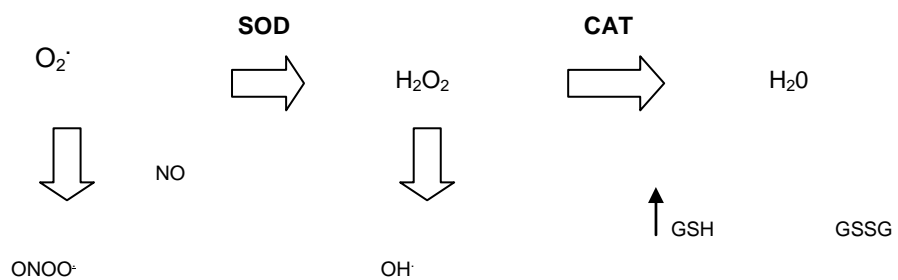


Figura 31: Esquema que resume el balance oxidante/ antioxidante mediante los parámetros medidos en los sitios de implantación de animales de todos los grupos experimentales. La metformina evitó los efectos de la hiperandrogenización sobre los nitritos y la peroxidación lipídica, mientras que el glutatión se mantuvo elevado en este grupo.

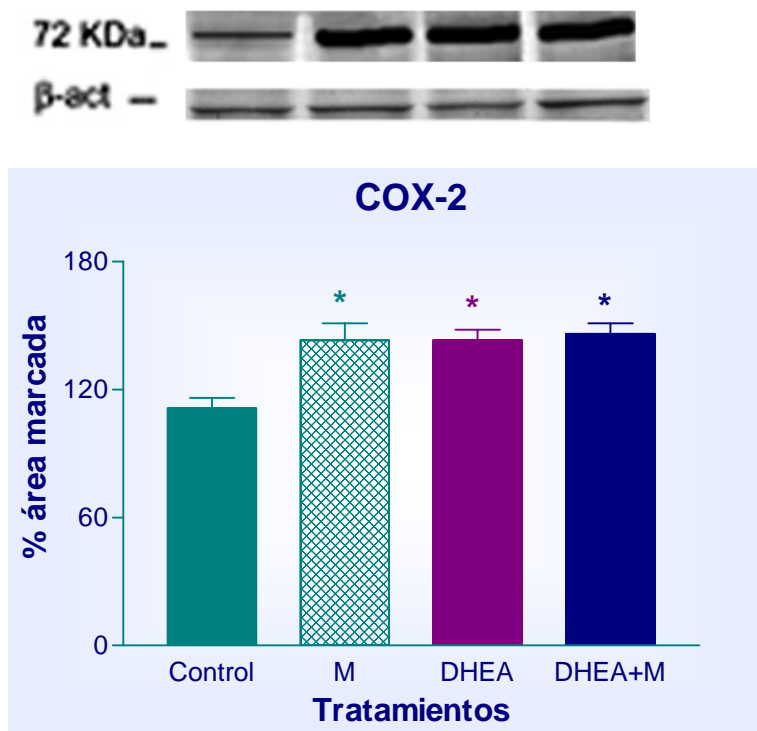


Figura 32: Abundancia de la ciclooxigenasa 2 en ovarios medida por western blotting. Se vio un incremento de dicha enzima en el grupo DHEA.

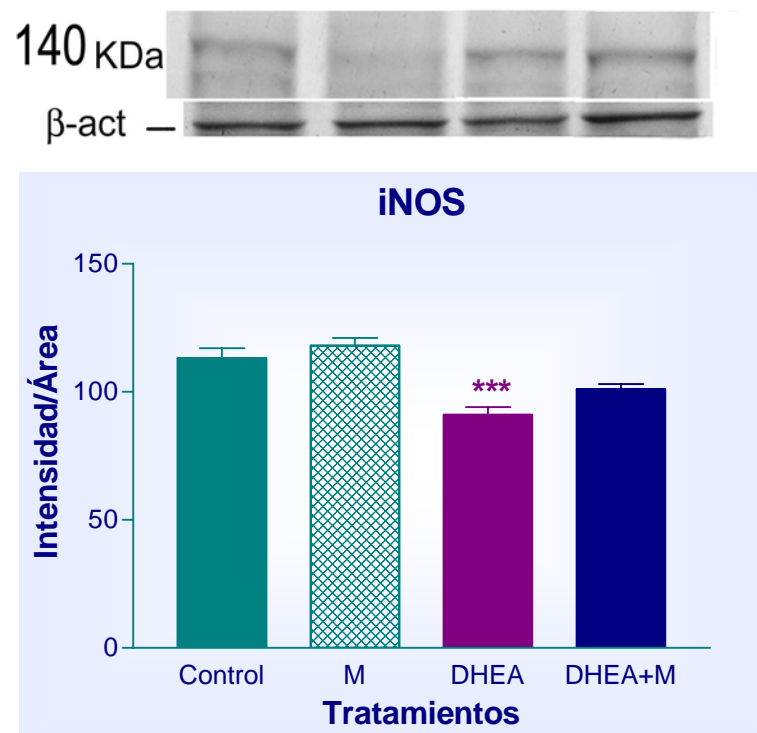


Figura 33: Expresión de la óxido nítrico sintasa inducible medida por western blotting en ovarios. La metformina evitó la disminución provocada por la hiperandrogenización.

Capítulo IV

Discusión

El objetivo del presente trabajo de tesis fue investigar el efecto del hiperandrogenismo sobre el desarrollo de la preñez temprana. Asimismo estudiamos los mecanismos mediante los cuales actúa la N, N`dimetilbiguanida: metformina.

En ensayos iniciales utilizamos un modelo murino donde ratones BALB/c preñados, eran hiperandrogenizados durante el período peri implantatorio con dehidroepiandrosterona (DHEA; durante los días 2 a 7 de preñez). Aquí cabe aclarar que: 1) la implantación se produce en el día 5 de preñez (día 0 de preñez la aparición de tapón mucoso), 2) utilizamos DHEA porque es el andrógeno más abundante que sintetiza el ovario de mujeres con Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP), 3) es por ello que se ha desarrollado un modelo murino de poliquistosis ovárica inyectando DHEA en roedores. La dosis utilizada es equivalente a los niveles de DHEA en circulación de las mujeres con SOP (Malesh y col 1962, Roy y col 1962, Lee y col 1991, 1998, Anderson y col 1992, Henmi y col 1991, Luchetti y col 2004, Sander y col 2005, 2006; Elia y col 2006, Solano y col 2006). Volviendo a nuestros resultados, encontramos que en el 100 % de los animales preñados e hiperandrogenizados durante el periodo peri implantatorio se vio impedida la implantación. Estos hallazgos nos llevó a utilizar el modelo de hiperandrogenización post implantatorio (esto es, inyección de DHEA en los días 6 y 7). Se observó que las hembras hiperandrogenizadas que habían sufrido reabsorción embrionaria mostraban el 100 % de los sitios reabsorbidos, por lo tanto fueron cuantificados los animales con reabsorción embrionaria y no los sitios reabsorbidos. El 82 % de animales hiperandrogenizados presentaron reabsorción embrionaria.

Estudiamos también cuales eran los mecanismos moleculares involucrados en el tratamiento con metformina. La metformina es una biguanida que comenzó siendo utilizada en el tratamiento de diabetes tipo 2 y que es capaz de normalizar los niveles de glucosa circulante sin afectar la secreción de insulina (Stumvoll y col 1995). Esta acción la ejerce a través de dos mecanismos distintos: la mayor utilización de glucosa por los tejidos y la disminución de la producción hepática de glucosa (Hundal y col 2000). Para su acción, la metformina activa la quinasa dependiente de AMP (AMPK) mediante

la cual se disminuye la producción de glucosa y se incrementa la oxidación de ácidos grasos (Fryer y col 2002; Elia y col 2006). Además de su tradicional función como regulador de la glucosa -como las sulfonilureas o la insulina- la metformina es capaz de mejorar las funciones cardiovasculares y disminuir el riesgo cardiovascular (Zhou y col 2001). Recientemente la metformina ha comenzado a utilizarse como tratamiento de mujeres con SOP (Fedorcsak y col 2003; Harbone y col 2003). En ese contexto se ha visto que la metformina disminuye los niveles de andrógenos circulantes, mejora la frecuencia ovulatoria (Nestler y col 1996; Ehrmann y col 1997; Velazquez y col 1997; Diamanti-Kandarakis y col 1998; Negri y col 2000; Glueck y col 2001; Jakubowicz y col 2001; la Marca y col 2002) y previene abortos cuando es administrada durante el primer trimestre de embarazo en mujeres con SOP (Jakubowicz y col 2001; Glueck y col 2004; Khattab y col 2006). Sin embargo se desconoce la totalidad del mecanismo de acción de esta droga. Ya que la combinación de drogas resulta en tratamientos del Síndrome del Ovario Poliquístico mas efectivos que las drogas aisladas, consideramos de suma importancia investigar el alcance de acción de la metformina como tratamiento del hiperandrogenismo.

Luego de determinado el modelo murino a utilizar evaluamos el efecto de la hiperandrogenización y el tratamiento con metformina focalizando nuestros estudios a **nivel sistémico** y a **nivel local** (en sitios de implantación, ganglios linfáticos drenantes y en ovarios). Los animales con reabsorción embrionaria inducida por DHEA tenían menores niveles de progesterona y estradiol en suero e incremento de glucosa. O sea que el hiperandrogenismo estaba disminuyendo la esteroidogénesis ovárica y según lo evaluado por el índice HOMA (Homeostasis Model Assessment) inducía insulino resistencia. Observamos que la metformina fue capaz de normalizar los niveles de progesterona y de estradiol y prevenir la insulino resistencia (ya que normaliza los niveles de glucosa en sangre). El cuerpo lúteo es una glándula fundamental que a través de la síntesis de progesterona actúa como soporte de la preñez temprana en mamíferos. Por otra parte el estradiol induce y mantiene la expresión de los receptores de progesterona (Graham y Clarke 1997), estimula al tejido endometrial, inicia la microvascularización y angiogénesis (Ferrara 1999) y es fundamental durante el proceso de

implantación (Rockwell y col 2002). Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con metformina estaría modulando el proceso implantatorio y la funcionalidad del cuerpo lúteo mediante la regulación de los niveles de estradiol y progesterona. En estudios previos se ha demostrado la capacidad de la metformina en normalizar el perfil hormonal en mujeres con SOP (Vandermolen y col 2001; Harbone y col 2003b; Weerakiet y col 2004; Kumari y col 2005). Pero tengamos en cuenta que aún aunque el ambiente hormonal sea normalizado y por lo tanto las mujeres con SOP ovulen y hasta puedan embarazarse, estas mujeres tienen altos índices de abortos tempranos (Homburg y col 1988). En otras palabras, esta patología es tan compleja que va más allá de normalizar los niveles hormonales y es por ello que esta tesis está dirigida a enfocar otros aspectos.

Los resultados muestran que el hiperandrogenismo inducido por DHEA lleva al establecimiento de insulino resistencia y que esto es prevenido por el tratamiento con metformina. A través de la regulación glucosa/insulina, la metformina estaría indirectamente modulando la esteroidogénesis ovárica tal como ha sido descrito (la Marca y col 2002). En síntesis, postulamos que la metformina regularía la esteroidogénesis ovárica directamente actuando sobre las células ováricas e indirectamente a través de la modulación de la insulino resistencia.

El establecimiento y mantenimiento de la preñez se encuentran asociados con la predominancia de citoquinas sistémicas del tipo Th2, mientras que los abortos están asociados con elevados niveles de citoquinas del tipo Th1 (Lim y col 1998; Clark y Croitoru 2001). El balance Th2 / Th1 se encuentra controlado hormonalmente. En particular, la progesterona promueve el desarrollo de la respuesta Th2. El efecto biológico de la progesterona está mediado por un complejo mecanismo el cual incluye la síntesis del *Factor Bloqueante Inducido por Progesterona* (PIBF). Hasta el presente, se ha postulado que el PIBF es sintetizado por linfocitos de mujeres embarazadas y que mediante esta síntesis se inhibe la liberación de ácido araquidónico y por lo tanto la producción de prostaglandinas (Szekeres-Bartho y col 1989). Más aún, bajas concentraciones uterinas de PIBF se asocian a abortos espontáneos (Polgár y col 2004). En el presente trabajo de tesis y mediante la utilización de un modelo murino, se demuestra que el hiperandrogenismo

inhibe la expresión de PIBF en los sitios de implantación. Pero lo novedoso es el hecho de que tanto el trofoblasto como la decidua mostraron reactividad para PIBF en los controles y en los grupos tratados con metformina, siendo ésta la primera evidencia de que otro tipo de célula diferente de linfocitos (tal como había sido documentado hasta el momento) es capaz de producir PIBF. Podemos ver que la ausencia de PIBF (ocasionada por el hiperandrogenismo) se correlaciona con niveles disminuidos de progesterona. Los antecedentes señalan que la neutralización de PIBF resulta en la pérdida de la preñez (Polgar et al 2004, Szereday et al 1997) y estos resultados se correlacionan con los presentados en este trabajo de tesis donde hemos encontrado una correlación directa entre la tasa de reabsorción y la falta de expresión del PIBF en útero.

Paralelamente analizamos el balance de citoquinas Th2/Th1. Del tipo Th2 cuantificamos IL-4 e IL-6 y del tipo Th1 al IFN gamma y a la IL-2. Vimos que la DHEA disminuía los niveles séricos de la IL-6 e incrementaba los de IL-2. La metformina

-no solo restauró la expresión de PIBF- sino que evitó la reducción de la IL-6 y aunque no pudo corregir el aumento en la producción de la IL-2 inducido por DHEA, previno la reabsorción embrionaria. Estos resultados sugieren que los niveles elevados de IL-2 son menos críticos que los niveles disminuidos de IL-6 para el mantenimiento de la preñez temprana. Este concepto está respaldado por el hecho de que la IL-6 actúa como un disparador de la síntesis de anticuerpos asimétricos, como un mecanismo inmunológico protector que se desata específicamente durante la preñez (Szekeres-Bartho y col 1989; Blois y col 2004). Más aún, Blois y col (2004) demostraron que es la ausencia en la producción de IL-6 por las células trofoblásticas y deciduales (y no la de otra citoquina) la que está relacionada con la patología abortiva. Cabe destacar que el tratamiento con metformina sola incrementó los niveles séricos de IL-6. Aquí tenemos que tener en cuenta que en estudios previos hemos encontrado que la metformina sola es capaz de aumentar las defensas antioxidantes de los linfocitos T a niveles más altos aún que los controles (Solano y col 2008). Estos resultados y los presentados en esta tesis demuestran que la metformina es capaz de modificar las “condiciones basales”. De hecho, Palomba y col (2006) encontraron que la metformina es

capaz de inducir un potencial reproductivo más elevado, con tasas de abortos espontáneos menores aún que los controles sin tratamiento alguno.

No se detectaron niveles séricos de IFN gamma en los sueros de ratones bajo ningún tratamiento durante la preñez temprana. Podríamos inferir que tal como ocurre en mujeres durante el primer trimestre de embarazo donde no existe síntesis de IFN gamma (Germain et al 2007) en el ratón estaría ocurriendo lo mismo.

Como hemos señalado, el PIBF inhibe la liberación de ácido araquidónico (Szekeres-Bartho y col 1989), que es convertido en prostaglandinas por la enzima COX-2. Estamos describiendo en forma novedosa que existe un efecto directo tanto de DHEA como de metformina sobre la localización y la expresión de la COX-2 en los sitios de implantación. En los animales tratados con DHEA, observamos una expresión aumentada de COX-2 uterina (recordar que esto se correlaciona con la ausencia de expresión de PIBF). Sin embargo, la metformina llevó la abundancia de COX-2 uterina a los valores controles.

Conjuntamente encontramos que en los sitios de implantación, la producción de la prostaglandina E (PGE) estaba disminuida y la de PGF2 alfa aumentada por el hiperandrogenismo. La metformina fue capaz de llevar ambos prostanoides a los niveles controles. Considerando que la enzima PGE2 9 ceto reductasa, que convierte la PGE (un mediador lueoprotector y responsable de la relajación de la musculatura uterina) a PGF2 alfa (lutelítico y vasoconstrictor de la musculatura uterina), está regulada negativamente durante la preñez (Farina y col 2006) todo parece indicar que el hiperandrogenismo modificaría en forma directa o indirecta la actividad de esta enzima y que el tratamiento con metformina lo revierte.

En resumen, el posible mecanismo que resulta en la reabsorción embrionaria en los ratones hiperandrogenizados con DHEA incluye: 1) la ausencia de producción de PIBF debida a la reducida disponibilidad de progesterona, 2) la producción disminuida de IL-6 debida a la ausencia de PIBF y 3) la expresión incrementada de COX-2 con incremento de la PGF2 alfa. La metformina fue capaz de revertir estos caminos anómalos que llevan a la reabsorción embrionaria.

Otro de los aspectos “locales” (en los sitios de implantación) evaluados fue el balance oxidante/antioxidante. Los sitios de implantación son regiones muy dinámicas respecto al control de la vasculatura, porque la invasión trofoblástica provoca la remodelación de los vasos maternos, y la formación de la placenta, un tejido enormemente vascularizado. Localizamos la eNOS y la iNOS por inmunohistoquímica en los sitios de implantación y cuantificamos la concentración de nitritos. Encontramos que la DHEA incrementó la expresión de la eNOS e iNOS y la producción de NO. Estos hallazgos están de acuerdo con trabajos previos sobre efectos directos de la DHEA sobre la síntesis de NO en células endoteliales humanas vía el aumento en la expresión de la eNOS (Chwalisz y col 200, Zou y col 2004). No podemos dejar de remarcar que la hiperandrogenización con DHEA produce un ambiente pro-inflamatorio, el cual se sabe es un disparador de la síntesis del NO (Motta y col 1999). Si bien el NO es fundamental en la preñez (a fin de asegurar la relajación uterina) y en la función vascular (Rengasamy y col 1993, Schini y col 1993, Ariel y col 1998), su exceso está asociado a procesos patológicos (Ignarro y col 1989, Jakubowicz y col 2001). En cuanto a la función del NO en el cuerpo lúteo se ha demostrado un efecto dual, luteoprotector o luteolítico de acuerdo al estado endocrino y con una actividad de la NOS ovárica mayor cuando los cuerpos lúteos son funcionales (Nowicki y col 1997, Motta y col 2001).

Asimismo, el NO también está involucrado con la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNOS), especies que en exceso son perjudiciales para las membranas celulares (Purcell y col 1999). En el presente trabajo demostramos incremento del estrés oxidativo en los sitios de implantación de los ratones hiperandrogenizados con DHEA. Esto se vio reflejado en un aumento de la peroxidación lipídica y en la respuesta antioxidante mediante un aumento en los niveles de glutatión (GSH). Las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa no mostraron cambios con ninguno de los tratamientos. Tal como se muestra en el esquema 31, el hiperandrogenismo aumenta la producción de NO y dado que la actividad de la SOD (enzima que captura radicales superóxido $O_2^{\cdot-}$) no se ve aumentada se acumulan en los sitios de implantación $O_2^{\cdot-}$ que combinado con NO producirían peroxinitrito, $ONOO^{\cdot}$ radical mas agresivo que los radicales de

los que proviene. Más aun al no existir aumento en respuesta al estrés (ocasionado por los andrógenos) en la actividad de la catalasa existiría en los sitios de implantación acumulación de radicales hidroxilos que llevarían al incremento observado en la peroxidación lipídica (Figura 31).

El tratamiento con metformina evitó el aumento en la expresión de la eNOS y la iNOS inducidos por la hiperandrogenización con DHEA. La concentración de NO fue restaurada a los valores controles, y lo mismo ocurrió con la peroxidación lipídica. Por otro lado, los niveles de GSH se mantuvieron elevados en el grupo tratado con metformina. Este mecanismo de defensa antioxidante disponible inmediatamente en los sitios de implantación, podría ser responsable de la disminución en la peroxidación lipídica.

Al igual que en los sitios de implantación, los ovarios provenientes de animales hiperandrogenizados mostraron incrementada abundancia de COX-2 lo que indicaría el establecimiento de un estado pro-inflamatorio. Este estado no pudo ser revertido por el tratamiento con metformina. Sin embargo, esto no parece ser de fundamental importancia ya que de todas formas se revirtió la reabsorción embrionaria producida por el hiperandrogenismo. El hiperandrogenismo disminuyó la expresión de iNOS en ovario que como hemos mencionado anteriormente se ha demostrado debe ser alta durante estadios funcionales del cuerpo lúteo (Motta y col 2001) pudiendo contribuir a una disfunción ovárica que se traduce también en una esteroidogénesis disminuida que junto a la hiperglucemia inducida por DHEA contribuirían a un conjunto de anomalías que afectan a la funcionalidad ovárica. La metformina fue capaz de revertir la disminución de la abundancia de iNOS y por lo tanto recobrar parte de la funcionalidad ovárica que parece ser fundamental para evitar la reabsorción embrionaria.

Otro de los aspectos inmunológicos que evaluamos fue la expresión de los subtipos linfocitarios T CD4+ y CD8+ en los sitios de implantación y en los ganglios retroperitoneales. En estudios previos de hiperandrogenización en la etapa puberal encontramos modificación del subtipo linfocitario T expresado en tejido ovárico y ganglios retroperitoneales (Luchetti y col 2004) sin embargo en el modelo de preñez hiperandrogenizado no encontramos diferencias entre los grupos experimentales. Analizando los dos modelos experimentales podemos considerar que primero, en el modelo

prepuberal la relación CD4+: CD8+ T fue de 1:1 mientras que en el modelo de preñez la relación fue CD4+ > CD8+. Esta diferencia es consecuencia de la diferente condición endocrina e inmune de ambos modelos: prepuber y preñez y de la regulación hormonal (Lawler y col 1999). Más aún, se considera que antes de la luteólisis existe un incremento de la expresión CD8+T circulante (Lawler y col 1999) mientras que durante la preñez, existe preponderancia de CD4+ T (Du y col 2001). Segundo, en estudios previos vimos que la hiperandrogenización era capaz de incrementar los CD8+T, mientras que en el presente trabajo no modifica la expresión de ambos subtipos, pero en el modelo prepuberal hemos androgenizado por un período de 20 días mientras que en el presente trabajo la hiperandrogenización fue de 2 días, tiempo insuficiente para que se diferencien los fenotipos linfocitarios. Finalmente, proponemos que el estado endocrino e inmune durante la preñez es más difícil de ser modificado que durante otros estadios debido a una fuerte regulación que impida que la menor alteración conduzca a la pérdida de la preñez. No olvidemos que justamente para que el feto no sea rechazado por la madre, una de las primeras condiciones es el fino “ajuste” del sistema inmune.

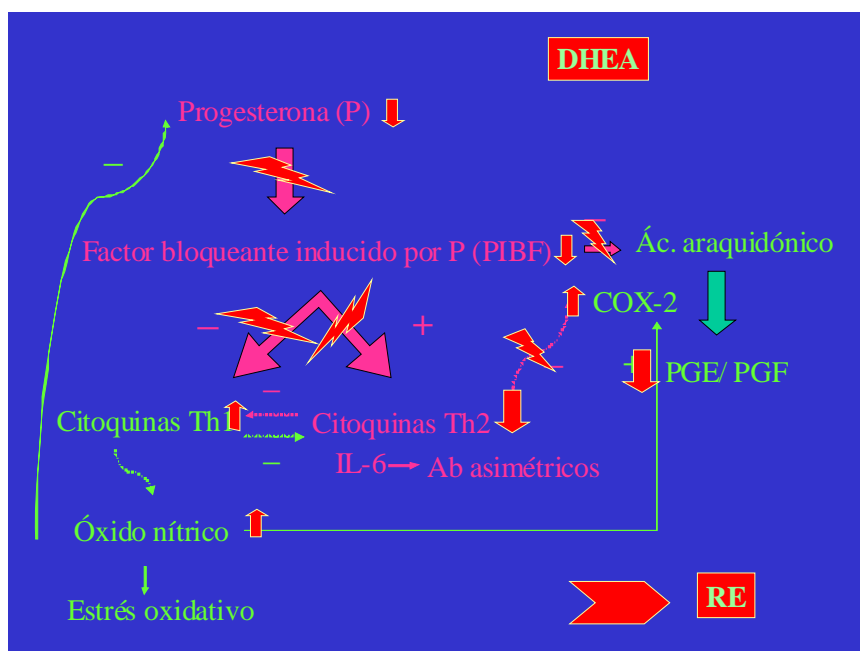
Podemos concluir que los resultados presentados involucran una cascada de eventos que se sincronizan para que la preñez sea exitosa y que involucra componentes del sistema endocrino e inmune. Durante procesos de hiperandrogenismo estos eventos se alteran y se produce la pérdida de la preñez. El tratamiento con metformina evita algunas de estas alteraciones.

Finalmente queremos destacar que en el presente trabajo de Tesis Doctoral se verifica la hipótesis planteada de que el hiperandrogenismo directa o indirectamente afecta la cascada cuyo eje es el factor bloqueante inducido por progesterona y que en parte la metformina es capaz de actuar en ciertos niveles y prevenir estos aspectos adversos. Los datos expuestos representan un importante aporte no sólo al tratamiento sino al conocimiento de la etiología del heterogéneo Síndrome del Ovario Poliquístico.

Conclusiones: Durante el proceso de hiperandrogenización en la preñez temprana en ratón se producen alteraciones endocrinas e inmunes que involucran a la cascada del *factor bloqueante inducido por progesterona* (PIBF) y que llevan a la pérdida de la preñez. Ellas son:

- 1.- Disminución de la esteroidogénesis ovárica (evaluada por progesterona y estradiol en suero)
- 2.- Ausencia de expresión de PIBF en los sitios de implantación
- 3.- Disminución de la interleuquina 6 y aumento de la interleuquina 2 circulantes
- 4.- Aumento de la abundancia de la enzima ciclooxigenasa inducible en los sitios de implantación
- 5.- Aumento de la abundancia de las enzimas óxido nítrico sintasas constitutiva e inducible en los sitios de implantación
- 5.- Aumento de la producción de la luteolítica prostaglandina F2 alfa y disminución de la producción de la luteotrófica prostaglandina E.
- 6.- Aumento de la producción de óxido nítrico por los sitios de implantación
- 7.- Aumento del estrés oxidativo en los sitios de implantación
- 8.- Aumento de la abundancia de la enzima ciclooxigenasa inducible en los ovarios
- 9.- Disminución de la abundancia de la enzima oxido nítrico sintasa inducible en los ovarios

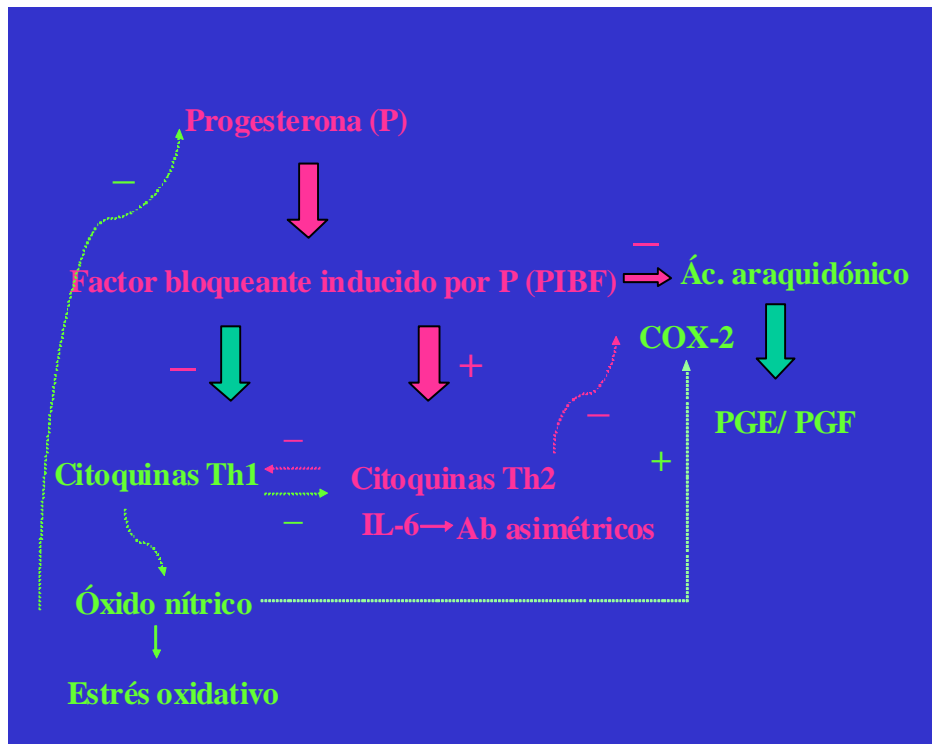
En el siguiente esquema se sintetiza parte de los resultados:



El tratamiento con metformina previno las anomalías endocrinas e inmunes provocadas por la hiperandrogenización y evitó la reabsorción embrionaria ya que:

- 1.- Normalizó la esteroidogénesis ovárica
- 2.- Restituyó la expresión de PIBF en los sitios de implantación
- 3.- Normalizó los niveles de la interleuquina 6 circulante
- 4.- Previno el aumento de la abundancia de la enzima ciclooxigenasa inducible en los sitios de implantación
- 5.- Previno el aumento de la abundancia de las enzimas óxido nítrico sintasas constitutiva e inducible en los sitios de implantación
- 5.- Normalizó los niveles de la prostaglandina F2 alfa y de la prostaglandina E
- 6.- Previno el aumento de la producción de óxido nítrico por los sitios de implantación
- 7.- Previno el aumento del estrés oxidativo en los sitios de implantación
- 8.- Previno la disminución de la abundancia de la enzima óxido nítrico sintasa inducible en los ovarios

En el siguiente esquema se sintetiza parte de los resultados:



Capítulo V

Referencias

- Abbot DH, Dumesic D, Eisner JR, Colman RJ, Kenmitz JW, 1998. Insights into the development of PCOS from studies of prenatally androgenized female rhesus monkeys, *Trends Endocrinol. Metab.* 9 (2), 62–67.
- Abbott DH, Dumesic DA, Franks S, 2002. Developmental origin of polycystic ovary syndrome - a hipótesis. *J Endocrinol.* 174 (1), 1-5.
- Abrahamsohn PA, 1983. Ultrastructural study of the mouse antimesometrial decidua. *Anat. Embryol.* 166, 263–274.
- Abrahamsohn PA, Zorn TMT, 1993. Implantation and decidualization in rodents. *Journal of Experimental Zoology* 266, 603-628.
- Anderson E, Lee MT, Lee GY, 1992. Cytogenesis of the ovarian antral follicle of the rat: ultra structural changes and hormonal profile following the administration of dehydroepiandrosterone. *Anat. Rec.* 234, 359– 382.
- Anderson E, Lee GY, O'Brien K, 1997. Polycystic ovarian condition in the dehydroepiandrosterone-treated rat model: hyperandrogenism and the resumption of meiosis are major initial events associated with cystogenesis of antral follicles. *Anat. Rec.* 249, 44–53.
- Ariel I, Hochberg A, Shochina M, 1998. Endothelial nitric oxide synthase immunoreactivity in early gestation and in throphoblastic disease. *J. Clin. Pathol.* 51, 427–431.
- Baillargeon JP, Luorno MJ, Nestler JE, 2003. Insulin sensitizers for polycystic ovary syndrome. *Clin Obstet Gynecol* 46, 325- 40.
- Baillargeon JP, Jakubowicz DJ, Luorno MJ y col, 2004. Effects of metformina and rosiglitazone, alone and in combination, in nonobese women with polycystic ovary syndrome and normal indices of insulin sensitivity. *Fertil Steril* 82, 893- 902.
- Balen AH, Tan SL, McDougall J, Jacobs HS, 1993. Miscarriage rates following in vitro fertilizat are increased in women with polycystic ovary syndrome and reduced by pituitary desensitization with buserelin. *Hum. Reprod.* 8 (6), 959–964.

- Balsinde J, Diez E, Mollinedo F, 1991. Arachidonic acid release from diacylglycerol in human neutrophils. Translocation of diacylglycerol-deacylating enzyme activities from an intracellular pool to plasma membrane upon cell activation. *J Biol Chem.* 266 (24), 15638-43.
- Barroso RP, Osuamkpe C, Nagamani M, 1998. Nitric oxide inhibits development of embryos and implantation in mice. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 503–507.
- Berdeaux A, 1993. Nitric oxide: an ubiquitous messenger. *Fundam. Clin.Pharmacol.* 7, 401–411.
- Blankenship TN, Given RL, 1992. Penetration of the uterine epithelial basement membrane during blastocyst implantation in the mouse. *Anat. Rec.* 233, 196–204.
- Blois S, Zenclussen AC, Roux ME, Olmos S, di Conza J, Arck PC, Margni RA, 2004. Asymmetric antibodies 245 es (AAb) in the female reproductive tract. *J. Reprod. Immunol.* 64 (1/2), 31–43.
- Bonnefont-Rousselot D, Raji B, Walrand S, Gardès-Albert M, Jore D, Legrand A, Peynet J, Vasson MP, 2003. An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. *Metabolism* 52 (5), 586-9.
- Boveris A, Costa LE, Cadenas E, Poderoso JJ, 1999. Regulation of mitochondrial respiration by adenosine diphosphate, oxygen, and nitric oxide. *Methods Enzymol.* 301, 188-98. Review.
- Buege JA, Aust SD, 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 52, 302- 310.
- Ceriello A, 2000. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* 49, 27–29.
- Chance B, 1954. Special methods: catalase. Glick (ed), R. Interscience. New York, 408-424.

- Chwalisz K, Garfield RE, 2000. Role of nitric oxide in implantation and menstruation. *Hum. Reprod.* 15, 96–111.
- Clark DA, Croitoru K, 2001. TH1/TH2, 3 imbalance due to cytokine producing NK, gamma delta T and NK-gammadelta T cells in murine pregnancy decidua in success or failure of pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 45 (5), 257–265.
- Crave JC, Fimbel S, Lejeune H y col, 1995. Effects of diet and metformina administration on sex hormone–binding globulin, androgens, and insulin in hirsute and obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 2057- 62.
- De Feo VI, 1967. Decidualization. *Cellular Biology of the Uterus*, 191-290.
- Diamanti-Kandarakis E, Kouli C, Tsianateli T, Bergiele A, 1998. Therapeutic effects of metformin on insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome, *Eur. J. Endocrinol.* 138 (3), 269–274.
- Ding A, Nathan M, Stuehr D, 1988. *Journal of Immunology* 141: 2407-12.
- Du C, Wahid Khalil M, Sriram S, 2001. Administration of dehydroepiandrosterone suppress experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice. *J. Immunol.* 167, 7094–7101.
- Ehrmann DA, Cavaghan MK, Imperial J, Rosenfield RL, Polonsky KS, 1997. Effects of metformin on insulin secretion, insulin action, and ovarian steroidogenesis in women with polycystic ovary syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (2), 524–530.
- Ehrmann DA, 2005. Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med* 352, 1223-36.
- Elia E, Sander V, Luchetti CG, Solano ME, Di Girolamo G, Gonzalez C, Motta AB, 2006. The mechanisms involved in the action of metformin in regulating ovarian function in hyperandrogenized mice, *Mol. Hum. Reprod.* 12 (8) 475–481.
- Elizur SE, Tulandi T, 2008. Drugs in infertility and fetal safety. *Fertil Steril* 89 (6), 1595-1602.

- Enders AC, Given RL, Schlafke S, 1978. Differentiation and migration of endoderm in the rat and mouse at implantation. *Anat. Rec.* 190, 65–77.
- Eriksson A, Attvall S, Bonnier M, Eriksson JW, Rosander B, Karlsson FA, 2007. Short-term effects of metformin in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 9 (4), 483-9.
- Farina MG, Billi S, Sordelli MS, Ribeiro ML, Di Girolamo G, Lombardi E, Franchi AM, 2006. Nitric oxide (NO) inhibits prostaglandin E2 9-ketoreductase (9-KPR) activity in human fetal membranes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 79(3-4), 260-70.
- Faure P, Rossini E, Wiernsperger N, Richard MJ, Favier A, Halimi S, 1999. An insulin sensitizer improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity in high fructose-fed rats. *Diabetes* 48 (2), 353-7.
- Fedorcsak P, Dale PO, Storeng R, Abyholm T, Tanbo T, 2003. The effect of metformin on ovarian stimulation and in vitro fertilization in insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome: an open-label randomized cross-over trial. *Gynecological Endocrinology* 17, 207–214.
- Feig DS, Briggs GG, Koren G, 2007. Oral anti-diabetic agents in pregnancy and lactation: a paradigm shift? *Ann Pharmacother* 41 (7), 1174-1180.
- Fenkci V, Fenkci S, Yilmazer M, Sertesser M, 2003. Decreased total antioxidant status and increased oxidative stress in women with Polycystic ovary syndrome may contribute to the risk of cardiovascular disease. *Fertil Steril*, 123-127.
- Finn CA, McLaren A, 1967. A study of the early stages of implantation in mice. *Journal of Reproduction and fertility* 13, 259-267.
- Förstermann U, Kleinert H, 1995. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 352 (4), 351-64. Review.
- Franks S, 1995. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 333, 853-61.
- Fridén BE, Runesson E, Hahlin M, Brännström M, 2000. Evidence for nitric oxide acting as a luteolytic factor in the human corpus luteum. *Mol Hum Reprod.* 6 (5), 397-403.

- Fryer LGD, Parbu-Patel A, Carling D, 2002. The anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signalling pathways, *J. Biol. Chem.* 277 (28), 25226–25232.
- Germain SJ, Sacks GP, Soorana SR, Sargent IL, Redman CW, 2007. Systemic inflammatory priming in normal pregnancy and preeclampsia: the role of circulating syncytiotrophoblast microparticles, *J. Immunol.* 178 (9), 5949–5956.
- Given RL, Enders AC, 1980. Mouse uterine glands during the periimplantation period: fine structure. *Am. J. Anat.* 157, 169–179.
- Given RL, Enders AC, 1981. Mouse uterine glands during the periimplantation period. II. Autoradiographic studies. *Anat. Rec.* 199, 109–127.
- Glueck CJ, Wang P, Fontaine R y col, 1999. Metformin-induced resumption of normal menses in 39 of 43 (91%) previously amenorrheic women with the polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 48, 511 -9.
- Glueck CJ, Fontaine RN, Wang P, Subbiah MT, Weber K, Illig E, Streicher P, Sieve-Smith L, Tracy TM, Lang JE, McCullough P, 2001. Metformin reduces weight, centripetal obesity, insulin, leptin, and low-density lipoprotein cholesterol in nondiabetic, morbidly obese subjects with body mass index greater than 30. *Metabolism* 50 (7), 856–861.
- Glueck CJ, Wang P, Fontaine R y col, 2001. Metformin to restore normal menses in oligo-amenorrheic teenage girls with polycystic ovary syndrome (PCOS). *J Adolesc Health* 29, 160 - 9.
- Glueck CJ, Wang P, Goldenberg N, Sieve-Smith L, 2002. Pregnancy outcomes among women with polycystic ovary syndrome treated with metformin. *Hum. Reprod.* 17 (11), 2858-2864.
- Glueck CJ, Wang P, Goldenberg N, Stieve-Smith L, 2004. Pregnancy loss, polycystic ovary syndrome, thrombophilia, hypofibrinolysis, enoxaparin, metformin. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 10 (4), 323–334.
- Glueck CJ, Dharashivkar S, Wang P y col, 2005. Obesity and extreme obesity, manifest by ages 20-24 years, continuing through 32-41 years in women, should alert

physicians to the diagnostic likelihood of polycystic ovary syndrome as a reversible underlying endocrinopathy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 122, 206- 12.

Goldenberg N, Glueck C, 2008. Medical therapy in women with polycystic ovarian syndrome before and during pregnancy and lactation. *Minerva Gynecol* 60 (1), 63-75.

Goppelt-Struebe M, 1995. Two step purification of human and murine leukotriene C4 synthase. *Biochim Biophys Acta* 1256 (2), 257-61.

Goppelt-Struebe M, 1995. Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozyme expression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 52 (4), 213-22. Review

Gouge RC, Marshburn P, Gordon BE, Nunley W, Huet-Hudson YM, 1998. Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Biol Reprod*. 58 (4), 875-9.

Gutierrez G, Malan Borel I, Margni RA, 2001. The placental regulatory factor involved in the asymmetric IgG antibody synthesis responds to IL-6 features. *J. Reprod. Immunol*. 49 (1), 21–32.

Harborne L, Fleming R, Lyall H y col, 2003 (a). Metformin or antiandrogen in the treatment of hirsutism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 4116- 23.

Harborne L, Fleming R, Lyall H, Norman J, Sattar N, 2003 (b). Descriptive review of the evidence for the use of metformin in polycystic ovary syndrome. *Lancet* 361, 1894–1901.

Henmi H, Endo T, Nagasawa K, Hayashi T, Chida M, Akutagawa N, Iwasaki M, Kitajima Y, Kiya T, Nishikawa A, Manase K, Rudo R, 2001. Lysyl oxidase and MMP-2 expression in dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovary in rats. *Biol. Reprod*. 64 (1), 157–162.

Herrero MB, Viggiano JM, Perez Martinez S, 1996. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on the outcome of in vitro fertilization in the mouse. *Reprod. Fertil. Dev*. 8, 301–304.

- Hou Q, Gorski J, 1993. Estrogen receptor and progesterone receptor genes are expressed differentially in mouse embryos during preimplantation development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9460–9404.
- Hundal RS, Krssak M, Dufour MS, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, Inzucchi SE, Schumann WC, Petersen KF, Landau BR, Shulman GI, 2000. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes, *Diabetes* 49 (12), 2063–2069.
- la Marca A, Morgante G, Palumbo M, Cianci A, Petraglia F, De Leo V, 2002. Insulin-lowering treatment reduces aromatase activity in response to follicle stimulating hormone in women with polycystic ovary syndrome, *Fertil. Steril.* 78 (6), 1234–1249.
- Ibanez L, de Zegher F, 2005. Flutamide-metformin plus ethinylestradioldrospirenone for lipolysis and antiatherogenesis in young women with ovarian hyperandrogenism: the key role of metformin at the start and after more than one year of therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 39 - 43.
- Ignarro LJ, 1989. Endothelium-derived nitric oxide: pharmacology and relationship to the actions of organic nitrate esters. *Pharm Res.* 6 (8), 651-9.
- Ignarro LJ, 1990. Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacol Toxicol.* 67 (1), 1-7. Review
- Jakubowicz DJ, Seppala M, Jakubowicz S, Rodríguez-Armas O, Rivas- Santiago A, Koistinen H, Koistinen R, Nestler J, 2001. Insulin reduction with metformin increases luteal phase serum glycodelin and insulin-like growth factor binding protein 1 concentrations and enhances uterine vascularity and blood flow in the polycystic ovary syndrome, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 86 (3), 1126–1133.
- Johnson MC, Diaz HA, Stocco C, Palomino A, Devoto L, Vega M, 1999. Antisteroidogenic action of nitric oxide on human corpus luteum in vitro: mechanism of action. *Endocrine* 11 (1), 31-6.

- Khattab S, Mohsen IA, Foutouh IA, Ramadan A, Moaz M, Al-Inany H, 2006. Metformin reduces abortion in pregnant women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 22, 680-684.
- Lawler DF, Hopkins J, Watson ED, 1999. Immune cell populations in the equine corpus luteum throughout the oestrus cycle in early pregnancy: an immunohistochemical and flow cytometry study. *J Reprod Fertil* 117, 281-290.
- Lee MT, Anderson E, Lee GY, 1991. Changes in ovarian morphology and serum hormones in the rat after treatment with dehydroepiandrosterone. *Anatomical Record* 231, 185–192.
- Lee GY, Croop JM, Anderson E, 1998. Multidrug resistance gene expression correlates with progesterone production in dehydroepiandrosterone-induced polycystic equine chorionic gonadotropin-stimulated ovaries of prepuberal rats. *Biology of Reproduction* 58, 330–337.
- Lim KJL, Odukoya OA, Ajjan RA, Li TC, Weetman AP, Cooke ID, 1998. Profile of cytokine mRNA expression in peri-implantation human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* 4 (1), 77–81.
- Lo JC, Feigenbaum SL, Yang J y col, 2006. Epidemiology and adverse cardiovascular risk profile of diagnosed polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 1357- 63.
- Lord JM, Flight IH, Norman RJ, 2003 Insulin-sensitising drugs (metformin, troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database System Reviews* 3 CD0033053.
- Luchetti CG, Solano ME, Sander V, Barreiro-Arcos ML, Gonzalez C, Di Girolamo G, Chiocchio S, Cremaschi G, Motta AB, 2004. Effects of dehydroepiandrosterone on ovarian cystogenesis and immune function. *J Reprod. Immunol.* 64, 59–74.
- Mahlesh VB, Greenblatt RB, 1962. Isolation of dehydroepiandrosterone and 17–hydroxy-pregnenolone from polycystic ovaries of the Stein-Leventhal syndrome. *J. Clin. Endocrinol. and Metab.* 22, 441-448.

- Malassine A, Frenzo JL, Evain-Brion D, 2003. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Human Reproduction Update* 9 (6), 531-539.
- Mansfield R, Galea R, Brincat M, Hole D, Mason H, 2003. Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis. *Fertil Steril* 79 (4), 956-962.
- Marletta MA, 1994. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*. 78 (6), 927-30. Review
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS y col, 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412- 9.
- Mc Carthy EA, Walker SP, Mc Lachlan K, Boyle J, Permezel M, 2004. Metformin in obstetric and gynecologic practice: a review. *Obstet Gynecol Surv* 59, 118–127.
- Miki Y, Nakata T, Suzuki T, Darnel AD, Moriya T, Kaneko C, Hidaka K, Shiotsu Y, Kusaka H, Sasano H, 2002. Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 87 (12), 5760-8.
- Misra HP, Fridovich I, 1972. *J. Biol. Chem.* 247 (10), 3170 -3175.
- Mizugishi K, Li C, Olivera A, Bielawski J, 2007. Maternal disturbance in activated sphingolipid metabolism causes pregnancy loss in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 117 (10).
- Moggetti P, Castello R, Negri C, 2000. Metformin effects on clinical features, endocrine and metabolic profiles, and insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebocontrolled 6-month trial, followed by open, long-term clinical evaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 139- 46.
- Moncada S, Higgs A, 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 329 (27), 2002-12. Review.

- Moncada S, Rees DD, Schulz R, Palmer RM, 1991. Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(6), 2166-70.
- Moran LJ, Noakes M, Clifton PM y col, 2003. Dietary composition in restoring reproductive and metabolic physiology in overweight women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 812 - 9.
- Motta AB, Faletti A, Gimeno MAF, 1995. Influence of Progesterone Levels on Prostaglandin Concentrations in Isolated Uterine Tissue and Incubation Medium on Pseudopregnant Rats. *Prostaglandins* 50, 213-223.
- Motta AB, Franchi AM, Gimeno MF, 1997. Role of nitric oxide on uterine and ovarian prostaglandin synthesis during luteolysis in the rat. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 56(4), 265-9.
- Motta AB, Chaud MA, de Gimeno MF 1998. Regulation by nitric oxide of prostaglandin E synthesis and spontaneous motility in rat uterine tissue. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 58(5), 333-8.
- Motta AB, Estevez A, de Gimeno MF, 1999. The involvement of nitric oxide in corpus luteum regression in the rat: feedback mechanism between prostaglandin F(2alpha) and nitric oxide. *Mol Hum Reprod*. 5(11), 1011-6.
- Motta AB, Estevez A, Franchi A, Perez-Martinez S, Farina M, Ribeiro ML, Lasserre A, Gimeno MF, 2001. Regulation of lipid peroxidation by nitric oxide and PGF2alpha during luteal regression in rats. *Reproduction* 121(4), 631-7.
- Motta AB, Estevez A, Tognetti T, Gimeno MA, Franchi AM, 2001. Dual effects of nitric oxide in functional and regressing rat corpus luteum. *Mol. Hum. Reprod*. 7 (1), 43-7.
- Moutsatsou P, Sekeris CE, 1997. Estrogen and progesterone receptors in the endometrium. *Ann N Y Acad Sci*. 816, 99-115.
- Narko K, Ritvos O, Ristimäki A, 1997. Induction of cyclooxygenase-2 and prostaglandin F2alpha receptor expression by interleukin-1beta in cultured human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 138 (9), 3638-44.

- Nathan C, Xie QW, 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 78 (6), 915-8. Review.
- Natuzzi ES, Ursell PC, Harrison M, 1993. Nitric oxide synthase activity in the pregnant uterus decreases at parturition. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 194, 1–8.
- Negri PCC, Tosi F, Perrone M, Caputo E, Zanolin M, Muggeo M, 2000. Metformin effects on clinical features, endocrine and metabolic profiles, and insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome: A randomized, double-blind, placebo-controlled 6-month trial, followed by open, long-term clinical evaluation, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (1), 139–146.
- Nestler JE, Powers LP, Matt DW y col, 1991. A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 72, 83 -9.
- Nestler JE, Jakubowicz DJ, 1996. Decreases in ovarian cytochrome P450c17{alpha} activity and serum free testosterone after reduction of insulin secretion in polycystic ovary syndrome, *N. Engl. J. Med.* 335 (9), 617–623.
- Nestler JE, 1997. Role of hyperinsulinemia in the pathogenesis of the polycystic ovary syndrome, and its clinical implications. *Semin Reprod Endocrinol* 15, 111 - 22.
- Nestler JE, Jakubowicz DJ, 1997. Lean women with polycystic ovary syndrome respond to insulin reduction with decreases in ovarian P450c17 alpha activity and serum androgens. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4075- 9.
- Nestler JE, Jakubowicz DJ, de Vargas AF y col, 1998. Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 2001- 5.
- Nestler JE, 2003. Insulin resistance syndrome and polycystic ovary syndrome. *Endocr Pract* 9 (2), 86 - 9.

Nowicki B, Fang I, Singhal J, Nowicki S, Yallampalli C, 1997. Lethal outcome of uterine infection in pregnant but not in non-pregnant rats and increased death rate with inhibition of nitric oxide. *Am. J. Reprod. Immunol.* 38, 309–312.

Okon MA, Laird SM, Tuckerman EM, Li TC, 1998. Serum androgen levels in women who have recurrent miscarriages and their correlation with markers of endometrial function. *Fertil. Steril.* 69, 682–690.

Olson LM, Jones-Burton CM, Jablonka-Shariff A, 1996. Nitric oxide decreases estradiol synthesis of rat luteinized ovarian cells: possible role for nitric oxide in functional luteal regression. *Endocrinology* 137 (8), 3531-9.

Palomba S, Russo T, Orio F, Falbo A, Manguso F, Cascella T, Tolino A, Carmina E, Colao A, Zullo F, 2006. Uterine effects of clomiphene citrate in women with polycystic ovary syndrome: a prospective controlled study. *Hum. Reprod.* 21 (11), 2823–2829.

Parr MB, Tung HN, Parr EL, 1986. The ultrastructure of the rat primary decidual zone. *Am. J. Anat.* 176, 423–436.

Pasquali R, Gambineri A, Biscotti D y col, 2000. Effect of long-term treatment with metformin added to hypocaloric diet on body composition, fat distribution, and androgen and insulin levels in abdominally obese women with and without the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 2767- 74.

Polgár B, Nagy E, Mikó E, Varga P, Szekeres-Barthó J, 2004. Urinary progesterone-induced blocking factor concentration is related to pregnancy outcome. *Biol Reprod.* 71 (5), 1699-1705.

Purcell TL, Given R, Chwalisz K, Garfield RE 1999. Nitric oxide synthase distribution during implantation in the mouse. *Molecular Human Reproduction* 5 (5), 467–475.

Rengasamy A, Johns RA, 1993. Inhibition of nitric oxide synthase by a superoxide generating system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267 (3), 1024-7.

- Rinkenberger J, Werb Z, 2000. The Labyrinthine placenta, *Nature Genetics* 25.
- Roy S, Mahlesh VB, Greenblatt RB, 1962. Effect of dehydroepiandrosterone and androstenedione on the reproductive organs of female rats; production of cystic changes in the ovary. *Nature* 196, 2-6.
- Sagle M, Bishop K, Ridley N, Alexander FM, Michel M, Bonney RC, Beard RW, Franks S, 1988. Recurrent early miscarriage and polycystic ovaries. *Br. Med. J.* 297, 1027–1028.
- Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P, 1993. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (15), 7240-4.
- Salvemini D, 1997. Nitric oxide and cyclooxygenases. In Lancaster JR and Parkinson JF (eds). *Nitric Oxide, Cytochromes P450, and Sexual Steroid Hormones*. Springer, Berlin, Germany, 61–73.
- Sartoretto JL, Melo GA, Carvalho MH, Nigro D, Passaglia RT, Scavone C, Cuman RK, Fortes ZB, 2005. Metformin treatment restores the altered microvascular reactivity in neonatal streptozotocin-induced diabetic rats increasing NOS activity, but not NOS expression. *Life Sci* 77, 2676–2689.
- Schini VB, Vanhoutte PM, 1993. Nitric oxide and homeostasis of the smooth vascular muscle. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 86 (1), 83-9.
- Schlafke S, Enders AC, 1975. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biol. Reprod.* 12, 41–65.
- Sepilian V, Nagamani M, 2005. Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome and severe insulin resistance. *J Soc Gynecol Investig* 12, 129 - 34.
- Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Varone G, Caruso A, Genazzani AR, 2003. Dehydroepiandrosterone modulates endothelial nitric oxide synthesis via direct genomic and nongenomic mechanisms. *Endocrinol* 144(8), 3449-55.

- Sir-Petermann T, Maliqueo M, Angel B, Lara HE, Perez-Bravo F, Recabarren SE, 2002. Maternal serum androgens in pregnant women with polycystic ovary syndrome: possible implications in prenatal androgenization. *Hum. Reprod.* 17, 2573–2579.
- Sladek SM, Roberts JM, 1996. Nitric oxide synthase activity in the gravid rat uterus decreases a day before the onset of parturition. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 175, 1661–1667.
- Smith EO, BeMent DM, Grossman LI, Lomax MI, 1991. The cDNA for the heart/muscle isoform of bovine cytochrome c oxidase subunit VIa encodes a presequence. *Biochim Biophys Acta* 1089 (2), 266-8.
- Spranger J, Mohlig M, Wegewitz U, 2004. Adiponectin is independently associated with insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 61, 738- 46.
- Srividhya S, Ravichandran MK, Anuradha CV, 2002. Metformin attenuates blood lipid peroxidation and potentiates antioxidant defense in high fructose-fed rats. *J Biochem Mol Biol Biophys* 6 (6), 379-85.
- Stefanovic V, Antic S, Mitic-Zlatkovic M, Vlahovic P, 1999. Reversal of increased lymphocyte PC-1 activity in patients with type 2 diabetes treated with metformin. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 15, 400–404.
- Stein IF, Leventhal ML, 1935. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 29, 181-91.
- Stuehr DJ, 1997. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 37, 339-59. Review.
- Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE, 1995. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus, *N. Engl. J. Med.* 333 (9), 550–554.
- Szekeres-Bartho J, Reznikoff-Etievant MF, Varga P, Pichon MF, Varga Z, Chaouat G, 1989. Lymphocytic progesterone receptors in normal and pathological human pregnancy, *J. Reprod. Immunol.* 16 (3), 239–247.

- Szekeres-Bartho J, Wegmann TG, 1996. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *J. Reprod. Immunol.* 31 (1/2), 81–95.
- Szekeres-Bartho J, Par G, Szereday L, Smart CY, Achacz I, 1997. Progesterone and non-specific immunological mechanisms in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 38 (3), 176–182.
- Szekeres-Bartho J, Polgar B, Kozma N, Miko E, Par G, Szereday L, Barakonyi A, Palkovics T, Papp O, Varga P, 2005. Progesterone-dependent immunomodulation. *Chem Immunol Allergy* 89, 118-25. Review.
- Szereday L, Varga P, Szekeres-Bartho J, 1997. Cytokine production in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 38 (6), 418–422.
- Tagawa N, Hidaka Y, Takano T, Shimaoka Y, Kobayashi Y, Amino N, 2004. Serum concentrations of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate and their relation to cytokine production during and after normal pregnancy. *Clin Chim Acta* 340 (1-2), 187-93.
- Tosca L, Crochet S, Ferré P, Fougelle F, Tesseraud S, Dupont J, 2006. AMP-activated protein kinase activation modulates progesterone secretion in granulosa cells from hen preovulatory follicles. *J Endocrinol.* 190 (1), 85-97.
- Tsai AL, Wei C, Kulmacz RJ, 1994. Interaction between nitric oxide and prostaglandin H synthase. *Arch Biochem Biophys.* 313 (2), 367-72.
- Vandermolen DT, Ratts VS, Evans WS, Stovall DW, Kauma SW, Nestler JE, 2001. Metformin increases the ovulatory rate and pregnancy rate from clomiphene citrate in patients with polycystic ovary syndrome who are resistant to clomiphene citrate alone. *Fert il Steril.* 75 (2), 310-5.
- Vega M, Johnson MC, Díaz HA, Urrutia LR, Troncoso JL, Devoto L, 1998. Regulation of human luteal steroidogenesis in vitro by nitric oxide. *Endocrine* 8 (2), 185-91.
- Velazquez EM, Mendoza S, Hamer T y col, 1994. Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy. *Metabolism* 43, 647 - 54.

- Velazquez E, Acosta A, Mendoza SG, 1997. Menstrual cyclicity alter metformin therapy in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol.* 90 (3), 392–395.
- Vivas C, 2005. Síndrome de ovario poliquístico, endometrio y riesgo de aborto, *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*- on line.
- Willis D, Franks S, 1995. Insulin action in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries is mediated by the insulin receptor and not the type I insulin-like growth factor receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 3788–3790.
- Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL, 1996. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (13), 6770-4.
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE, 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 108 (8), 1167–1174.
- Zorn TMT, Bevilacqua EM, Abrahamsohn PA, 1986. Collagen remodeling during decidualization in the mouse. *Cell and Tissue Research* 244, 443-448.
- Zou MH, Kirkpatrick SS, Davis BJ, Nelson JS, Wiles WG, Schlattner U, Newmann D, Brownlee M, Freeman MB, Goldman MH, 2004. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive mitogen species. *J Biol Chem* 279, 940–951.